

# 响应面法优化金莲花总黄酮的超声提取工艺

徐秀泉<sup>1\*</sup>, 许源<sup>1</sup>, 汤建<sup>1</sup>, 尚磊<sup>2</sup>

(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学京江学院, 江苏 镇江 212013)

**[摘要]** 目的: 优化金莲花总黄酮的超声提取工艺。方法: 以总黄酮得率为指标, 采用响应面设计方法对影响总黄酮得率的乙醇体积分数、提取时间及料液比进行优化。结果: 最佳工艺条件为采用 49% 乙醇, 料液比 1:43, 在 50 °C 下超声提取 22 min, 在此最佳条件下, 总黄酮得率为 12.02 mg·g<sup>-1</sup>, 实验结果与模型预测值相符。结论: 利用超声方法提取金莲花总黄酮工艺稳定可靠。

**[关键词]** 金莲花; 总黄酮; 超声提取; 响应面设计

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0035-04

## Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of Total Flavonoids from *Trollius chinensis* by Response Surface Methodology

XU Xiu-quan<sup>1\*</sup>, XU Yuan<sup>1</sup>, TANG Jian<sup>1</sup>, SHANG Lei<sup>2</sup>

(1. College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. College of Jingjiang, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the ultrasound-assisted extraction technology of total flavonoids from *Trollius chinensis* Bunge. **Method:** The factors such as ethanol concentration, extraction time and liquid-material ratio were optimized by response surface methodology. **Result:** The highest extraction rate of total flavonoids by ultrasound-assisted extraction was 12.02 mg·g<sup>-1</sup> using ethanol concentration 49 percent, liquid-material ratio of 1:43, extraction temperature at 50 °C, and extracted for 22 min, which was agreed with model predictions. **Conclusion:** The extraction process by ultrasound-assisted was stable and reliable.

**[Key words]** *Trollius chinensis*; total flavonoids; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology

**[收稿日期]** 20110318(012)

**[基金项目]** 江苏大学大学生科研立项项目(Y09A098)

**[通讯作者]** \* 徐秀泉, 讲师, 从事天然活性成分提取分离及活性分析, Tel:0511-85038403, E-mail:xxq781026@sohu.com

这两者有效成分的得率权重定为正值, 又因玄参在本方中是君药, 而陈皮是臣药, 将权重系数分别设为 0.6, 0.4。在有效成分明确的前提下, 浸膏得率越高则纯度越低, 因此本试验将浸膏得率设为负权重系数; 如果指标成分不明确, 以浸出物多少来代表有效成分时, 浸膏得率的权重系数应相应增大, 并设为正权重系数<sup>[2]</sup>。这样以方差分析的优选出的工艺条件更加合理。

丸中肉桂酸、橙皮苷和哈巴俄苷[J]. 浙江师范大学学报, 2009, 32(3):313.

[2] 李丽, 周军. 多指标综合评分法优化痛风宁颗粒提取工艺[J]. 中成药, 2007, 29(2):28.

[3] 张峻. 正交试验法优选黄芩水提工艺的实验研究[J]. 基层中药杂志, 1999, 13(3):13.

[4] 王剑波, 郭书台, 朱玲珍, 等. 双指标 HPLC 优选紫参血康片醇提工艺[J]. 第四军医大学学报, 1998, 19(5):560.

### [参考文献]

[1] 徐静汶, 刘小花. 高效液相色谱法同时测定参橘止咳滴

[责任编辑 仝燕]

金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 为毛茛科金莲花属多年生草本植物, 主要分布于我国河北、辽宁和吉林等省。金莲花具有清热解毒、抗菌消炎等作用, 临床主要用于上呼吸道感染、咽炎、扁桃体炎等<sup>[1]</sup>。近年来研究发现其黄酮类化合物是抗氧化、抗病毒的主要活性成分<sup>[2-3]</sup>, 对黄酮类活性成分的提取多采用传统的加热回流方式<sup>[4-5]</sup>, 本研究采用先进的超声提取方法, 利用响应面设计方法优化金莲花总黄酮超声提取工艺参数, 为金莲花资源的合理开发利用提供参考。

### 1 仪器与试剂

金莲花购自江苏镇江九泰医药有限公司, 经江苏大学药学院沈绛英副主任药师鉴定为毛茛科植物金莲花 *T. chinensis* 的干燥花蕾, 粉碎过 40 目筛备用。芦丁对照品(批号 100080-200306)购自中国药品生物制品检定所, 其他试剂均为国产分析纯。

UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司), DHG-9145 型鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司), KQ-250DB 型超声波仪(昆明市超声仪器有限公司), BS 110 S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

### 2 方法与结果

**2.1 标准曲线的绘制**<sup>[6]</sup> 精密称取 105 °C 干燥至恒重的芦丁对照品 12.7 mg, 加 70% 乙醇溶解, 定容至 50 mL 得 254 mg·L<sup>-1</sup> 芦丁对照品储备溶液, 量取该储备液 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL 置于 25 mL 量瓶, 分别依次加入 5% NaNO<sub>2</sub> 1 mL, 10% AlNO<sub>3</sub> 1 mL, 4% NaOH 10 mL, 最后用 70% 乙醇定容至 25 mL, 于 510 nm 波长处测定吸光度, 以样品质量浓度对吸光度进行线性回归, 得回归方程  $Y = 0.012X + 0.001$  ( $R^2 = 0.9991$ )。结果表明, 芦丁在 10.16 ~ 60.96 mg·L<sup>-1</sup> 与吸光度成良好线性关系。

**2.2 金莲花总黄酮的提取及含量测定** 准确称取 1.0 g 金莲花粉末, 加入一定量的乙醇溶液, 在 50 °C 下超声提取规定时间, 离心后按照标准曲线项下测定样品吸光度, 计算黄酮得率。

**2.3 试验设计** 根据中心组合设计原理, 结合响应面分析方法, 综合单因素预试验结果, 以乙醇体积分数、超声提取时间、料液比 3 个因素为自变量, 总黄酮的提取得率为响应值, 设计 3 因素 5 水平共 17 个实验点的响应面分析实验。对乙醇体积分数、提取时间、料液比作如下变化:  $X_1 = (x_1 - 60)/20$ ,

$X_2 = (x_2 - 20)/10$ ,  $X_3 = (x_3 - 40)/10$ , 因素水平分析选取见表 1。试验方案与结果见表 2, 其中 12 个为析因试验, 5 个为中心试验。

表 1 响应面因素水平编码

编码水平	$x_1$ 乙醇体积 分数/%	$x_2$ 提取 时间 /min	$x_3$ 料液比 /g·mL <sup>-1</sup>
-1	40	10	1:30
0	60	20	1:40
1	80	30	1:50

**2.4 建立模型方程与显著性检验** 应用 Design-Expert 7.1.6 软件对表 2 中的数据进行二次多元回归拟合, 得到乙醇体积分数 ( $X_1$ )、提取时间 ( $X_2$ )、料液比 ( $X_3$ ) 与金莲花总黄酮之间的二次多项回归方程:

$$Y = 11.54 - 1.09 X_1 + 0.71 X_2 + 0.61 X_3 + 0.38 X_1 X_2 + 0.19 X_1 X_3 + 0.16 X_2 X_3 - 0.90 X_1^2 - 1.18 X_2^2 - 1.07 X_3^2$$

表 2 金莲花中黄酮类化合物响应面设计

No.	影响因素			总黄酮得率/mg·g <sup>-1</sup>	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	实验值	理论值
1	0	0	0	11.48	11.54
2	-1	-1	0	10.25	10.22
3	0	-1	-1	8.39	8.12
4	0	0	0	11.58	11.54
5	-1	0	1	11.25	11.08
6	-1	0	-1	9.95	10.25
7	0	1	-1	9.42	9.45
8	0	1	1	10.50	10.77
9	1	1	0	9.42	9.22
10	0	0	0	11.56	11.54
11	0	0	0	11.60	11.54
12	-1	1	0	10.98	10.88
13	0	-1	1	8.83	9.03
14	1	-1	0	7.18	7.28
15	1	0	1	9.58	9.28
16	0	0	0	11.49	11.54
17	1	0	-1	7.50	7.67

对上述回归模型进行显著性检验, 结果见表 3。由表 3 回归方差显著性检验表明, 一次项乙醇体积分数、超声提取时间、料液比对总黄酮得率的线性效

表3 回归模型方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
$X_1$	9.57	1	9.57	137.91	<0.001
$X_2$	4.02	1	4.02	57.91	<0.001
$X_3$	3.00	1	3.00	43.25	<0.001
$X_1X_2$	0.57	1	0.57	8.21	<0.05
$X_1X_3$	0.15	1	0.15	2.19	
$X_2X_3$	0.10	1	0.10	1.48	
$X_1^2$	3.41	1	3.41	49.12	<0.001
$X_2^2$	5.91	1	5.91	85.17	<0.001
$X_3^2$	4.84	1	4.84	69.76	<0.001
残差	0.49	7	0.069		
失拟项	0.47	3	0.16	54.12	<0.001
误差	0.012	4	0.002 9		
总离差	33.70	16			
模型	33.21	9	3.69	53.18	<0.001

应极显著;二次项中各因素对总黄酮提取率的曲面效应极显著;比较各因子间交互作用除乙醇浓度与

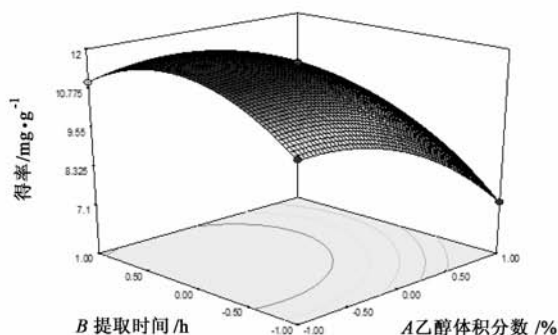
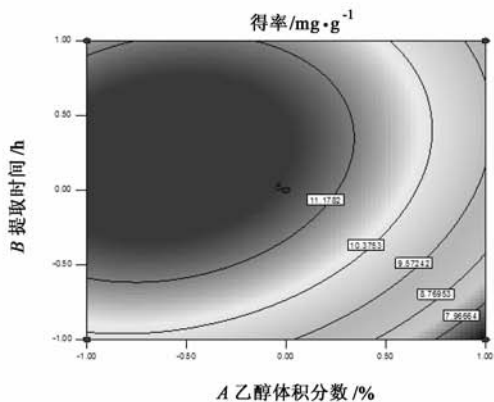


图1 乙醇体积分数、提取时间对总黄酮得率影响的立体分析图和响应等高线

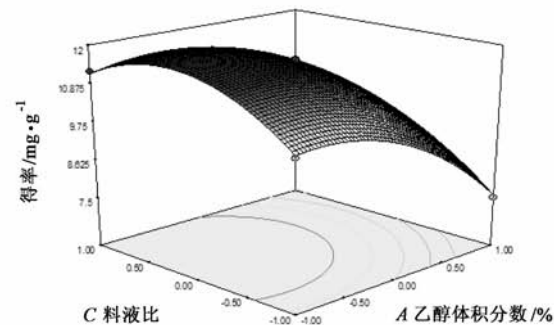
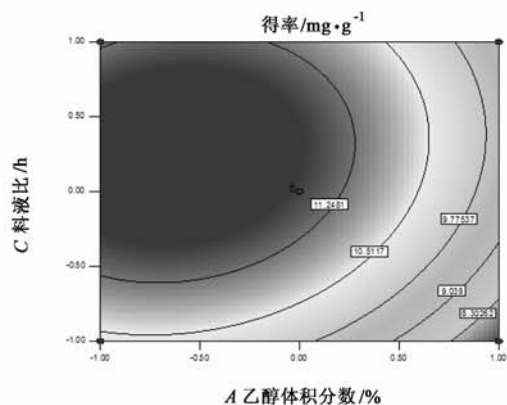


图2 乙醇体积分数、料液比对总黄酮得率影响的立体分析和响应等高线

超声提取时间外不显著。在本实验设计范围内,回归方程显著性检测  $P < 0.000 1$ ,模型与实际实验拟合良好,试验误差小,证明应用响应面法优化的提取工艺提取金莲花总黄酮是可行的。

**2.5 响应面分析及最优提取条件的确定** 借助 Design-Expert 软件依据回归方程来绘制响应面立体分析图及等高线,考察所拟合的响应面曲线的形状,响应面立体图如图 1~3 所示,利用该图可以对影响黄酮类化合物提取得率的条件下任何 2 种因素的交互效应进行分析和评价,并确定最佳因素水平范围。等高线的形状可反应交互效应的强弱,椭圆形表示两因素交互作用显著,而圆形则与之相反。从图中可以看出,各因素间的交互作用不显著。从等高线图可以看出极值条件应在圆心处,3 因素对金莲花总黄酮的提取都有显著的影响,表现为等高线较为陡峭。

为确定各因素的最佳取值,利用 Design-Expert 软件分析,得出回归模型存在最大值点, ( $X_1, X_2, X_3$ ) 的代码值为 ( $-0.53, 0.23, 0.25$ )。与之对应的

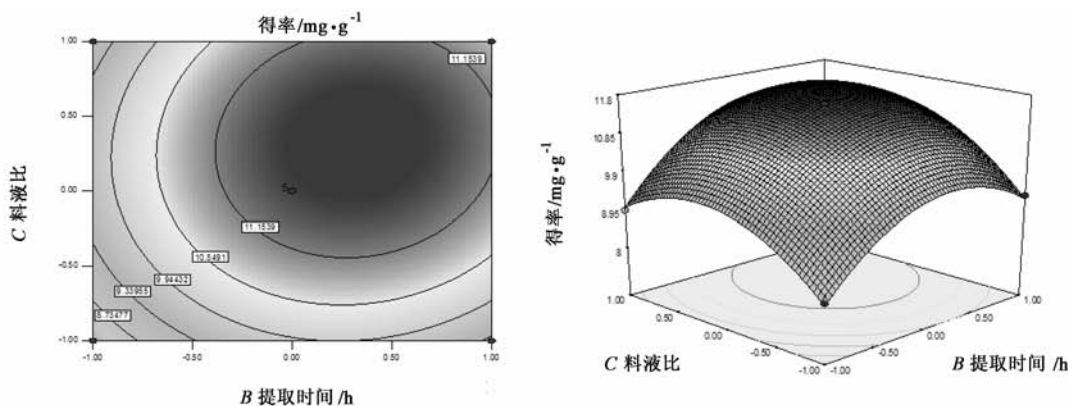


图 3 提取时间、料液比对总黄酮得率影响的立体分析图和响应等高线

实测值为乙醇体积分数 ( $A$ ) = 49.4%, 提取时间 ( $B$ ) = 22.3, 料液比 1:42.5, 此时金莲花中黄酮类化合物的提取率的最大估计值  $Y = 11.99 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。为实际操作方便,同时考察工艺的实用性,选取药材金莲花 5 g,乙醇体积分数 49%,提取时间 22 min,料液比 1:43,进行验证试验,结果黄酮得率平均值为  $12.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

优化条件 3 次提取平均值与理论值的偏差为  $0.29\% < 3\%$ ,说明实验值与理论值有较好的拟合性。

### 3 讨论

将响应面分析法对超声辅助提取金莲花总黄酮的工艺条件进行优化,获得最佳提取工艺条件为采用 49% 乙醇,料液比 1:43,在  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  下超声提取 22 min,在此最佳条件下,总黄酮得率为  $12.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,试验结果与模型预测值相符。超声提取方法简单,

具有提取效率高、时间短、无需加热等优点,是一种较理想的提取金莲花总黄酮的方法。

### [参考文献]

- [1] 李占林,李丹毅,吴瑛,等. 金莲花抗菌有效成分[J]. 沈阳药科大学学报 2008,25(8):627.
- [2] LI Y L, MA S C, YANG Y T, et al. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge[J]. J Ethnopharmacol, 2002,79:365.
- [3] 颜娟,胡海娜,田嘉,等. 金莲花中总黄酮抗氧化作用的研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(2):386.
- [4] 辛春兰,潘海峰,李守拙,等. 正交设计优选金莲花的提取工艺[J]. 中草药,2008,36(12):1818.
- [5] 赵二劳,王爱玲. 金莲花中总黄酮提取工艺的优化[J]. 精细化工,2009,26(12):1185.
- [6] 中国药典.一部[S].2010.333.

[责任编辑 全燕]