

# 响应面分析法优化葛根中异黄酮提取工艺

王艳艳<sup>1</sup>, 王团结<sup>2\*</sup>, 丁琳琳<sup>3</sup>

(1. 江苏联合职业技术学院连云港中医药分院, 江苏 连云港 222006; 2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001; 3. 天津红日药业股份有限公司, 天津 301700)

**[摘要]** 目的: 优选葛根中异黄酮的提取工艺。方法: 以葛根异黄酮为评价指标, 通过响应面分析法优化葛根异黄酮的提取工艺, 并对最佳提取工艺进行工艺验证。结果: 葛根异黄酮的最佳提取工艺为 65% 乙醇, 超声提取 28 min, 料液比 1:29, 异黄酮的提取率可达 4.87%。结论: 采用响应面分析法优化对葛根异黄酮提取条件进行优化合理可行。

**[关键词]** 响应面; 葛根; 异黄酮; 提取工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0045-04

## Optimization of Extraction Technology of Isoflavones from *Pueraria lobata* by Response Surface Analysis Methodology

WANG Yan-yan<sup>1</sup>, WANG Tuan-jie<sup>2\*</sup>, DING Lin-lin<sup>3</sup>

1. Lianyungang Branch of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Union Technical Institute, Lianyungang 222006, China;
2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd, Lianyungang 222001 China;
3. Tianjin Chasesun Pharmaceutical Co. Ltd, Tianjin 301700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize of extraction technology for isoflavones from *Pueraria lobata*. **Method:** Optimization of extraction technology for isoflavones from *P. lobata* by response surface analysis method with isoflavones from *P. Lobata* as index, and verification of optimum extraction technology. **Result:** Optimal extraction technology was as follows: ethanol concentration 65%, ultrasonic extraction time 28 min, solid-liquid ratio 1:29, extraction ratio of isoflavones could be up to 4.87%. **Conclusion:** It was feasible to optimize extraction processing of isoflavones from *P. lobata* by response surface analysis methodology.

**[Key words]** response surface methodology; *Pueraria lobata*; isoflavones; extraction technology

葛根作为历代药食同源的植物之一, 含有丰富的异黄酮类成分, 不仅具有保护心血管系统的作用, 还有降血糖降血脂、改善微循环、抑制血小板聚集以及增强免疫力等作用。鉴于葛根异黄酮的药用价值, 寻找一种提取效率高、工艺条件简单、易于工业化大规模操作的提取方法迫在眉睫。本文主要探讨了超声法提取葛根中异黄酮的工艺研究, 考察了超

声时间、料液比、乙醇浓度等因素对异黄酮提取率的影响。在单因素实验的基础上进行响应面优化, 以提取率为指标考察提取葛根异黄酮的最佳提取工艺。

### 1 材料

葛根药材采于江苏连云港云台山, 经南京中医药大学宿树兰副教授鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata*。烘干, 备用, 95% 乙醇, 无水乙醇等均为分析纯; 双蒸水(自制)。

VIS-7220 型可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司), BC-R5001 型旋转蒸发器(上海贝凯生物化工设备有限公司), HHS-1 型电热恒温水浴锅(上海浦东荣丰科学仪器有限公司), CT-C 型热风循环

**[收稿日期]** 20110413(013)

**[第一作者]** 王艳艳, 硕士, 讲师, 从事药剂学、制药设备、分析化学等方面的教学与研究, Tel: 15062985899, E-mail: wyy8127@163.com

**[通讯作者]** \* 王团结, 硕士研究生, 从事药剂学研究, Tel: 0518-85522009, E-mail: union\_wang@163.com

烘箱(南京千方臭氧设备厂),LD5-2A 型离心机(北京医用离心机厂),B3200S 型超声清洗机(必能信超声上海有限公司)。

## 2 方法与结果

**2.1 原材料处理** 将采摘的葛根干燥,粉碎后过药典 2 号筛。

**2.2 标准曲线绘制** 精密称取葛根素适量,加 95% 的乙醇溶解,配制成一定量的葛根素对照品液,备用。取该对照品液分别配制成 2,4,6,8,10 mg·L<sup>-1</sup> 的葛根素溶液,于 250 nm 测定吸光度,以质量浓度对吸光度进行线性回归,得到线性方程为  $A = 73.4C + 0.0198$  ( $r = 0.9999$ ),线性范围 2 ~ 10 mg·L<sup>-1</sup>。

### 2.3 单因素影响试验

**2.3.1 超声时间对异黄酮提取得率的影响** 准确称取 1g 葛根粉末 15 份置于锥形瓶中,加入 50% 乙醇 20 mL,在 40 °C,超声频率 70 kW 下分别超声 5,10,15,20,30 min,抽滤后测定滤液体积并在 250 nm 下测定吸光度,计算提取得率。由图 1 可知,随着超声时间的延长,葛根中异黄酮的提取得率逐渐增加。15 min 之后异黄酮的得率无显著提高,考虑超声过程中会产生大量热量,时间过长使提取温度不易控制,因此单因素试验提取时间确定为 15 min。

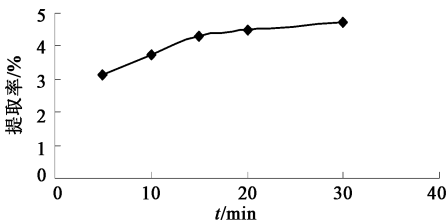


图 1 超声时间对葛根异黄酮得率的影响 ( $n=3$ )

**2.3.2 乙醇体积分数对异黄酮提取得率的影响** 准确称取 1 g 葛根粉末 15 份置于锥形瓶中,分别加入水、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、无水乙醇 20 mL,超声温度 40 °C,超声频率 70 kW 下超声 15 min,然后抽滤并测定滤液体积,测定吸光度,计算提取得率。由图 2 可知,异黄酮提取得率随乙醇体积分数的增加先上升后降低,在 50% 乙醇得率最高,可达到 3.6% 左右。

**2.3.3 乙醇用量对异黄酮提取得率的影响** 准确称取 1 g 葛根粉末 15 份置于锥形瓶中,分别加入 50% 乙醇 10,15,20,30,40 mL,超声温度 40 °C,超声频率 70 kW 下超声 15 min,然后抽滤并测定滤液体积,测定吸光度,计算提取得率。由图 3 可得,随着溶剂乙醇用量的增加,异黄酮提取得率也逐渐上

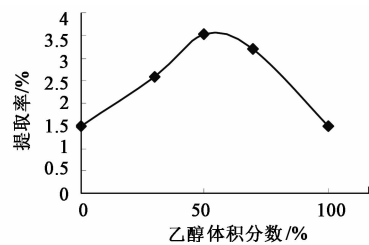


图 2 乙醇体积分数对葛根异黄酮得率的影响

升,但增加的幅度渐缓,30,40 倍用量情况下没有显著的变化。

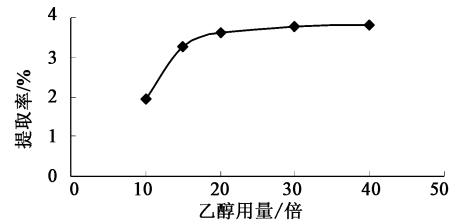


图 3 乙醇用量对葛根异黄酮得率的影响

### 2.4 响应面优化试验

**2.4.1 试验设计** 根据响应面分析软件提供的模型,设乙醇浓度 ( $X_1$ )、提取时间 ( $X_2$ )、乙醇用量 ( $X_3$ ) 3 因素为自变量,葛根异黄酮的提取得率为响应值,设计三因素三水平的试验,并根据单因素试验结果选定三因素的零水平和波动区。根据以上超声提取单因素工艺的研究,异黄酮提取得率随乙醇体积分数的变化先增大后减少,50% 乙醇最佳,所以选取 50% 乙醇为自变量  $X_1$  的零水平。异黄酮提取得率随提取时间的增加也是逐渐增加,但在 20 min 前比在 20 min 后增加的幅度大,从实际生产操作和成本考虑,提取时间不能过长,即选取 20 min 为自变量提取时间  $X_2$  的零水平。同理,异黄酮提取得率随溶剂用量的增加也是增加的,在 20 倍溶剂前期提取率增长较快,可以推测最佳料液比在 1:20 附近,即选择 20 倍溶剂量为自变量料液比  $X_3$  的零水平。试验因素与水平的取值见表 1。

表 1 野葛藤中异黄酮的提取工艺响应面因素水平编码

编码水平	$X_1$ 乙醇体积分数/%	$X_2$ 超声时间/min	$X_3$ 乙醇用量/mL·g <sup>-1</sup>
-1	30	10	15
0	50	20	20
1	70	30	25

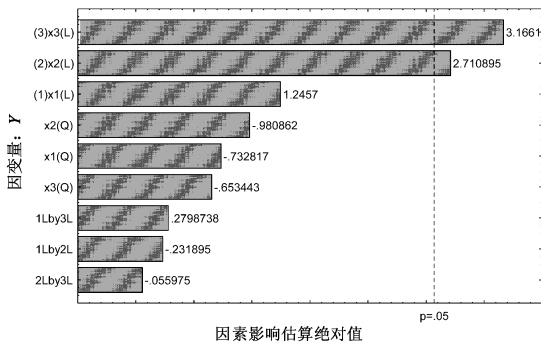
**2.4.2 响应面试验安排及试验结果** 15 个试验点可分为 2 类,其一析因点,自变量取值在  $X_1, X_2, X_3$  所构成的三维顶点,共有 14 个析因点;其二零点,为区域的中心点,零点试验重复 3 次,用以估计试验误

差,每次试验得到的异黄酮含量见表 2,试验安排及结果见表 2。根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理,试验中对三因素各取三水平,设计了三因素三水平共 15 个试验点的响应面分析试验。

表 2 野葛藤中异黄酮的提取工艺响应面分析试验

No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	异黄酮提取得率 / %
1	-1	-1	-1	3.59
2	-1	1	1	4.52
3	-1	-1	1	4.20
4	-1	1	-1	3.97
5	1	-1	1	4.50
6	1	1	-1	3.95
7	1	-1	-1	3.74
8	1	1	1	4.17
9	-1.67	0	0	3.57
10	1.67	0	0	4.42
11	0	-1.67	0	2.88
12	0	1.67	0	4.86
13	0	0	-1.67	3.29
14	0	0	1.67	4.78
15	0	0	0	4.54

以葛根异黄酮提取得率为响应值,根据表 2 的试验设计,用 SAS 6.0 统计分析软件进行多元回归分析,所得的分析结果见图 4。



3 因素、1 模块、运行 15 次;标准残差 = 0.195 488 6

图 4 葛根异黄酮提取回归分析标准影响排列图

可以看出,方程一次项的影响是显著的,交互项作用影响不显著,故交互项可以省略,各具体试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。料液比  $X_3$  和提取时间  $X_2$  的线性项的  $P$  均  $> 0.5$ ,对提取得率的影响显著,所以各单因素对葛藤提取得率的影响次序是乙醇用量  $>$  超声时间  $>$  乙醇体积分数。

经回归拟合后,试验因子对响应值的影响可用

回归方程表示为:

$$Y = 4.48784 + 0.149472X_1 + 0.325281X_2 + 0.379907X_3 - 0.132417X_1^2 - 0.177237X_2^2 - 0.118074X_3^2 - 0.036250X_1X_2 + 0.04375X_1X_3 - 0.00875X_2X_3。$$

根据上述回归方程作出响应面分析图及等值线图,见图 5~7。

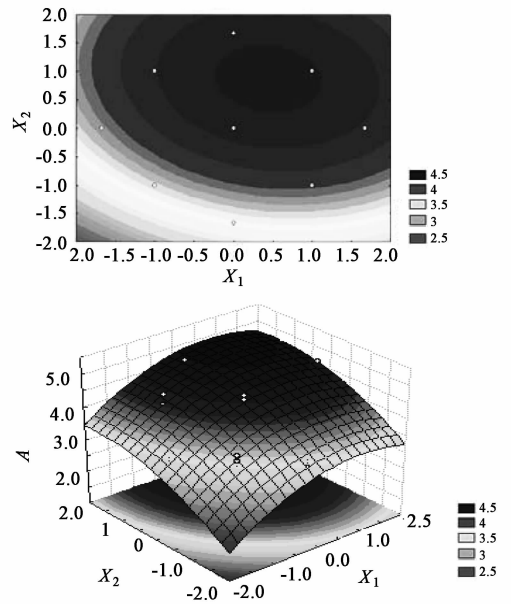


图 5 响应面法(乙醇体积分数、提取时间)立体分析图和相应等高线

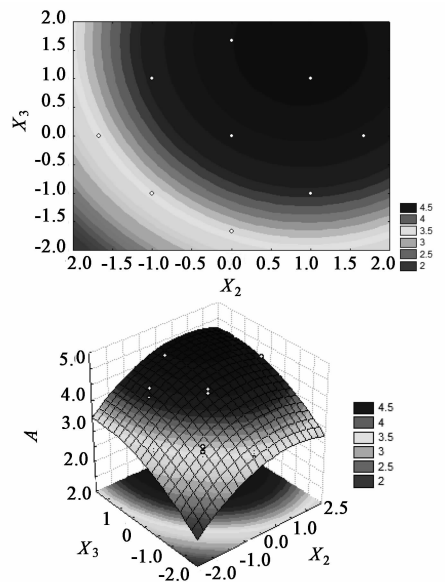


图 6 响应面法(料液比、提取时间)立体分析图和相应等高线

2.4.3 提取条件优化及最优条件验证 为确定各因素的最佳取值,可以利用 SAS 软件进行岭脊分析,通过岭脊分析后,得出回归模型存在最大值点,  $Y$  的最大估计值为稳定点 4.999 6%,  $(X_1, X_2, X_3)$  的代码值为  $(0.738398, 0.799775, 1.715932)$ 。与之

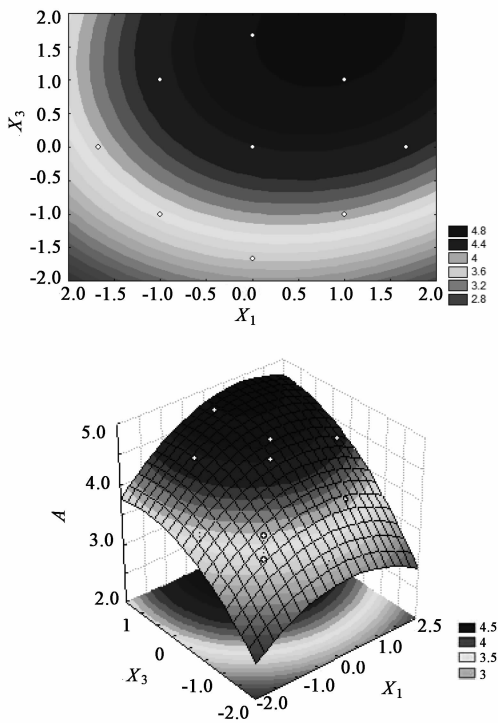


图 7 响应面法(料液比、乙醇体积分数) 立体分析图和相应等高线

对应的实测值为乙醇体积分数( $X_1$ ) = 64.767 96% , 提取时间( $X_2$ ) = 27.997 75 min, 乙醇用量( $X_3$ ) = 28.579 66, 此时异黄酮提取得率的最大估计值  $Y = 4.999 6\%$ 。为实际操作方便, 选取乙醇体积分数( $X_1$ ) = 65% , 提取时间( $X_2$ ) = 28 min, 乙醇用量( $X_3$ ) = 29, 进行验证试验。该优化条件 3 次提取异黄酮得率均值 4.87% , 理论值的偏差为 2.67% , 说明实验值与理论值有较好的拟合性。

### 3 讨论

单因素影响试验中, 考察乙醇浓度对异黄酮提取得率的影响, 可以看出提取得率随乙醇体积分数的增加先上升后降低, 在 50% 时得率最高, 可达到 3.6% 左右。

响应面设计不仅适用社会科学, 同样也适用于自然科学。可以用相应的软件 statistica 自动生成试验安排表, 方法简单快捷, 且试验安排也可作适当调整, 灵活多变的安排试验。响应面设计不仅可以得到与正交设计相同的结论, 而且能直接统计出因素的显著性, 并能预测出试验的最优化条件和最高效率。通过响应面法设计研究葛根异黄酮超声提取工艺的最优条件, 29 倍量 65% 乙醇, 超声提取 28 min, 在此条件下, 异黄酮的提取得率可达到 4.87%。

### [参考文献]

- [1] 冯维希, 张永丹, 韩婷, 等. 响应面分析法优化两相溶剂系统提取葛花异黄酮工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(24):177.
- [2] Xu Hua-neng, Zhang Yingxin, He Chaohong. Ultrasonically assisted extraction of isoflavones from stem of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and its mathematical model[J]. Chin J Chem Eng, 2007, 15(6):861.
- [3] Xu Hua-Neng, Huang Wei-Ning, He Chao-Hong. Modeling for extraction of isoflavones from stem of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi using n-butanol/water two-phase solvent system[J]. Sep Purif Technol, 2008, 62(3):590.

[责任编辑 全燕]