

# 响应面法优化新疆黑果小檗鲜果中总黄酮提取工艺

欧阳艳\*, 刘伟, 赵晓南

(伊犁师范学院化学与生物科学学院, 新疆 伊宁 835000)

**[摘要]** 目的: 优选黑果小檗鲜果中总黄酮的提取工艺。方法: 采用紫外分光光度法测定总黄酮含量, 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、料液比、提取时间为自变量, 进行三因素三水平 Box-Behnken 试验设计, 利用响应面分析法优化新疆黑果小檗鲜果总黄酮提取条件。结果: 黑果小檗鲜果中总黄酮的最佳提取工艺为乙醇体积分数 43%, 提取温度 80 ℃, 料液比 1:33, 提取时间 2 h; 总黄酮提取量 24.75 mg·g<sup>-1</sup>, 达到预测值 25.37 mg·g<sup>-1</sup> 的 97.6%。结论: 采用响应面法优化黑果小檗鲜果中总黄酮的提取工艺合理可行。

**[关键词]** 黑果小檗鲜果; 总黄酮; 响应面法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0046-04

**[doi]** 10.11653/zgsyfyjzxx2013070046

## Optimization of Extraction Technology for Total Flavonoids from Xinjiang *Berberis heteropoda* Fruit by Response Surface Methodology

OUYANG Yan\*, LIU Wei, ZHAO Xiao-nan

(College of Chemistry and Biological Sciences, Yili Normal University, Yining 835000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of total flavonoids from Xinjiang *Berberis heteropoda* fruit. **Method:** The content of total flavonoids was determined by UV, which was as dependent variable, based on single factor test, with solid-liquid ratio, extraction time and ethanol concentration as independent variables, three factors and three levels Box-Behnken design was adopted, extraction technology conditions of total flavonoids from Xinjiang *B. heteropoda* fruit were optimized by response surface methodology. **Result:** Optimal extraction conditions were as followings: extracted 2 h with 33 times the amount of 43% ethanol at 80 ℃, yield of total flavonoids was 24.75 mg·g<sup>-1</sup>, which accounted for 97.6% of the predicted value (25.37 mg·g<sup>-1</sup>). **Conclusion:** Response surface methodology to optimize extraction technology of total flavonoids from Xinjiang *B. heteropoda* fruit was feasible and reasonable.

**[Key words]** *Berberis heteropoda* fruit; total flavonoids; response surface methodology

黑果小檗为多年生灌木, 叶片长椭圆形至倒卵形; 花期 5 月, 果期 7~8 月; 果实为圆球形, 成熟果实为紫黑色<sup>[1]</sup>。黑果小檗广泛生长于新疆天山南北部<sup>[2]</sup>, 其果实长期以来被当地哈萨克族和维吾尔族人民晾干泡茶饮用<sup>[3]</sup>, 具有清热燥湿、泻火解毒

等功效<sup>[4]</sup>, 主要成分包括葡萄糖、果糖、生物碱、黄酮类及色素类等物质<sup>[5]</sup>。黄酮类化合物是自然界普遍存在的一类次生代谢产物, 具有很好的药理活性<sup>[6]</sup>。目前, 国内对新疆黑果小檗总黄酮的研究鲜有报道, 本实验以新疆黑果小檗为原料, 通过响应面法优化黑果小檗总黄酮的提取工艺条件, 以期为新 疆黑果小檗资源的利用开发提供研究依据。

### 1 材料

UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津分析仪器厂), BAO-150AG 型电热恒温干燥箱(上海亚荣生化仪器厂), FA2104 型电子天平(上海舜宇恒

**[收稿日期]** 20121028(010)

**[基金项目]** 伊犁师范学院有机重点项目(2012THZD01)

**[通讯作者]** \* 欧阳艳, 博士, 教授, 从事天然产物中有效成分的提取与分离, Tel: 13909995611, E-mail: ylsyoyy@126.com

平科学仪器有限公司),DF-101S型集热式磁力加热搅拌器(金坛市医疗仪器)。

黑果小檗鲜果采摘于伊犁哈萨克自治州霍城县大西沟乡,经伊犁师范学院资源与生态研究所赵玉副教授鉴定为小檗科小檗属 *Berberis heteropoda* Schtenk 的鲜果。芦丁对照品(国药集团化学试剂有限公司,批号 F20120530),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 标准曲线的绘制**<sup>[7-8]</sup> 精确称取芦丁对照品 20.0 mg,用无水乙醇溶解并定容至 100 mL 量瓶中。准确吸取该溶液 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,依次加 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.3 mL,静置 6 min;加 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 0.3 mL,摇匀,静置 6 min;加 4% NaOH 溶液 4.0 mL,加水至刻度,摇匀,静置 15 min;于 510 nm 处测定吸光度(A),平行试验 3 次,得回归方程  $A = 10.32019C - 0.03084$  ( $r = 0.9999$ )。

**2.2 总黄酮含量测定** 准确称取黑果小檗鲜果肉 1.00 g 于 100 mL 圆底烧瓶中,加入一定体积分数的乙醇溶液,在一定温度下回流提取一定时间,抽滤,合并滤液,浓缩后用无水乙醇定容。精密吸取 3.0 mL 样品液,按 2.1 项下方法测定 A,根据回归方程计算样品液中总黄酮的质量浓度,按下式计算总黄酮提取量。

$Y = C_{测} V_0 / m$ ,其中为稀释倍数, $V_0$  为原溶液体积, $m$  为样品质量。

### 2.3 单因素试验考察

**2.3.1 乙醇体积分数** 固定提取温度 80 ℃,料液比 1:30,提取时间 1.5 h,考察不同体积分数(20%,40%,60%,80%,100%)乙醇溶液对总黄酮提取量的影响。结果总黄酮提取量分别为 17.77,21.05,19.46,17.20,16.42 mg·g<sup>-1</sup>,说明总黄酮提取量先随乙醇体积分数升高而增加,之后开始下降。原因可能是新疆黑果小檗鲜果黄酮的主要成分为黄酮苷类等极性较大的化合物,极性较大的溶剂更有利于提取该类物质。

**2.3.2 提取温度** 以 60% 乙醇为提取溶剂,料液比 1:30,提取时间 1.5 h,考察提取温度(50,60,70,80,90 ℃)对总黄酮提取量的影响。结果总黄酮提取量依次为 15.60,16.14,19.71,20.12,20.96 mg·g<sup>-1</sup>;说明总黄酮提取量随温度升高而增加,当温度 >80 ℃ 后,总黄酮的提取量变化不大,分析原因为 60% 乙醇沸点约 85 ℃ 左右,提高加热温度至 90 ℃,溶剂本身温度并不会增加。同时考虑到温度过

高会破坏提取物部分活性成分,故选择提取温度以 80 ℃ 为宜。

**2.3.3 料液比** 以 60% 乙醇为提取溶剂,于 80 ℃ 下提取 1.5 h,考察料液比(1:10,1:20,1:30,1:40,1:50)对总黄酮提取量的影响。结果总黄酮提取量依次为 15.60,16.14,19.71,20.12,20.96 mg·g<sup>-1</sup>;说明总黄酮提取量随料液比增大而逐渐升高,当料液比达 1:30 时,继续增加提取液的比例,对总黄酮提取量的影响并不明显。

**2.3.4 提取时间** 以 60% 乙醇为提取溶剂,料液比 1:30,于 80 ℃ 下考察提取时间(0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 h)对总黄酮提取量的影响。结果总黄酮提取量依次为 17.62,19.56,21.23,22.73,22.18 mg·g<sup>-1</sup>;说明在 2 h 内,总黄酮提取量随提取时间延长而增大,之后总黄酮提取量降低,原因可能是随提取时间延长,部分黄酮类化合物水解。

**2.4 响应面试验** 在单因素试验基础上,固定提取温度 80 ℃,选取乙醇体积分数、料液比、提取时间为自变量,设计三因素三水平试验,中心点重复试验 5 次,析因部分试验 12 次<sup>[8-9]</sup>。因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。以随机次序进行,利用 Design expert 8.0 软件对数据进行多元回归拟合,得到预测模型  $Y = 25.02 + 0.68A + 0.73B + 1.28C - 0.48AB + 0.018AC + 0.31BC - 2.21A^2 - 1.49B^2 - 2.08C^2$ 。

表 1 黑果小檗鲜果中总黄酮提取工艺 Box-Behnken 设计因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 提取时间/h	C 料液比/g·mL <sup>-1</sup>
-1	20	1.5	1:20
0	40	2.0	1:30
1	60	2.5	1:40

由表 3 可知,总模型  $F = 167.37$ ,表明模型显著;水平  $P = 0.0001 < 0.01$ ,方程极显著。由  $P$  值可知交互项不显著,表明总黄酮提取量与自变量非简单的线性关系;失拟检验的  $F = 2.71$ ,表明数据拟合效果较好,因此可采用此模型对回归方程进行检验。响应面分析见图 1。

由图 1 可知,回归方程存在极大值,由 Design expert 8.0 软件分析可得最大响应值 25.37 mg·g<sup>-1</sup>,最优提取条件为乙醇体积分数 43%,料液比 1:33.29,提取时间 2.13 h。结合生产实际操作,确定总黄酮提取的优化工艺参数为乙醇体积分数 43%,料液比 1:33,提取时间 2 h。在此条件下进行 3 次

表 2 黑果小檗鲜果中总黄酮提取工艺响应面试验安排

No.	A	B	C	总黄酮提取量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	0	0	0	25.145
2	0	0	0	24.954
3	1	-1	0	21.821
4	0	0	0	24.953
5	-1	1	0	21.776
6	-1	-1	0	19.367
7	-1	0	1	21.151
8	0	1	1	23.941
9	-1	0	-1	19.066
10	0	0	0	25.235
11	0	-1	-1	19.567
12	1	0	-1	20.125
13	0	1	-1	20.446
14	1	0	1	22.534
15	0	0	0	24.805
16	0	-1	1	21.831
17	1	1	0	22.300

表 3 回归方程方差分析

参数	f	SS	F	P
总模型	9	8.47	167.37	0.000 1
A	1	3.67	72.62	0.000 1
B	1	4.32	85.34	0.000 1
C	1	13.14	259.80	0.000 1
AB	1	0.93	18.39	0.003 6
AC	1	0.026	0.52	0.494 5
BC	1	0.38	7.48	0.029 1
A <sup>2</sup>	1	20.65	408.27	0.000 1
B <sup>2</sup>	1	9.32	184.22	0.000 1
C <sup>2</sup>	1	18.30	361.68	0.000 1
失拟项	3	0.079	2.71	0.180 2

平行试验,结果总黄酮提取量  $24.75 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , RSD 1.17%,说明优选的工艺稳定可行。

### 3 讨论

目前天然产物活性成分提取中常用正交设计或者均匀设计法,减少了试验次数,但也降低了结论的精度<sup>[10]</sup>。响应面分析法在提取条件寻优过程中,可连续的对影响因素的各个水平进行分析,并在影响因素与响应值之间确立数学模型,通过对数据拟合得出较好的试验参数。本试验在单因素试验基础

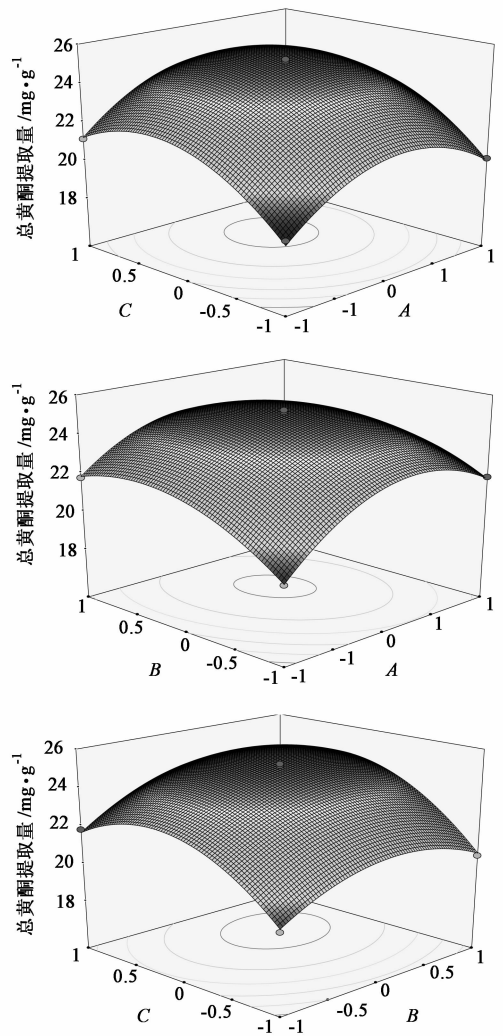


图 1 不同自变量交互作用对总黄酮提取量影响的响应面和等高线

上,通过对乙醇体积分数、料液比、提取时间各水平的多元回归及二项拟合建立总黄酮提取量与各因素的回归方程,确定了最佳提取工艺,可为黑果小檗资源的深加工提供理论依据。

### [参考文献]

- [1] 侯秀云,古丽巴哈尔·阿巴拜克力. 黑果小檗色素提取工艺条件的研究[J]. 食品科学,2008,29(7):171.
- [2] 孙健玲,李小鹰. 黑果小檗抗肿瘤细胞生物学作用的研究[J]. 中国现代医药杂志,2008,10(4):10.
- [3] 滕云,张国强,彭子模. 黑果小檗红色素的提取及其稳定性研究[J]. 食品科学,2007,8(5):67.
- [4] 刘存瑞,曾宪佳. 化学因素对黑果小檗色素的稳定性影响[J]. 广州食品工业科技,2002,19(1):56.
- [5] 新疆维吾尔自治区卫生厅. 维吾尔药材标准[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1993:24.

# 正交试验优选艾蒿黄酮乳膏基质处方

丁洁<sup>1</sup>, 王爱霞<sup>2</sup>, 牛犇<sup>1\*</sup>, 梁宁<sup>1</sup>, 高俊<sup>2</sup>

(1. 甘肃省商业科技研究所, 兰州 730020; 2. 甘肃省人民医院, 兰州 730000)

**[摘要]** 目的: 优选艾蒿黄酮乳膏的基质组成及配比。方法: 以乳膏的外观形状、稳定性、延展性、黏度、显微镜观察及 pH 等为综合评价指标, 采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计对基质中十六醇、十八醇、乳化剂及 1,3-丙二醇的用量进行优化。结果: 艾蒿黄酮乳膏的最佳基质配比为艾蒿总黄酮 0.5%, 十六醇 6%, 十八醇 6%, 乳化剂 8%, 1,3-丙二醇 4%, 尿素 2%, 纯水 64%。结论: 按优选工艺制备的艾蒿黄酮乳膏外观细腻均匀, 黏度及延展性适宜, 性状稳定, 颜色呈亮黄色, 有中药特殊气味, 符合使用要求。

**[关键词]** 艾蒿黄酮; 痤疮; 乳膏基质; 正交试验; 工艺配比

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0049-04

**[doi]** 10.11653/zgsyfyjzz2013070049

## Optimization of Matrix Formulation of Artemisia Flavonoids Cream by Orthogonal Test

DING Jie<sup>1</sup>, WANG Ai-xia<sup>2</sup>, NIU Ben<sup>1\*</sup>, LIANG Ning<sup>1</sup>, GAO Jun<sup>2</sup>

(1. Gansu Institute of Business Technology, Lanzhou 730020, China;

2. Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize matrix composition and ratio of artemisia flavonoids cream. **Method:**  $L_9(3^4)$  orthogonal test was employed to investigate effects of four factors including the amount of cetyl alcohol, octadecanol, emulsifiers, 1, 3-propylene glycol on matrix formulation, with appearance, stability, ductility, viscosity, pH value and microscopic observation as comprehensive evaluation index. **Result:** The best proportion of matrix prescription was as following: artemisia flavonoids 0.5%, cetyl alcohol 6%, octadecano 6%, emulsifier 8%, 1, 3-propylene glycol 4%, urea 2%, pure water 64%. **Conclusion:** This prepared cream was fine and uniform with suitable consistence and ductility, stable properties. The color of it was bright yellow, odor was special smell of traditional Chinese medicine, it was in line with the requirements.

**[Key words]** artemisia flavonoids; acne; cream matrix; orthogonal test; process ratio

**[收稿日期]** 20121101(004)

**[基金项目]** 甘肃省科技厅科技开发项目(0805TCYA042)

**[第一作者]** 丁洁, 助理工程师, 硕士, 从事天然产物研究与开发, Tel:13609304019, E-mail:dingjie860118@163.com

**[通讯作者]** \* 牛犇, 高级工程师, 从事天然产物研究与开发, Tel:0931-8551962, E-mail:lznuben@163.com

- [6] Li Y L, Fang H, Xu W F. Recent advance in the research of flavonoids as anticancer agents [J]. Mini-Rev Med Chem, 2007, 7(7): 663.
- [7] 熊蔚蔚, 徐铭键, 刘健, 等. 毛樱桃总黄酮超声提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 29.
- [8] Liu W, Yu Y Y, Yang R Z, et al. Optimization of total flavonoid compound extraction from gynura medica leaf using response surface methodology and chemical composition analysis [J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(11): 4750.
- [9] 卢奕, 马力. 响应面法优化松花粉总酚的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 53.
- [10] 徐秀泉, 虞倩, 徐颖. 赶黄草总黄酮超声提取工艺的响应面法优化及其体外抗氧化活性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 38.

[责任编辑 仝燕]