

响应面分析法优化雪灵芝黄酮提取工艺

王昌涛, 孙啸涛, 周 雪

(北京工商大学 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048)

摘要: 利用响应面分析法对雪灵芝中黄酮类物质的提取工艺进行优化。通过单因素试验分别考察乙醇体积分数、提取时间、提取温度和料液比对雪灵芝黄酮提取率的影响, 选取适当的试验因素水平, 利用Design Expert软件和Box-Behnken设计法设计响应面试验, 对各个因素的显著性和交互作用进行分析。结果表明: 雪灵芝黄酮醇提工艺的最佳条件为料液比1:40(g/mL)、乙醇体积分数68.6%、提取温度66℃、提取时间0.83h(50min), 在该条件下验证总黄酮提取率达到5.07mg/g, 接近于预测值5.10mg/g。研究表明, 优化得到的回归模型具有良好的预测能力。

关键词: 雪灵芝; 提取; 响应面分析法; 总黄酮

Optimization of Extraction Process for Flavonoids from *Arenaria kansuensis* Maxim. by Response Surface Methodology

WANG Chang-tao, SUN Xiao-tao, ZHOU Xue

(Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: The optimal extraction conditions for flavonoids from *Arenaria kansuensis* Maxim. were determined using response surface methodology (RSM). On the basis of single-factor tests, the effects of ethanol concentration, extraction duration, extraction temperature, and liquid-material ratio on extraction rate were explored. A regression model describing extraction rate of flavonoids as a function of three variables was established with the Design-Expert software according to the Box-Behnken design principle and experimental data. Quadratic regression analysis was used to establish a mathematical model describing flavonoids extraction. The optimal extraction conditions for flavonoids from *Arenaria kansuensis* Maxim. were material-liquid ratio of 1:40 (g/mL), ethanol concentration of 68.6%, extraction temperature of 66 °C and extraction time of 0.83 h. Under the optimal extraction conditions, the maximum extraction yield of flavonoids was 5.07 mg/g, which was close to the predicted value of 5.10 mg/g. Therefore, the established regression model has good prediction capability.

Key words: *Arenaria kansuensis* Maxim.; extraction; response surface methodology (RSM); flavonoids

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)14-0091-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201314018

雪灵芝(*Arenaria kansuensis* Maxim.)又名草灵芝, 属石竹科(Caryophyllaceae)蚤缀属(*Arenaria*)植物, 为多年生垫状草本, 分布于海拔4200~5100m的昆仑山、巴颜喀拉山及祁连山、大坂山地区^[1-2]。传统医学认为其具有清热解毒、消肿的功效^[3-4], 近代医学研究表明其具有免疫调节^[5-6]、抗肿瘤^[7]、抗自由基活性^[8]等多种作用。黄酮类物质由于具有多酚结构, 可以清除人体内超氧离子自由基, 具有较强的抗氧化和抗衰老作用, 雪灵芝醇提物具有较高的体外抗氧化活性可能与此相关^[8-10]。中国科学院成都生物研究所研究员吴凤愕与日本东邦大学药学部学者小池一男等从雪灵芝中分离出包括三萜、甾体和黄酮等11个化合物, 并对它们作了结构鉴定, 但目前对雪灵芝黄酮的提取尚没有系统研究^[9]。响应面分析法(response surface methodology, RSM)结合Box-Behnken设计方法,

以多元二次回归方程将各因素与响应值之间的函数关系用多项式进行拟合, 可以通过对回归方程以及响应面的分析寻求最佳工艺条件^[11-16]。对于多因素三水平的考察来说, Box-Behnken设计是中心复合设计(central composite design, CCD)的理想替代方案^[13]。本研究以雪灵芝为原料, 采用Box-Behnken设计响应面分析结合的方法对雪灵芝黄酮的提取工艺进行优化, 以期在食品和保健品领域有进一步的应用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

雪灵芝: 市购, 产地西藏喜马拉雅山脉, 特级品。

乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等(均为分析

收稿日期: 2012-05-30

基金项目: 北京市科技新星项目(2008B08); “中青年骨干人才培养计划”项目(PHR20110873); 质检公益性行业科研专项(201010023)

作者简介: 王昌涛(1975—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为生物技术。E-mail: wangct@th.btbu.edu.cn

纯) 北京化学试剂厂; 芦丁对照品(纯度 $\geq 98\%$, 生产批号100080-200707) 中国食品药品检定研究院。

1.2 仪器与设备

UV-T6型分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; RE-52CS/5299型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; DZKW-4电子恒温水浴锅 北京中兴伟业仪器有限公司; SHB-B95循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; TB-2002电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司; ZN-04B小型粉碎机 北京兴时利和科技发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 雪灵芝黄酮的提取方法

取干燥雪灵芝, 粉碎过60目筛, 准确称量2.00g, 按一定料液比加入不同体积分数乙醇溶液, 在一定温度条件下回流提取, 待提取液冷却至室温后减压抽滤, 滤液用旋转蒸发器蒸发浓缩, 用体积分数70%的乙醇定容为25mL, 混匀后测定总黄酮含量。

1.3.2 总黄酮含量的测定方法

雪灵芝总黄酮含量测定应用铝络合物显色法^[17-18]。

1.3.2.1 芦丁标准曲线的绘制

精确称取120℃干燥至恒质量的芦丁标准品50.3mg, 无水乙醇定容至50mL, 超声, 得到质量浓度为1mg/mL的标准液。

准确移取上述标准溶液0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL于25mL容量瓶中, 各加入5g/100mL NaNO₂溶液0.8mL, 摇匀, 静置6min; 加入10g/100mL Al(NO₃)₃溶液0.8mL, 摇匀, 静置6min; 加入1mol/L NaOH溶液10.00mL, 用体积分数70%乙醇溶液定容至25.00mL, 摇匀, 静置10~15min, 于510nm波长处测定吸光度。以标准溶液的质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, $y=1.6834x+0.0048$, $R^2=0.9998$ 。

1.3.2.2 雪灵芝中总黄酮含量的测定

精确移取样品溶液1.00mL于25mL容量瓶中, 按照1.3.2.1节方法测定吸光度。

1.3.2.3 黄酮提取率的计算公式

$$Y = \frac{\rho_1 \times (V_1/V_2) \times V}{m}$$

式中: Y 为总黄酮提取率/(mg/g); ρ_1 为吸光度按照标准曲线计算出得显色溶液中黄酮质量浓度/(mg/mL); V_1 为显色时溶液的定容体积/mL; V_2 为显色时移取的提取液的体积/mL; V 为提取液的总体积/mL; m 为称取样品的质量/g。

1.3.3 单因素试验

精确称取2.00g过60目筛的雪灵芝干粉5份置于100mL烧瓶中, 分别加入一定体积分数乙醇, 在一定的回流温

度条件下回流提取一定时间。冷却、静置、抽滤、弃去滤渣, 滤液浓缩至近干, 用体积分数70%的乙醇定容为25mL, 混匀后测定黄酮含量。设定乙醇体积分数70%、料液比1:50(g/mL)、提取温度70℃、提取时间1h, 固定其他条件, 分别考察乙醇体积分数、料液比、提取温度、提取时间对雪灵芝总黄酮提取率的影响。

1.3.4 响应面试验设计

依据单因素试验结果, 以影响雪灵芝黄酮提取率的主要因素作为考察因素, 采用二次回归旋转组合设计法, 应用Box-Behnken设计模型优化和预测雪灵芝黄酮化合物的提取工艺。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对黄酮提取率的影响

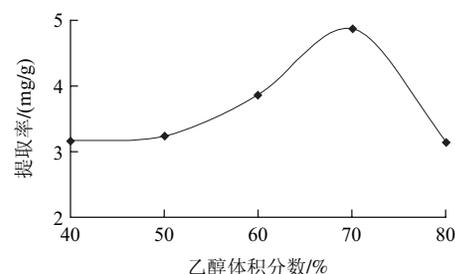


图1 乙醇体积分数对雪灵芝黄酮提取率的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of flavonoids from *Arenaria kansuensis* Maxim.

如图1所示, 雪灵芝黄酮提取率随着乙醇体积分数在40%~70%范围内增加而升高, 当乙醇体积分数为70%时提取率最高, 原因是黄酮类化合物极性较小, 因此, 随着乙醇体积分数增加溶解度增大, 提取率升高; 当乙醇体积分数继续增加时提取率反而下降, 原因可能是高体积分数乙醇溶液使得一些醇溶性杂质溶出量增加从而与黄酮类化合物竞争, 并参与显色反应使干扰因素增大进而影响最终的测定, 导致黄酮类化合物的提取率下降。

2.1.2 料液比对黄酮提取率的影响

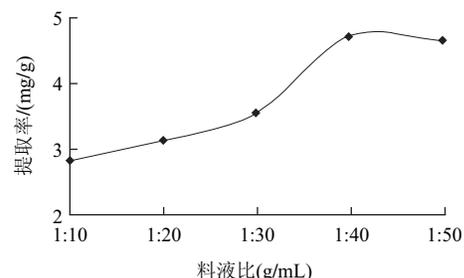


图2 料液比对雪灵芝黄酮提取率的影响

Fig.2 Effect of solid-liquid ratio on the extraction rate of flavonoids from *Arenaria kansuensis* Maxim.

如图2所示,随着提取剂使用量增大黄酮提取率随之升高,当料液比达到1:40后,继续增大提取剂使用量提取率变化不大,从减少试剂用量和保证提取效率的综合考虑,最优的料液比为1:40(g/mL)。

2.1.3 提取温度对黄酮提取率的影响

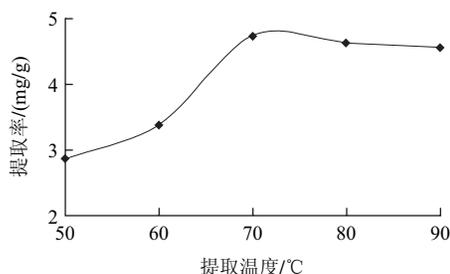


图3 提取温度对雪灵芝黄酮提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on the extraction rate of flavonoids from *Arenaria kansuensis* Maxim.

如图3所示,在50~70°C的温度范围内,提取率随提取温度的升高而增大,原因可能是温度的增加能够降低提取溶剂的黏度,促进介质传递同时增加溶解度;当温度高于70°C后进一步升高温度,提取率反而降低,原因可能是过高温度使其他醇溶物质溶解从而与黄酮类物质形成竞争,导致溶解度相对降低;另一方面黄酮类化合物含有多羟基结构易被氧化,过高温度使其结构被破坏,因而使提取率下降。

2.1.4 提取时间对黄酮提取率的影响

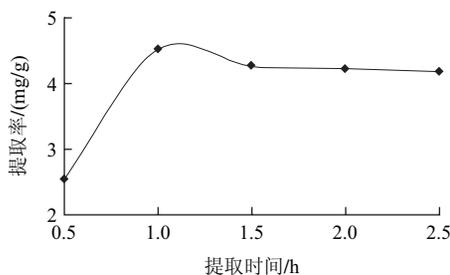


图4 提取时间对雪灵芝黄酮提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on the extraction yield of flavonoids from *Arenaria kansuensis* Maxim.

在如图4所示,随着提取时间的延长,总黄酮提取率显著提高,但当提取时间大于1h后,继续延长提取时间对黄酮提取率并没有显著影响。因此,最优化的提取时间为1h。

2.2 响应面法优化雪灵芝黄酮提取工艺

综合考虑单因素试验结果,在料液比1:40(g/mL)条件下,选择乙醇体积分数(A)、提取时间(B)和提取温度(C)为考察因素,以黄酮提取率(Y)为试验指标。借助Design Expert软件,采用Box-Behnken设计法设计响应面试验优化提取工艺。1、0、-1分别代表自变量的高、中、低

水平,自变量编码值与真实值之间的关系分别为 $X_1=(A-70)/10$ 、 $X_2=(B-1)/0.5$ 、 $X_3=(C-70)/10$ 。试验因素水平及编码见表1。

表1 响应面分析因素水平及编码

Table 1 Factors, levels and codes of response surface analysis

水平	因素		
	X_1 乙醇体积分数/%	X_2 提取时间/h	X_3 提取温度/°C
-1	60	0.5	60
0	70	1.0	70
1	80	1.5	80

2.2.1 雪灵芝黄酮提取工艺回归模型建立及方差分析

应用Design Expert软件中的Box-Behnken模型设计分析方案,试验结果如表2所示,试验组1~12是析因试验,其析因点为自变量构成的三维顶点;试验组13~17是中心试验,其中心点即零点,重复试验5次以达到估算实验误差的目的。

表2 响应面分析方案及结果

Table 2 Experimental design and results of response surface analysis

试验号	X_1	X_2	X_3	Y/(mg/g)
1	-1	-1	0	2.14
2	1	-1	0	1.73
3	-1	1	0	3.84
4	1	1	0	3.07
5	-1	0	-1	3.41
6	1	0	-1	2.39
7	-1	0	1	3.76
8	1	0	1	3.15
9	0	-1	-1	2.05
10	0	1	-1	3.72
11	0	-1	1	2.44
12	0	1	1	4.57
13	0	0	0	4.87
14	0	0	0	4.93
15	0	0	0	4.97
16	0	0	0	4.79
17	0	0	0	4.88

将表2所得的试验数据采用Design Expert软件进行统计分析,统计分析结果如表3所示。对各因素进行回归拟合,得到回归方程:

$$Y=4.86800-0.35125X_1+0.85500X_2+0.29375X_3-0.090000X_1X_2+0.10250X_1X_3+0.11500X_2X_3-1.09525X_1^2-1.07775X_2^2-0.59525X_3^2$$

式中: X_1 为乙醇体积分数; X_2 为提取时间; X_3 为提取温度。各项系数的绝对值代表相应因素对黄酮提取率影响程度;系数的正负代表影响方向。由表3可以看出, X_2 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对黄酮提取率影响极显著; X_1 、 X_3 对黄酮提取率影响显著,这表明乙醇体积分数、提取时间和提取温度3个因素对于雪灵芝黄酮提取率都有显著的影响,影响程度由大到小为提取时间、乙醇体积分数和提取温度;其他项即交互项对黄酮提取率影响不显著;拟

合模型的修正相关系数平方(R^2)为0.9201, 即92.01%的数据可用此方程解释; 失拟项检验值 >0.05 , 不显著; 用上述回归方程描述各因素与响应值的关系时, 其因变量和全体自变量之间的线性关系($R=20.32/20.44=0.9941$), 模型的显著水平 $P<0.0001$, 回归方差模型极显著, 说明此方程可靠且与实际情况拟合良好, 无其他因素的显著影响, 试验误差较小, 可用其代替真实试验点进行分析和预测。

表3 回归模型方差分析

Table 3 ANOVA for the regression model

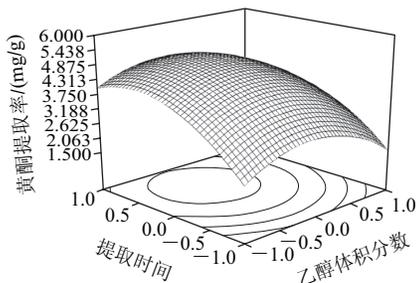
方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	20.32	9	2.26	126.52	<0.0001	**
X_1	0.99	1	0.99	55.31	0.0001	*
X_2	5.85	1	5.85	327.75	<0.0001	**
X_3	0.69	1	0.69	38.69	0.0004	*
X_1X_2	0.032	1	0.032	1.82	0.2198	
X_1X_3	0.042	1	0.042	2.36	0.1687	
X_2X_3	0.053	1	0.053	2.96	0.1288	
X_1^2	5.05	1	5.05	283.06	<0.0001	**
X_2^2	4.89	1	4.89	274.09	<0.0001	**
X_3^2	1.49	1	1.49	83.61	<0.0001	**
残差	0.12	7	0.018			
失拟项	0.100	3	0.033	5.25	0.0714	
纯误差	0.025	4	0.0063			
总和	20.44	16				

注: **. 差异极显著($P<0.01$); *. 差异显著($P<0.05$).

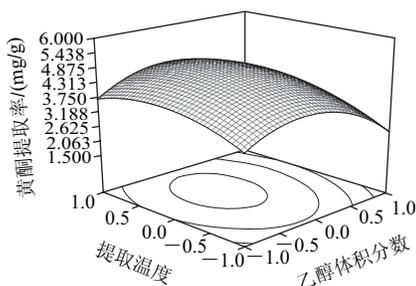
2.2.2 雪灵芝黄酮提取工艺的响应面分析

响应面图能够通过响应值与各影响因素所构成的三维空间的曲面图以及其在二维平面上的等高线图, 较为直观地反映各因素及各因素的相互作用对黄酮提取率的影响。

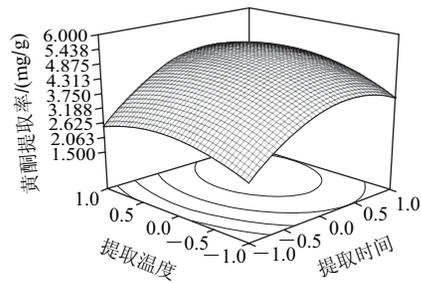
应用Design Expert软件中的Box-Behnken模型, 将影响雪灵芝黄酮提取率的一个因素固定为零水平, 得到另外两个因素对提取率的交互影响结果, 其对应的响应面及等高线如图5所示。



A. 乙醇体积分数和提取时间



B. 乙醇体积分数和提取温度



C. 提取时间和提取温度

图5 两因素交互作用对黄酮提取率影响的等高线和响应面图
Fig.5 Response surface and contour plots for the effects of cross-interactions among factors on extraction rate of flavonoids

从图5A的等高线图可以看出: 沿乙醇体积分数轴向等高线密集, 而提取时间轴向等高线相对稀疏, 说明乙醇体积分数对提取率峰值的影响比时间大, 等高线呈椭圆形, 说明两因素的交互作用较显著。从图5A的响应面图可以看出: 提取时间对雪灵芝黄酮提取率的影响较显著, 曲面较陡, 随着提取时间的延长, 提取率经过一个先快速增加然后缓慢降低的过程; 乙醇体积分数对雪灵芝黄酮提取率的影响不太显著, 曲面较缓和并且随着时间的延长, 提取率经过一个先升高后降低的过程, 原因可能是乙醇体积分数较低时含水量较高, 容易将细胞中的蛋白质、糖类等易溶于水的物质提取出来, 由于提取液较黏稠从而影响黄酮的快速扩散溶出; 而高体积分数乙醇溶液使一些醇溶性杂质溶出量增加从而与黄酮类化合物竞争, 导致黄酮提取率降低。

从图5B的等高线图可以看出: 沿提取温度轴向等高线密集, 而乙醇体积分数轴向等高线相对稀疏, 说明提取温度对提取率峰值的影响比乙醇体积分数大, 等高线呈近似椭圆形, 说明两因素具有一定的交互作用。从图5B的响应面图可以看出: 乙醇体积分数对雪灵芝黄酮提取率的影响较显著, 曲面较陡, 随着提取温度的升高, 提取率经过一个先升高后降低的过程; 提取温度对雪灵芝黄酮提取率的影响不太显著, 曲面较缓和并且随着温度的上升, 提取率经过一个先升高后稍微减小的过程。

从图5C的等高线图可以看出: 沿提取温度轴向等高线密集, 而提取时间轴向等高线相对稀疏, 说明提取温度对提取率峰值的影响比提取时间大, 等高线呈椭圆形, 说明两因素的交互较显著。从图5C的响应面图可以看出: 提取时间对雪灵芝黄酮提取率的影响较显著, 曲面较陡, 随着提取时间的延长, 提取率经过一个先升高后降低的过程; 提取温度对雪灵芝黄酮提取率的影响不太显著, 曲面较缓和并且随着温度的上升, 提取率经过一个先升高后稍微减小的过程。

2.2.3 雪灵芝黄酮最佳提取工艺的确证

在选取的各因素范围内, 根据回归模型通过Design Expert软件分析得出雪灵芝黄酮的最佳提取工艺条件为乙

醇体积分数68.6%、提取时间0.83h、提取温度66℃、料液比1:40(g/mL), 预测得到的黄酮提取率为5.10mg/g。考虑到实际操作的便利选择: 乙醇体积分数69%、提取时间50min、提取温度66℃、料液比1:40(g/mL)条件下进行实验验证, 提取率分别为5.05、5.08、5.07mg/g, 平均提取率为5.07mg/g, 证明雪灵芝黄酮的提取率与预测值基本吻合, 说明预测模型与实际情况拟合较好。

3 结论

本实验通过单因素试验分别考察乙醇体积分数、提取时间、提取温度和液料比对雪灵芝黄酮提取率的影响, 确定了影响黄酮提取率的主要因素, 在此基础上, 利用 Design Expert软件Box-Behnken设计法设计响应面试验, 建立了数学模型, 预测得到了最优的提取工艺条件, 并进一步验证, 雪灵芝黄酮的最佳提取工艺条件: 乙醇体积分数69%、提取时间0.83h(50min)、提取温度66℃、料液比1:40(g/mL), 此条件下黄酮提取率可达5.07mg/g, 优化模型能较好的预测乙醇热回流雪灵芝黄酮提取率。

参考文献:

- [1] 黄勇, 许倩兮, 彭光华. 藏药雪灵芝中总皂苷含量的测定[J]. 中国药师, 2010, 13(1): 94-96.
- [2] 唐昌林. 中国植物志第26卷[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 187-188.
- [3] 郭鹏举. 青海地道地产药材[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1966: 204-206.
- [4] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 北京: 民族出版社, 1986: 141-142.
- [5] 彭宝珠, 冯伟力, 王利彦, 等. 藏药雪灵芝对炎症和免疫功能的影响

[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(6): 363-366.

- [6] 李凤文, 赵鹏, 刘荣珍, 等. 雪灵芝调节小鼠免疫功能作用的实验研究[J]. 中国热带医学, 2007, 7(11): 1999-2000.
- [7] 赵鹏, 姚思宇, 王彦武, 等. 雪灵芝对二乙基亚硝胺诱导大鼠肝癌组织细胞的抑制作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(38): 7553-7555.
- [8] 付翔, 陈薇, 段小群, 等. 雪灵芝提取物清除羟基自由基和抑制脂质过氧化作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(7): 35-36.
- [9] WU F E, KAZUO K, TAMO T N, et al. Terpenoids and flavonoids from a renaria kansuensis[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1990, 38(8): 2281-2282.
- [10] 雷宁, 张文生, 杜树山. 蚤缀属植物的种群分布、化学及药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(10): 929-931.
- [11] BAŞ D, BOYAC I H. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(3): 836-845.
- [12] BEZERRA M A, SANTELLI R E, OLIVEIRA E P, et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry[J]. Talanta, 2008, 76(5): 965-977.
- [13] HANRAHAN G, LU K. Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization[J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2006, 36(3/4): 141-151.
- [14] KLEI E J, RIVERA S L. A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2000, 23(14): 2097-2121.
- [15] STEINBERG D M, BURSZTYN D. Response surface methodology in biotechnology[J]. Quality Engineering, 2010, 22(2): 78-87.
- [16] TARLEY C R T, SILVEIRA G, dos SANTOS W N L, et al. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: methods for optimization based on factorial design and response surface methodology[J]. Microchemical Journal, 2009, 92(1): 58-67.
- [17] 易建华, 朱振宝. 响应面优化酶法提取芹菜黄酮工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(10): 92-96.
- [18] 向昌国, 向宁, 黄成龙, 等. 响应面法优化刺葵黄酮类化合物的微波提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(22): 32-36.