

响应面法优化葛根总黄酮的超声辅助提取工艺

陈雅维, 张延萍, 周冬菊, 周惠云, 陈丽娜, 尹卫平

(河南科技大学化工与制药学院, 河南 洛阳 471003)

摘要: 为提高葛根总黄酮的得率, 采用响应面试验设计优化超声辅助提取葛根总黄酮的工艺条件。在单因素试验基础上确定以超声时间、料液比及超声温度为3个主要因素, 以总黄酮得率为响应值, 根据 Box-Behnken 原理采用三因素三水平响应面试验设计进行优化。结果表明超声辅助法提取葛根总黄酮的最佳工艺条件为: 以蒸馏水作为超声提取溶剂, 超声时间 43 min、料液比 1:10(g/mL)、超声温度 68℃, 总黄酮得率为 5.28%, 与预测得率 5.36% 相比, 相对误差仅为 1.49%。说明该模型可靠, 与实际情况拟合较好。

关键词: 葛根; 总黄酮; 超声辅助提取; 响应面设计

Response Surface Methodology for Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Flavonoids from *Radix Puerariae*

CHEN Ya-wei, ZHANG Yan-ping, ZHOU Dong-ju, ZHOU Hui-yun, CHEN Li-na, YIN Wei-ping
(College of Chemical Engineering and Pharmaceutical Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: Response surface methodology was employed to optimize the ultrasound-assisted extraction of flavonoids from *Radix Puerariae*. The effects of extraction time, solid-to-liquid ratio, and temperature on the extraction yield of flavonoids were studied by one-factor-at-a-time method. A regression model for the yield of flavonoids was established using a Box-Behnken design involving the above three factors at three levels. The results showed that the optimal extraction conditions were as follows: distilled water as extraction solvent, extraction time of 43 min, solid-to-liquid ratio of 1:10 (g/mL), and temperature of 68 °C. Under these conditions, the observed yield of flavonoids was 5.28% in comparison with the predicted yield of 5.36%, and the relative error was only 1.49%, suggesting that the optimal extraction conditions are reliable.

Key words: *Radix Puerariae*; flavonoids; ultrasound-assisted extraction; response surface methodology (RSM)

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)14-0041-04

葛根为豆科植物野葛(*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi) 的干燥根^[1], 在我国分布广泛, 河北、河南、山东、安徽、江苏、江西等地均有分布, 尤以河南、湖南、浙江、四川等地盛产。葛根含多种黄酮类成分, 主要活性成分为大豆素、大豆甙、葛根素、葛根素-7-木糖甙等^[2], 具有抗氧化、抑菌、抗癌等作用, 能够防治骨质疏松, 对气管炎、冠心病以及妇科疾病有一定的疗效^[3-4], 并且具一定的解酒保肝作用^[5]。目前各种葛根类的保健食品、饮料^[6-8]不断涌现, 因此对葛根有效成分的提取及纯化分离研究具有积极意义。

葛根黄酮类物质的提取方法包括传统的醇回流法、浸渍法、渗漉法以及近年不断发展的微波辅助提取法、超临界提取法、超声辅助提取法等^[9-11]。其中,

利用超声波产生的强烈振动、高加速度、强烈的空化效应、搅拌作用等^[12], 可加速药物有效成分进入溶剂, 缩短提取时间, 并且避免高温对提出成分的影响, 有利于提高黄酮类物质的得率。本实验采用超声辅助提取法, 应用响应面试验设计优化超声温度、时间及料液比等各提取工艺条件, 以期为葛根的高效利用提供可靠的参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

葛根购于药房, 用粉碎机粉碎后过 40 目筛备用。葛根素标准品 中国食品药品检定研究院。95% 乙醇、蒸馏水、正丁醇等其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2011-07-09

作者简介: 陈雅维(1983—), 女, 助教, 硕士, 研究方向为天然产物分离提取。E-mail: yaweichen@yahoo.cn

1.2 仪器与设备

JA3003 型电子天平 上海天平仪器厂; KQ-250 型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; UV-2000 型紫外-可见分光光度计 尤尼柯仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 总黄酮标准曲线的绘制

精密称量葛根素标准品适量, 置于 25mL 的容量瓶中, 加 95% 乙醇定容, 即配制成质量浓度 0.2mg/mL 的葛根素标准品溶液。分别精密吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 置于 10mL 容量瓶中, 加 95% 乙醇定容。以 95% 乙醇为空白对照, 在波长 250nm 处测定吸光度, 并绘制吸光度和质量浓度的标准曲线。

1.3.2 单因素试验^[13-14]

1.3.2.1 溶剂种类对于葛根总黄酮得率的影响

称取 5.00g 葛根, 分别按照料液比 1:10(g/mL) 加入相应量的不同溶剂, 于室温下用超声清洗器处理 30min, 取样, 用紫外分光光度计在波长 250nm 处测定吸光度。不同溶剂种类及配比分别为 95% 乙醇、60% 乙醇、50% 乙醇、40% 乙醇、乙酸乙酯、丙酮、正丁醇、蒸馏水、乙醇与乙酸乙酯混合(9:1, V/V)、乙醇与乙酸乙酯混合(1:9, V/V)、乙醇与正丁醇混合(9:1, V/V)、乙醇与正丁醇混合(1:9, V/V)。

1.3.2.2 超声时间对葛根总黄酮得率的影响

称取 5.00g 葛根, 按照料液比 1:10 加入相应量的蒸馏水, 分别于室温下用超声清洗器处理 5、20、30、45、60min。取样, 用紫外分光光度计在波长 250nm 处测定吸光度。

1.3.2.3 料液比对于葛根总黄酮得率的影响

称取 5.00g 葛根, 分别按照料液比 1:6、1:8、1:10、1:12、1:14、1:18 加入相应体积的蒸馏水, 于室温下用超声清洗器处理 45min。取样, 测定吸光度。

1.3.2.4 超声温度对于葛根总黄酮得率的影响

称取 5.00g 葛根, 按照料液比 1:8 加入相应量的蒸馏水, 分别于 40、60、65、70、75℃, 用超声清洗器处理 45min。取样, 测定吸光度。

1.3.3 响应面优化试验设计

在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken 原理, 以总黄酮得率为响应值, 采用超声时间、料液比、超声温度为三因素进行三水平的试验设计, 具体设计方案见表 1^[15-18]。

2 结果与分析

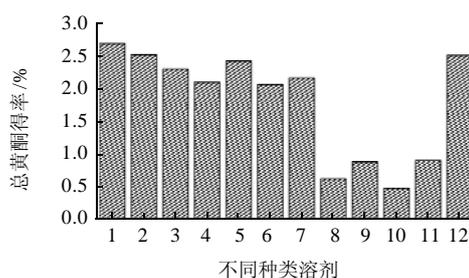
2.1 总黄酮标准曲线方程

以吸光度为横坐标、葛根素质量浓度为纵坐标, 得线性回归方程为: $y = -0.0004 + 0.0114x (R^2 = 0.9968)$

式中: y 为质量浓度/(mg/mL); x 为吸光度。结果表明, 葛根素质量浓度在 0.002~0.014mg/mL 范围内, 线性关系良好。

2.2 单因素试验

2.2.1 溶剂种类对于葛根总黄酮得率的影响



1. 95% 乙醇; 2. 60% 乙醇; 3. 50% 乙醇; 4. 40% 乙醇; 5. 蒸馏水; 6. 丙酮; 7. 乙醇-乙酸乙酯混合(9:1, V/V); 8. 乙醇-乙酸乙酯混合(1:9, V/V); 9. 乙醇-正丁醇混合(9:1, V/V); 10. 乙醇-正丁醇混合(1:9, V/V); 11. 乙醇与丙酮混合(V/V, 1:9); 12. 乙醇与丙酮混合(9:1, V/V)。

图 1 不同溶剂对总黄酮得率的影响

Fig.1 Effect of various solvents on the yield of flavonoids

由图 1 可知, 使用不同种类的溶剂进行超声法提取葛根, 所得的提取液中总黄酮得率差异较大。根据相似相溶原理, 溶剂极性与黄酮类物质极性相近可达到较大溶出, 不同溶剂提取所得的黄酮组分组成也有所差别。乙醇与水的复合溶剂提取所得的总黄酮得率明显高于乙醇与正丁醇、乙酸乙酯及丙酮所配制的复合溶剂。单一溶剂丙酮用于提取也可取得较高得率, 但考虑到丙酮毒性较大, 弃之不用。而蒸馏水在超声场的强化下充分溶出了水溶性黄酮类物质, 同时促进脂溶性黄酮类物质的溶出, 使得总黄酮得率可达 2.42%, 与 95% 乙醇为溶剂的得率 2.69% 相比差别不大, 且蒸馏水具有廉价易得、对环境无污染、操作方便等优点, 因此选用蒸馏水作为超声辅助法提取葛根的溶剂。

2.2.2 超声时间对于葛根总黄酮得率的影响

由图 2 可知, 随着超声时间的延长, 总黄酮得率呈现先增大后减小的变化趋势。可能是由于超声时间过长会增加黄酮类物质在空气中的氧化时间, 使得其结构被破坏, 从而导致总黄酮得率减少, 并且影响到总黄酮的质量。因此, 选择 40min 作为超声辅助法提取葛根的较优时间。

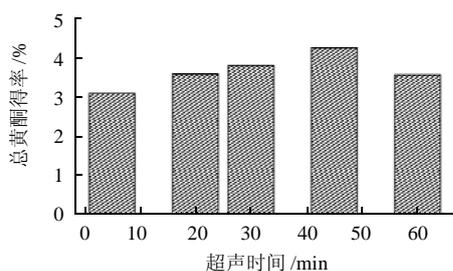


图2 超声时间对总黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of ultrasound-assisted extraction time on the yield of flavonoids

2.2.3 料液比对葛根总黄酮得率的影响

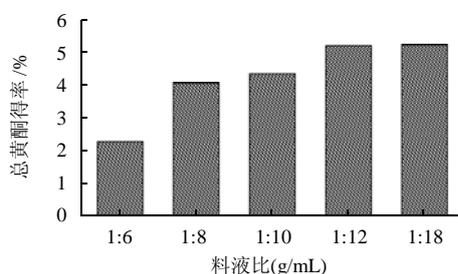


图3 料液比对总黄酮得率的影响

Fig.3 Effect of solid-to-liquid ratio on the yield of flavonoids

由图3可知：随着料液比降低，总黄酮得率呈现增加的趋势。这说明提取溶剂的体积增大，提高了药材与溶液中黄酮类物质的浓度梯度，增大了扩散速度，有利于有效成分的溶出。当料液比从1:8变化至1:10时，总黄酮得率没有显著增大，说明可能药材与溶剂边界层浓度差减小，扩散基本达到平衡。而当料液比变化至1:12时，提取液中总黄酮得率有所增大，溶剂体积过大，虽然使得提取液中总黄酮质量增大，但是提取液浓度过小，会使得后续的浓缩操作消耗大量能量，不利于工业化生产。综合考虑，选择1:8作为超声辅助法提取葛根的较优料液比。

2.2.4 温度对于葛根总黄酮得率的影响

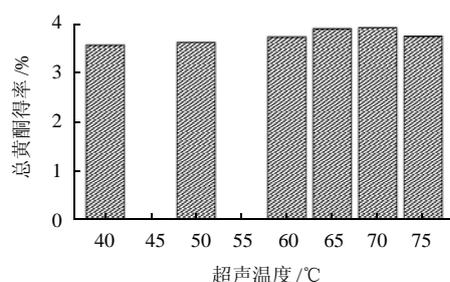


图4 超声温度对总黄酮得率的影响

Fig.4 Effect of ultrasound-assisted extraction temperature on the yield of flavonoids

由图4可知，随着超声温度的升高，提取液中总黄酮得率呈现先增大后减小的变化趋势。可能有益于温度的升高，使得黄酮类物质在溶液中的溶解度增大，促进了有效成分的溶出。但是温度过高，会使得黄酮类物质氧化加剧，结构被破坏，导致总黄酮质量减少。因此，选择70°C作为超声辅助法提取葛根总黄酮的较优温度。

2.3 葛根总黄酮的超声辅助提取工艺优化

在单因素试验的基础上，选择超声时间、料液比、超声温度作为自变量，以总黄酮得率作为变量，采用Box-Behnken原理对葛根总黄酮的超声辅助提取工艺进行响应面试验优化，试验设计及结果见表1。

2.3.1 回归模型的建立及方差分析

表1 葛根总黄酮的超声辅助提取工艺响应面试验设计及结果
Table 1 Scheme and experimental results of response surface design

| 试验号 | A 超声时间/min | B 料液比(g/mL) | C 超声温度/°C | Y 总黄酮得率/% |
|-----|------------|-------------|-----------|-----------|
| 1 | 30 | 1:8 | 65 | 4.60 |
| 2 | 60 | 1:8 | 65 | 4.12 |
| 3 | 30 | 1:8 | 75 | 3.95 |
| 4 | 60 | 1:8 | 75 | 4.17 |
| 5 | 30 | 1:6 | 70 | 3.45 |
| 6 | 30 | 1:10 | 70 | 5.22 |
| 7 | 60 | 1:6 | 70 | 2.96 |
| 8 | 60 | 1:10 | 70 | 5.00 |
| 9 | 45 | 1:6 | 65 | 2.48 |
| 10 | 45 | 1:6 | 75 | 3.13 |
| 11 | 45 | 1:10 | 65 | 5.33 |
| 12 | 45 | 1:10 | 75 | 5.16 |
| 13 | 45 | 1:8 | 70 | 4.47 |
| 14 | 45 | 1:8 | 70 | 4.55 |
| 15 | 45 | 1:8 | 70 | 4.49 |

通过Design Expert软件处理数据，将响应值与各个因素进行回归拟合，可得回归模型为：

$$Y = -8.0476 - 0.10491A + 0.618475B + 0.33381C + 0.002227AB + 0.002317AC + 0.00474BC - 0.00092A^2 - 0.03565B^2 - 0.0036C^2$$

表2 回归方程方差分析

Table 2 Variance analysis of the developed regression equation for the yield of flavonoids

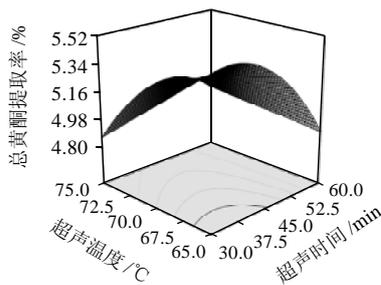
| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均值 | F值 | P值 |
|----------------|------|-----|------|---------|----------|
| 模型 | 8.03 | 9 | 0.90 | 151.94 | < 0.0001 |
| A | 0.12 | 1 | 0.12 | 19.65 | 0.0068 |
| B | 7.38 | 1 | 7.38 | 1255.96 | < 0.0001 |
| C | 0.16 | 1 | 0.16 | 26.68 | 0.0036 |
| AB | 0.02 | 1 | 0.02 | 3.04 | 0.1417 |
| AC | 0.12 | 1 | 0.12 | 20.58 | 0.0062 |
| BC | 0.01 | 1 | 0.01 | 1.53 | 0.2710 |
| A ² | 0.16 | 1 | 0.16 | 27.15 | 0.0034 |
| B ² | 0.08 | 1 | 0.08 | 12.79 | 0.0159 |
| C ² | 0.03 | 1 | 0.03 | 5.09 | 0.0736 |
| 残差 | 0.03 | 5 | 0.01 | | |
| 失拟 | 0.03 | 3 | 0.01 | 8.10 | 0.1119 |
| 总差 | 8.06 | 14 | | | |

由表 2 可知, 该模型 $P < 0.0001$, 回归模型方程的 $R^2 = 0.9455 > 0.9$, 说明模型影响显著, 对数据进行了很好的拟合, 试验方法可靠。模型失拟不显著, 说明模型可以用于实际值的预测。一次项中料液比 $P < 0.0001$, 达到极其显著水平。超声时间及温度的 $P < 0.05$, 达到显著水平。交互项中超声时间及温度的交互影响较显著。二次项中, A^2 项及 B^2 项影响显著。其余项影响均不显著。依据系数估计值及各因素 P 值, 可知选定的因素对于葛根总黄酮得率的影响大小顺序依次为料液比 > 超声温度 > 超声时间。剔除影响不显著的交互项及二次项, 可得优化模型方程为:

$$Y = 6.25409 - 0.089869A + 1.02278B - 0.13227C + 0.00231733AC - 0.000892786A^2 - 0.033919B^2$$

2.3.2 响应面分析及工艺优化

交互项中只有 AC 项(超声时间及超声温度交互项)影响显著, 因此根据回归模型绘制出 AC 交互项影响的响应面及等高线图。



固定水平: 料液比 1:8(g/mL)。

图 5 超声时间及温度对于总黄酮得率交互影响的响应面及等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots showing the effects of extraction time and temperature on the yield of flavonoids

由图 5 可知, 当固定料液比后, 通过响应面图可以清晰地观察到总黄酮得率随着超声温度及超声时间变化的趋势, 并且超声温度及时间的影响显著。随着超声时间的延长, 总黄酮得率呈现先增大后减小的趋势。随着超声温度的升高, 总黄酮得率呈现先快速增大后趋于平稳的变化趋势。当超声温度 65~70℃、超声时间 40~45min 时, 总黄酮得率较高。

通过 Design Expert 软件分析, 可得超声辅助法提取葛根总黄酮的最佳工艺条件为超声时间 42.75min、料液比 1:9.96(g/mL)、超声温度 67.70℃, 预测总黄酮得率 5.36%。为了便于试验操作, 选取超声时间 43min、料液比 1:10、超声温度 68℃, 在此条件下平行实验 3 次, 测得平均总黄酮得率为 5.28%, 相对误差 1.49%。说明该模型与实际情况拟合较好, 模型可靠。

3 结论

在单因素试验的基础上, 利用 Design Expert 软件, 采用 Box-Behnken 原理进行试验设计, 建立了超声辅助法提取葛根总黄酮得率的模型方程: $Y = 6.25409 - 0.089869A + 1.02278B - 0.13227C + 0.00231733AC - 0.000892786A^2 - 0.033919B^2$ 。通过回归计算, 得到超声辅助法提取葛根总黄酮的最优工艺参数: 超声时间 43min、料液比 1:10(g/mL)、超声温度 68℃, 此条件下总黄酮得率为 5.28%。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 312-313.
- [2] 杨东晖, 陈浪, 曾志, 等. 葛根化学成分的研究[J]. 华南师范大学学报: 自然科学版, 2002(4): 94-97.
- [3] 崔苏镇, 彭学莲. 葛根的药理作用研究概况[J]. 时珍国药研究, 1998, 9(3): 279-280.
- [4] 华辉, 郭勇. 黄酮类化合物药理研究进展[J]. 广东药学, 1999, 9(4): 9-12.
- [5] 蒲自和, 王宁. 葛根的药理学研究进展[J]. 西北药学杂志, 2000, 15(2): 81-83.
- [6] 祝冬青, 孔庆新. 葛根保健黄酒的酿造工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(4): 98-101.
- [7] 黄亚东, 祝冬青. 葛根醒酒保肝饮料的开发研究[J]. 酿酒科技, 2008(7): 114-116.
- [8] 李燕燕, 边宝林, 杨健, 等. 葛根丹参胶囊成型工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(4): 22-23.
- [9] 公衍玲, 黄山, 于慧荣. 葛根提取方法的比较研究及其工艺条件优化[J]. 青岛科技大学学报: 自然科学版, 2009, 30(5): 415-417.
- [10] 刘敏彦, 董超, 高秀强, 等. 中药葛根提取工艺研究[J]. 中国药业, 2008, 17(3): 24-25.
- [11] 罗志强, 孙术国, 黄静, 等. 微波辅助萃取葛根粉中葛根素工艺研究[J]. 中国食物与营养, 2009(9): 41-44.
- [12] 郭孝武. 一种提取中草药化学成分的方法: 超声提取法[J]. 天然产物研究与开发, 1998, 11(3): 37-40.
- [13] 王淑霞, 李爱梅, 张俊杰, 等. 响应面分析法优化龙眼核中多酚物质提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(10): 35-39.
- [14] VIROT M, TOMAO V, BOURVELLEC C L, et al. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2010, 17(6): 1066-1074.
- [15] ZOU Yu, XIE Chunyan, FAN Gongjian, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin from *Auricularia auricular* fruit bodies[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010, 11(4): 611-615.
- [16] KHAJEH M. Optimization of microwave-assisted extraction procedure for zinc and copper determination in food samples by Box-Behnken design[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2009, 22(4): 343-346.
- [17] LIM J Y, HYANG S Y, KWANG Y K, et al. Optimum conditions for the enzymatic hydrolysis of citron waste juice using response surface methodology (RSM)[J]. Food Science Biotechnology, 2010, 19(5): 1135-1142.
- [18] GAO Yuntao, FU Yanli, WANG Chen, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from tartary buckwheat seedling by response surface methodology[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 28-32.