

响应面法优化飞机草总黄酮提取工艺

王桂荣, 张燕娣, 张连学

(吉林农业大学 中药材学院, 吉林 长春 130118)

摘要:采用溶剂回流法从飞机草中提取总黄酮。单因素试验以提取温度、提取时间、料液比和乙醇浓度作为考察因素, Box-Behnken 中心组合试验法设计, 采用响应面法(RSM)评估了 4 个因素对飞机草总黄酮得率的影响。结果表明: 响应面的典型分析可知稳定点是最大值, 决定系数为 0.9722。飞机草黄酮最佳提取工艺条件为提取温度 80℃、提取时间 4.5 h、料液比 1:41、乙醇浓度 51%。在此条件下飞机草黄酮的得率为 7.162%。

关键词:飞机草; 黄酮类化合物; 响应面法

中图分类号:Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)15-0078-05

飞机草(*Eupatorium odoratum* L.)为菊科泽兰属多年生草本或亚灌木植物, 学名香泽兰, 原产中南美洲, 现已广泛分布在我国华南、西南地区^[1-2]。飞机草也是危害我国最为严重的外来入侵物种之一^[3]。飞机草全草入药, 是我国民间中草药, 性温, 味微酸, 具有散瘀消肿、解毒和止血功效, 用于跌打肿痛, 疮疡肿毒、皮炎和外伤出血^[4]。现代药理研究表明, 飞机草叶提取物能抑制绿脓杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、淋球菌等生长, 并能促进伤口愈合^[5-6]。近年来有关飞机草化学成分的研究取得了很大进展, 研究表明飞机草的多种药理作用与其存在的独特的多羟基黄酮类化合物有关^[7-10]。但关于飞机草中黄酮类化合物提取工艺优化的报道较少, 现采用水浴回流法提取飞机草中总黄酮, 利用 Box-Behnken 响应面法优化飞机草总黄酮提取的最佳工艺条件, 为飞机草中的黄酮类化合物的开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

飞机草全草采自四川省西昌市, 采后自然晾干, 临时用时烘箱(60℃)干燥后粉碎备用。试验试剂: 无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、盐酸均为分析纯; 芦丁标准品购于中国药品生物制品鉴定所。试验仪器: 721 可见分光光度计(上海天翔光学仪器有限公司); PL203 电

子天平(上海梅特勒-托利多仪器公司); H. H. S 电热恒温水浴锅(江苏常熟医疗器械厂); FW177 中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 芦丁标准曲线的绘制 精密量取烘箱干燥至恒重的芦丁标准品 20 mg, 以 30%乙醇超声波溶解, 并定容于 250 mL 容量瓶中, 得 0.08 mg/mL 的标准溶液。精确吸取标准液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 mL, 于 50 mL 的容量瓶中, 加入 5 g/100mL 亚硝酸钠 1.5 mL, 混合均匀, 静置 5 min, 加入 10 g/100mL 的硝酸铝 1.5 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加入 4 g/100mL 的氢氧化钠 20 mL, 加入体积分数为 30%的乙醇定容至 50 mL, 摇匀, 放置 10 min, 于 510 nm 波长处测定吸光度。以试剂空白作为参比液。标准曲线的制作以芦丁浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, Excel 线性回归得到标准曲线的方程为: $y = 11.496x - 0.0011$ ($R^2 = 0.998$)。由标准曲线可知, 芦丁检测浓度在 0.0016~0.0192 mg/mL 范围内, 吸光度与芦丁的含量呈线性关系。

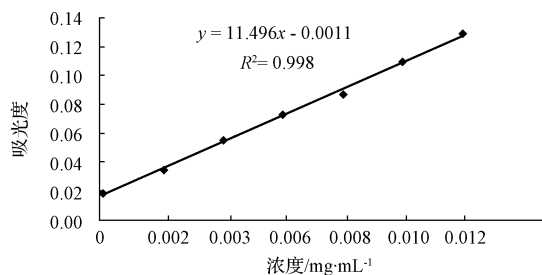


图1 芦丁标准曲线

Fig. 1 Rutin standard curve

1.2.2 飞机草总黄酮得率的测定 飞机草总黄酮得率测定方法采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 分光光度法测

第一作者简介:王桂荣(1979-), 女, 在读硕士, 研究方向为中药天然产物开发。E-mail: wangguirong1979@163.com.

责任作者:张连学(1955-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事药用植物栽培与育种及资源保护和利用方面的研究工作。E-mail: zlxbooksea@163.com.

收稿日期:2012-04-09

的^[11]。飞机草提取液加入蒸馏水定容至 250 mL,准确吸取 1 mL 于 50 mL 的容量瓶中,加入 5 g/100mL 亚硝酸钠 1.5 mL,混合均匀静置 5 min,加入 10 g/100mL 的硝酸铝 1.5 mL,摇匀,静置 6 min,加入 4 g/100mL 的 NaOH 20 mL,混合均匀静置 10 min,在分光光度计上以 510 nm 波长测定吸光度。参比液选用试剂空白。根据芦丁的标准曲线计算出总黄酮得率。

$$\text{飞机草总黄酮得率}(\%) = \frac{(A+0.0011) \times 50 \times 250}{11.496 \times 1000 \times M} \times 100,$$

式中:A-吸光度值;M-称取样品飞机草质量,g。

1.2.3 单因素试验 提取温度对飞机草总黄酮得率的影响:分别称取 5 g 粒度为 60 目的飞机草粉 6 份,分别置于圆底烧瓶中,料液比分别为 1:40,温度为 40、50、60、70、80、90℃,乙醇浓度为 50% 的条件下,回流提取 5 h。料液比对飞机草总黄酮得率的影响:分别称取 5 g 粒度为 60 目的飞机草粉 6 份,分别置于圆底烧瓶中,料液比分别为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50,温度为 80℃,乙醇浓度为 50%,加入 30 mL 乙醇回流提取 2 h 后,真空抽滤出提取液,在滤渣中加入 30 mL 乙醇继续回流提取 2 h。提取时间对飞机草总黄酮得率的影响:分别称取 5 g 粒度为 60 目的飞机草粉 6 份,分别置于圆底烧瓶中,料液比分别为 1:40,温度为 80℃,乙醇浓度为 50% 的条件下,分别提取 1、2、3、4、5 和 6 h。乙醇浓度对飞机草总黄酮得率的影响:分别称取 5 g 粒度为 60 目的飞机草粉 6 份,分别置于圆底烧瓶中,料液比为 1:30,温度为 80℃,加入 30 mL 乙醇回流提取 2 h 后,真空抽滤出提取液,在滤渣中加入 30 mL 乙醇继续回流提取 2 h,乙醇浓度分别为 40%(v/v,下同)、50%、60%、70%、80%、90%。pH 对飞机草总黄酮得率的影响:分别称取 5 g 粒度为 60 目的飞机草粉 6 份,分别置于圆底烧瓶中,料液比分别为 1:40,温度为 80℃,pH 值分别为 7、8、9、10、11、12,乙醇浓度为 50% 的条件下,回流提取 5 h。

1.2.4 响应面法优化飞机草黄酮提取工艺条件-Box-Behnken 设计 根据单因素试验结果,以影响飞机草总黄酮得率的主要因素,即提取温度、提取时间、料液比、乙醇浓度为输入变量,以总黄酮得率为试验指标,进行 Box-Behnken 中心组合设计试验。试验因素水平编码见表 1。

表 1 试验因素水平编码表

Table 1 The factors and levels of response surface methodology

水平	提取温度 $X_1/^\circ\text{C}$	提取时间 X_2/h	料液比 X_3	乙醇浓度 $X_4/\%$
-1	70	4	1:30	40
0	80	5	1:40	50
1	90	6	1:50	60

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取温度对总黄酮得率的影响 由图 2 可知,随

着提取温度的升高,飞机草总黄酮的得率逐渐增加,提取温度达到 80℃ 时飞机草总黄酮得率达到 6.723%,此后温度升高,飞机草总黄酮得率却呈现微弱的降低趋势。因此,提取温度考察范围定为 70~90℃。

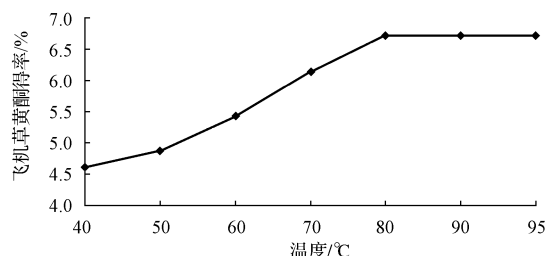


图 2 提取温度对飞机草总黄酮得率的影响

Fig. 2 The effects of extraction temperature on extraction yield of total flavonoids

2.1.2 料液比对黄酮得率的影响 由图 3 可知,随料液比的增大,飞机草总黄酮得率先增加后减少,当料液比为 1:40 时飞机草总黄酮得率达到最大为 6.411%。因此料液比考察范围定为 1:30~1:50。

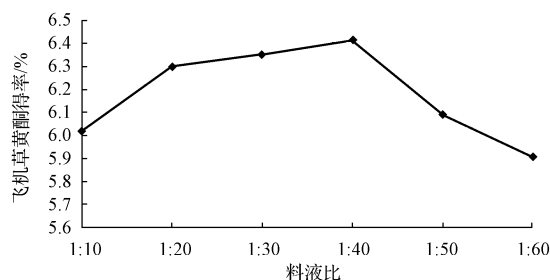


图 3 料液比对飞机草总黄酮得率的影响

Fig. 3 The effects of ratio of liquid to solid on extraction yield of total flavonoids

2.1.3 提取时间对总黄酮得率的影响 由图 4 可知,随着提取时间的延长,飞机草总黄酮的得率逐渐增加,提取时间为 5 h 飞机草总黄酮得率达到最大为 6.723%,因此提取时间的考察范围定为 4~6 h。

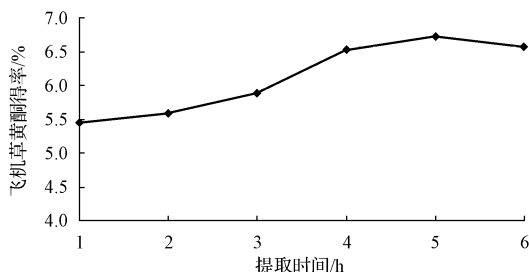


图 4 提取时间对飞机草总黄酮得率的影响

Fig. 4 The effects of extraction time on extraction yield of total flavonoids

2.1.4 乙醇浓度对总黄酮得率的影响 由图 5 可知,随着乙醇浓度的增大,飞机草总黄酮得率先增加后减少,当乙醇浓度为 50% 时飞机草总黄酮得率达到最大,为

6.564%。乙醇浓度考察范围定为 40%~60%。

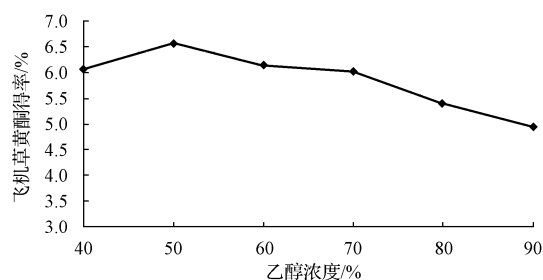


图 5 乙醇浓度对飞机草总黄酮得率的影响

Fig. 5 The effects of ethanol concentration on extraction yield of total flavonoids

2.1.5 pH 值对总黄酮提取率的影响 由图 6 可知, pH 值增大飞机草总黄酮的含量有所增加, 当 pH 值为 12 时黄酮的提取率最大为 4.834%, 但飞机草总黄酮得率的变化率比较小, 说明 pH 值对提取过程影响较小, 所以在响应面优化试验中未考虑 pH 值的影响。

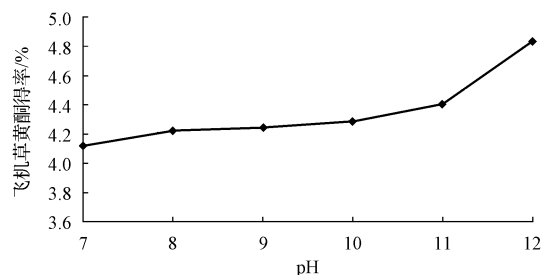


图 6 pH 值对飞机草总黄酮得率的影响

Fig. 6 The effects of pH value on extraction yield of total flavonoids

2.2 响应面试验

2.2.1 数学模型的建立及检验 采用 Design Expert 8.0 软件进行数据回归分析, 建立各影响因素之间的数学模型^[12], 并获得飞机草黄酮提取工艺的最优条件, 试验方案及试验结果见表 2。对试验结果进行多项回归分析, 得到飞机草总黄酮得率对提取温度、提取时间、料液比、乙醇浓度的二次多项回归模型为: $Y = 7.089 + 0.075 X_1 - 0.016 X_2 + 0.076 X_3 + 0.109 X_4 + 0.108 X_1 X_2 + 0.045 X_1 X_3 + 0.049 X_1 X_4 - 0.031 X_2 X_3 - 0.144 X_2 X_4 + 0.207 X_3 X_4 - 0.349 X_1^2 - 0.409 X_2^2 - 0.222 X_3^2 - 0.439 X_4^2$ 。方差分析结果见表 3。根据数理统计学的相关知识分析, 模型的失拟项 ($P = 0.13$) 不显著, 说明在试验过程中, 试验的误差等偶然因素不会对试验结果带来显著影响, 其回归方程的失拟平方和不显著。试验数据确定的数学模型的 P 值 < 0.0001 , 说明在试验因子与响应值确定的回归方程中, 其应变量与各个自变量之间的线性关系极显著, 也说明响应面试验方法可靠; Adeq Precision 是衡量信号与噪音的比率的物理量, 通常这个值应该大于 4, 该试验确定的 Adeq Precision 值为 19.562,

表 2 试验方案及试验结果

试验号	提取温度 $X_1/^\circ\text{C}$	提取时间 X_2/h	料液比 X_3	乙醇体积 $X_4/\%$	飞机草总黄酮 得率 $Y/\%$
1	0	0	0	0	7.112
2	0	0	0	0	7.012
3	-1	0	-1	0	6.418
4	0	-1	0	-1	6.127
5	0	0	0	0	7.103
6	0	1	1	0	6.489
7	1	1	0	0	6.596
8	0	1	0	-1	6.213
9	1	0	0	-1	6.216
10	0	0	1	1	6.879
11	-1	1	0	0	6.189
12	0	1	0	1	6.075
13	0	0	0	0	7.084
14	-1	0	0	-1	6.199
15	1	0	0	1	6.489
16	0	1	-1	0	6.403
17	1	-1	0	0	6.264
18	-1	0	1	0	6.484
19	-1	0	0	1	6.276
20	0	0	0	0	7.137
21	0	-1	1	0	6.562
22	0	-1	0	1	5.565
23	0	0	-1	1	6.314
24	0	0	-1	-1	6.396
25	0	-1	-1	0	6.355
26	1	0	1	0	6.714
27	1	0	-1	0	6.469
28	-1	-1	0	0	6.287
29	0	0	1	-1	6.135

表 3 回归模型分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2.910	14	0.210	34.93	< 0.0001	*
X_1	0.067	1	0.067	11.22	0.0048	**
X_2	0.003	1	0.003	0.53	0.4775	
X_3	0.069	1	0.069	11.55	0.0043	**
X_4	0.140	1	0.140	24.12	0.0002	**
$X_1 X_2$	0.046	1	0.046	7.77	0.0145	*
$X_1 X_3$	0.008	1	0.008	1.35	0.2653	
$X_1 X_4$	0.009	1	0.009	1.61	0.2245	
$X_2 X_3$	0.003	1	0.003	0.62	0.4458	
$X_2 X_4$	0.083	1	0.083	13.94	0.0022	**
$X_3 X_4$	0.17	1	0.170	28.68	0.0001	**
X_1^2	0.79	1	0.790	133.15	< 0.0001	**
X_2^2	1.08	1	1.080	182.36	< 0.0001	**
X_3^2	0.32	1	0.320	53.89	< 0.0001	**
X_4^2	1.25	1	1.250	210.22	< 0.0001	**
残差	0.083	14	0.005			
失拟项	0.074	10	0.007	3.31	0.13	not significant
纯误差	0.008	4	0.002			
总和	2.99	28				
LR-squared	0.9722		C. V. %	1.19	Adeq Precision	19.562

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

说明该试验确定的数学模型有足够的分辨力,能真实地反映试验结果;该试验确定的回归方程的变异系数(C.V. 值为 1.19%) 低于 10%,说明试验的稳定性良好;数学模型的相关系数 $R^2 = 0.9722$,响应值的变化有 97% 来源于所选择的试验单因素,用此数学模型能很好地描述试验结果,只有约 3% 的响应值变异不能通过此模型解释。综合分析表明用此模型来分析和预测飞机草黄酮的提取工艺结果是比较合适的。在回归方程模型中,对各因变量进行的方差分析结果表明:模型一次项 X_1 、 X_3 、 X_4 差异极显著;交互项 $X_1 X_2$ 差异显著, $X_2 X_4$ 、 $X_3 X_4$ 差异极显著,其它交互项差异不显著;各个二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 差异极显著,说明不能用简单的线性关系来描述试验因素与响应值之间的关系。从回归方程的系数值和方差分析结果可以看出,在响应面的试验范围内,各个试验因素的主效应关系为:乙醇浓度>料液比>提取温度>提取时间。

2.2.2 响应曲面和等高线图分析 从多元回归方程中,可以得到各个试验因素对飞机草总黄酮得率影响的响应曲面及等高线图(图 7~9)。由图 7(a)、8(a)和 9(a)响应面图可知,得到响应面图开口向下,随着每个试验因素的增大,响应面对应的值相应增大,当响应值增大到极值后,随着各因素的增大,响应值逐渐减小。该模型有稳定点,最大值就是其稳定点。从其等高线图 7(b)、

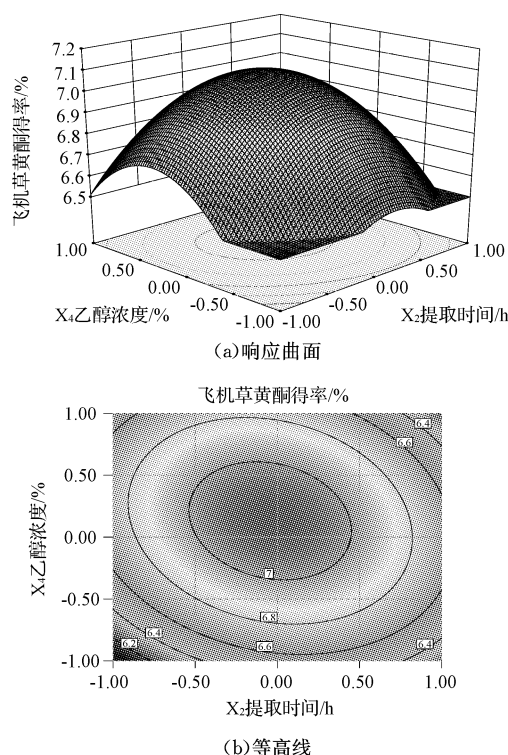


图 8 提取时间和乙醇浓度及其交互作用对总黄酮得率影响的响应曲面和等高线

Fig. 8 The response surface plot and contour plot of the effect of extraction time, ethanol concentration and their mutual interactions on extraction yield of total flavonoids

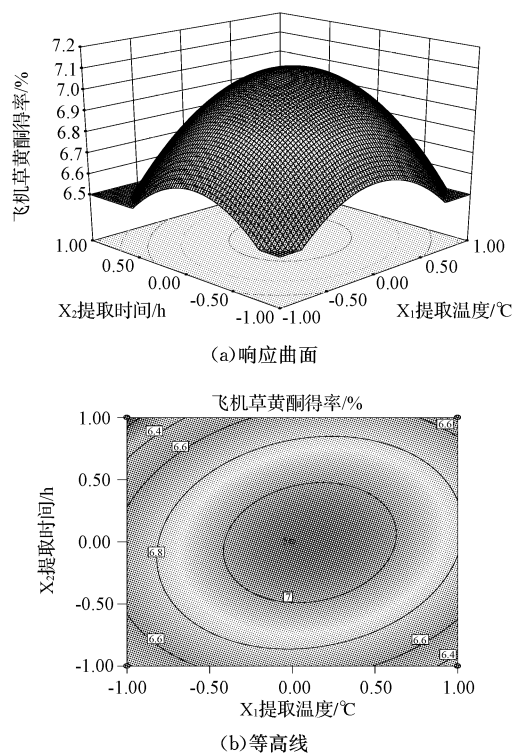


图 7 提取温度和提取时间及其交互作用对总黄酮得率影响的响应曲面和等高线

Fig. 7 The response surface plot and contour plot of the effect of extraction temperature, extraction time and their mutual interactions on extraction yield of total flavonoids

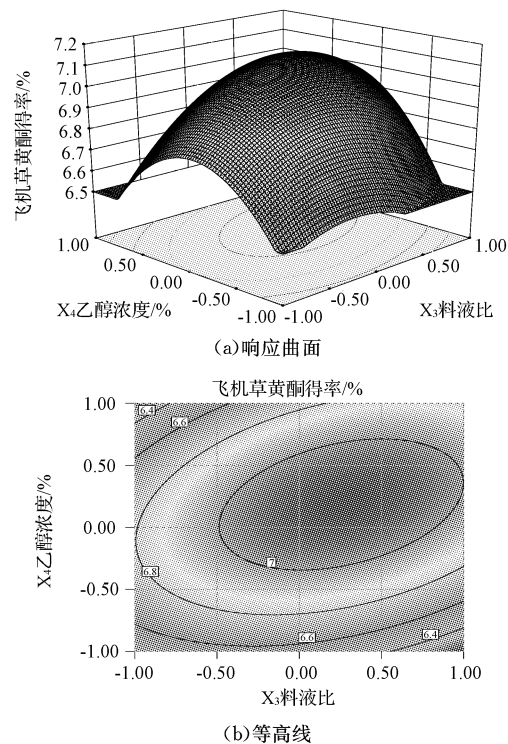


图 9 料液比和乙醇浓度及其交互作用对飞机草黄酮得率影响的响应曲面和等高线

Fig. 9 The response surface plot and contour plot of the effect of ratio of liquid to solid, ethanol concentration and their mutual interactions on extraction yield of total flavonoids

8(b)和9(b)可以直观地看出,等高线呈现椭圆型,处于同一椭圆曲线上飞机草总黄酮得率是一样的。在椭圆区域的中心,飞机草总黄酮得率最高,由中心向边缘飞机草总黄酮得率逐渐降低。同时也证明了提取温度和提取时间、提取时间和乙醇浓度、料液比和乙醇浓度这3组因素的交互作用显著。

2.2.3 最优工艺条件求取与验证 采用 Design Expert 8.0 软件确定了飞机草总黄酮提取的最优工艺条件如下:提取温度为 80.17℃,提取时间为 4.5 h,料液比为 1:40.9,乙醇体积分数为 51.20%;用此最优工艺条件提取飞机草总黄酮,飞机草总黄酮得率的理论值可达到 7.158%。为了验证响应面法结果的可靠性,同时考虑到试验条件和仪器等的局限性,对响应面法得到的最优工艺条件进行修正,最终确定的飞机草总黄酮提取最优工艺条件如下:提取温度为 80℃,提取时间为 4.5 h,料液比为 1:41,乙醇体积分数为 51%。在最优工艺条件下重复提取飞机草总黄酮 3 次进行验证试验,得到的飞机草总黄酮的平均得率为 7.162%,与理论值吻合较好,表明试验设计和响应面法优化得到的提取工艺参数准确可靠,具有一定的实用价值。

3 结论

试验采用溶剂回流提取法从飞机草中提取总黄酮,单因素试验考察提取温度、提取时间、料液比、乙醇浓度和 pH 对飞机草总黄酮得率的影响,在此基础上选择提取温度、提取时间、料液比、乙醇浓度等 4 个因素进行 Box-Behnken 中心组合试验设计,采用 Design Expert 8.0 软件进行数据回归和方差分析,建立了飞机草总黄酮提取工艺的数学模型,回归方程的决定系数为 0.9722,方程显著,拟合良好,可以进行实际预测。模型回归方程及其等高线探讨了影响飞机草黄酮得率的关键因素及各试验因素的相互作用,得到各试验因素的主效应关系为:乙醇浓度>料液比>提取温度>提取时间。提取温度和提取时间、提取时间和乙醇浓度、料液比和乙醇浓

度存在明显的交互效应。

对响应面法得到的模型进行分析,最后得到飞机草总黄酮提取的最佳工艺条件为:提取温度为 80℃,提取时间为 4.5 h,料液比为 1:41,乙醇体积分数为 51%。验证试验结果表明,利用最佳提取条件进行 3 次重复试验,飞机草总黄酮的平均得率为 7.162%,与模型预测值基本相符。数据回归分析和验证试验表明该响应面法是一种非常适合、有效的方法。

参考文献

- [1] 陈泽坦. 飞机草粗提物对棉铃虫的生物活性[J]. 农药, 2003, 42(4): 45-46.
- [2] 丁智慧, 张学镭, 刘吉开, 等. 飞机草中的化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(5): 22-24.
- [3] 袁经权, 杨峻山, 缪剑华. 飞机草化学成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1771-1773.
- [4] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 第 7 分册. 上海: 上海科技出版社, 1999: 841-842.
- [5] Phan T T, Hughes M A, Cherry G W. Effects of an aqueous extract from the leaves of *Chromolaena odorata* on the proliferation of human keratinocytes and on their migration in an in vitro model of reepithelialization[J]. Wound Repair Regen, 2001, 9(4): 305-313.
- [6] Thang P T, Patrick S, Teik L S, et al. Anti-oxidant effects of the extracts from the leaves of *Chromolaena odorata* on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes against hydrogen peroxide and hypoxanthine-xanthine oxidase induced damage[J]. Burns, 2001, 27(4): 319-327.
- [7] Sunil K T. Flavonoid and terpenoid constituents of *Eupatorium odoratum*[J]. Phytochemistry, 1974, 13: 4-5.
- [8] Barua R N. Flavonoids of *Chromolaena odorata* [J]. Phytochemistry, 1978, 17: 7-8.
- [9] Eckhard W. Exudate flavonoids in a tropical weed. *Chromolaena odorata* (L.) R. M. King et H. Robinson[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1995, 23(7/8): 873-874.
- [10] Bose K. Flavonoid constituents of *Eupatorium odoratum* [J]. Phytochemistry, 1973, 12: 667-668.
- [11] 吴杰, 翁涛, 薛巧星. 仙人掌中槲皮素提取条件的正交设计优选[J]. 武汉生物工程学院学报, 2006, 2(2): 121-124.
- [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.

Optimization of Extraction Technology for Total Flavonoids from *Eupatorium odoratum* L. by Response Surface Methodology

WANG Gui-rong, ZHANG Yan-di, ZHANG Lian-xue

(College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agriculture University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Response surface methodology (RSM) was applied to optimize extraction process of total flavonoids from *Eupatorium odoratum* L. Based on single experiments, extraction temperature, extraction time, ratio of liquid to solid and ethanol concentration were selected for Box-Behnken central composite designing. RSM was employed to study the effect of these factors on the yield of total flavonoids. The results showed that canonical analysis of surface responses revealed the stationary surface was a maximum. The coefficient of determination was 0.9722. The optimal process conditions were extraction temperature 80℃, extraction time 4.5 hours, ratio of liquid to solid 1:41 and ethanol concentration 51%. Under these optimized conditions, the extraction yield of total flavonoids was up to 7.162%.

Key words: *Eupatorium odoratum* L.; flavonoids; response surface methodology