

# 响应曲面分析法优化油茶籽中总黄酮提取工艺

陈诗强<sup>1</sup>, 林江萧<sup>2</sup>, 陈剑锋<sup>2</sup>, 刘国敏<sup>3</sup>, 龚林光<sup>2</sup>, 梁一池<sup>1\*</sup>

(1. 福建中医药大学药学院, 福州 350122; 2. 福州大学天然产物与中药现代化研究所, 福州 350108; 3. 福建省闽侯桐口国有林场, 福州 352101)

**[摘要]** 目的: 优化油茶籽中总黄酮的乙醇提取工艺。方法: 以提取温度、提取时间、乙醇体积分数、料液比为自变量, 应用 Box-Behnken 中心组合设计建立数学模型, 以总黄酮提取率为响应值作响应面和等高线, 采用响应面法优化油茶籽中总黄酮的提取工艺。结果: 最佳提取工艺条件为温度 66 °C, 70% 乙醇提取 1.3 h, 料液比 1:22; 油茶籽总黄酮提取率 1.87%, 与理论值(1.89%)接近。结论: 该优选工艺稳定可靠, 为油茶资源的合理利用提供参考。

**[关键词]** 油茶籽; 总黄酮; 提取; 优化; 响应曲面分析法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0026-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013080026

## Optimization of Extraction Technology for Total Flavonoids from *Camellia oleifera* Seeds by Response Surface Methodolgy

CHEN Shi-qiang<sup>1</sup>, LIN Jiang-xiao<sup>2</sup>, CHEN Jian-feng<sup>2</sup>,  
LIU Guo-min<sup>3</sup>, GONH Lin-guang<sup>2</sup>, LIANG Yi-chi<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Fuzhou 350122, China;  
2. Institute of Modern Natural Product & TCM, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;  
3. Tongkou National Forest Farm of Minhou, Fuzhou 352101, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of total flavonoids from *Camellia oleifera* seeds. **Method:** With extraction temperature, extraction time, ethanol concentration and solid-liquid ratio as independent variables, Box-Behnken central composite design was used to establish mathematical model, response

**[收稿日期]** 20121116(014)

**[基金项目]** 福建省科技厅重点项目(2011N1007);福建省自然科学基金计划项目(2011J05073)

**[第一作者]** 陈诗强, 硕士, 从事质量控制与品质评价研究, Tel:15705963025, E-mail:462531970@qq.com

**[通讯作者]** \* 梁一池, 教授, 博士生导师, 从事中药材质量控制与品质评价的研究, Tel:13799399596, E-mail:fafulyc@126.com

藤叶干品计算, 绿原酸总保留率达 66.32%。经合作企业中试试表明, 优选的分离纯化工艺较稳定可行, 可用于工业化试生产。

### [参考文献]

[1] 杜延兵, 裘爱泳. 绿原酸生物活性、资源及其提取纯 [J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 250.  
[2] 史秀玲, 高银辉. 绿原酸对小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 199.  
[3] 戚晓渊, 史秀灵, 高银辉, 等. 绿原酸抗肝纤维化作用的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 139.

[4] 杨晓芸, 肖潇, 熊吟, 等. 金银花颜色与有效成分含量的相关性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 92.  
[5] 喻菁, 王小平, 徐强. 忍冬藤叶中绿原酸的提取工艺研究 [J]. 陕西中医, 2008, 29(6): 734.  
[6] 喻菁, 王小平, 徐强. 忍冬藤叶中绿原酸的分离纯化工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2379.  
[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 206.

[责任编辑 全燕]

surface and contour were made with yield of total flavonoids as response value, response surface methodology was adopted to optimize extraction technology of total flavonoids from *C. oleifera* seeds. **Result:** Optimum extraction technology conditions were as followings: extraction temperature 66 °C, ethanol concentration 70%, extracting time 1.3 h, solid-liquid ratio of 1:22. Under these conditions, yield of total flavonoids from *C. oleifera* seeds was 1.87%, which was close to the theoretical value of 1.89%. **Conclusion:** This optimized technology was stable and reliable, and it could provide reference for rational utilization of resources of *C. oleifera*.

[ **Key words** ] *Camellia oleifera* seeds; total flavonoids; extraction; optimization; response surface methodology

油茶为多年生小乔木或灌木,广泛分布于湖南、江西、福建等 15 个省区,其中福建省为我国油茶的中心产区之一。其富含黄酮类化合物,具有多种生理活性,如抗氧化、调血脂、增强记忆、抗抑郁、抗焦虑、中枢抑制和神经保护等。本实验通过响应曲面分析法对油茶籽中总黄酮的提取工艺进行研究,优选出易操作、低成本、高得率且适合于工业化生产的工艺技术,为油茶资源的综合利用及其黄酮类新产品的开发提供实验依据。

## 1 材料

UV-9100 型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司),DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),CP214 型电子天平(奥豪斯仪器有限公司)。油茶采自福建省闽侯桐口国有林场,经福建中医药大学药学院梁一池教授鉴定为山茶科山茶属油茶 *Camellia oleifera* Abel。芦丁对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-11040302),其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备**<sup>[1]</sup> 精密称取干燥的油茶籽粗粉 0.5 g,置 50 mL 圆底烧瓶中,加 70% 乙醇 10 mL,回流提取 1.5 h,残渣提取 2 次,趁热减压抽滤,滤过,合并滤液,于 60 °C 减压浓缩至干,加无水乙醇适量,超声处理使溶解,放冷,加无水乙醇定容至 25 mL,即得。

**2.2 对照溶液的制备** 精密称取于 120 °C 干燥至恒重的芦丁对照品 10 mg,置于 50 mL 量瓶中,加无水乙醇适量,超声使溶解,放冷,加无水乙醇至刻度,摇匀。即得。

**2.3 标准曲线绘制** 精密量取芦丁对照品溶液 0.0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加入 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 三氯化铝溶液 2 mL,加无水乙醇定容至刻度,摇匀,充分显色 15 min,于 421 nm 处测定吸光度(A),以加入芦丁对照品溶液 0.0 mL 的溶液为空白对照。以 A 为纵坐标,质量浓度为横

坐标,得回归方程  $Y = 0.7551X - 0.0032$  ( $r = 0.9996$ ),表明芦丁质量浓度在 0.04 ~ 0.2 g·L<sup>-1</sup> 与 A 线性关系良好。

**2.4 样品测定** 精密量取适量供试品溶液,按 2.3 项下方法测定 A,计算总黄酮含量<sup>[2]</sup>。

油茶籽总黄酮提取率 = 油茶籽中总黄酮提取质量 / 油茶籽干重 × 100%

## 2.5 单因素试验考察

**2.5.1 提取温度考察** 精密称取油茶籽粗粉 0.5 g,按 2.1 项下方法进行提取,按 2.4 项下方法进行测定,其他条件固定不变,选取提取温度分别为 40,50,60,70,80 °C,结果总黄酮提取率依次为 1.62%,1.75%,1.82%,1.72%,1.77%,故选择 60 °C。

**2.5.2 乙醇体积分数考察** 精密称取油茶籽粗粉 0.5 g,按 2.1 项下方法进行提取,按 2.4 项下方法进行测定,其他条件固定不变,乙醇体积分数分别为 50%,60%,70%,75%,80%,结果总黄酮提取率依次为 1.65%,1.75%,1.86%,1.75%,1.73%,故选用 70% 乙醇。

**2.5.3 提取时间考察** 精密称取油茶籽粗粉 0.5 g,按 2.1 项下方法进行提取,按 2.4 项下方法进行测定,其他条件固定不变,提取时间分别为 30,60,90,120,150 min,结果总黄酮提取率依次为 1.55%,1.65%,1.85%,1.76%,1.77%,故选择提取 90 min。

**2.5.4 料液比考察** 精密称取油茶籽粗粉 0.5 g,其他条件固定不变,分别加 10,15,20,25,30 倍量 70% 乙醇,按 2.1 项下方法进行提取,按 2.4 项下方法进行测定,结果总黄酮提取率依次为 1.52%,1.65%,1.84%,1.74%,1.77%,故选择加 20 倍量。

**2.6 响应曲面分析法优化工艺**<sup>[3]</sup> 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理<sup>[4]</sup>,选取提取温度,乙醇体积分数,提取时间和料液比为考察因素,在单因素试验基础上,采用四因素三水平的响应曲面分析法进行分析。每个自变量的低、中、高试验水平分

别以 -1, 0, 1 进行编码, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2。

表 1 油茶籽中总黄酮的提取工艺 Box-Behnken 中心组合试验因素水平

水平	$X_1$ 提取温度 /°C	$X_2$ 乙醇体积 分数/%	$X_3$ 提取 时间/min	$X_4$ 料液比
-1	50	50	60	1:15
0	60	60	90	1:20
1	70	70	120	1:25

表 2 油茶籽中总黄酮的提取工艺 Box-Behnken 中心组合试验安排

No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	总黄酮 提取率/%
1	-1	-1	0	0	1.36
2	-1	1	0	0	1.31
3	1	-1	0	0	1.34
4	1	1	0	0	1.78
5	0	0	-1	-1	1.47
6	0	0	-1	1	1.46
7	0	0	1	-1	1.30
8	0	0	1	1	1.84
9	-1	0	0	-1	1.49
10	-1	0	0	1	1.46
11	1	0	0	-1	1.41
12	1	0	0	1	1.79
13	0	-1	-1	0	1.14
14	0	-1	1	0	1.27
15	0	1	-1	0	1.27
16	0	1	1	0	1.88
17	-1	0	-1	0	1.55
18	-1	0	1	0	1.54
19	1	0	-1	0	1.73
20	1	0	1	0	1.53
21	0	-1	0	-1	1.69
22	0	-1	0	1	1.26
23	0	1	0	-1	1.42
24	0	1	0	1	1.43
25	0	0	0	0	1.38
26	0	0	0	0	1.51
27	0	0	0	0	1.32

利用 Design-Expert 8.0 软件对表 2 中数据进行多元回归拟合, 得出回归方程中的各项系数(表 3), 并用  $F$  检验检验显著性<sup>[5-6]</sup>。

由表 3 可知, 各因素对油茶籽总黄酮的提取工艺影响顺序为乙醇体积分数 > 提取温度 > 提取时间 > 料液比。提取时间和料液比的一次项影响不显著, 除此两项外其他各项的  $F$  检验均很显著, 说明试验响应值的变化非常复杂, 各个试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系, 而存在二次关系, 且四因素间存在明显的交互作用。得出总黄酮提取

表 3 回归方程系数及其显著性检验

系数项	SS	$f$	MS	$F$	$P$
常数项	1.48	1	0.007	15.52	0.004 <sup>2)</sup>
$X_1$	0.072	1	0.063	12.09	0.041 0 <sup>1)</sup>
$X_2$	0.086	1	0.088	6.94	0.035 9 <sup>1)</sup>
$X_3$	0.062	1	0.046	1.52	0.161 4
$X_4$	0.038	1	0.018	0.59	0.105 3
$X_1X_2$	0.12	1	0.06	8.99	0.027 1 <sup>1)</sup>
$X_1X_3$	-0.047	1	0.08	10.3	0.041 6 <sup>1)</sup>
$X_1X_4$	0.10	1	0.042	11.4	0.014 7 <sup>1)</sup>
$X_2X_3$	0.12	1	0.058	15.91	0.025 7 <sup>1)</sup>
$X_2X_4$	0.11	1	0.048	17.61	0.022 3 <sup>1)</sup>
$X_3X_4$	0.14	1	0.076	21.51	0.032 6 <sup>1)</sup>
$X_1^2$	0.096	1	0.047	10.4	0.015 7 <sup>1)</sup>
$X_2^2$	-0.046	1	0.158	6.91	0.035 7 <sup>1)</sup>
$X_3^2$	0.057	1	0.043	6.61	0.032 3 <sup>1)</sup>
$X_4^2$	0.062	1	0.066	5.51	0.042 6 <sup>1)</sup>
模型		10	0.051	10.69	0.028 2 <sup>1)</sup>
失拟度		14	0.033	1.51	0.243 9
纯误差		2	0.005		
残差		26			

注: <sup>1)</sup> 表示影响极显著), <sup>2)</sup> 表示影响显著。

率的回归方程为  $Y = 1.48 + 0.072X_1 + 0.086X_2 + 0.062X_3 + 0.038X_4 + 0.12X_1X_2 - 0.047X_1X_3 + 0.10X_1X_4 + 0.12X_2X_3 + 0.11X_2X_4 + 0.14X_3X_4 + 0.096X_1^2 - 0.046X_2^2 + 0.057X_3^2 + 0.062X_4^2$ 。响应面的回归模型  $F$  检验呈很显著; 模型的校正决定系数 ( $Adj R^2$ ) = 0.904 2, 说明该模型能解释 90.42% 响应值变化; 失拟项的  $F = 1.51, P = 0.243 9 > 0.05$ , 不显著; 表明可用二次回归方程模型代替试验点对试验数据进行分析, 效应面分析见图 1~3。

由图 1 可知, 乙醇体积分数和提取温度最大时, 油茶籽总黄酮提取率最大, 总黄酮提取率与乙醇体积分数成正相关。图 2 表明提取温度和提取时间最大时, 总黄酮提取率最大, 总黄酮提取率随时间增加先增大后变小; 总黄酮提取率随提取温度增加先增大后变小。图 3 表明提取温度和料液比最大时, 总黄酮提取率最大, 总黄酮提取率与料液比成负相关。综上所述, 油茶籽中总黄酮最佳提取工艺条件为提取温度 66 °C, 乙醇体积分数 70%, 提取时间 1.3 h, 料液比 1:22, 此条件下油茶籽总黄酮的最大提取率 1.87%。

**2.7 验证试验** 按最佳提取条件进行 6 次重复验证试验, 计算总黄酮提取率分别为 1.88%, 1.86%, 1.89%, 1.85%, 1.83%, 1.83%。说明该提取工艺稳定可行。

### 3 讨论

本实验根据 Box-Behnken 中心组合试验设

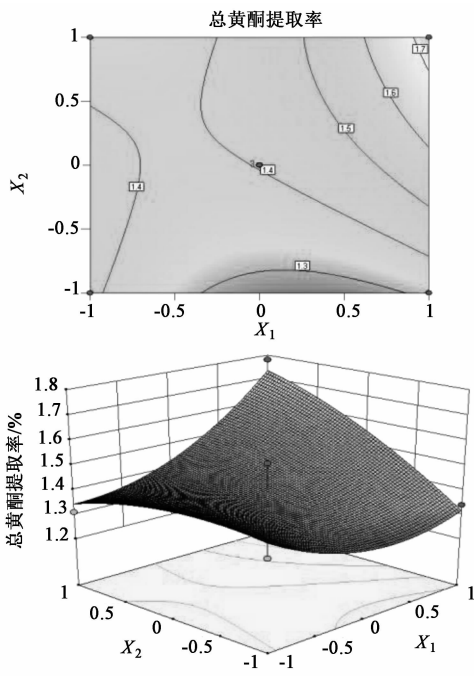


图1 提取温度与乙醇体积分数对油茶籽中总黄酮提取的影响等高线及响应面

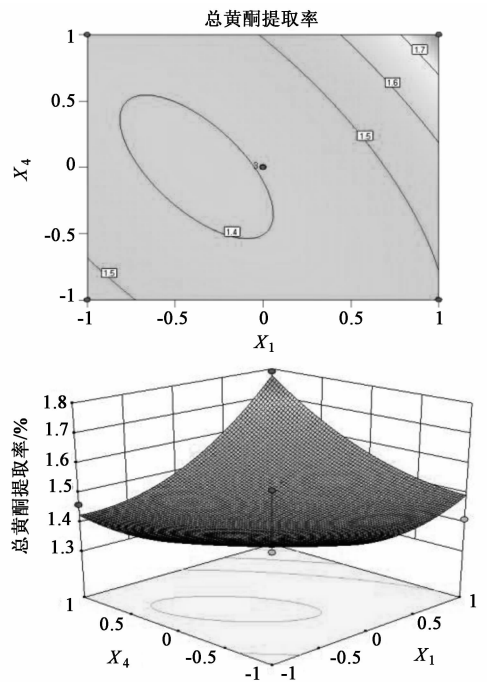


图3 提取温度与料液比对油茶籽中总黄酮提取的影响等高线及响应面

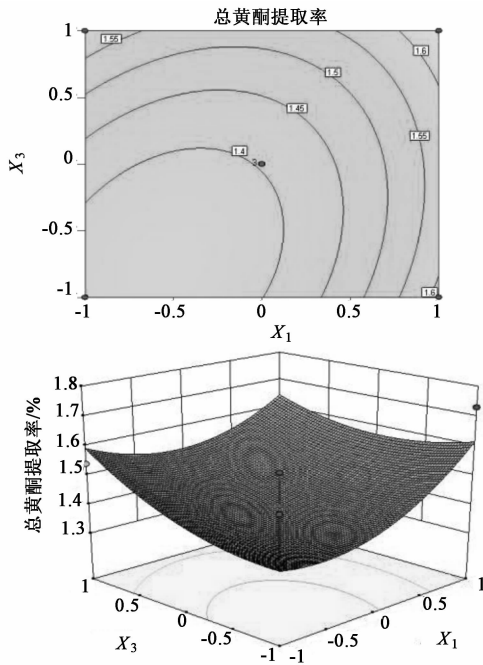


图2 提取温度与提取时间对油茶籽中总黄酮提取的影响等高线及响应面

计<sup>[7]</sup>,以油茶籽为原料,建立了提取温度、提取时间、乙醇体积分数、料液比对油茶籽总黄酮提取率的回归模型( $R^2 = 0.9042$ ),并对模型进行失拟,进行

$F, t$  检验,分析表明可用二次回归方程模型代替试验点对试验结果进行分析。

[参考文献]

[1] 沈建福,姜天甲,王徐卿. 油茶壳中总黄酮的最佳提取工艺研究[J]. 中国粮油学报,2008,23(3):104.  
 [2] 裴咏萍,李维林,张涵庆. 三氯化铝比色法测定中药中总黄酮含量的方法改进[J]. 现代中药研究与实践,2009,23(4):58.  
 [3] 侯淑珍,王景媛,王娜,等. 响应面分析法优化牛蒡根多糖提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):21.  
 [4] BOX G E P, Hunter W G. Statistics for experiments: An introduction to design, data analysis, and model building [M]. New York: Wiley,1990:250.  
 [5] 徐中儒. 回归分析与试验设计[M]. 北京:中国农业出版社,1998:71.  
 [6] 袁志发,周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京:高等教育出版社,2000:381.  
 [7] 魏学军,林先燕,冯光维,等. 响应面优化一贯煎中多糖的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):22.

[责任编辑 全燕]