

响应面法优化东北接骨木总黄酮的超声波提取工艺

张 爽, 刘淑英, 于莉莉, 仲文晶, 刘洪章

(吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 134001)

摘 要:对乙醇体积分数、超声时间、液料比、超声温度进行单因素试验,在此基础上选取乙醇体积分数、超声时间、液料比进行响应面法优化东北接骨木总黄酮的超声波提取工艺的研究,利用响应面分析这3个因素对东北接骨木总黄酮提取的影响。结果表明:东北接骨木中总黄酮超声提取的最佳工艺为:乙醇体积分数为76.03%,超声时间48.86 min,液料比为19.53 mL/g,黄酮提取量达到5.79692 mg/g。

关键词:东北接骨木;超声提取;总黄酮;响应面法

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)14-0011-04

东北接骨木(*Sambucus mandchurica* Kitag.)属忍冬科接骨木属。接骨木大约有40余种,在我国大概产20余种^[1-2],大部分生长在我国的东部、华北和东北等地,东北地区大概生长有5~6种。东北接骨木是珍贵的药用植物,它的主要功效有活血、祛风、治筋骨疼痛风湿等^[3]。同时东北接骨木也是我国非常重要的观赏植物之一^[4],

具有较大的开发潜力^[5],所以近些年来国内外对这种植物的研究也日益增加^[6-7]。

响应面法是利用多元二次回归方程,建立函数关系,对函数的等高线以及响应面进行分析,然后研究各确定因子之间的关系,最后确定最佳的工艺参数^[9-11]。响应面法具有很多的优点,尤以良好的预测性、较高的精准度、通过函数关系可以确定最合理参数等优点最为突出,所以近些年广泛地应用于各个领域^[12]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

东北接骨木叶采自吉林农业大学校园;芦丁标准品由中国药品生物制品检定所提供;无水乙醇分析纯由北

第一作者简介:张爽(1987-),女,在读硕士,研究方向为天然产物化学。E-mail:zhangshuang5566@qq.com.

责任作者:刘洪章(1957-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为作物资源。E-mail:lhaz999@126.com.

基金项目:吉林省科技厅资助项目(20100254)。

收稿日期:2012-03-26

[7] 曲泽洲. 几种山区果树根系的研究[J]. 河北园艺, 1985(1):15-19.

[8] 沈隽. 果树植物的根系及研究方法[J]. 北京农业大学学报, 1956(2):1-4.

[9] 山东农学院园艺系果树栽培教研组. 果树根系研究[J]. 山东农学院学报(自然科学版), 1959(4):33-44.

[10] 刘兴治, 赵云清, 于长明, 等. 果树根系分布的研究(二) 梨、桃、李、杏、櫻桃、核桃、板栗[J]. 北方果树, 1980(4):11-14.

(致谢:贵州省遵义师范学院生物系 2006、2007 级学生参加部分研究,在此表示感谢。)

The Root Distribution of Cherries Introduced to Guizhou

SHI Hong-qin¹, ZOU Chen¹, CHEN Rong-hua²

(1. Biology Department, Zunyi Normal College, Zunyi, Guizhou 563002; 2. Fruit and Vegetable Station, Zunyi Agriculture Bureau, Zunyi, Guizhou 563002)

Abstract: With 'Pitch-black', 'Hongdeng', 'Dazi', 'Zhifuhong', 'Longguan' cherry as the materials, the distribution of their tree roots were observed with Oskamp method. The results showed that cherry tree distributed in the area of 300 cm distance from the main trunk and the depth of 90 cm. The distribute rate of the roots(the diameter \leq 2 mm) was about 33.54%, the 2 mm \leq the diameter \leq 10 mm was about 59.92% and the diameter \geq 10 cm was about 6.54%, the 40 cm lateral distance from main trunk was the dense regions of the cherry tree roots, outside of this range, the amounts of the tree root reduced with the increase of the depth and the lateral distance from the main trunk.

Key words: cherry; root distribution; observation; Guizhou

京化工厂生产。主要仪器:UV1800 紫外分析仪(岛津仪器有限公司),旋转蒸发仪(上海青浦沪西仪器厂),WB-9415B 超声波清洗器(北京六一仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的绘制 准确称取芦丁标准试剂 0.005 g,用体积分数为 70%乙醇进行溶解,然后定容到 100 mL 的容量瓶中,摇匀即可。分别吸取对照品标准溶液 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于容量瓶中,加入 5%NaNO₂ 溶液 0.3 mL,摇匀放大约 5 min,再加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL,摇匀放大约 5 min,再加入 1 mol/L NaOH 溶液 5.0 mL,用体积分数为 70%乙醇稀释至刻度,然后放大约 20 min,在波长为 510 nm 处测定吸光值,然后制作标准曲线,线性回归方程为 $y = 11.692x + 0.0077$; $R^2 = 0.9995$ 。

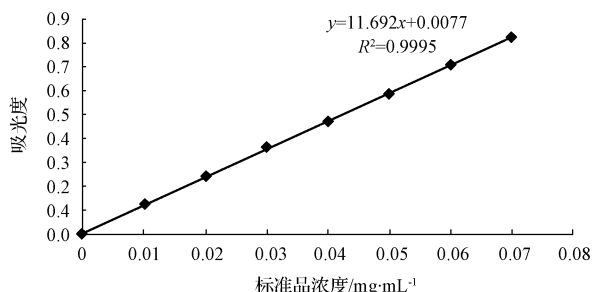


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 The standard curve of rutin

1.2.2 样品溶液的制备 精确 2 g 东北接骨木叶粉末,放入 30 mL 容量瓶中,用体积分数为 70%乙醇定容,然后进行超声提取 30 min,抽滤,即得样品溶液。

1.2.3 东北接骨木的总黄酮得率的计算 准确吸取样品溶液 2 mL 于 10 mL 容量瓶中,用 70%乙醇定容,按照 1.2.1 的方法测定吸光度,用下列公式计算东北接骨木总黄酮得率:总黄酮得率(%) = $(C \times V_1 \times V_2 \times 10^{-3}) / (W \times V_0) \times 100\%$; C-样品溶液的浓度(mg/mL); V_1 -稀释体积(mL); V_2 -样品溶液定容后的体积(mL); V_0 -吸光度所用样品溶液体积(mL); W-样品的质量(g)。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对东北接骨木总黄酮得率的影响

在超声提取时间为 30 min,超声的功率为 200 W,超声的温度为 40℃,料液比为 1:15 的条件下,不同的乙醇体积分数对东北接骨木总黄酮得率的影响见图 2。由图 2 可知,当乙醇体积分数小于 70%时,随着乙醇体积分数的提高,东北接骨木总黄酮得率也随着增大;当乙醇体积分数达到 70%时,东北接骨木总黄酮提取率达到了最大;当乙醇体积分数超过 70%的时候,东北接骨木总黄酮提取率逐渐下降。因此,该试验最终选取了乙醇体

积分数为 70%为最佳的提取溶剂,将乙醇体积分数选择在 60%~80%进行下一步的响应面优化条件。

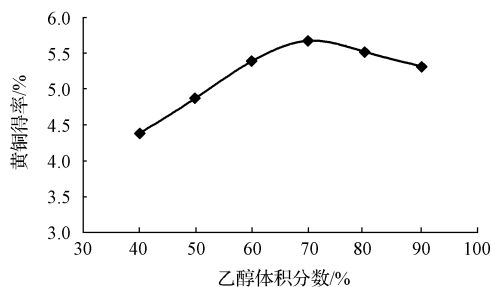


图2 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响

Fig.2 The effect of ethanol concentration on extraction yield of total flavonoids

2.1.2 超声温度对东北接骨木总黄酮得率的影响 在超声提取时间为 30 min,超声功率为 200 W,乙醇体积分数为 70%,料液比为 1:15 的条件下,不同超声温度对东北接骨木总黄酮得率的影响见图 3。由图 3 可知,随着温度的升高东北接骨木总黄酮得率略微提高,当温度达到 40℃以后,随着温度的升高,东北接骨木总黄酮得率有下降的趋势,但不明显,说明温度对东北接骨木总黄酮的提取率影响不大,所以响应面法中不考虑温度因素对东北接骨木总黄酮提取率的影响。

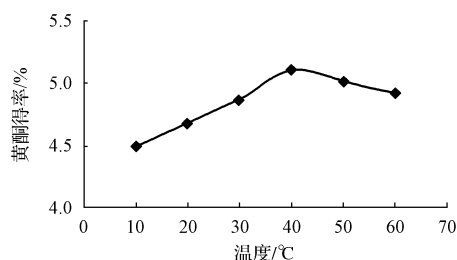


图3 超声温度对总黄酮得率的影响

Fig.3 The effect of extraction temperature on extraction yield of total flavonoids

2.1.3 超声时间对东北接骨木总黄酮得率的影响 在超声提取温度为 40℃,超声的功率为 200 W,乙醇体积分数为 70%,料液比为 1:15 的条件下,不同超声时间对东北接骨木总黄酮得率的影响见图 4。由图 4 可知,当提取时间在 20~50 min,东北接骨木总黄酮得率呈上升趋势,然后随时间的延长总黄酮得率呈现逐渐下降的趋势。该试验选取了 50 min 作为提取的最佳时间,将提取时间选择在 40~60 min 作为响应面优化条件。

2.1.4 液料比对东北接骨木总黄酮得率的影响 在超声提取时间为 30 min,超声的功率为 200 W,乙醇体积分数为 70%,提取时间为 50 min 的条件下,不同液料比对东北接骨木总黄酮得率的影响见图 5。由图 5 可知,随着液料比的增加,东北接骨木总黄酮得率逐渐升高,当液料比达到 20 mL/g 时总黄酮得率达到最大,随着液料

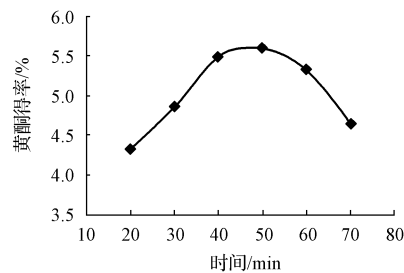


图 4 超声时间对总黄酮得率的影响

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

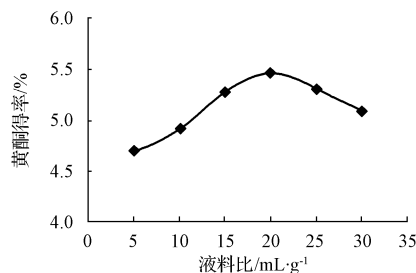


图 5 液料比对总黄酮得率的影响

Fig. 5 The effect of ratio of liquid-solid ratio extraction yield of total flavonoids

比的增加,东北接骨木总黄酮得率下降。因此,该试验选取 20 mL/g 为液料比的最佳值,同时把液料比选择在 15~25 mL/g 作为响应面下一步优化的条件。

2.2 采用响应面法优化东北接骨木总黄酮得率工艺

2.2.1 响应面法因素和水平的选取 根据以上的单因素试验,该试验选取了 3 个因素进行试验设计,分别是乙醇体积分数、超声时间、液料比。并在每个因素中最大的东北接骨木黄酮得率区域选择 3 个合适的水平,用 +1 代表自变量高水平,用 0 代表自变量中水平,用 -1 代表自变量低水平(表 1)。

表 1 响应面法的因素和水平

Table 1 The factors and levels of response surface methodology

因素/水平 The factors and levels	-1	0	1
时间 Time/min	40	50	60
液料比 Liquid-solid ratio/mL · g ⁻¹	15	20	25
乙醇浓度 Ethanol concentration/%	60	70	80

2.2.2 响应面试验方案及结果 取 3 个自变量,分别为超声时间(A)、乙醇浓度(B)、液料比(C),在超声温度为 40℃时,以东北接骨木总黄酮提取率为响应值(R),进行响应面试验,结果见表 2、3。

2.2.3 方差分析及显著性检验 通过响应面软件进行分析,响应面回归方程模型为:黄酮提取 = -34.58164 + 0.60268A + 0.97916B + 0.38976C - 2.53400 × 10⁻³ AB + 8.72000 × 10⁻⁴ AC - 3.71100 × 10⁻³ BC - 6.04895 × 10⁻³ A² - 0.014028B² - 2.30845 × 10⁻³ C²。模型 P < 0.05,表明该模型显著。模型复相关系数为 0.9834。模型中 3

表 2 响应面方案及试验结果

Table 2 The experiments design and results of response surface methodology

试验序号 Experiment numbers	时间 A Time /min	液料比 C Liquid-solid ratio /mL · g ⁻¹	乙醇浓度 B Ethanol concentration /%	黄酮提取率 Extraction ratio/%
1	1	1	0	4.9136
2	-1	0	1	5.0605
3	-1	-1	0	4.3141
4	0	0	0	5.6808
5	0	1	-1	5.0472
6	1	0	1	5.4274
7	-1	1	0	5.0338
8	0	1	1	5.3472
9	0	0	0	5.6729
10	1	0	-1	4.4859
11	0	0	0	5.7226
12	0	0	0	5.7871
13	0	-1	-1	4.5109
14	0	-1	1	5.5531
15	-1	0	-1	4.4678
16	0	0	0	5.6173
17	1	-1	0	4.7007

个二次项、乙醇体积分数(C)、交互项 BC 影响为极显著水平;一次项液料比(B)、交互项 AB 的影响均为显著;时间(A)、交互项 AC 影响为不显著。该模型的纯误差的均方值较小为 3.991 × 10⁻³,说明此模型有效,应用响应曲面法优化提取东北接骨木总黄酮的提取工艺可行。

表 3 二次响应面回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of quadratic response surface regression mode

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P-value Prob>F
Model	4.018892143	9	0.446543571	46.19744281	<0.0001
A-时间	0.053040245	1	0.053040245	5.487311523	0.0517
B-液料比	0.199396125	1	0.199396125	20.62865008	0.0027
C-乙醇体积分数	1.03420962	1	1.03420962	106.9947992	<0.0001
AB	0.06421156	1	0.06421156	6.643046861	0.0366
AC	0.03041536	1	0.03041536	3.146639979	0.1194
BC	0.13771521	1	0.13771521	14.24741267	0.0069
A ²	1.540622994	1	1.540622994	159.3861097	<0.0001
B ²	0.517839929	1	0.517839929	53.57345176	0.0002
C ²	0.22437648	1	0.22437648	23.21300825	0.0019
Residual	0.067661862	7	0.00966598		
Lack of fit	0.05169685	3	0.017232283	4.317512153	0.0958
Pure error	0.015965012	4	0.003991253		
Cor total	4.086554005	16			

2.2.4 响应面超声提取东北接骨木总黄酮的得率 通过响应面法超声提取东北接骨木总黄酮的得率试验得出最优条件,在乙醇体积分数为 76.03%,超声时间 48.86 min,液料比为 19.53 mL/g,黄酮提取量达到 5.79692 mg/g。考虑到实际操作的便利,将东北接骨木总黄酮提取最佳条件调整为 40℃下乙醇体积分数为

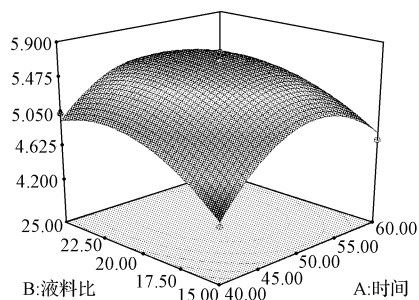


图6 超声时间与乙醇浓度的响应面

Fig. 6 Response surface method of A and B

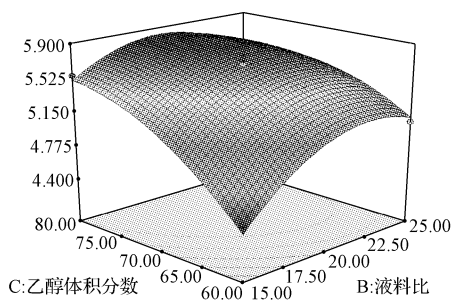


图7 乙醇体积分数与液料比的响应面

Fig. 7 Response surface method of B and C

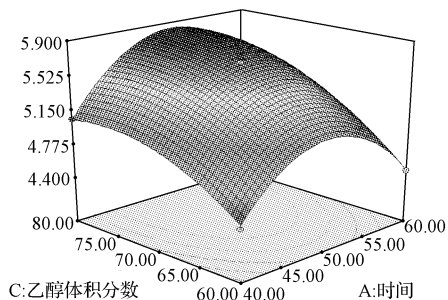


图8 时间与乙醇体积分数的响应面

Fig. 8 Response surface method of A and C

70%, 超声的时间 50 min, 液料比 20 mL/g, 实际测得的东北接骨木总黄酮的提取量为 5.6612 mg/g, 与响应面预测值相差不大, 该模型可行, 具有一定的实用价值。

3 结论

该试验通过响应面法确定了东北接骨木提取总黄酮的最佳提取工艺条件为: 乙醇体积分数为 76.03%, 超声时间 48.86 min, 液料比为 19.53 mL/g, 黄酮提取量达到 5.79692 mg/g。各因素对东北接骨木总黄酮提取率影响由大到小为: 乙醇体积分数 > 液料比 > 超声时间, 其中乙醇体积分数的影响最为显著。

参考文献

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 1280 卷. 北京: 科学出版社, 1961-2004.
- [2] 吴征镒, 路安民, 汤彦承, 等. 中国被子植物科属综论[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 2093.
- [4] 杨春澍. 药用植物学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1997.
- [5] Yang X J, Wong M S, Wang N L, et al. A new eudesmane derivative and a new fatty acid ester from *Sambucus williamsii* [J]. Chem Pharm Bull, 2006, 54(5): 676.
- [6] Yang X J, Wong M S, Wang N L, et al. Lignans from the stems of *Sambucus williamsii* and their effects on osteoblastic UMR106 cells [J]. J Asian Nat Prod Res, 2007, 9(6/8): 583.
- [7] 杨序娟, 王乃利, 黄文秀, 等. 接骨木中的三萜类化合物及其对类成骨细胞 UMR106 的作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(6): 449.
- [8] Capel-Martinez J L. Ultrasound in chemistry: analytical applications [M]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, 2009: 60-70.
- [9] Bas D, Boyaci I H. Modeling and optimization. I: usability of response surface methodology [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78: 836-845.
- [10] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3): 91-94.
- [11] 茆诗松, 王静龙, 史定华, 等. 统计手册[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 78-86.
- [12] 赵鹏, 李稳宏, 朱骤海, 等. 超声波提取冬花多糖的响应面法工艺优化[J]. 精细化工, 2009, 26(6): 548.

Optimization of Total Flavonoids Extraction from *Sambucus mandchurica* Kitag by Response Surface Method

ZHANG Shuang, LIU Shu-ying, YU Li-li, ZHONG Wen-jing, LIU Hong-zhang
(College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 134001)

Abstract: Through four factors that is ethanol concentration, extraction time, liquid-solid ratio and extraction temperature for the single factor experiments, on the basis of selecting the ethanol concentration, extraction time, liquid-solid ratio for the optimization of total flavonoids extraction from *Sambucus mandchurica* Kitag, the three factors for extraction yield of the total flavonoids by RSM were studied. The results showed that best condition to ultra the total flavonoids from *Sambucus mandchurica* Kitag were ethanol concentration 76.03%, ultrasound time 48.86 min and liquid solid ratio 19.53 mL/g, the extraction yield of the total flavonoids was 5.79692 mg/g.

Key words: *Sambucus mandchurica* Kitag; ultrasonic extraction; total flavonoids; response surface methodology