

响应面分析法优化山楂叶中黄酮的提取工艺

施红林,黄琦,褚沈佳,库娜娜,俞小燕,王媛媛

(浙江科技学院 生物与化学工程学院,杭州 310023)

摘要: 响应面分析法优化山楂叶中黄酮的提取工艺,以黄酮粗提取率为指标,采用乙醇回流法提取。通过单因素试验及响应面分析,研究了提取温度、液固比、乙醇体积分数和提取时间4个主要因素对山楂叶中黄酮粗提取率的影响。采用Box-Behnken中心组合设计和响应面分析法,建立了回归方程的预测模型,确定最佳提取条件为液固比29 mL/g,乙醇体积分数68%,提取温度64℃,提取时间34 min,在此条件下黄酮粗提取率为3.07%。试验结果与模型预测值基本相符,因此,该工艺可应用于山楂叶中黄酮的提取。

关键词: 黄酮;山楂叶;响应面分析法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1671-8798(2014)03-0165-07

Optimization of extraction technology of flavonoids from hawthorn leaves by response surface method

SHI Honglin, HUANG Qi, CHU Shenjia, KU Nana, YU Xiaoyan, WANG Yuanyuan

(School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science
and Technology, Hangzhou 310023, China)

Abstract: Response surface method was used to optimize the technological conditions of extracting flavonoids compounds from hawthorn leaves, with extraction yield of flavonoids as indicator and ethanol reflux as extraction method. Single factor experiment and response surface method were used to discuss the influence on extraction yield by extraction temperature, liquid-solid ratio, the ethanol concentration and extraction time. The regression equation prediction model was developed by Box-Behnken center combination design and response surface method. The best extract conditions are as follows: the liquid-solid ratio 29 mL/g, ethanol concentration 68%, extracting temperature 64℃ and extracting time 34 min. Under the condition, the extraction yield of flavonoids is 3.07%. The results are agreed with model predictions. Thus the technology can be used as the extraction process of flavonoids from hawthorn leaves.

Key words: flavonoids; hawthorn leaves; response surface method

收稿日期: 2014-05-19

基金项目: 浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)(2013R415019);浙江科技学院青年教师进企事业单位实践进修基金项目(2014-SJ09)

作者简介: 施红林(1991—),女,浙江省萧山人,2010级制药工程专业本科生。

通信作者: 黄琦,讲师,硕士,主要从事食品、药品质量安全与控制研究。

山楂叶为蔷薇科植物山里红或山楂的干燥叶,在中国具有悠久的保健与药用历史。山楂叶中含有大量的黄酮、17 种氨基酸(包括 8 种人体必需的氨基酸),和一定量的微量元素和丰富的 V_C 、 V_{B1} 、 V_{B2} ,以及绿原酸、山楂酸、胆碱、挥发油等。山楂叶中所含黄酮类成分对心血管系统疾病有明显的药理作用^[1-2],2005 年版《中国药典》正式收载山楂叶^[3]。

本研究采用响应面分析法对山楂叶中黄酮类化合物的提取工艺进行优化,采用乙醇回流法,先用单因素试验分析提取温度、液固比、乙醇体积分数和提取时间 4 个主要因素对山楂叶中黄酮粗提取率的影响,再通过响应面分析得出其最佳的提取条件,以期对山楂叶的深入开发与应用提供重要的试验和理论依据。

1 仪器与试剂

DFY-500 摇摆式高速中药粉碎机(温岭市大德中药器械有限公司),752 紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司),BS224S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),DKS-24 型电热恒温水浴锅(杭州蓝天化验仪器厂),SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(河南巩义市英峪予华仪器厂)。

山楂叶烘干、研磨,过 20 目筛,置阴凉干燥处备用。亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、无水乙醇均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。试验用水为蒸馏水。

2 试验方法

2.1 标准曲线的绘制

精密称取芦丁标准品 10 mg,用 60%乙醇溶解后,移至 100 mL 容量瓶中,用 60%乙醇溶液定容,即得 0.10 mg/mL 的芦丁标准溶液,备用。

精确量取芦丁标准溶液 0.00、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.50 mL,置于 10 mL 容量瓶中,分别加入 5%的 $NaNO_2$ 溶液 0.3 mL,摇匀放置 6 min,再分别加入 10%的 $Al(NO_3)_3$ 溶液 0.3 mL,摇匀放置 6 min,最后分别加入 4%的 NaOH 溶液 4.0 mL,用 60%乙醇溶液定容至 10 mL,摇匀放置 10 min。采用空白样品作参比,在 510 nm 波长测定其吸光度^[4]。以吸光度 A 为纵坐标,芦丁的质量浓度 c (mg/mL)为横坐标绘制标准曲线。

2.2 山楂叶黄酮提取工艺及粗提取率计算

山楂叶黄酮提取工艺过程:山楂叶(干燥叶)→粉碎→过 20 目筛→乙醇热回流提取→抽滤→定容→待测液。

准确移取待测液稀释 50 倍,同 2.1 项下显色、测定吸光度,计算测定提取液中黄酮的质量浓度。总黄酮粗提取率公式为:

$$\text{黄酮粗提取率} = \frac{c \times V \times 50}{W \times 1000} \times 100\%$$

式中, c —提取液中黄酮的质量浓度,mg/mL; W —称取的山楂叶粉的质量,g。

2.3 单因素试验

在山楂叶粉末目数一定的条件下,考察提取温度、液固比、乙醇体积分数和提取时间对粗提取率的影响。

2.4 响应面优化分析山楂叶黄酮提取工艺

采用 Dsign-Expert 软件处理数据,根据单因素试验结果,选取液固比(A)、乙醇体积分数(B)、提取温度(C)和提取时间(D)为试验因素,以黄酮粗提取率为响应值,设计试验。响应面因素水平见表 1。

表 1 响应面试验设计因素和水平

Table 1 Experimental factors and levels in response surface design

水平	A	B	C	D
-1	10	50	50	20
0	20	60	60	30
1	30	70	70	40

2.5 山楂叶黄酮的鉴定

采用以下 3 种方法进行山楂叶中黄酮类物质的定性鉴定^[5]。

2.5.1 铝盐显色反应

取山楂叶乙醇提取液,加入 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液摇匀,观察溶液颜色,溶液显亮黄色,说明为黄酮类化合物。

2.5.2 浓硫酸显色反应

取山楂叶乙醇提取液,加入几滴浓硫酸,摇匀后观察颜色变化,溶液由黄色变为橙色,说明为黄酮类化合物。

2.5.3 盐酸-镁粉显色反应

取山楂叶乙醇提取液,加入少量镁粉振摇,再滴加浓盐酸 3~4 滴,观察颜色变化,溶液颜色由黄色变为红色,说明为黄酮类化合物。

3 结果与讨论

3.1 标准曲线的绘制

按 2.1 方法得到芦丁标准曲线的线性回归方程为: $A = 26.162c + 0.0027$, 相关系数 $r = 0.9992$, 在试验的质量浓度范围内线性关系良好。

3.2 单因素试验结果

3.2.1 提取温度对粗提取率的影响

分别准确称取 3 g 山楂叶粉末 5 份置于 5 个圆底烧瓶中,各加入 60% 乙醇 60 mL,分别在 30、40、50、60、70 °C 水浴中提取 30 min,测定吸光度,计算黄酮粗提取率,结果见图 1。

从图 1 可知,提取温度对山楂叶中黄酮的粗提取率有较大影响,粗提取率随温度的上升而增大,60 °C 时有最大粗提取率,60 °C 后粗提取率趋于平稳。山楂叶组织随温度升高而逐渐软化,细胞膨胀,同时,温度升高降低了浸出液的黏度,增加了溶出成分的溶解度和扩散速度,有利于有效成分浸出。

3.2.2 液固比对粗提取率的影响

分别准确称取 3 g 山楂叶粉末 5 份置于 5 个圆底烧瓶中,分别按液固比 5、10、20、30、40 mL/g,用 60% 乙醇在 60 °C 水浴中提取 30 min,测定吸光度,计算黄酮粗提取率,结果见图 2。

从图 2 可知,液固比对山楂叶中黄酮的粗提取率有较大影响,粗提取率随液固比增大而增大,其中 20 mL/g 之后的增长率较之前的增长率缓慢。液固比反映了质量浓度差,质量浓度差所产生的渗透压力是植物细胞组织与提取溶剂之间相平衡过程的主要推动力。质量浓度差越大,扩散推动力越大,越有利于提高浸取效率。但是液固比过高,提取效果的提高不会很明显,而且会消耗大量的溶剂。

3.2.3 乙醇体积分数对粗提取率的影响

分别准确称取 3 g 山楂叶粉末 5 份置于 5 个圆底烧瓶中,分别加入 60 mL 体积分数为 40%、50%、60%、70%、80% 的乙醇,在 60 °C 水浴中提取 30 min,测定吸光度,计算黄酮粗提取率,结果见图 3。

从图 3 可知,乙醇体积分数对山楂叶黄酮粗提取率有较大影响,当乙醇体积分数达到 70% 时,黄酮粗提取率最高,随后略有下降趋势。根据相似相溶原理,可能是山楂叶黄酮极性与 70% 的乙醇溶液的极性大致一致。另外,乙醇体积分数过高,脂溶性物质溶出也增加,干扰因素也随之增大。因此,乙醇溶液体积分数定为 70% 左右为宜。

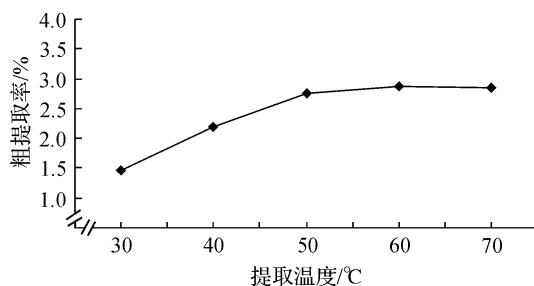


图 1 提取温度对粗提取率的影响

Fig. 1 Effects of extraction temperature on extraction yield of flavonoids

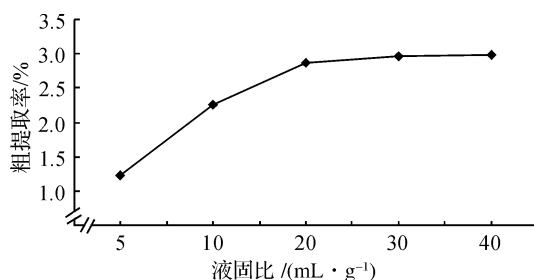


图 2 液固比对粗提取率的影响

Fig. 2 Effects of liquid-solid ratio on extraction yield of flavonoids

3.2.4 提取时间对粗提取率的影响

分别准确称取 3 g 山楂叶粉末 5 份置于 5 个圆底烧瓶中,分别加入 60%乙醇 60 mL,于 60 ℃水浴中分别提取 10、15、20、30、40 min,测定吸光度,计算出黄酮的粗提取率,结果见图 4。

从图 4 可知,提取时间对粗提取率的影响呈先上升后下降的趋势,30 min 时有最大粗提取率。提取时间太短,山楂叶中的黄酮类物质浸出太少;提取时间过长,可能是提取出的部分黄酮不稳定而被破坏分解,使得粗提取率略有下降趋势。因此,提取时间定为 30 min 左右为宜。

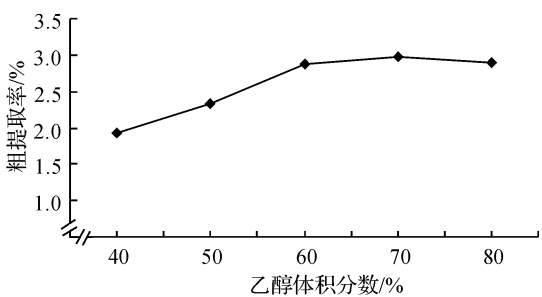


图 3 乙醇体积分数对粗提取率的影响

Fig. 3 Effects of ethanol concentration on extraction yield of flavonoids

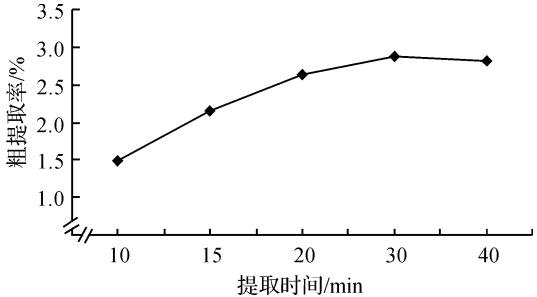


图 4 提取时间对粗提取率的影响

Fig. 4 Effects of extraction time on extraction yield of flavonoids

3.3 山楂叶黄酮提取的响应面优化分析

根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,以黄酮的粗提取率为目标函数,选取液固比(A)、乙醇体积分数(B)、提取时间(C)和提取温度(D)为自变量,设计 4 因素 3 水平的响应面分析试验。设计方案与结果见表 2。

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Arrangement and experimental results of response surface design

试验号	A	B	C	D	粗提取率/%
1	1	0	0	-1	2.82
2	0	0	-1	-1	2.31
3	1	0	0	1	2.91
4	0	0	0	0	2.86
5	0	0	1	1	2.78
6	-1	-1	0	0	2.04
7	-1	1	0	-0	2.17
8	0	0	-1	1	2.50
9	-1	0	0	-1	2.21
10	1	0	1	0	2.94
11	0	-1	0	1	2.26
12	0	-1	1	0	2.27
13	0	-1	-1	0	2.17
14	-1	0	0	1	2.21
15	0	-1	0	-1	2.15
16	0	0	1	-1	2.65
17	0	0	-1	0	2.75
18	0	1	0	1	2.92
19	1	-1	0	0	2.41
20	-1	0	-1	0	2.12
21	0	1	0	-1	2.77
22	0	0	0	0	2.78
23	0	0	0	0	2.90
24	0	0	0	0	2.83
25	1	1	0	0	2.87
26	0	0	0	0	2.75
27	0	1	1	0	2.93
28	1	0	-1	0	2.86
29	-1	0	1	0	2.24

采用 Design-Expert 统计软件对试验结果进行响应面回归分析,回归二次方程的方差显著性检验分析结果见表 3。

表 3 响应面分析法对黄酮粗提取率的方差分析

Table 3 Analysis of variance of the constructed regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2.67	14	0.19	16.38	<0.000 1
A	1.22	1	1.22	104.45	<0.000 1
B	0.81	1	0.10	69.23	<0.000 1
C	0.10	1	0.037	8.66	0.010 7
D	0.037	1	0.027	3.21	0.094 7
AB	0.067	1	0.033	5.34	0.048 5
AC	4.000×10^{-4}	1	2.025×10^{-3}	0.034	0.855 6
AD	2.025×10^{-3}	1	1.600×10^{-3}	0.17	0.683 0
BC	1.600×10^{-3}	1	4.000×10^{-4}	0.14	0.716 4
BD	4.000×10^{-4}	1	9.000×10^{-4}	0.034	0.855 6
CD	9.000×10^{-4}	1	0.25	0.077	0.785 1
A ²	0.25	1	0.28	21.81	0.000 4
B ²	0.28	1	0.075	24.36	0.000 2
C ²	0.075	1	0.081	6.48	0.023 3
D ²	0.081	1	0.012	6.94	0.019 6
残差	0.16	14	0.015		
失拟项	0.15	10	3.630×10^{-3}	4.09	0.193 5
纯误差	0.015	4			
总和	2.83	28			
$R^2=0.992\ 5$, $R^2_{\text{Adj}}=0.980\ 3$					

注:差异显著($P<0.05$),差异极显著($P<0.01$)

采用响应面分析法分析试验结果,建立二次响应面回归模型,以山楂叶黄酮的粗提取率为响应值的回归方程为:

$$\text{粗提取率} = 2.82 + 0.32A + 26B + 0.092C + 0.056D + 0.082AB - 0.010AC + 0.023AD + 0.020BC + 0.010BD - 0.015CD - 0.20A^2 - 0.21B^2 - 0.11C^2 - 0.11D^2$$

P 值的大小表明模型及各考察因素的显著水平。由表 3 可知,以山楂叶中黄酮的粗提取率为响应值时,回归方程显著性检验 $P<0.000\ 1$,表明该二次方程模型极显著;同时,失拟项 $P=0.193\ 5>0.100\ 0$,不显著,表明试验结果和数学模型拟合良好,即可用该数学模型推测试验结果^[6]。模型的调整确定系数 $R^2_{\text{Adj}}=0.980\ 3$,说明模型拟合度好,响应值的 98.03%是由于所选变量引起,表明实际值与预测值具有较好的拟合相关性,可以用该回归方程确定最佳提取工艺^[7]。

通过模型的回归方差分析(表 3)可以看出,液固比 A($P<0.000\ 1$)、乙醇体积分数 B($P<0.000\ 1$)对粗提取率的影响是极显著的,提取温度 C($P=0.010\ 7$)、交互相 AB($P=0.048\ 5$)对试验结果影响显著,而提取时间 D($P=0.094\ 7$)对试验结果影响不显著。4 个因素之间的交互作用见图 5~图 10。

从等高线图可直观反映出 2 个变量间交互作用的显著程度,等高线图的圆心越接近椭圆,表示交互作用越强,等高线的稀疏表示响应面图形的平缓^[8]。由图 5 可见,液固比(A)和乙醇体积分数(B)交互作用显著,黄酮粗提取率随液固比和乙醇体积分数的增加而增加且有增速趋缓的走势。由图 6 可见,黄酮的粗提取率随提取温度(C)和液固比(A)的升高而增加,但提取温度升高到一定程度以后,不再上升,这是因为过高的温度使得所提取出的一部分对热不稳定的黄酮成分被破坏,从而影响了粗提取率。由图 7 可见,随着液固比(A)和提取时间(D)的增加,黄酮的粗提取率随之增加,根据提取动力学理论,提取时间

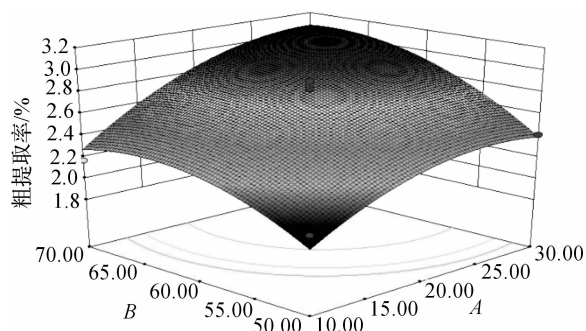


图 5 液固比和乙醇体积分数对黄酮粗提取率影响的响应面和等高线

Fig. 5 Response surface and contour line of liquid-solid ratio and ethanol concentration

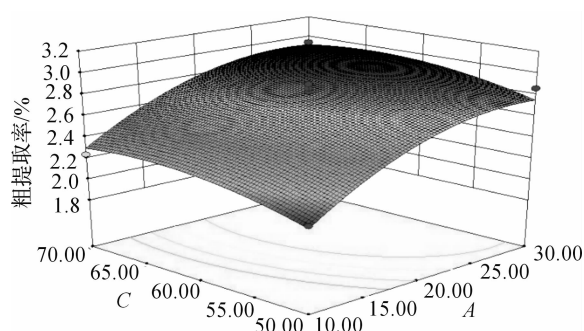


图 6 液固比和提取温度对黄酮粗提取率影响的响应面和等高线

Fig. 6 Response surface and contour line of liquid-solid ratio and extraction temperature

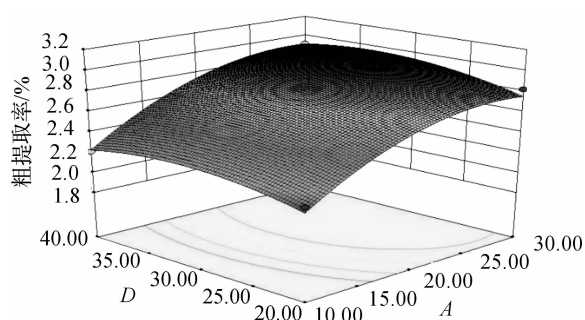


图 7 液固比和提取时间对黄酮粗提取率影响的响应面和等高线

Fig. 7 Response surface and contour line of liquid-solid ratio and extraction time

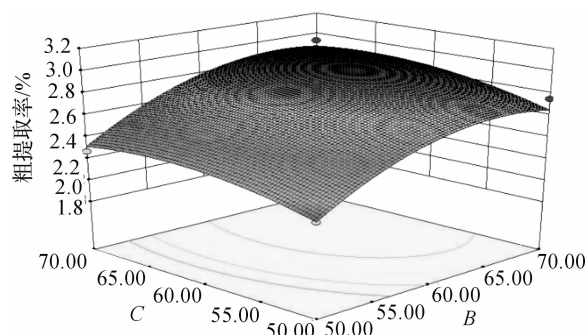


图 8 乙醇体积分数和提取温度对黄酮粗提取率影响的响应面和等高线

Fig. 8 Response surface and contour line of ethanol concentration and extraction temperature

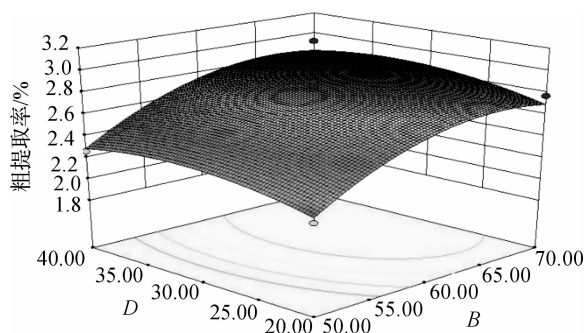


图 9 乙醇体积分数和提取时间对黄酮粗提取率影响的响应面和等高线

Fig. 9 Response surface and contour line of ethanol concentration and extraction time

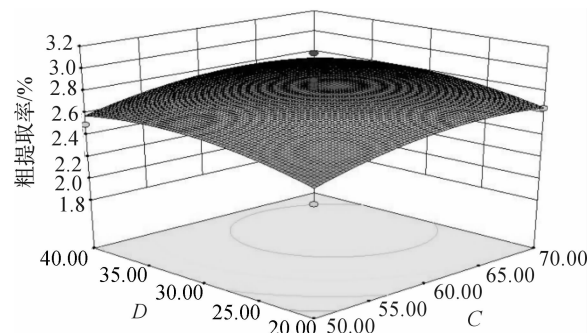


图 10 提取温度和提取时间对黄酮粗提取率影响的响应面和等高线

Fig. 10 Response surface and contour line of extraction temperature and extraction time

的延长有助于黄酮的充分扩散析出,但过长的提取时间会加剧黄酮在较高温度环境中的破坏,从而影响黄酮的粗提取率。由图 8 和图 9 可见,黄酮的粗提取率随着乙醇体积分数(B)的升高而增加,根据相似相溶的原理,最佳的乙醇体积分数是由山楂叶黄酮的极性决定的。图 10 中等高线图形趋于圆形,表明提取温度(C)与提取时间(D)的相互作用不显著。

通过 Design-Expert 软件分析,在各因素试验水平范围内,得出山楂叶黄酮的醇提理论最佳工艺条件为:液固比 29 mL/g、乙醇体积分数 68%、提取温度 64 ℃,提取时间 34 min。在所得的最佳提取工艺条件下连续进行 3 次山楂叶黄酮的提取试验,测得平均粗提取率为 3.07%,RSD 为 1.512%,与预测粗提取率 3.11%接近,说明该方程与实际情况拟合性良好。

3.4 山楂叶黄酮定性鉴定结果

山楂叶黄酮定性鉴定结果如表 4 所示,结果表明,山楂叶乙醇提取物是黄酮类化合物。

表 4 山楂叶黄酮定性鉴定结果
Table 4 Qualitative analysis of flavonoids from hawthorn leaves

鉴定类别	铝盐络合反应	浓硫酸显色反应	盐酸-镁粉反应
现象	溶液呈亮黄色	溶液呈橙色	溶液呈红色

4 结 语

综合单因素试验和响应面优化试验,得出了试验条件下山楂叶黄酮最佳提取工艺:以山楂叶粉末为原料,液固比 29 mL/g,乙醇体积分数 68%,水浴温度 64 ℃,提取时间 34 min,在此条件下的平均粗提取率达 3.07%,与预测值基本相符,说明响应面优化得到的提取工艺参数准确、可靠,具有实用价值。

参考文献:

[1] 李红,张爽,纪影实,等. 山楂叶总黄酮对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中草药,2010,41(5): 794-798.

[2] 刘俊芳,连建学,李昌俊. 山楂叶总黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 中国药房,2011,22(35): 3277-3280.

[3] 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,2005:22-23.

[4] Fu B Q, Li H, Wang X R, et al. Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase[J]. Agricultural and Food chemistry,2005,53:7408-7414.

[5] 吴立军,吴继洲. 天然药物化学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2007:182.

[6] 林建原,李丽红. 响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺[J]. 中国食品学报,2013,13(2):83-90.

[7] 王喜萍,李长生. 响应面法优化菝葜中活性成分提取工艺[J]. 食品科技,2014,39(2):205-209.

[8] 吴佳慧,王林,高菲,等. 香菇多糖的酶法提取[J]. 食品与发酵工业,2011,37(7):201-206.