

响应面分析法优化缬草中黄酮类化合物的提取工艺

卢忠英¹, 陈仕学^{1,*}, 李彦青¹, 姚元勇², 鲁道旺², 邢明明²

(1. 铜仁学院材料与化学工程学院实验中心, 贵州铜仁 554300;

2. 铜仁学院应用化学研究所, 贵州铜仁 554300)

摘要: 本文以产自贵州地区的缬草为实验材料, 以乙醇为浸提试剂, 探究缬草中黄酮类化合物的提取工艺。方法: 在乙醇浓度、料液比、浸提温度和浸提时间四个单因素实验基础上, 采用响应面设计方法优化提取工艺参数。结果表明: 最佳提取工艺为乙醇浓度 53.0%, 料液比 1:29 g/mL, 浸提温度 73 ℃, 浸提时间 2.6 h。在此条件下, 实际得到的黄酮类化合物得率为 2.133%, 与理论提取率相比较, 其 RSD 为 3.5%。结论: 响应面法优化的缬草中黄酮类化合物提取工艺稳定, 具有可靠性。

关键词: 缬草, 黄酮类化合物, 响应面分析法, 得率

Extraction of flavonoids from valerian optimized by response surface method

LU Zhong-ying¹, CHEN Shi-xue^{1,*}, LI Yan-qing¹, YAO Yuan-yong², LU Dao-wang², XING Ming-ming²

(1. Experimental Center of Materials and Chemical Engineering, Tongren University, Tongren 554300, China;

2. Institute of Applied Chemistry, Tongren University, Tongren 554300, China)

Abstract: The extraction process of flavonoid compounds originated from *Valeriana ofecnilis* (produced from Guizhou province) was investigated using ethanol as the extraction solvent. Method: Four factors, including concentration of Ethanol, ratio of raw material to solvent, extracting temperature and time, were optimized by response surface method. The optimum conditions were as follows: the concentration of ethanol was 53.0%; ratio of material to solvent was 1:29 g/mL; extraction temperature was 73 ℃ and extraction time was 2.6 h. Under the optimum conditions, the difference of between real value of 2.133% and theoretic value in rate of extraction was about 3.5%. Conclusion: Response surface method was a reliable tool to optimize the extraction of flavonoid compounds from *Valeriana ofecnilis*.

Key words: *Valeriana ofecnilis*; Flavonoids; Response surface method; Yield

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2016)05-0196-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.05.030

缬草 (*Valeriana ofecnilis*) 为败酱科缬草属植物, 主要以根茎入药。缬草主要有效成分有挥发油、环烯醚萜类、生物碱类、黄酮类化合物^[1-4]。据报道, 缬草中黄酮类化合物先已发现 7 种, 其具有改善微循环、抗肿瘤和抗菌等生理活性^[5]。基于缬草含丰富的有效成分, 生物活性多样, 具有广阔的开发前景, 可以创造巨大的经济和社会效益^[6-8]。黄酮类化合物是一类在植物体中广泛存在, 且具有多种生物活性的多酚类化合物。它具有明显的抗溃疡、抗炎、抗菌、生物抗氧化性、降低血管脆性及异常的通透性、

抑制血小板聚集和血栓形成等生理活性^[9-11]。本文以缬草为原材料, 以乙醇为提取剂进行浸提黄酮类化合物, 在单因素实验基础上, 采用响应面法优化实验得出最佳提取工艺条件, 为缬草的进一步开发利用提供理论依据, 从而提高缬草的综合利用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

缬草 采自贵州江口县; 石油醚、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠 成都金山化学试剂有限公司; 以上试剂均为分析纯。

收稿日期: 2015-06-25

作者简介: 卢忠英 (1987-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 天然药物化学成分与新药研发, E-mail: luzhongying@126.com。

* 通讯作者: 陈仕学 (1976-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 主要从事生化分析与天然产物化学成分分离, E-mail: 461330960@qq.com。

基金项目: 梵净山特色苗药资源保护与开发产学研基地 (黔教合 KY 字 [2014] 233); 贵州省教育厅自然科学研究项目 (黔教合 2013184); 贵州省普通高等学校特色重点实验室 (黔发合 K 字 [2011] 005)。

电热恒温电水浴锅 国华电器有限公司; DHG-9146 型真空干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; FW80 型万能粉碎机 北京科伟永兴仪器有限公司; AR124CN 型电子天平 上海恒平科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的绘制 准确称取芦丁标准品 10.0 mg, 溶解, 水浴加热, 于 100 mL 容量瓶定容, 制成 0.1 mg/mL 标准溶液。再用移液管移取芦丁标准溶液 0、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 分别加入 5 g/100 mL 亚硝酸钠 0.4 mL, 放置 5 min, 再加 10 g/100 mL 硝酸铝 0.4 mL, 放置 5 min, 再加 4 g/100 mL 氢氧化钠 4 mL。定容, 静置 10 min。在 510 nm 波长下测其吸光值, 以芦丁标准样品质量浓度 C mg/mL 为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标, 绘制标准曲线。得出回归方程, 由回归方程计算缬草中黄酮类化合物得率为: $Y(\%) = C \times V \times D \times 100/M$ 。上式中: Y 为得率, %; C 为提取液中黄酮类化合物的含量, mg/mL; V 为提取液的体积, mL; D 为稀释倍数; M 为样品质量 g。

1.2.2 工艺流程 缬草→预处理→脱脂样品→乙醇提取黄酮→浓缩→黄酮类化合物的吸光值测定→数据整理优化提取条件→验证实验。

1.2.3 材料预处理 将缬草置于粉碎机内粉碎成粉末, 将粉末通过 100 目筛子过滤后, 用石油醚在回流装置里回流脱脂 2 h, 抽滤, 置于烘干器中 40 ℃ 干燥 10 h, 干燥后得样品备用。

1.2.4 缬草中黄酮提取及含量测定 准确称取脱脂样品干粉 1.0 g 置于容积 100 mL 烧瓶内, 按一定料液比加入乙醇水溶液在一定温度下回流提取一定时间后, 过滤。相同方法提取两次, 合并滤液, 用乙醇水溶液定容。用回归方程测定缬草总黄酮得率。

1.2.5 单因素实验设计和响应面实验方法 称取 5 份预处理后的缬草粉末各 1 g, 设浸提料液比为 1:20 g/mL, 浸提温度为 70 ℃, 浸提时间为 2 h, 考察乙醇浓度分别为 40%、50%、60%、70%、80%; 对缬草中黄酮类化合物得率的影响, 由此可得乙醇的最佳浓度。再以最佳乙醇浓度为浸提溶剂, 继续考察料液比为 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 g/mL; 浸提温度为 55、60、65、70、75 ℃; 浸提时间为 1、1.5、2、2.5、3 h 等因素对缬草中黄酮类化合物得率的影响。在上述实验基础上, 为得到缬草中黄酮提取的最优工艺条件, 以乙醇浓度 (X_1)、料液比 (X_2)、浸提温度 (X_3)、浸提时间 (X_4) 为自变量设计实验, 以黄酮类化合物得率 (%) 为响应值, 进行响应面分析实验^[12], 实验因素和水平设计见表 1。

1.3 数据统计分析

单因素实验数据用 Microsoft Office Excel2007 分析作图。响应面优化实验数据采用 Design - Expert V8.0 进行分析处理和作图。

2 结果与分析

2.1 芦丁标准曲线的制作

由 1.2.1 的方法制得的标准曲线方程为: $Y = 0.084C - 0.004$ ($R^2 = 0.999$), 二者呈良好的线性关系 (见图 1)。根据标准曲线计算黄酮类化合物的得率为: $Y(\%) = C \times V \times D \times 100/M$ 。

表 1 Box-Behnken 设计实验因素水平及编码

Table 1 The factors, levels and codes of Box-Behnken design

因素	编码水平		
	-1	0	1
X_1 乙醇浓度 (%)	40	50	60
X_2 料液比 (g/mL)	1:25	1:30	1:35
X_3 浸提温度 (℃)	65	70	75
X_4 浸提时间 (h)	2.5	3	3.5

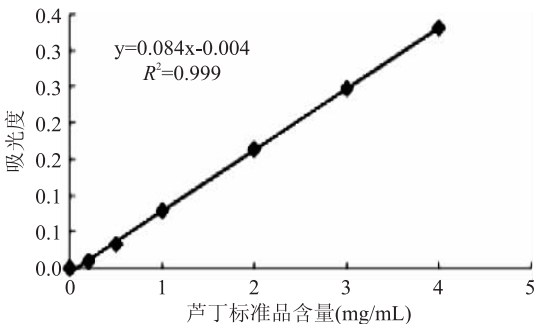


图 1 标准曲线方程

Fig.1 Standard cure of the rutin

2.2 单因素实验

2.2.1 乙醇浓度对缬草中黄酮类化合物得率的影响 如图 2 所示。

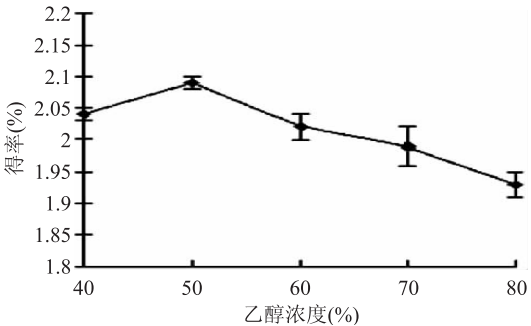


图 2 乙醇浓度对黄酮类化合物得率的影响

Fig.2 The effect of ethanol concentration on the yield of flavonoids

由图 2 可知, 当乙醇浓度在 40%~50% 之间时, 得率明显增加, 在 50% 达到最大, 继续增加至 60% 时, 得率一直降低。在 60%~80% 得率明显下降 ($p < 0.05$), 乙醇浓度过大时会导致样品细胞内部杂质的溶出, 而使黄酮类化合物得率略有增加。可见, 当乙醇浓度为 50% 时得最高, 确定最佳乙醇浓度为 50%。

2.2.2 料液比对缬草中黄酮类化合物得率的影响 由图 3 可知, 当料液比在 1:15~1:30 g/mL 时, 得率持续增加; 继续增加料液比至 1:35 g/mL, 黄酮类化合物得率有显著下降趋势^[13] ($p < 0.05$)。因此, 确定最佳料液比为 1:30 g/mL。

2.2.3 浸提温度对缬草中黄酮类化合物得率的影响

响 如图4所示。

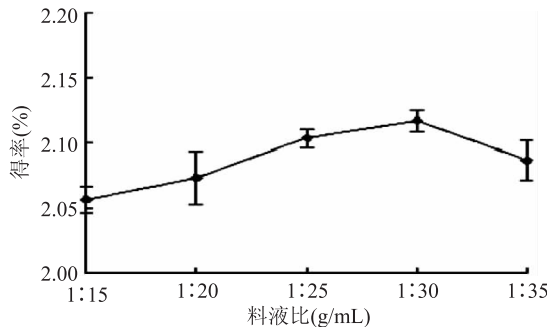


图3 料液比对黄酮类化合物得率的影响

Fig.3 The effect of liquid ratio on the yield of flavonoids

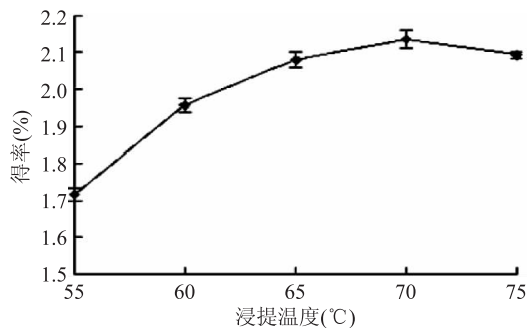


图4 浸提温度对黄酮类化合物得率的影响

Fig.4 The effect of extraction temperature on the yield of flavonoids

由图4可知,当浸提温度在55~70℃时,缬草中黄酮的得率是缓缓增大的;浸提温度超过70℃时,黄酮类化合物得率有所下降,分析可能是温度过高破坏了黄酮类化合物的热稳定性,同时杂质溶出的概率也有所增加所致^[14]。因此,确定最佳浸提温度可选为70℃。

2.2.4 浸提时间对缬草中黄酮类化合物得率的影响

如图5所示。

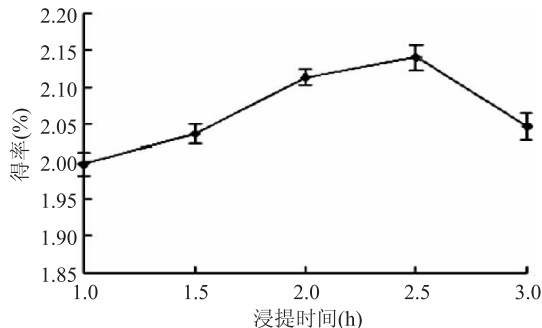


图5 浸提时间对黄酮类化合物得率的影响

Fig.5 The effect of extraction time on the yield of flavonoids

由图5可知,当浸提温度在1~2.5 h之间时,黄酮类化合物得率稳步增长达到最大,继续增加时间,黄酮类化合物得率明显降低。因此,确定最佳浸提时间为2.5 h。

2.3 响应面法优化提取缬草中黄酮类化合物

2.3.1 响应面实验结果 响应面实验结果见表2,方

差分析见表3。

表2 响应面实验结果

Table 2 The results of the response surface					
实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	得率(%)
1	-1	-1	0	0	1.940
2	1	-1	0	0	2.071
3	-1	1	0	0	1.976
4	1	1	0	0	1.917
5	0	0	-1	-1	1.810
6	0	0	1	-1	1.988
7	0	0	-1	1	1.952
8	0	0	1	1	2.204
9	-1	0	0	-1	1.917
10	1	0	0	-1	2.000
11	-1	0	0	1	1.929
12	1	0	0	1	2.071
13	0	-1	-1	0	1.774
14	0	1	-1	0	1.845
15	0	-1	1	0	2.083
16	0	1	1	0	2.107
17	-1	0	-1	0	1.845
18	1	0	-1	0	1.750
19	-1	0	1	0	2.095
20	1	0	1	0	2.060
21	0	-1	0	-1	1.881
22	0	1	0	-1	1.929
23	0	-1	0	1	2.048
24	0	1	0	1	2.012
25	0	0	0	0	2.107
26	0	0	0	0	2.119
27	0	0	0	0	2.095

表4 回归方程可靠性分析

Table 4 Credibility analysis of regression equation

项目	数值	项目	数值
标准差	0.065	R ²	0.8627
均值	1.98	R ² _{Adj}	0.6704
变异系数(%)	3.27	精密度	6.917

2.3.2 模型建立与方差分析 利用 Design - Expert.V8.0 软件对表2响应值进行回归拟合,以X₁、X₂、X₃、X₄为自变量对得率Y进行数据拟合建立如下多元二次回归数学模型:

$$Y = 2.11 + 0.014X_1 - 9.167E - 0.04X_2 + 0.12X_3 + 0.043X_4 - 0.047X_1X_2 + 0.015X_1X_3 + 0.015X_1X_4 - 0.012X_2X_3 - 0.021X_2X_4 - 0.027X_3X_4 - 0.066X_1^2 - 0.065X_2^2 - 0.096X_3^2 - 0.068X_4^2$$

由表3可知,该二次回归方程的X₃表现出极显著影响,其他因素影响较小,说明实验中各因素对得率的影响不是简单的线性关系;且表中可知建立的模型极显著而失拟项不显著,说明建立的模型能与实际有较好的拟合。从表4可知回归决定系数R²为0.8627,说明有86.27%的响应面值符合此模型;校正

表3 回归方程方差分析
Table 3 Analysis of variance of the regression equation

方差来源	平方和 SS	自由度 df	均方 SM	F 值	Prob > F	显著性
模型	0.26	14	0.019	4.49	0.0110	**
X ₁	2.324E-003	1	2.324E-003	0.56	0.4729	
X ₂	1.008E-005	1	1.008E-005	2.413E-003	0.9618	
X ₃	0.16	1	0.16	38.04	0.0001	**
X ₄	0.022	1	0.022	5.21	0.0456	*
X ₁ X ₂	9.025E-003	1	9.025E-003	2.16	0.1724	
X ₁ X ₃	9.000E-004	1	9.000E-004	0.22	0.6525	
X ₁ X ₄	8.702E-004	1	8.702E-004	0.21	0.6579	
X ₂ X ₃	5.523E-004	1	5.523E-004	0.13	0.7238	
X ₂ X ₄	1.764E-003	1	1.764E-003	0.42	0.5305	
X ₃ X ₄	2.809E-003	1	2.809E-003	0.67	0.4314	
X ₁ ²	0.024	1	0.024	5.64	0.0390	*
X ₂ ²	0.023	1	0.023	5.39	0.0427	*
X ₃ ²	0.049	1	0.049	11.82	0.0064	**
X ₄ ²	0.024	1	0.024	5.85	0.0361	*
残差	0.042	10	4.178E-003			
误差和	0.31	26				

表5 提取条件优化
Table 5 Optimization of extraction condition

因素	条件		理论得率(%)	实际得率(%)	RSD(%)
	理论	实际			
乙醇浓度(%)	52.73	53			
料液比(g/mL)	1:28.99	1:29	2.143	2.133	3.5
浸提温度(℃)	72.98	73			
浸提时间(h)	2.63	2.6			

决定系数 R^2_{Adj} 为 0.6704。说明 67.04% 的实验数据的变化可以用这个回归模型来参考说明;其中 CV 变异系数较小和精密度数值为 6.917,说明此方程具有良好的稳定性和可靠性。此外,从表 3 中可知,该二次回归方程一次项和二次项中的 X_3 、 X_4 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 均表现出显著水平,综上所述,该模型能较好的拟合缬草中黄酮类化合物的提取工艺。

2.3.3 响应面分析 为考察各交互项对黄酮类化合物得率的影响,对该模型进行降维分析。由图 6 可直观观察各因素对响应值的影响,比较图(A)~图(F)可知, X_3 、 X_4 随着量的增大,响应面值增大;当响应值增大到极值后,随着因素的增大,响应值逐渐减小; X_1 、 X_2 影响响应面曲线较平缓,即影响黄酮类化合物得率的主次因素为 $X_3 > X_4 > X_1 > X_2$,与方差分析结果相同。

2.3.4 最佳提取工艺确定 通过 Design-Expert.V8.0 对二元回归方程求最大值得到最佳提取工艺条件和黄酮类化合物理论最大得率。设计提取条件优化实验,在最优工艺条件下进行重复实验,计算得率,进行比较分析,实验结果见表 5。

由表 5 可知,在最佳提取工艺条件下重复实验,黄酮得率为 2.133%,接近理论得率 2.143%,RSD 值为 3.5%,说明响应面法建立的黄酮类化合物提取数

学模型具有稳定可靠性。

3 结论

本实验采用了 Design-Expert.V8.0 软件中的 Box-Behnken(BBD)中心组合原理设计实验,选用乙醇作为溶剂提取缬草中的黄酮类化合物。结果表明:最佳提取工艺为乙醇浓度 53.0%,料液比 1:29 g/mL,浸提温度 73℃,浸提时间 2.6 h。在此条件下,实际得到的黄酮类化合物得率为 2.133%,与理论得率 2.143%,其 RSD 为 3.5%,充分说明了优化的缬草中黄酮类化合物提取为工艺稳定,具有可靠性。

参考文献

[1]周琳,张悦,张静,等.缬草开发前景广阔[J].国土与自然资源研究,2003,(3):91-92.

[2]张震学,姚新生.药用植物缬草的化学研究进展[J].中国药物化学杂志,2000,10(3):226-230.

[3]都晓伟,吴军凯.缬草属植物化学成分及药理活性研究进展[J].国外医药,植物药分册,2006,21(1):10-14.

[4]路洪顺,刘鑫军.缬草的开发价值与栽培技术[J].中国野生植物资源,2002,21(5):61-62.

[5]Fernández S, Wasowski C, Paladini A C, et al.Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid- isolated from Valeriana officinalis.[J].Pharmacology Biochemistry & Behavior,

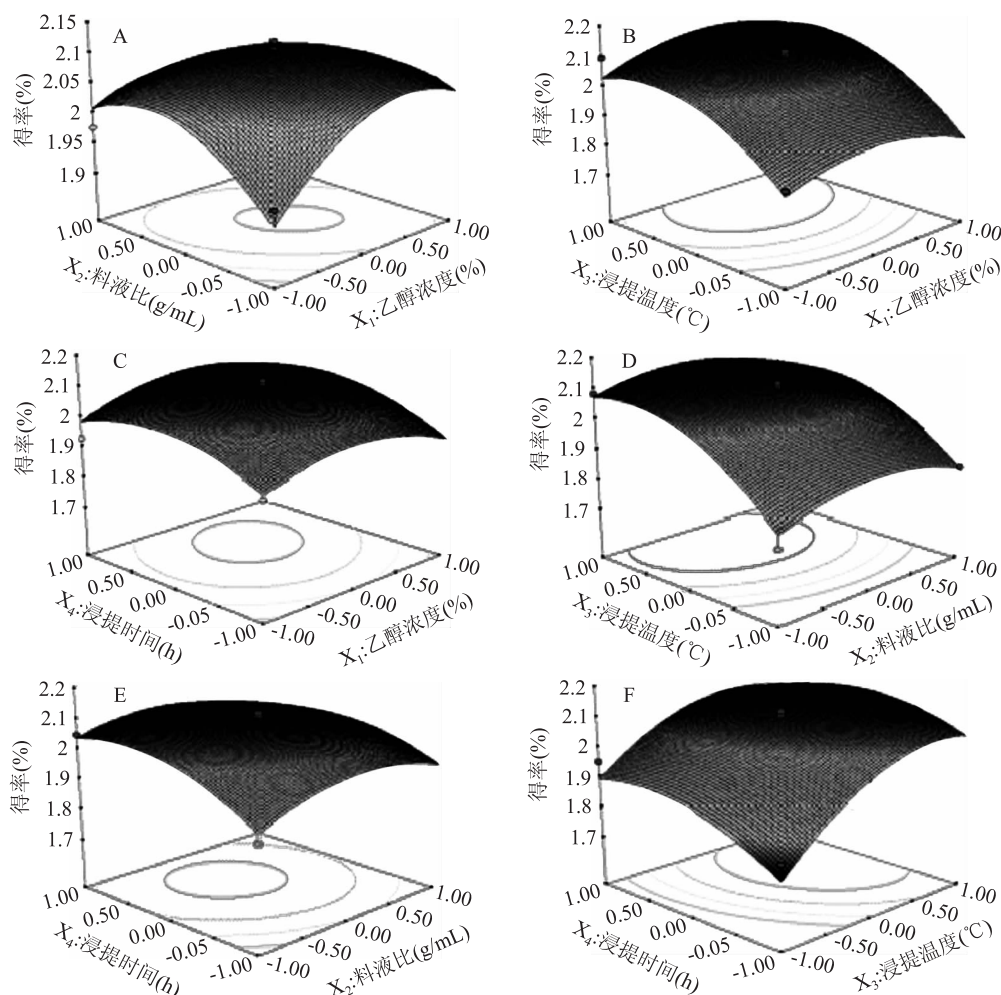


图6 乙醇浓度、料液比、浸提温度、浸提时间对黄酮类化合物得率交互影响响应面图

Fig.6 Response surface plots showing the effects of four extraction conditions on flavonoids yield

2004,77(2):399-404.

[6] 薛存宽,沈凯. 缬草主要活性成分的初步研究[J]. 现代中西医结合杂志,2003,12(9):912-914.

[7] 张振学. 药用植物缬草的生物活性研究进展与开发[J]. 沈阳药科大学学报,20017(3):222-225.

[8] 黄龙. 缬草化学成分 GC/MS 分析研究[J]. 氨基酸和生物资源,2002,24(2):11-13.

[9] 曹伟国,刘志勤,邵云,等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报,2003,23(12):2241-2247.

[10] 延玺刘,会青,邹永青,等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J]. 有机化学,2008,28(9):1534-1544.

[11] 魏红,丰帆,陈旭丹,等. 4 种中药黄酮提取物清除自由基活性的研究[J]. 天津师范大学学报,2008,28(2):14-17.

[12] Myers R H, Montgomery D C, Anderson - Cook C M. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments [M] // Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons, 2009:284-286.

[13] 赵敏,周欢,姜忠丽,等. 桃仁蛋白的提取及功能性质研究[J]. 农产品加工,2014,(7):42-44.

[14] 赵春艳,敖长金,缪亚娟,等. 沙葱中黄酮类化合物分离提取工艺的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2010,(1):131-133.

(上接第 195 页)

[9] Zaidul I S M, Yamau chi, Hiroaki, et al. RVA study of mixtures of wheat flour and potato starches with different phosphorus contents [J]. Food Chemistry, 2007, 102 (4): 1105-1111.

[10] 于小禾,江南平. 直接干燥法测定粮食水分的条件优化[J]. 粮食储藏,2011,40(04):46-49.

[11] Abdel - Aal E S M, Hue P, Chibbar RN, et al. Physicochemical and structural characteristics of flours and starches from waxy and non-waxy wheat [J]. Cereal Chemistry, 2002,79(3):458-464.

[12] Li Po-Hsien, Huang Chien-Chun, Yang Ming-Yu, et al. Textural and sensory properties of salted noodles containing purple yam flour [J]. Food Research International, 2012, 47 (02): 223-228.

[13] 艾宇薇. 和面工艺对面团品质影响的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2013.32

[14] 杨宏黎. 熟化工艺对面条品质影响的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2008.23-24

[15] 李聪,陆启玉. 面条制作过程中面带熟化工艺研究[J]. 农业机械,2011,(08):99-103.