

# 陕产瞿麦中总黄酮提取工艺响应曲面法的优化

张爽 刘治飞 高洁 问娟娟

(陕西国际商贸学院医药学院,西安,712046)

**摘要** 目的:评价响应曲面法优选出超声辅助提取陕产瞿麦中总黄酮类化合物的最优方案。方法:实验以陕产瞿麦为原料,乙醇为提取剂,在单因素实验的基础上,通过响应面实验对超声辅助法提取陕产瞿麦中总黄酮的工艺进行优化。结果:优选出了超声辅助提取陕产瞿麦中总黄酮的最佳工艺条件:液料比10倍、提取功率140 W、乙醇浓度80%时,总黄酮的提取率最大可以达到0.851%。结论:工艺的实验值与预测值基本相符,采用响应曲面法优选超声辅助提取陕产瞿麦中黄酮类化合物的提取工艺稳定可行,为陕产瞿麦资源的开发和利用提供一定的参考依据。

**关键词** 陕产瞿麦;黄酮类化合物;超声提取;响应曲面法;单因素试验;紫外可见分光光度法;工艺条件;提取率

## Study on Optimization of Total Flavonoids of Herba Dianthi from Shaanxi in the Extraction Process by Response Surface Method

Zhang Shuang, Liu Zhifei, Gao Jie, Wen Juanjuan

(School of Medicine, Shaanxi Institute of International Trade &amp; Commerce, Xi'an 712046, China)

**Abstract Objective:** To select the optimized plan of ultrasonic assisted extracting total flavonoids in Herba Dianthi from Shaanxi by the response surface method. **Methods:** In this experiment, Shaanxi producing Herba Dianthi was taken as raw material, and ethanol as extraction agent. On the basis of single factor experiment, the extraction process of total flavonoids from Herba Dianthi of Shaanxi by ultrasonic assisted method was optimized with the response surface method. **Results:** The ultrasonic assisted extraction conditions of total flavonoids in Herba Dianthi from Shaanxi were optimized; liquid and material ratio was 10 times, extraction power 140W, 80% ethanol concentration, and the extraction rate of flavonoids could reach 0.851%. **Conclusion:** The process of the experimental values are basically consistent with the predicted value, indicating using response surface methodology to optimize ultrasonic assisted extraction technology of flavonoids in Herba Dianthi in Shaanxi Province is stable and feasible, and providing reference for the development and utilization of Herba dianthi resources in Shaanxi Province.

**Key Words** Herba Dianthi in Shaanxi Province; Flavonoids; Ultrasonic extraction; Response surface method; Single factor test; UV visible spectrophotometry; Process conditions; Extraction rate

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.06.056

瞿麦又名野麦、石柱花、十样景花等,为石竹科石竹属植物瞿麦 *Dianthus superbus* L. 的干燥地上部分。瞿麦是我国常用的传统中药,性味苦、寒;归心经、小肠经、膀胱经。具有清热利水,破血通经之功效,主治小便不通、热淋、血淋、砂石淋、目赤肿痛、经闭等症<sup>[1]</sup>。现代药理学的研究表明,瞿麦具有抗肿瘤、利尿、兴奋子宫、抗菌、免疫调节作用、抗氧化作用、溶血作用等作用。其主要成分有皂苷类、环肽类、黄酮类、蒽醌类、有机酸类、挥发油类、生物碱类、维生素、色素及多糖等<sup>[2-3]</sup>。

响应曲面法是一种统计学试验设计方法,该法

通过建立连续变量曲面模型,对影响过程的因子及其交互作用进行评价,确定最佳水平,而且所需要的观察组数相对较少,可节省人力物力。中药有效成分复杂,有效成分含量相对较低,且在提取过程中会受到很多因素的影响,响应曲面法可以有效的优化中药有效成分的提取工艺,其实验次数少,可以在一定程度上缩短实验周期<sup>[4]</sup>。本实验以陕产瞿麦作为研究对象,采用响应曲面法对超声波辅助提取陕产瞿麦中的活性成分总黄酮进行了工艺的优化。以期陕产瞿麦中黄酮类化合物的提取及陕产瞿麦资源的进一步开发和利用提供一定的理论依据。

### 1 材料与仪器

1.1 实验材料 瞿麦(陕西省眉县药材总公司,经陕西国际商贸学院生药教研室雷国莲教授鉴定为石竹科植物瞿麦 *Dianthus superbus* L. 的带花全草);芦丁标准品(中国食品药品检定研究院);无水乙醇(分析纯);亚硝酸钠(分析纯);氢氧化钠(分析纯)。

1.2 实验仪器 微波萃取仪 XH100B(北京详钻发展有限公司);高速万能粉碎机 FW100(天津市泰斯特仪器有限公司);FA1104 型电子分析天平(天津鑫博得仪器有限公司);紫外分光光度计 UV2400(天津精密科学仪器有限公司)。

### 2 方法

2.1 溶液的配制 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 0.010 9 g,置于 50 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇溶解,继续加 70% 乙醇溶液至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含 0.218 mg 的对照品溶液,然后给溶剂贴上标签备用。

供试品溶液的制备 取陕产瞿麦粉末 5 g,精密称取,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 80% 的乙醇 50 mL,精密称量,超声提取 25 min,取出放置至室温,加 80% 的乙醇适量,补足失去的质量,抽滤弃去药渣,取滤液置于 25 mL 的容量瓶中,得到供试品溶液。

2.2 测定波长的选择 取试验样品适量,在亚硝酸钠溶液为 1.0 mL 5% 存在的碱性条件下,经溶液硝酸铝显色后,以试剂作为空白参比液在 420 ~ 700 nm 波长范围内测定吸光度,在 506 nm 波长处有最大吸收,故测定时选用此波长。

2.3 标准曲线的绘制 精密量取芦丁对照品溶液 2、3、4、5、6、7 mL,分别置于 25 mL 容量瓶中,加入 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 5 min;加入 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min;加入 4% 氢氧化钠溶液 10 mL,用 80% 乙醇溶液定容至刻度,摇匀,放置 15 min,以上述试剂作为空白对照,分别在 506 nm 处测定吸光度<sup>[5]</sup>。以吸光度(A)为纵坐标,以质量(mg)为横坐标,绘制标准曲线。

2.4 陕产瞿麦中黄酮得率的计算 陕产瞿麦中总黄酮得率(%) = 提取的总黄酮质量/瞿麦粉末质量 × 100%。

2.5 陕产瞿麦中黄酮的提取工艺的条件

2.5.1 单因素实验 以乙醇的浓度、液料比、提取功率及超声时间为单因素,考查各因素对陕产瞿麦中总黄酮得率的影响。

2.5.2 响应曲面实验设计 根据 Box-Behnken 软

件提供的数据模型,以陕产瞿麦总黄酮提取率作为响应面值,并选择乙醇浓度 A、液料比 B、功率 C 这 3 个因素为自变量,采用统计分析软件 Design-Expert8. 0. 6 中的响应面进行分析,从而获取最佳工艺参数。见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素水平

水平 编码	A 乙醇浓度(%)	B 液料比(倍)	C 超声功率(W)
-1	65	8	100
0	80	10	140
1	95	12	180

### 3 结果与分析

3.1 芦丁标准曲线 按照 2.3 的方法绘制芦丁标准曲线,以芦丁对照品的质量(mg)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,得到芦丁对照品的标准曲线为  $Y = 0.4637X - 0.0426$ ,相关系数  $R^2 = 0.9966$ ,由此说明芦丁对照品的质量在 0.4 ~ 1.6 mg 范围时吸光度与质量呈良好的线性关系。

#### 3.2 单因素实验

3.2.1 超声时间对总黄酮提取率的影响 固定乙醇体积分数 80%,提取温度 40 ℃,液料比 10(倍),功率 160 W,准确称取 5 g 瞿麦粉末 5 份,提取时间分别按 10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、35 min,进行超声提取,根据陕产瞿麦中总黄酮的得率确定最佳超声功率。见图 1。

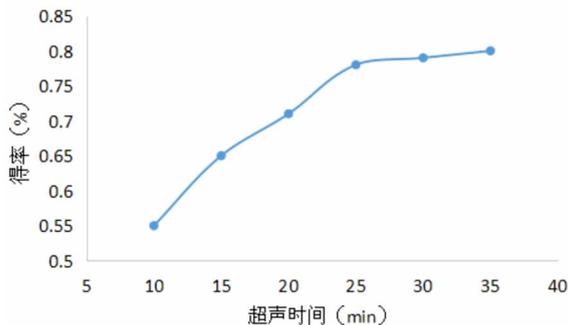


图 1 超声时间对陕产瞿麦总黄酮得率的影响

从图 1 可以看出,总黄酮得率随着超声时间的增加逐渐上升,到 25 min 时上升较平缓,其原因可能为随着超声时间的增长,是黄酮类化合物溶出不明显,已经达到饱和<sup>[6]</sup>。因此,虽然提取时间增长了,但总黄酮的得率变化不大。所以,选择 25 min 为最佳提取时间。

3.2.2 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响 固定液料比 10(倍),功率 160 W,提取温度 40 ℃,提取时间 25 min,准确称取 5 g 瞿麦粉末 5 份,分别用乙醇体积分数 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇超声提

取,根据陕产瞿麦中总黄酮的得率确定最佳乙醇浓度。见图2。

从图2可以看出,总黄酮得率随着乙醇浓度的增加逐渐上升,开始时黄酮得率增加明显,但当乙醇浓度达到80%以后黄酮得率开始下降。其原因可能是随着乙醇浓度的增加,脂溶性的成分被溶解出来,从而干扰了黄酮类化合物的提取,导致总黄酮的得率反而降低<sup>[7]</sup>。因此,乙醇浓度以80%左右较为合适。

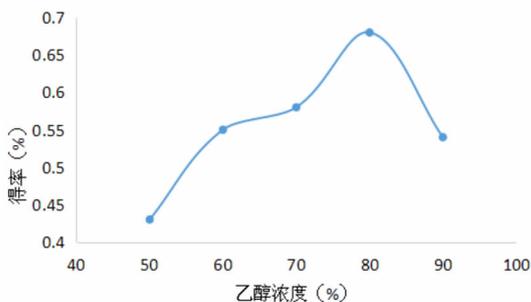


图2 乙醇浓度对陕产瞿麦总黄酮得率的影响

3.2.3 料液比对总黄酮提取率的影响 固定乙醇体积分数80%,功率160 W,提取温度40℃,提取时间25 min,准确称取5 g瞿麦粉末5份,分别按液料比(倍)为8、9、10、11、12,进行超声提取,根据陕产瞿麦中总黄酮的得率确定最佳液料比。见图3。

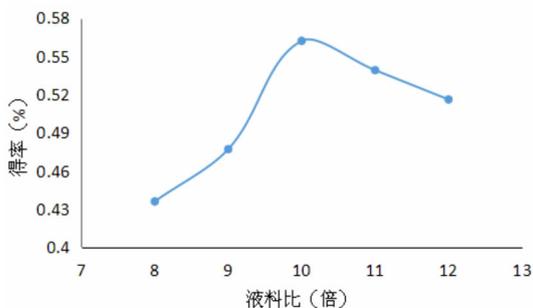


图3 液料比对陕产瞿麦总黄酮得率的影响

由图3可以看出,总黄酮的得率随液料比的增加而逐渐增大,当液料比大于10(倍)时,总黄酮的得率逐渐降低,其原因可能是当液料比增大到一定程度时导致一些非黄酮类物质溶出,与黄酮类物质竞争溶出,干扰了黄酮类物质的溶出<sup>[8-9]</sup>。因此选取10(倍)为最佳液料比。

3.2.4 超声功率对黄酮提取率的影响 固定乙醇体积分数80%,提取温度40℃,液料比10(倍),功率160 W,提取时间25 min,准确称取5 g瞿麦粉末5份,分别按80 W、100 W、120 W、140 W、160 W,进行超声提取,根据陕产瞿麦中总黄酮的得率确定最佳超声功率。见图4。

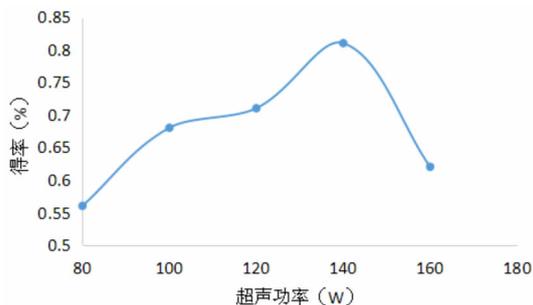


图4 超声功率对陕产瞿麦总黄酮得率的影响

由图4可知,总黄酮得率随着超声功率的增加逐渐上升,当超声功率为140 W时瞿麦总黄酮的得率最高,140 W以后总黄酮得率逐渐下降。理论上讲超声功率越大,细胞壁越容易被破坏,越有利于物质的溶出,但在黄酮类物质溶出的同时也导致黄酮类物质结构的破坏或是其他非黄酮类物质的溶出,干扰了总黄酮的得率<sup>[10]</sup>。因此超声功率选用140 W最合适。

### 3.3 响应面试验及结果分析

3.3.1 响应曲面法 在单因素试验的基础上,运用 Design-Expert 8.0.6 软件,以乙醇浓度 A、液料比 B、功率 C 作为超声辅助提取陕产瞿麦中总黄酮提取率的影响因素,再通过以总黄酮的提取率作为响应平表数据进行带入分析,得到表2和表3的回归分析结果。

表2 Box-Behnken 设计方案及试验结果

实验号	A 乙醇浓度	B 液料比	C 超声功率	提取率 (%)
1	1	0	1	0.519
2	0	-1	-1	0.545
3	0	1	1	0.619
4	0	-1	1	0.516
5	0	0	0	0.847
6	0	0	0	0.859
7	0	0	0	0.839
8	1	0	-1	0.507
9	0	0	0	0.839
10	-1	-1	0	0.451
11	0	0	0	0.899
12	-1	1	0	0.419
13	-1	0	-1	0.417
14	0	1	-1	0.501
15	1	-1	0	0.423
16	1	1	0	0.639
17	-1	0	1	0.416

3.3.2 回归模型方程 根据表3.6中,陕产瞿麦中总黄酮的提取率作为响应值,再使用 Design-Expert8.0.6 对数据进行全面分析,最终得到了多元二次回归模型方程:

表 3 回归方程方差分析

变异源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.52	9	0.057	76.89	<0.0001
A	0.019	1	0.019	24.80	0.0016
B	7.381E-003	1	7.381E-003	9.88	0.0163
C	1.250E-003	1	1.250E-003	1.67	0.2369
AB	0.015	1	0.015	20.58	0.0027
AC	4.225E-005	1	4.225E-005	0.057	0.8188
BC	5.402E-005	1	5.402E-005	7.23	0.0311
A <sup>2</sup>	0.22	1	0.22	290.58	<0.0001
B <sup>2</sup>	0.090	1	0.090	121.06	<0.0001
C <sup>2</sup>	0.11	1	0.11	153.09	<0.0001
Residual	5.229E-003	7	7.470E-004		
Lack of fit	2.714E-003	3	9.046E-004	1.44	0.3564
Pure Error	2.515E-003	4	6.288E-004		
Cor Total	0.52	16			

$R^2 = 0.9093, R^2_{Adj} = 0.9771$

$$Y = + 0.86 + 0.048A + 0.030B + 0.013C + 0.062AB + 3.250E - 003AC + 0.037BC - 0.23A^2 - 0.15B^2 - 0.16C^2$$

其中:Y 为陕产瞿麦中总黄酮的提取率,A、B、C 为 3 因素的编码值。

从回归方程方差分析表中可发现,P 模型 < 0.0001,F 模型 = 76.89 > 0.05,表明了本研究选用的二次回归方程模型非常显著,可以用于实际的预测。陕产瞿麦中总黄酮的提取率 F 失拟 = 1.44 > 0.05,P 失拟 = 0.3564 > 0.05,表示失拟不显著。表中的决定系数  $R^2 = 0.9093$ ,调整确定系数  $R^2_{Adj} = 0.9771$ ,说明此模型的实验值与拟合值之间有很好的拟合度。

综上所述,该模型可以很好表示出自变量和响应值之间的关系<sup>[12-13]</sup>。结合表 2 和表 3 我们可以分析看出,A、B、AB 和 BC 对陕产瞿麦中总黄酮的提取率都产生显著的影响,其中 A 和 AB 对陕产瞿麦中总黄酮的提取率极显著。各因素对于陕产瞿麦总黄酮的提取率影响的排序:乙醇浓度 A > 料液比 B > 超声功率 C。

3.3.3 各因素对提取率影响的响应面图 图 5 为在最佳的超声功率条件下,乙醇浓度和液料比对陕产瞿麦中总黄酮提取率的交互效应的响应面和等高线图。曲线有较大的变化曲度,说明陕产瞿麦中的总黄酮得率受液料比和提取时间的影响均较大,但乙醇浓度对总黄酮得率影响的曲线较液料比对总黄酮得率的影响的曲线更陡峭,因此,乙醇浓度对陕产瞿麦中总黄酮的得率的影响相对于液料比对其影响更显著。从等高线可以看出,等高线为椭圆形,因

此,液料比和提取时间的交互作用显著,与方差分析结果一致。当液料比在 10.40 倍、乙醇浓度为 83% 附近时,总黄酮的得率较大<sup>[14-15]</sup>。

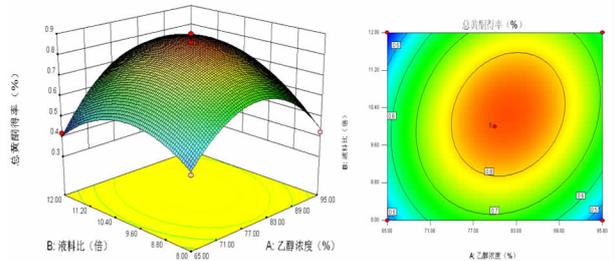


图 5 乙醇浓度和液料比对陕产瞿麦总黄酮提取率的影响

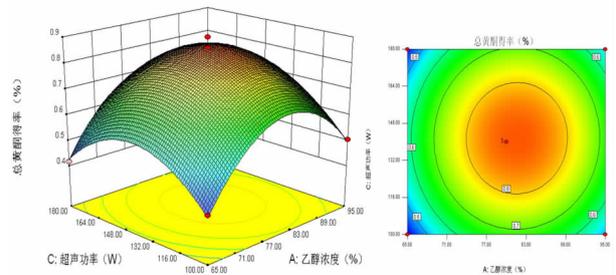


图 6 乙醇浓度和超声功率对陕产瞿麦总黄酮提取率的影响

图 6 为在最佳的液料比条件下,乙醇浓度和超声功率对陕产瞿麦中总黄酮提取率的交互效应的响应面和等高线图。乙醇浓度对总黄酮得率影响的曲线较超声功率对总黄酮得率的影响的曲线更陡峭,因此,乙醇浓度对陕产瞿麦中总黄酮的得率的影响相对于超声功率对其影响更显著,并随着液料比的增大总黄酮的得率呈现先上升后下降的趋势。当超声功率在 148 W、乙醇浓度为 83% 附近时,总黄酮的得率较大。

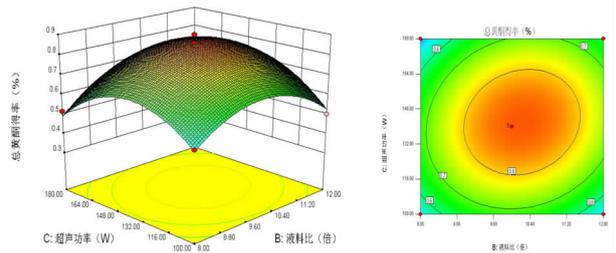


图 7 液料比和超声功率对陕产瞿麦总黄酮提取率的影响

图 7 为在最佳的乙醇浓度条件下,液料比和超声功率对陕产瞿麦中总黄酮提取率的交互效应的响应面和等高线图。液料比对总黄酮得率影响的曲线较超声功率对总黄酮得率的影响的曲线更陡,因此,液料比对陕产瞿麦中黄酮的得率的影响相对于超声功率对其影响更显著,并随着提液料比的增大黄酮的得率呈现先上升后下降的趋势。从等高线可以看出,等高线为椭圆形,因此,可判断液料比和超声功率的交互作用显著,与方差分析结果一致。当超声

功率在 148 W、液料比为 10.40 倍附近时,总黄酮的得率较大。

3.3.4 最佳工艺条件的确定及验证性实验 通过响应面试验得出用超声辅助提取瞿麦中黄酮的最佳条件为:乙醇浓度为 81.87%,液料比 10.27 倍,超声功率 142.19 W,40℃提取 25 min,提取率最大可以达到 0.862%。考虑到实验条件的可操作性,将工艺参数调整为:乙醇浓度 80%,液料比 10 倍,超声功率 140 W。再对调整以后的工艺参数进行 3 次平行实验,3 次实验平均得率为 0.851%,与预测值 0.862% 相差 0.011%,实际值与预测值较为接近,充分验证了回归模型的合理性,说明响应面分析法适合于陕产瞿麦中总黄酮的提取优化工艺。

#### 4 讨论

目前,正交试验、均匀设计和响应面法是提取工艺优化经常采用的方法。正交试验和均匀设计虽然实验的次数少,但是准确度不高。响应曲面法的实验次数相对前 2 种方法多,但它是建立在数学、统计学、计算机科学基础上,采用多元二次回归方程来考察各因素与响应值之间的函数关系,能对优选出的实验参数进行全面分析的一种统计方法<sup>[16]</sup>。对于陕产瞿麦目前尚缺乏系统性的研究,它的指标性成分及质量标准尚未建立。本实验在单因素实验的基础上,通过响应曲面法优化了超声辅助提取陕产瞿麦中总黄酮的提取工艺,并通过实验验证了实验值与 Design-Expert 8.0.6 软件的预测值基本相符,说明本工艺对陕产瞿麦中总黄酮的提取是稳定可行的。因此本工艺能为陕产瞿麦质量标准的建立提供一定的参考,同时也能为陕产瞿麦资源的开发和利用提供一定的理论依据。

#### 参考文献

[1]徐国钧,何红贤,徐璐珊,等.中国药理学[M].北京:中国医药科

技出版社,1996:1385.

- [2]傅旭阳,田均勉.瞿麦的化学成分研究[J].中草药,2015,46(5):645-648.
- [3]汪向海,巢启荣,黄浩,等.瞿麦化学成分研究[J].中草药,2000,31(4):248-249.
- [4]赵立春,杨更亮.响应曲面法在中药有效成分提取中的应用研究[J].中药与临床,2013,4(6):62-64.
- [5]陈建平,王金辉,王艳杰,等.蒙药瞿麦中总黄酮超声提取工艺研究及含量测定[J].中华中医药杂志,2013,28(9):2580-2584.
- [6]刘伟,何晓燕,陈文强,等.响应面优化野生樱桃李叶总黄酮的超声辅助提取工艺[J].天然产物研究与开发,2015,27(10):1765-1770.
- [7]陈飞,何先元,周卯勤,等.超声辅助提取四齿四棱草中总黄酮及其抗氧化活性[J].天然产物研究与开发,2016,28(1):96-101.
- [8]寇亮,李璐,陆丽娜,等.响应面法优化柠条锦鸡儿总黄酮超声提取工艺及其体外抗氧化性研究[J].食品工业科技,2016,37(17):225-231.
- [9]陈红梅,谢翎.响应面法优化半枝莲黄酮提取工艺及体外抗氧化性分析[J].食品科学,2016,37(2):45-50.
- [10]向极钎,王应玲,刘晓鹏,等.忍冬藤总黄酮超声辅助提取工艺及其体外抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2017,38(2):251-256.
- [11]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.
- [12]陈新瑶,董星,陈景杰,等.响应曲面法优化猴头菇粗多糖的提取工艺[J].中国农业科技导报,2017,19(3):131-136.
- [13]赵志刚,宣丽英,李志英,等.响应面法优化超声辅助提取夏枯草多糖工艺[J].食品研究与开发,2016,37(12):91-95.
- [14]范金波,蔡茜彤,冯叙桥,等.超声波辅助提取牛蒡根多酚工艺参数优化[J].食品与发酵工业,2014,40(11):247-252.
- [15]朱亚松,许伟,邵荣,等.响应面法优化白背三七多糖的提取工艺[J].中国药科大学学报,2016,47(3):359-362.
- [16]许海燕,郑伶俐,多本加,等.响应面法优化秦岭龙胆有效成分的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(15):31-34.

(2017-06-30 收稿 责任编辑:杨觉雄)