

响应面法优化八宝景天叶总黄酮的 超声提取工艺

吴现芳,赵成爱*,余梅燕,杨琳琳,徐伟强

(吉林农业大学资源与环境学院,吉林长春 130118)

摘要:利用响应面分析法优化八宝景天叶中总黄酮的超声提取工艺。以总黄酮提取率为评价指标,在考察单因素实验的基础上,利用 Box-Behnken 响应面分析法确定最佳提取工艺条件。八宝景天叶中总黄酮的最佳提取工艺条件为:乙醇浓度 72%,液料比 21:1 mL/g,超声温度为 64℃,超声时间 48 min;在此条件下总黄酮的提取率为 3.116%。响应面优化得到的提取工艺稳定合理,准确可靠,是提取八宝景天叶中总黄酮的可行方法。

关键词:八宝景天,总黄酮,提取工艺,响应面法

Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from leaves of *Sedum spectabile* Boreau by response surface methodology

WU Xian-fang, ZHAO Cheng-ai*, YU Mei-yan, YANG Lin-lin, XU Wei-qiang

(College of Resources and Environment, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Response surface analysis methodology was used to optimize the extraction technology of total flavonoids from *Sedum spectabile* Boreau leaves. The total flavonoids were extracted using ultrasonic assisted ethanol extraction. On the basis of single factor, Box-Behnken response surface methodology was employed for selecting the optimum extraction process by the indexes of the contents of total flavonoids from *Sedum spectabile* Boreau leaves. Total flavonoids of optimum extraction conditions were as follows, 72% of the ethanol concentration, liquid-solid ratio of 21:1, ultrasonic temperature of 64℃, ultrasonic time 48 min. Under these conditions, the total flavonoids extraction was 3.116%. The extraction process obtained by response surface methodology was stable and reasonable, accurate and reliable. It was a feasible method to extract the total flavonoids from *Sedum spectabile* Boreau leaves.

Key words: *Sedum spectabile* Boreau; total flavonoids; extraction process; response surface methodology

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)01-0224-05

八宝景天 (*Sedum spectabile* Boreau), 又名蝎子草、华丽景天、长药景天等^[1], 俗称八宝、胡豆七、活血三七, 系景天科景天属植物, 以全草入药, 全年可采, 多鲜用。其性平、味苦、微酸, 具有祛风除湿、活血化痰、止血止痛和清热解毒的功效^[2]。研究表明景天属植物中含有丰富的营养物质, 如生物碱、甾体、鞣质、黄酮、缩合单宁和生氰化合物等^[3]。其中黄酮类有效成分在清热解毒、抗氧化、抑菌、抗癌等方面有显著效果^[4]。目前八宝景天主要作为观赏植物用于园林绿化, 对其较高的药用价值研究较少, 对八宝景天叶尤其是总黄酮的研究更少。因此, 本文旨在研究八宝景天叶中总黄酮的提取工艺, 为八宝景天叶的进一步开发利用提供理论依据和技术支持^[5]。近年来, 超声技术已普遍应用于提取植物中生物活性物质, 它具有能耗低、效率高、不破坏有效成分等特点, 但超声技术应用于提取八宝景天叶中黄酮类物质的研

究尚未见报道^[6]。本文研究了影响八宝景天叶总黄酮超声提取效果的各因素, 并通过响应面分析法, 确定了最佳提取工艺条件, 为进一步开发利用八宝景天叶的药用价值提供了可靠依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

八宝景天 (*Sedum spectabile* Boreau) 叶 采自吉林农业大学植物园, 干燥、粉碎, 密封备用; 芦丁标准品 (含量 ≥ 95%) 国药集团化学试剂有限公司; 亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、乙醇等 均为分析纯。

JFSD-100 粉碎机 上海淀久中药机械制造有限公司; KQ5200B 型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; RE-2000 旋转蒸发器、SHZ-III 型循环水真空泵 上海亚荣生化仪器厂; 722E 型光栅分光光度计 山东高密彩虹分析仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的绘制方法 准确称取 120℃ 下干燥至恒重的芦丁标准品 10.00 mg, 用适量 70% 乙醇充分溶解, 转移至 50 mL 容量瓶中, 用 70% 乙醇定容至

收稿日期: 2012-06-07 * 通讯联系人

作者简介: 吴现芳 (1984-), 女, 硕士, 研究方向: 天然产物化学。

刻度,摇匀制成浓度为 0.2mg/mL 的标准品溶液。精密量取该标准品溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mL 于 10mL 比色管中,加 5% 亚硝酸钠水溶液 0.30mL,摇匀,放置 6min;加 10% 硝酸铝 0.30mL,摇匀,放置 6min;再加 4% 氢氧化钠 4.00mL,摇匀,用蒸馏水定容至刻度,摇匀,放置 15min,以相应试剂为空白,在 510nm 处测定吸光度^[7]。以浓度 C 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.2 八宝景天叶总黄酮的测定方法 将新鲜的八宝景天叶烘干,粉碎并过 60 目筛,用实验设定的提取条件进行超声提取。提取液趁热减压抽滤,滤液定容,即得供试品溶液。精密量取 1.0mL 供试品溶液于 10mL 比色管中,按 1.2.1 项方法平行测定三次,计算总黄酮提取率。

$$\text{总黄酮提取率}(\%) = \frac{C \times V_1 \times V_3}{V_2 \times m} \times 100$$

式中:C 为比色管中测量液的总黄酮浓度,mg/mL;V₁ 为测量液的定容体积,10mL;V₂ 为测量时量取的体积,1.0mL;V₃ 为提取液的定容体积,50mL;m 为八宝景天叶干粉的质量,1000mg。

1.2.3 超声波辅助提取总黄酮的单因素实验 分别选取不同的乙醇浓度、液料比、超声时间和超声温度进行单因素实验,考察各单因素对八宝景天叶总黄酮提取率的影响。

1.2.4 响应面分析法优化总黄酮的提取条件 在单因素实验的基础上,进一步考察乙醇浓度、液料比、超声温度和超声时间对八宝景天叶总黄酮提取效果的影响,利用 Design Expert 7.0.0 软件,根据中心组合实验设计原理,以总黄酮提取率为响应值,采用四因素三水平的响应面分析法,对超声提取条件进行优化,因素水平安排见表 1。

表 1 响应面实验因素及水平

Table 1 Factors and levels in response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
A 乙醇浓度(%)	60	70	80
B 液料比(mL/g)	15:1	20:1	25:1
C 超声温度(°C)	50	60	70
D 超声时间(min)	30	40	50

2 结果与分析

2.1 标准曲线

标准曲线如图 1 所示。回归方程为: A = 11.779C + 0.0072, R² = 0.9996, 表明芦丁在 0.01 ~ 0.06mg/mL 范围内线性关系良好。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响 在液料比 20:1, 超声温度 40°C, 超声时间 20min 的条件下, 分别研究乙醇浓度 50%、60%、70%、80%、90%、95% 对总黄酮提取率的影响, 结果见图 2。

由图 2 可知, 随着乙醇浓度的增大, 黄酮提取率增高, 当乙醇浓度为 70% 时, 达到最高, 超过 70% 后, 提取率有所下降。可能是因为乙醇浓度过高, 一些醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分溶出量增加, 这些成分与黄酮类化合物竞争乙醇, 从而导致总黄酮

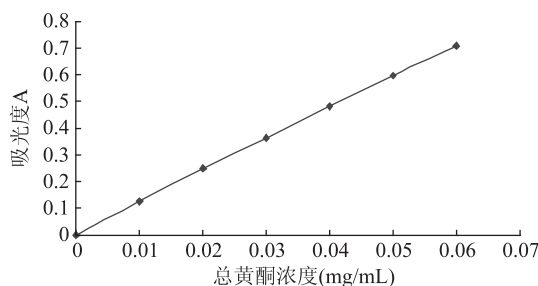


图 1 芦丁标准曲线

Fig.1 Standard curve of rutin

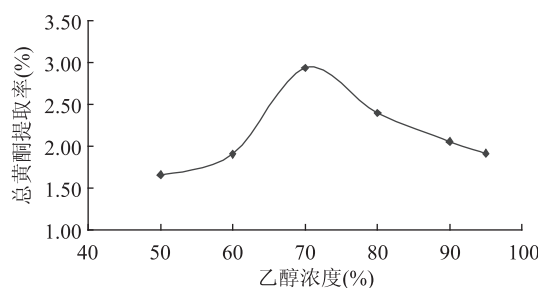


图 2 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

Fig.2 Effect of concentration of ethanol on extraction of total flavonoids

提取率下降^[8]。因此,乙醇浓度以 70% 为宜。

2.2.2 液料比对总黄酮提取率的影响 在乙醇浓度 70%, 水浴 40°C, 超声 20min 的条件下, 分别研究液料比 10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1 mL/g 对八宝景天叶总黄酮提取率的影响, 结果见图 3。

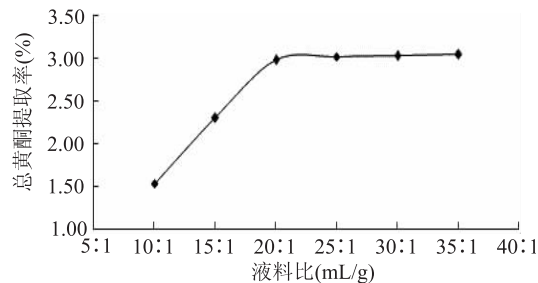


图 3 液料比对总黄酮提取率的影响

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

由图 3 可知, 当液料比小于 20:1 时, 随液料比的增加, 总黄酮提取率明显增大, 超过 20:1 时, 再增大液料比, 提取率趋于稳定。可能因为 20:1 的溶剂已将黄酮类成分基本溶出完全, 综合考虑黄酮提取率、溶剂用量、能量损耗等因素, 故选择液料比 20:1 为宜。

2.2.3 超声温度对八宝景天叶总黄酮提取率的影响 在乙醇浓度 70%, 液料比 20:1, 超声 20min 的条件下, 分别研究水浴超声温度 30、40、50、60、70、80°C 对八宝景天叶总黄酮提取率的影响, 结果见图 4。

由图 4 可知, 随着温度升高, 提取率增高, 在 60°C 达到最大值, 随着温度继续升高, 提取率下降。通常情况下, 温度升高能加快分子的运动速度和渗透扩散能力, 加快物质的溶出率, 但是过高的温度会氧化破坏黄酮类化合物结构, 导致其提取率下降, 所

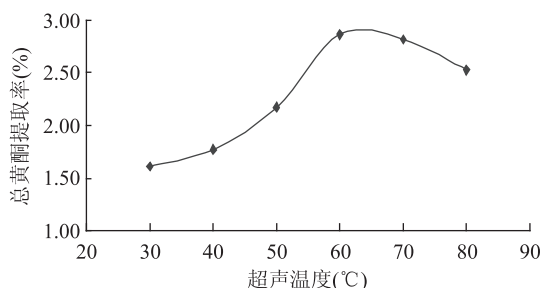


图4 超声温度对总黄酮提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic extraction temperature on the yield of total flavonoids

以选 60℃ 为宜。

2.2.4 超声时间对八宝景天叶总黄酮提取率的影响

在乙醇浓度 70%、液料比 20:1、60℃ 水浴的条件下,分别研究超声 10、20、30、40、50、60min 对八宝景天叶总黄酮提取率的影响,结果见图 5。

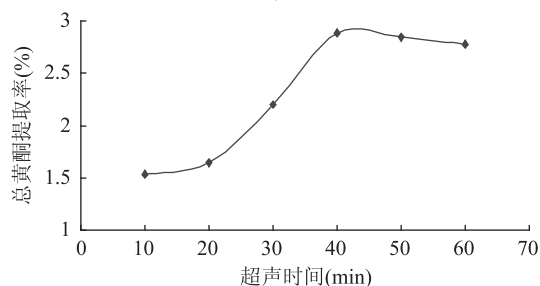


图5 超声时间对总黄酮提取率的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic extraction time on the yield of total flavonoids

由图 5 可知,黄酮提取率在超声 10min 时较低,40min 时明显增高,此后再延长超声时间,提取率稍有下降。可能由于长时间超声波处理,溶液温度逐渐上升,影响了黄酮类化合物的稳定性,导致提取率下降。从节约时间上考虑,选 40min 为宜。

2.3 响应面分析实验

2.3.1 实验设计及结果 综合单因素实验结果,以乙醇浓度、液料比、超声温度和超声时间为影响因素,以总黄酮提取率为响应值进行响应面分析实验^[9],实验设计及结果见表 2。

采用 Design expert 7.0.0 软件对表 2 中实验结果进行多项拟合回归,得到总黄酮提取率对乙醇浓度、液料比、超声温度和超声时间的二次多项回归模型:

$$Y = 3.0604 + 0.0983A + 0.0801B + 0.00192C + 0.0963D + 0.0748AB - 0.0405AC + 0.0415AD + 0.0835BC + 0.0565BD + 0.0293CD - 0.319A^2 - 0.303B^2 - 0.0501C^2 - 0.0861D^2$$

2.3.2 响应面结果分析 为了检验回归方程的有效性,进一步确定各因素对总黄酮提取率的影响程度,对回归模型进行了方差分析,结果见表 3。

由表 3 可知,模型的 $p < 0.0001$,差异极显著;失拟项的 p 值为 0.5549,不显著,决定系数 $R^2 = 0.9648$,响应值的变化有 96.48% 来源于所选因素,即来源于乙醇浓度、液料比、超声温度和超声时间。表明此模型拟合度较好,回归方程能很好的描述各因素与响

应值之间的关系,该实验方法可靠^[10]。

表2 响应面分析实验设计及结果

Table 2 Response surface design arrangement and experimental results

实验号	A	B	C	D	总黄酮提取率 Y(%)
1	0	1	0	-1	2.608
2	0	0	0	0	2.979
3	-1	-1	0	0	2.316
4	1	0	0	1	2.857
5	0	0	0	0	3.102
6	0	-1	1	0	2.603
7	-1	0	1	0	2.629
8	-1	1	0	0	2.378
9	0	1	-1	0	2.621
10	0	0	0	0	3.107
11	0	0	1	-1	2.765
12	0	0	0	0	3.008
13	0	1	1	0	2.863
14	1	1	0	0	2.677
15	1	-1	0	0	2.316
16	-1	0	0	1	2.595
17	1	0	1	0	2.809
18	0	-1	0	-1	2.545
19	0	1	0	1	2.968
20	0	0	-1	1	2.992
21	1	0	0	-1	2.608
22	-1	0	-1	0	2.549
23	0	0	1	1	2.988
24	1	0	-1	0	2.891
25	0	0	-1	-1	2.886
26	0	-1	0	1	2.679
27	0	0	0	0	3.106
28	0	-1	-1	0	2.695
29	-1	0	0	-1	2.512

回归模型一次项 A 和 D 的 p 值均小于 0.0001,表明其对总黄酮提取率影响极显著,B 的 p 值小于 0.01,表明其对总黄酮提取率影响高度显著;交互项 AB 和 BC 影响显著,其余不显著;二次项 A^2 、 B^2 、均达到极显著水平, D^2 强显著, C^2 不显著。表明各因素对总黄酮提取率存在交互影响,而不是简单的线性关系^[11]。响应曲面图可以形象地描述各因素之间的相互作用,如图 6~图 11 所示。

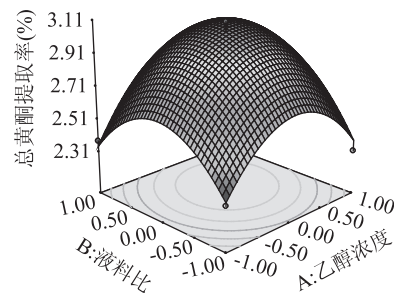


图6 乙醇浓度和液料比对总黄酮提取率的交互影响

Fig.6 Effect of concentration of ethanol and liquid-to-material ratio on the yield of total flavonoids

响应曲面坡度越陡峭,表明响应值对于操作条件的改变越敏感;反之曲面坡度越平缓,操作条件的

表3 回归模型方差分析结果
Table 3 ANOVA for response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p	显著性
模型	1.46	14	0.1	27.4	<0.0001	***
A	0.12	1	0.12	30.48	<0.0001	***
B	0.077	1	0.077	20.25	0.0005	**
C	4.41×10^{-5}	1	4.41×10^{-5}	0.012	0.9158	
D	0.11	1	0.11	29.26	<0.0001	***
AB	0.022	1	0.022	5.88	0.0294	*
AC	6.56×10^{-3}	1	6.56×10^{-3}	1.73	0.21	
AD	6.89×10^{-3}	1	6.89×10^{-3}	1.81	0.1996	
BC	0.028	1	0.028	7.34	0.017	*
BD	0.013	1	0.013	3.36	0.0881	
CD	3.42×10^{-3}	1	3.42×10^{-3}	0.9	0.3587	
A ²	0.66	1	0.66	174.06	<0.0001	***
B ²	0.59	1	0.59	156.54	<0.0001	***
C ²	0.016	1	0.016	4.28	0.0575	
D ²	0.048	1	0.048	12.65	0.0032	**
残差	0.053	14	3.80×10^{-3}			
失拟项	0.038	10	3.79×10^{-3}	0.99	0.5549	
纯误差	0.015	4	3.84×10^{-3}			
总离差	1.51	28				
		R ²	0.9648			
		R ² _{Adj}	0.9296			

注: *** 差异极显著 $p < 0.0001$; ** 差异高度显著 $0.0001 < p < 0.01$; * 差异显著 $0.01 < p < 0.05$ 。

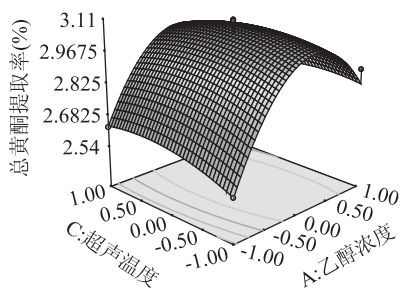


图7 乙醇浓度和超声温度对总黄酮提取率的交互影响
Fig.7 Effect of concentration of ethanol and ultrasonic extraction temperature on the yield of total flavonoids

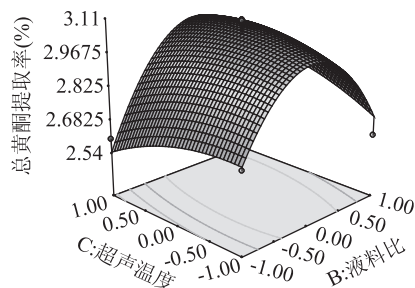


图9 液料比和超声温度对总黄酮提取率的交互影响
Fig.9 Effect of liquid-to-material ratio and ultrasonic extraction temperature on the yield of total flavonoids

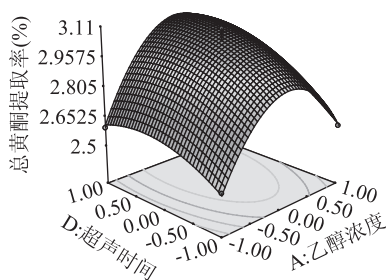


图8 乙醇浓度和超声时间对总黄酮提取率的交互影响
Fig.8 Effect of concentration of ethanol and ultrasonic extraction time on the yield of total flavonoids

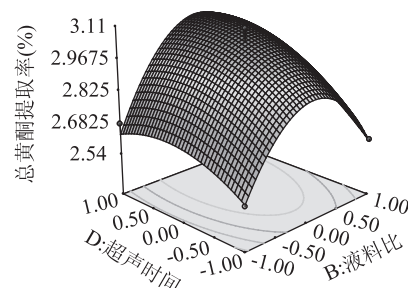


图10 液料比和超声时间对总黄酮提取率的交互影响
Fig.10 Effect of liquid-to-material ratio and ultrasonic extraction time on the yield of total flavonoids

改变对响应值的影响也就越小^[12]。图6~图11直观地反映了各因素交互作用对响应值的影响,乙醇浓度和液料比、液料比和超声温度交互作用曲面陡峭,表明其对总黄酮提取率的交互作用明显。

通过响应面分析优化,Design expert 7.0.0 软件对回归方程进行计算,得到超声提取八宝景天叶总黄酮的最佳工艺条件为:乙醇浓度 72.12%,液料比

21.42:1mL/g,超声温度 63.98℃,超声时间 47.71min;在此条件下模型预测总黄酮提取率为 3.12%。考虑到实际操作条件的局限性,对最佳工艺条件进行如下修正:乙醇浓度 72%,液料比 21:1mL/g,超声温度为 64℃,超声时间 48min。根据此条件进行了 3 次平行验证实验,结果八宝景天叶中总黄酮的平均提取

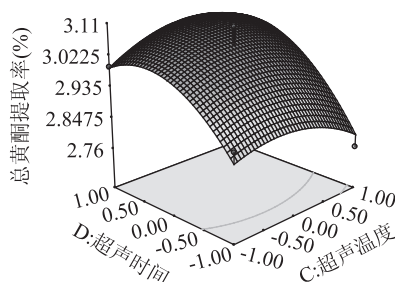


图11 超声温度和超声时间对总黄酮提取率的交互影响

Fig.11 Effect of ultrasonic extraction temperature and ultrasonic extraction time on the yield of total flavonoids

率为 3.116%，与模型预测值一致（相对误差 0.11%）。说明实验结果与模型拟合良好，利用响应面分析法优化得到的超声提取工艺参数准确可靠，具有可行性。

3 结论

八宝景天叶中含有丰富的黄酮类化合物，具有很好的药用价值和开发利用前景。本实验以干燥的八宝景天叶粉末为原料，以乙醇为提取溶剂，采用超声波辅助提取技术，在单因素实验基础上，用响应面实验对其提取工艺参数进行优化。结果表明最佳的操作条件为：乙醇浓度为 72%，液料比 21:1 mL/g，超声温度为 64℃，超声时间 48 min。优化得到的最佳提取工艺是提取八宝景天叶黄酮类化合物的有效途径，为进一步开发其药用成分提供了可靠依据。

（上接第 220 页）

无锡：江南大学报，2005。

[9] Takayo S, Toshiroh H, Yutaka M. Distribution of free amino acids in the rice kernel and kernel fractions and the effect of water soaking on the distribution[J]. Agric Food Chem, 1994, 42(5): 1122-1125.

[10] Perer L, Kenneth M. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with O-phthalaldehyde[J]. Analytical Chemistry, 1979, 51(11): 1667-1674.

[11] 盖钧镒. 实验统计方法[M]. 北京：中国农业出版社，

（上接第 223 页）

容易去除，通过进一步的研究优化工艺，可以作为工业提取的有效方法。但是要在菠萝蜜产区进行粗酶的加工生产，由于目前还缺乏更多的有关规模化提取菠萝蜜蛋白酶的工艺技术，且本工艺还存在一些未完善的地方，因此有待进行更深入的研究。

参考文献

[1] 毛琪, 叶春海, 李应志, 等. 菠萝蜜研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(3): 439-443.

[2] 焦凌梅. 菠萝蜜营养成分与开发利用价值[J]. 广西热带农业, 2010(1): 17-19.

[3] 方焕, 生吉萍. 工业生产中木瓜蛋白酶的活性检测方法比

参考文献

[1] 陈江霞. 八宝景天及应用领域[J]. 新农业, 2009(11): 46-47.

[2] 万定荣. 垂盆草及其同属(景天属)药用种的民族医疗应用[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(8): 1853-1855.

[3] 韩敬, 赵莉. 景天属植物研究进展[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(11): 2129-2130.

[4] 刘飞, 王鸿飞, 林燕, 等. 费菜总黄酮提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 252-254.

[5] 顾英, 韩凤丽, 王洪洋. 响应面法优化红薯叶类黄酮提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(3): 286-289.

[6] 吕惠卿, 吴晓莉. 木槿花总黄酮超声提取工艺的优化[J]. 中国中医药科技, 2009, 16(6): 461-463.

[7] 苏秀芳, 秦健梅. 超声辅助法提取剑叶龙血树根总黄酮的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 97-100.

[8] 周丽, 李秉超. 草本龙芽中总黄酮提取工艺的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2007, 29(1): 15-17.

[9] 吴冬青, 徐新建, 张丽, 等. 响应面分析法优化竹节草黄酮提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 125-128.

[10] 高蓉, 陈练洪, 李稳宏, 等. 超声法提取化香树果序中黄酮类化合物工艺[J]. 化学工程, 2007, 35(8): 65-67.

[11] 高义霞, 景红艳, 姜祖君, 等. 响应面分析法优化乳苣总黄酮提取工艺的研究[J]. 中药材, 2010, 33(4): 621-624.

[12] 刘奉强, 肖鉴谋, 刘太泽. 应用响应面法优化超声波提取荆芥中总黄酮的工艺[J]. 南昌大学学报: 工科版, 2011, 33(2): 149-155.

2003: 193-297.

[12] 李冰冰, 王玉萍, 顾振新, 等. 发芽糙米与稻谷的谷氨酸脱梭酶活力及 γ -氨基丁酸含量比较[J]. 食品与发酵工业, 2006, 2(5): 28-30.

[13] 孙向东, 任红波, 姚鑫森. 糙米发芽期间生理活性成分 γ -氨基丁酸变化规律研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2006, 1(2): 63-68.

[14] 张晖. 米胚芽谷氨酸脱梭酶性质及其富集 γ -氨基丁酸研究[D]. 无锡：江南大学, 2004

[15] 王允祥, 吕凤霞, 陆兆新. 杯伞发酵培养基的响应曲面法优化研究[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(3): 89-94.

较[J]. 食品与机械, 2000(6): 27-29.

[4] 舒薇, 郭勇. 木瓜凝乳蛋白酶的自水解作用及其对分离纯化的影响[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(1): 80-83.

[5] 李春喜, 姜丽娜, 邵云, 等. 生物统计学[M]. 北京: 科学出版社, 2005.

[6] 苏小建, 梁成钦, 何星存, 等. 罗汉果蛋白酶的提取方法比较[J]. 食品工业科技, 2007, 28(2): 157-159.

[7] 唐晓珍, 黄雪松, 乔聚林, 等. 生姜蛋白酶的工业提取方法比较[J]. 无锡轻工大学学报, 2003(2): 20-21.

[8] 郭冬青, 纪付江, 高健, 等. 无花果蛋白酶的不同提取方法比较及酶学性质研究[J]. 湖北农业科学, 2011(6): 1258-1260.