

响应面法优化野火球总黄酮微波提取工艺

杜娟, 吴岚, 闫红, 李来军, 陈宁, 张楠楠

(佳木斯大学 药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:以野火球为试材,选择乙醇体积分数、微波时间、微波功率、液料比4个因素,利用微波提取技术对野火球全草总黄酮成分提取工艺进行研究。通过Box-Behnken中心组合设计试验和响应面分析法,模拟得到二次多项式回归方程的预测模型。结果表明:最佳提取工艺条件为乙醇浓度20%,微波时间45 s,微波功率350 W,液料比1:20 mL/g。为野火球的开发利用提供参考依据和科学数据。

关键词:野火球;总黄酮成分;微波提取法;响应面分析

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)11-0129-04

野火球(*Trifolium lupinaster* L.)属豆科(Leguminosae)车轴草属(*Trifolium*)多年生草本植物,别名车轴草,始载于《中国主要植物图说》,具有镇静安神、止咳、止血等功效^[1],目前有关野火球牧草开发^[2]和组织培养^[3]方面研究较多,由于野火球中含较丰富的黄酮类成分^[4],试验通过对其总黄酮成分提取工艺优化^[5],以期为其药理活性研究奠定基础,为野火球的进一步开发利用提供理论参考和科学数据。

第一作者简介:杜娟(1974-),女,硕士,副教授,现主要从事中药质量标准等研究工作。E-mail:jmsdujuan@126.com.

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(D201209);黑龙江省教育厅科研资助项目(12531714)。

收稿日期:2015-01-19

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试野火球采摘于黑龙江省伊春市绿潭仙翁山,经佳木斯大学药学院刘娟教授鉴别为豆科植物野火球(*Trifolium lupinaster* L.)。

仪器:S₅₄型紫外可见分光光度计(上海棱光技术有限公司);BP211D电子分析天平(德国戴多利斯公司);格兰仕微波炉(佛山市格兰仕微波炉电器有限公司);架盘药物天平(北京医用天平厂);玻璃仪器气流烘干器(英峪仪器厂);乙醇(天津市凯通化学试剂有限公司);芦丁(西安瑞盈生物科技有限公司);亚硝酸钠(哈尔滨新达化工厂);氢氧化钠(天津市博迪化工有限公司);硝酸铝(北京化工厂);试剂均为分析纯。

coating using the method of coating processing were determined at this study. It showed that,tea polyphenol incorporated into sodium alginate-based edible coating had good effect on preservation of fresh-cut *Bellis perennis*, especially 0.05 g/mL sodium alginate coating contained 2.0% (w/v) of tea polyphenol. Due to the 0.05 g/mL sodium alginate coating contained 2.0% (w/v) of tea polyphenol,the fresh weight changes maintained well and the rate of fresh weight changes only reached -0.33% after 24 days;withering rate decreased perfectly,CK group of fresh-cut *Bellis perennis* faded nearly all and the group of 0.05 g/mL sodium alginate and 0.05 g/mL sodium alginate coating contained 1.0% (w/v) of tea polyphenol faded more than half,but only 16.56% fresh-cut *Bellis perennis* become faded;the content of soluble sugar and content of soluble protein increased slowly;the maximum value of POD activity and PPO activity appeared slower,and there was a delay for 8 days,4 days,4 days separately compared with CK group,0.05 g/mL sodium alginate group and 0.05 g/mL sodium alginate coating contained 1.0% (w/v) of tea polyphenol group;MDA content of fresh-cut *Bellis perennis* increased slowly within 24 days,and MDA content was obviously smaller than that of CK group in the late;the relative conductivity stay at a lower lever,but the relative conductivity of other three groups of fresh-cut *Bellis perennis* had greatly improved.

Keywords: *Bellis perennis*; tea polyphenol; sodium alginate; preservation

1.2 试验方法

1.2.1 野火球药材的处理 将野火球药材洗净后干燥,粉碎,过筛以待备用。

1.2.2 标准溶液和储备液的配制 精密移取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8 mL 芦丁标准溶液,分别置于 25 mL 容量瓶中,加水至 2.4 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 0.4 mL 摇匀放置 6 min,精确加入 10% 硝酸铝溶液 0.4 mL 摇匀放置 6 min,精确加入 4.3% 氢氧化钠溶液 4 mL,加水至 25 mL,摇匀后静置 15 min。以试剂空白为参比,通过紫外分光光度计测定,对芦丁溶液浓度(x)和吸光度(y)进行回归处理得到回归方程为 $y=8.9056x+0.0002$, $R^2=0.9988$,表明芦丁的含量和吸光度呈良好的线性关系。

1.2.3 微波法提取总黄酮成分单因素考察 称取野火球粉末 0.1 g,采用微波提取法,分别考察乙醇浓度 20%~80%,微波时间 15~60 s,微波功率 200~400 W,液料比(1:10)~(1:30) mL/g^[6] 对黄酮成分的影响。

1.2.4 响应面试验设计 在以上微波单因素试验考查的基础上,应用响应面法中心组合设计(Box-Behnken 8.0.5b),以黄酮提取率(R)为响应值,提取液料比、微波的提取功率、乙醇溶液浓度和提取时间 4 个因素为自变量^[7],进行总黄酮成分提取工艺条件试验优化设计,见表 1。

表 1 试验因素水平及编码

Table 1 Experimental factors level and coding

水平 Level	A 浓度 Concentration/%	B 时间 Time/s	C 功率 Power/W	D 液料比 Liquid-solid ratio/(mL·g ⁻¹)
-1	20	15	250	1:20
0	40	30	300	1:25
+1	60	45	350	1:30

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇浓度的选择 按液料比 1:20 mL/g 分别加入 0%、20%、40%、60%、80% 不同浓度的乙醇,在微波功率 300 W 加热 30 s,过滤,精密移取滤液 0.2 mL。由图 1 可知,随着乙醇体积分数增加总黄酮得率逐渐提高,当乙醇体积分数约为 40% 时提取率达到最大,之后随着乙醇体积分数的增大提取率下降,因此在其它条件确定时乙醇最佳体积分数约为 40%。

2.1.2 微波时间的选择 按液料比 1:20 mL/g 加入 40% 的乙醇,在微波功率 300 W 分别加热 0、15、30、45、60 s,过滤,精密移取滤液 0.2 mL。由图 2 可知,随着反应时间的增加,总黄酮得率逐渐提高,当提取时间为 45 s 时达到最大,之后开始减少,因此,在其它条件确定的情况下,45 s 约为黄酮微波提取的最佳时间。

2.1.3 液料比选择 按液料比分别为 1:10、1:15、

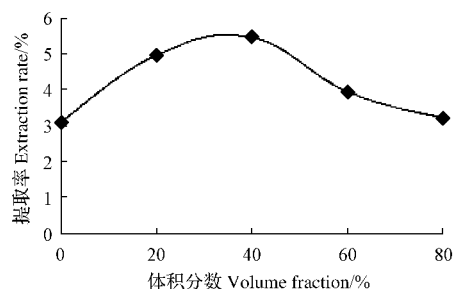


图 1 乙醇浓度对提取率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on total flavone extraction rate

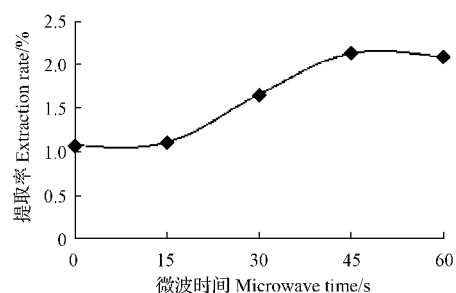


图 2 不同提取时间对提取率的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on total flavone extraction rate

1:20、1:25、1:30 mL/g 加入 40% 的乙醇,在微波功率为 300 W 下加热 45 s,过滤,精密移取滤液 0.2 mL。由图 3 可知,在料液比约为 1:10 mL/g 时黄酮得率达到最大值,之后随液料比增大得率下降,因此在其它条件一定时,1:10 mL/g 为最佳液料比。

2.1.4 微波功率的选择 按液料比 1:20 mL/g 加入 40% 的乙醇,在微波功率分别为 200、250、300、350、400 W 下加热 45 s,过滤,精密移取滤液 0.2 mL。由图 4 可知,随着微波功率增加总黄酮得率逐渐提高,当微波功率达 400 W 时提取率达到最大,因此在其它条件确定的情况下,400 W 为最优微波功率。

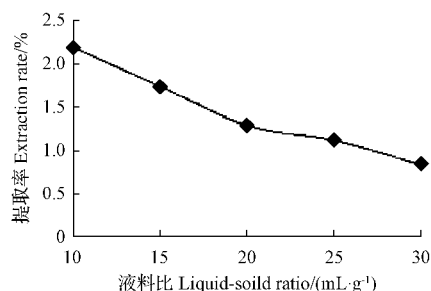


图 3 不同液料比对提取率的影响

Fig. 3 Effect of solid-liquid ratio on total flavone extraction rate

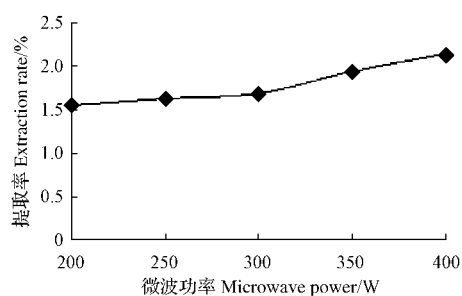


图4 不同功率对提取率的影响

Fig. 4 Effect of microwave power on total flavone extraction rate

2.2 提取工艺条件的优化

由表 2、3 可知,对试验数据进行多项式拟合回归,以总黄酮提取率(Y)为因变量,乙醇浓度(A),微波时间(B),微波功率(C)和液料比(D)为自变量,建立回归方程如下:

$$Y = 0.48960 + 0.033519A + 0.031365B + 0.017181C - 0.25003D - 4.99958E - 004AB - 3.28125E - 005AC + 9.50000E - 006AD - 5.50000E - 005BC + 5.89000E - 004BD - 3.00000E - 005CD - 1.19631E - 004A^2 - 3.58722E - 005B^2 - 1.89585E - 005C^2 + 4.00940E - 003D^2$$

由表 3 可知,上述回归方程描述与响应面值之间的关系时因其模型的 $P < 0.0001$ (显著),差拟项检验的 $P = 0.2171$ (不显著), $R^2 = 0.9988$,表明模型充分

表2 响应面分析方案及试验结果

Table 2 Experiment design and result of response surface methodology

试验号 No.	A 乙醇浓度 Concentration %	B 微波时间 Time /s	C 微波功率 Power /W	D 液料比 Liquid-solid ratio /(mL·g ⁻¹)	Y 提取率 Extraction rate %
1	1	0	0	-1	1.2000
2	-1	-1	0	0	0.7500
3	0	-1	0	-1	1.2263
4	0	0	0	0	1.0575
5	0	0	0	0	0.9788
6	-1	0	0	-1	1.2338
7	-1	0	-1	0	0.8063
8	0	1	1	0	1.1025
9	-1	0	1	0	1.08375
10	1	1	0	0	0.8213
11	0	0	1	-1	1.3388
12	0	1	0	-1	1.4250
13	0	1	0	1	1.0988
14	0	-1	-1	0	0.6000
15	-1	1	0	0	1.1400
16	0	0	0	0	0.9228
17	0	0	0	0	0.9863
18	0	1	-1	0	0.9750
19	-1	0	0	1	0.7988
20	0	-1	0	1	0.7234
21	1	0	-1	0	0.8438
22	1	0	1	0	0.9900
23	0	0	-1	1	0.7650
24	0	-1	1	0	0.8925
25	1	-1	0	0	1.03125
26	0	0	0	0	0.9975
27	0	0	-1	-1	1.1175
28	1	0	0	1	0.7688
29	0	0	1	1	0.9563

表3 回归模型方差分析

Table 3 Regression model analysis of variance

方差来源 Source	平方和 Sum of Square	自由度 DF	均方 Mean square	F F value	Pr>F
模型	1.00	14	0.072	15.93	<0.0001
A-乙醇浓度	2.067E-003	1	2.067E-003	0.46	0.5085
B-微波时间	0.15	1	0.15	33.28	<0.0001
C-微波功率	0.13	1	0.13	29.29	<0.0001
D-料液比	0.49	1	0.49	109.62	<0.0001
AB	0.090	1	0.090	20.04	0.0005
AC	4.307E-003	1	4.307E-003	0.96	0.3440
AD	3.610E-006	1	3.610E-006	8.040E-004	0.9778
BC	6.806E-003	1	6.806E-003	1.52	0.2385
BD	7.806E-003	1	7.806E-003	1.74	0.2085
CD	2.250E-004	1	2.250E-004	0.050	0.8261
A ²	0.015	1	0.015	3.31	0.0904
B ²	4.226E-004	1	4.226E-004	0.094	0.7635
C ²	0.015	1	0.015	3.25	0.0932
D ²	0.065	1	0.065	14.51	0.0019
残差	0.063	14	4.490E-003		
失拟性	0.054	10	5.360E-003	2.32	0.2171
纯误差	9.257E	4	2.314E-003		
总差	1.06	28			

拟合试验数据,该方程是野火球中总黄酮提取率与提取工艺各参数的合适数学模型^[8]。由图 5、6 可知,利用此回归方程确定野火球总黄酮的最佳提取工艺为乙醇浓度 20%,微波时间 45 s,微波功率 350 W,料液比 1:20 mL/g。

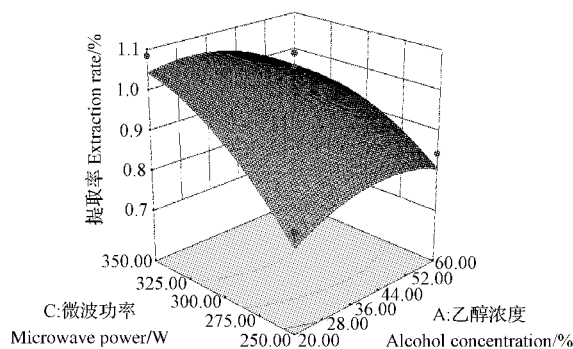
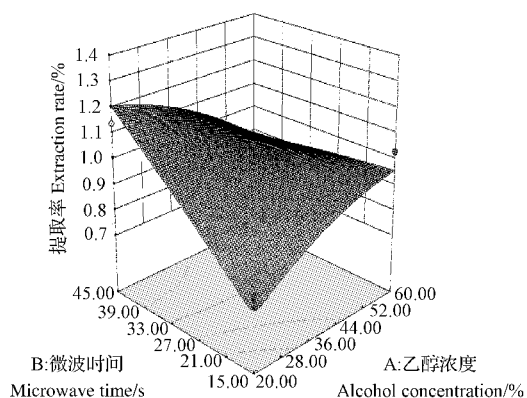


图5 微波时间和功率对提取率的影响

Fig. 5 Effect of microwave time and microwave power on total flavone extraction rate

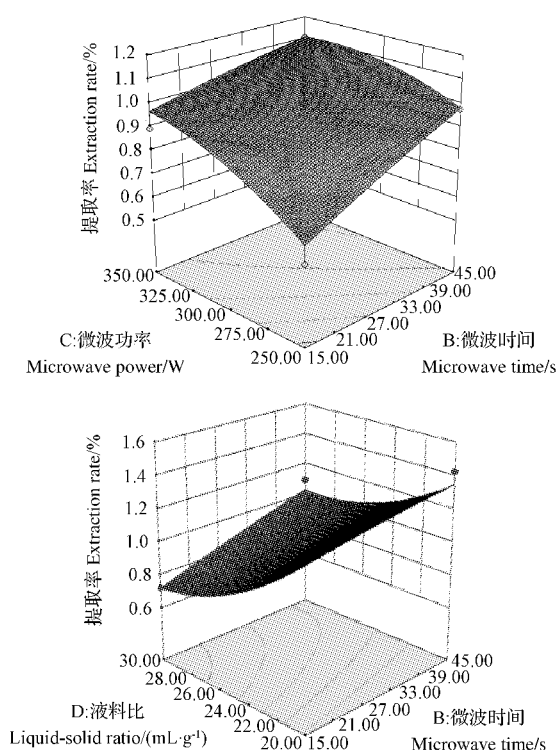


图6 微波时间和液料比对提取率影响

Fig. 6 Effect of microwave time and liquid-solid ratio on total flavone extraction rate

3 结论

该研究在单因素试验的基础上,应用微波提取法,对野火球全草总黄酮成分提取工艺进行了优化,在响应面分析基础上建立了提取量与4种因素的回归方程,确立了最佳提取工艺根据拟合模型绘制响应面的三维图与等高线图1、2中试验确定最佳提取工艺条件,结果显示,最佳提取条件为乙醇浓度20%,微波时间45 s,微波功率350 W,液料比1:20 mL/g,为野火球开发利用提供了科学依据。

参考文献

- [1] 王跃东. 三叶草[M]. 昆明:云南科技出版社,2000:94-98.
- [2] 崔日顺,罗忠默,张万哲,等. 野火球草粉开发利用及调制技术[J]. 中国饲料,1995(17):25-27.
- [3] 赵桂兰,罗希明,刘颜芝. 野火球悬浮培养细胞原生质体再生植株[J]. 植物学报,1991,33(7):547-551.
- [4] 王丽艳,邢凤兰,高春林,等. 野火球的化学成分研究[J]. 中草药,2010,11(41):1776-1779.
- [5] Jung H S, Kim M H, Gwak N G, et al. Antiallergic effects of *Scutellaria baicalensis* on inflammation in vivo and in vitro[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 141:345-349.
- [6] 邵文斌,于爱红,束长宇,等. 响应面法优化靛壳花椒果皮多糖提取工艺[J]. 中成药,2012,34(9):1806-1810.
- [7] 李海滨,胡晓旭,普开,等. 响应面法优化野波罗蜜根皮总黄酮的微波提取工艺[J]. 食品工业科技,2014,33(6):226-229.
- [8] 侯学敏,李林霞,张直峰,等. 响应面法优化薄荷叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品科学,2013,34(6):124-128.

The Determination and Extraction Technology Optimization of Flavonoids Content from *Trifolium lupinaster* L.

DU Juan, WU Lan, YAN Hong, LI Lai-jun, CHEN Ning, ZHANG Nan-nan
(Pharmacy Department, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: Taking *Trifolium lupinaster* as material, the effects of ethanol volume fraction, microwave irradiation time, microwave power, material liquid ratio on the extraction rate of total flavonoids content were studied based on the single factor experiment using Box-Behnken central composite experimental design and response surface analysis (RSM) method, established two regression equations of microwave extraction of flavonoids, and the extraction rate of total flavonoids content by response surface graph drawing and the contour map as the response value. The results showed that, through the analysis to determine the best extraction conditions test response surface, that were 20% ethanol concentration, microwave time 45 seconds, microwave power 350 W, the ratio of liquid to solid 1:20 mL/g. It provided a theoretical basis and technical support for further development and utilization of *Trifolium lupinaster*.

Keywords: *Trifolium lupinaster*; the total flavonoids components; microwave extraction; response surface analysis