

响应面法优化黄花菜总黄酮提取工艺

周向军*, 高义霞, 张霞

(天水师范学院生命科学与化学学院, 甘肃 天水 741001)

[摘要] 目的:采用响应面法优化黄花菜总黄酮的提取工艺。方法:在单因素试验的基础之上,选取浸提温度、浸提时间、料液比和乙醇体积分数作为影响因子,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,进行响应面分析。结果:黄花菜总黄酮最佳提取工艺为 90% 乙醇浸提时间 180 min,浸提温度 75 ℃,料液比 1:35。总黄酮提取率预测值为 0.571%,实际值为 0.581%,相对误差为 1.32%。结论:优选工艺稳定、可行,操作简单。

[关键词] 黄花菜;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(2011)16-0029-04

Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoids from *Hemerocallis citrina* by Response Surface Method

ZHOU Xiang-jun*, GAO Yi-xia, ZHANG Xia

(College of Life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China)

[Abstract] **Objective:** Response surface analysis methodology (RSM) was used for optimizing the extraction technology of total flavonoids from *Hemerocallis citrina*. **Method:** On the basis of single-factor tests, extraction temperature, extraction time, solid-liquid ratio and ethanol concentration were selected as influencing factors during extraction. Box-Behnken design was used to establish mathematical model. **Result:** The optimum conditions for total flavonoids were extraction time 180 min, extraction temperature 75 ℃, ethanol concentration 90%, solid-liquid ratio 1:35. The predicted extraction yield of total flavonoids was 0.571%, and the verification 0.581%, with relative error of 1.32%. **Conclusion:** The optimized extraction technology was stable, feasible and simple.

[Key words] *Hemerocallis citrina*; total flavonoids; response surface method

黄花菜 *Hemerocallis citrina* baroni 即金针菜,又名忘忧草、萱草等,是百合科萱草属多年生宿根草本植物的花蕾,色黄,形似金针,蒸熟晒干即为黄花菜^[1-2]。我国黄花菜主要分布在湖南祁东、湖北、陕西、江苏、四川、浙江及甘肃庆阳等 7 个主产区,其中以甘肃庆阳黄花菜种植面积最大、质量最好,于 1984 年被前外贸部授予“蓓蕾牌西北特级金针菜”^[3-4]。黄花菜条长肥厚,富含糖、蛋白质、氨基酸、维生素和矿物质等人体必需成分,具有利尿、消炎、清热、消食健胃等药用和保健作用^[5-6]。研究表明,

黄花菜总黄酮类化合物具有增强免疫力、抗菌抗病毒和抑制癌细胞生长等多种功能^[7]。目前有关黄花菜总黄酮提取工艺研究多采用正交试验,这对于各因素对提取效果的交互影响分析存在不足^[8],关于响应面法优化黄花菜总黄酮提取工艺未见报道。本试验在探讨了各因素对黄花菜总黄酮提取率影响的基础之上,采用响应面法优化提取工艺,为黄花菜的进一步开发提供理论依据。响应面法(response surface analysis methodology, RSM)是利用合理的试验设计,采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析寻求最佳工艺参数,进行多变量优化的一种有效方法^[9-10],具有使用简单、精密度高、预测性好的优点^[11],广泛应用于生物、食品、农业等领域^[12]。

[收稿日期] 20101110(009)

[通讯作者] *周向军,讲师,从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: zhouxiangjun125@126.com

1 材料

黄花菜采自甘肃庆阳市,为蒸熟晒干天然产品。室温干燥,粉碎,过 80 目筛,备用。

芦丁对照品购自南京替斯艾么中药技术研究所(含量 99%,批号 TCM027-090216),乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、等均为分析纯试剂。2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 为 Sigma 产品(批号 D913-2)。

AE40 型-电子天平(北京赛多利天平有限公司),RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),722 型分光光度计(上海欣茂仪器公司),Allegra 64R-高速冷冻离心机(Beckman Coulter)。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制 精确称取 120 °C 干燥后并恒重的芦丁对照品 25 mg,加入 75% 的乙醇 80 mL,加热溶解,冷却后用 75% 乙醇定容至 100 mL,摇匀备用,配置成 0.25 g·L⁻¹ 的芦丁对照品溶液。采用 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 光度法制作标准曲线^[13]:精密吸取 0,2,3,4,5,6,7 mL 上述芦丁对照品溶液,分别放置 25mL 的量瓶中,加 5% 亚硝酸钠 1 mL 摇匀放置 6 min,加 10% 的硝酸铝 1 mL 摇匀放置 6

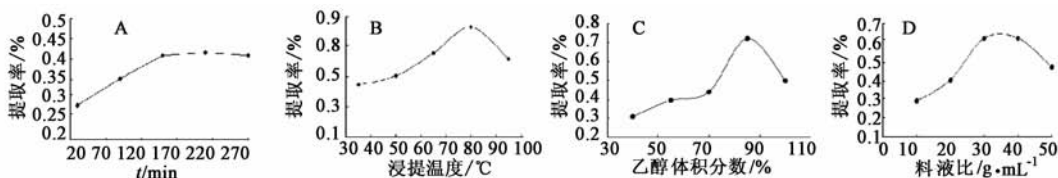
min,加 4% 的氢氧化钠 10 mL,用 75% 的乙醇稀释至刻度,放置 15 min 后测吸光度。以吸光度为纵坐标,芦丁质量浓度为横坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y = 13.217 X - 0.0047 (R^2 = 0.9997)$, 0 ~ 0.07 g·L⁻¹ 线性关系良好。

2.2 总黄酮的提取及测定 精确称取黄花菜干粉 1 g,置于 100 mL 烧瓶内,以一定料液比加入一定体积分数的乙醇溶液,于一定温度下回流提取一定时间后,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min。滤渣同法处理,合并上清液。

总黄酮含量(以芦丁计) = 样液黄酮含量(mg) × 提取液总体积(mL) / 测定体积(mL),提取率% = 样液中黄酮的含量(mg) / 黄花菜质量(mg) × 100%。

2.3 单因素试验

2.3.1 浸提时间对总黄酮提取率的影响 在料液比 1:30、乙醇体积分数 70%、浸提温度 65 °C、浸提时间分别为 30, 90, 150, 210, 270 min 的条件下,探讨浸提时间对总黄酮提取率的影响,见图 1。从图中可看出,在提取时间为 150 min 时,提取率达到最大,延长提取时间,提取率不再增加,维持在一定水平,因此提取时间选择在 150 min 为宜。



A. 浸提时间; B. 浸提温度; C. 料液比; D. 乙醇体积分数

图 1 各单因素对黄花菜总黄酮提取率的影响

2.3.2 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响 在料液比 1:30、浸提温度 65 °C、浸提时间 150 min、乙醇体积分数分别为 40%, 55%, 70%, 85%, 100% 的条件下,探讨乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响,见图 1。当乙醇体积分数为 40% ~ 85% 时,总黄酮提取率逐渐上升,并在 85% 处达到最大,当乙醇体积分数继续增大时,提取率明显下降,这可能是乙醇体积分数过高时,一些醇溶性杂质、色素等成分溶出增多,导致黄酮类化合物提取率下降^[15],因此乙醇体积分数以 85% 为宜。

2.3.3 浸提温度对总黄酮提取率的影响 在料液比 1:30、浸提时间 150 min、乙醇体积分数 85%、浸提温度分别为 35, 50, 65, 80, 95 °C 的条件下,探讨浸提温度对总黄酮提取率的影响,见图 1。提取率随温度的升高而逐渐增大,当温度为 80 °C 时,提取率

达到最大。当温度高于 80 °C 时,可能由于温度造成黄酮部分降解,提取率反而降低,因此浸提温度选择 80 °C 为宜。

2.3.4 料液比对总黄酮提取率的影响 在乙醇体积分数 85%、浸提温度 80 °C、浸提时间 150 min、料液比分别为 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 的条件下,探讨料液比对总黄酮提取率的影响,见图 1。随着料液比的增大,黄酮提取率逐渐增大,当料液比介于 1:30 ~ 1:40 时,总黄酮提取率达到最大,当料液比高于 1:40 时,提取率反而下降,主要是随着溶剂体积的增大,其他非黄酮类可溶性物质溶解度也逐渐增大,进而致使总黄酮相对提取率降低。所以选择 1:30 为宜。

2.4 响应面设计 在单因素试验的基础之上,选择浸提时间(A)、浸提温度(B)、乙醇体积分数(C)和

料液比(D)为因素,选用 Design-Expert 7.0.0 试验设计,以总黄酮得率为响应值,进行响应面分析试验^[14],见表1。以 A, B, C, D 为自变量,以黄花菜总黄酮提取率为响应值(Y),进行响应面分析试验。试验方案及结果见表2。

表1 黄花菜提取工艺响应面试验因素水平

水平	A		B		C		D	
	时间/min	温度/°C	乙醇体积分数/%	料液比/g·mL ⁻¹				
-1	1	50	50	10				
0	2	70	70	20				
1	3	90	90	30				

表2 黄花菜提取工艺 Box-behnken 设计方案及响应值

No.	A	B	C	D	提取率/%
1	150	80	85	30:1	0.476
2	150	80	80	25:1	0.446
3	180	75	85	30:1	0.447
4	150	75	90	30:1	0.569
5	120	80	90	30:1	0.516
6	150	80	80	35:1	0.514
7	150	80	90	25:1	0.475
8	120	80	80	30:1	0.450
9	180	80	85	25:1	0.411
10	150	75	80	30:1	0.448
11	150	85	90	30:1	0.495
12	150	75	85	35:1	0.513
13	120	80	85	25:1	0.398
14	150	80	85	30:1	0.462
15	120	75	85	30:1	0.435
16	180	80	90	30:1	0.509
17	150	85	80	30:1	0.499
18	120	80	85	35:1	0.502
19	150	85	85	25:1	0.498
20	180	80	85	35:1	0.494
21	150	85	85	35:1	0.587
22	180	80	80	30:1	0.445
23	150	80	85	30:1	0.487
24	120	85	85	30:1	0.474
25	150	80	90	35:1	0.571
26	150	75	85	25:1	0.513
27	180	85	85	30:1	0.484

利用 Design-Expert7.0.0 软件对表2 试验数据进行二次多项式回归拟合,得到的数学模型为 $Y = 0.48 - 0.00125A + 0.009B + 0.025C + 0.037D - 0.0005AB + 0.007AC - 0.005AD - 0.031BC + 0.022BD + 0.007CD - 0.027A_2 + 0.019B_2 + 0.020C_2 + 0.014D_2$,各因素的方差分析见表3。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液4 mL共6份,分别置于25 mL量瓶中,按2.1方法进行,RSD 1.08%,表明本方法精密度良好。

表3 总黄酮提取回归模型的方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	0.044	14	0.0031	4.59	0.0059
A	0.00001871	1	0.0000188	0.028	0.8709
B	0.001045	1	0.001045	1.54	0.2388
C	0.0076	1	0.00765	11.25	0.0057
D	0.016	1	0.016	23.72	0.0004
AB	0.000001	1	0.000001	0.001	0.9700
AC	0.000196	1	0.000196	0.29	0.6012
AD	0.00011	1	0.00011	0.16	0.6943
BC	0.0039	1	0.0039	5.74	0.0337
BD	0.00198	1	0.00198	2.91	0.1137
CD	0.000196	1	0.000196	0.29	0.6012
A ₂	0.00377	1	0.00377	5.54	0.0365
B ₂	0.00199	1	0.00199	2.92	0.1133
C ₂	0.0021	1	0.0021	3.11	0.1032
D ₂	0.0011	1	0.0011	1.60	0.2297
残差	0.00816	12	0.00068		
失拟项	0.00785	10	0.000785	5.00	0.1781
纯误	0.000314	2	0.000157		

2.6 验证性试验 按2.2方法平行提取总黄酮6份,各精密吸取5 mL,分别置于25 mL量瓶中,按2.1进行,测得黄花菜总黄酮含量平均为0.581%,RSD 1.32%,表明本方法重复性良好。

2.7 加标回收率试验 在已知含量的6份总黄酮提取液中,各加入2 mL芦丁对照品(0.15 g·L⁻¹),按2.1方法进行,计算得平均回收率为100.05%,RSD 1.87%,故认为用上述方法测定黄花菜总黄酮含量是可行的。

2.8 稳定性试验 吸取总黄酮提取液5 mL,按2.1方法进行。对显色后的反应液每隔10 min测定1次吸光度。结果显示吸光度在1.5 h内无明显变化,RSD 1.12%,表明显色后反应液在1.5 h稳定性良好。

3 分析

由表3知,模型的“ $P > F$ ”值小于0.01,表明二次方程拟合极显著,失拟项 $F = 5$,表明失拟项相对于绝对误差是不显著的,而不显著的失拟项才可用。浸提时间 A 、浸提温度 B 的“ $P > F$ ”值大于0.05,表明其对总黄酮提取率影响不显著,乙醇浓度 C 和液固比 D 的“ $P > F$ ”值小于0.01,表明其对总黄酮提取率影响极显著。且影响黄花菜总黄酮提取率的各因素按影响大小排序依次为料液比、乙醇体积分数、浸提温度、浸提时间。二次项 A^2 的“ $P > F$ ”值小于0.01,表明其对总黄酮提取率影响极显著, B_2, C_2, D_2 影响不显著。交互项按影响大小排列依次为 BC ,

BD,CD,AC,BC,AB,其中 BC 达到显著水平,其他不显著,表明各因素对黄酮提取率不是简单线性关系。各交互因素响应曲面图见图 2,可看出浸提温度和

乙醇体积分数交互影响显著,表现为曲线图陡峭,其他因素曲线较平滑。

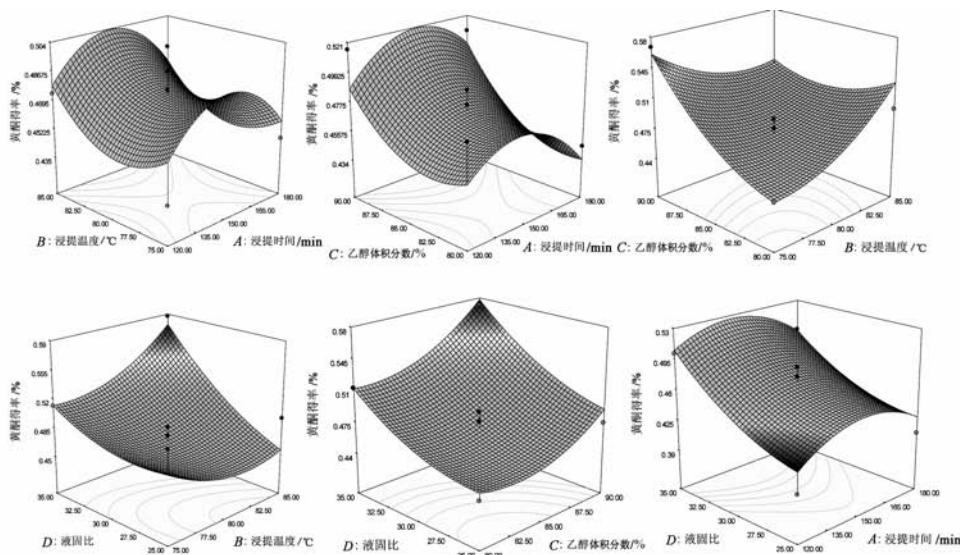


图 2 各因素两两交互作用对总黄酮提取率影响的响应面

进一步对回归模型进行预测得出黄花菜总黄酮提取率的最佳工艺为浸提时间 180 min,浸提温度 75 ℃,乙醇体积分数 90%,液固比 34.99:1,此条件下总黄酮提取率为 0.571%。考虑到实际操作的可操作性,将黄花菜总黄酮的提取条件在回归方程得到的理论值基础上修正为浸提时间 180 min,浸提温度 75 ℃,乙醇体积分数 90%,液固比 35:1。在此条件下进行重复试验,重复试验值为 0.581%,RSD 1.32%,与预测值较为接近,说明采用响应面法得到的工艺参数可靠,具有一定的实用价值。

[参考文献]

[1] 杨大伟,夏延斌. 脱水黄花菜加工过程中褐变抑制条件的研究[J]. 食品与发酵工业,2003,29(8):48.

[2] 虎玉森,杨继涛,杨鹏. 黄花菜挥发油成分分析[J]. 食品科学,2010,31(12):223.

[3] 蒲金涌,姚晓英,王位泰,等. 陇东地区黄花菜的气候适应性分析及其种植分区[J]. 中国蔬菜,2002(6):20.

[4] 李瑞琴,车宗贤,任惠玲. 甘肃省庆阳市黄花菜产业发展现状及对策探讨[J]. 陕西农业科学,2005(4):78,139.

[5] 何成雄. 萱草花提取液及表皮生长因子对人真皮成纤维细胞增殖的作用[J]. 中华皮肤科杂志,1994,27(4):218.

[6] HATA K, ISHIKAWA K, HORIKI. Differentiation

inducing activities of human leukemia cell line (HL60) by extracts of edible wild plants in Akita[J]. Nat Med, 1998, 52: 269.

[7] 马宏芳,牛雪平,孟双明,等. 正交试验法优选黄花菜中总黄酮的微波提取工艺[J]. 内蒙古大学学报:自然科学版,2010,41(3):297.

[8] 郑辉杰,李志强,刘伟,等. 响应面法优化番茄红素提取工艺研究[J]. 北方园艺,2009(2):5.

[9] 朱珠,冷进松. 响应面分析法优化仙人掌黄酮提取工艺[J]. 食品科学,2010,31(22):485.

[10] 蔡护花,桥永文男. 柑橘果实中柠檬苦素类化合物的研究现状与展望[J]. 植物学报,1996,38(4):328.

[11] 刘晓军. 柑橘加工副产品加工利用[J]. 农产品加工,2007(11):29.

[12] Kaur D, Wani A A, Oberoi D P S, et al. Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology [J]. Food Chem, 2008(2): 711.

[13] 李佳,李国庆,苏力坦,等. 超声波提取短毛怪柳中总黄酮[J]. 生物技术,2008,18(5):38.

[14] 苏雅静,孙爱东,高雪娟. 竹笋壳总黄酮提取工艺的响应面设计优化[J]. 食品工业科技,2010,31(1):233.

[15] 贾长虹,常丽新,赵京,等. 月季果中黄酮的提取及其对自由基清除作用的研究[J]. 食品工业科技,2010,31(1):168.

[责任编辑 全燕]