

## 响应面法优化镰形棘豆中总黄酮微波提取工艺

陈晨, 奚稳, 陈涛, 赵景阳, 李玉林\*

中国科学院藏药研究重点实验室 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008

**摘要:** 利用响应面分析法优化镰形棘豆中总黄酮提取工艺。在单因素试验的基础上, 选取微波功率、提取时间、料液比 3 个因素为自变量, 以乙醇浓度为 75% 的条件下, 以总黄酮提取率作为响应值, 采用 3 因素 3 水平的响应面分析法, 依据回归分析确定最优提取工艺为: 微波提取功率为 731 W, 提取时间为 26 min, 料液比为 26, 在此条件下总黄酮提取率理论值为 1.58%, 实际测得值为 1.56%, 两者较接近。在单因素试验的基础上采用响应面法对总黄酮提取条件优化合理可行, 验证实验表明所得模型方程能较好地预测实验结果。

**关键词:** 镰形棘豆; 总黄酮; 微波提取法; 响应面分析法

中图分类号: R93

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.026

## Optimization for Extraction Conditions of Flavonoids from *Oxytropis falcata* Bunge with the Response Surface Method

CHEN Chen, XI Wen, CHEN Tao, ZHAO Jing-yang, LI Yu-lin\*

Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology,  
Chinese Academy of Sciences, Xining, 810008, China

**Abstract:** We used the Box-Behnken design to optimize flavonoids extraction from *Oxytropis falcata* Bunge. The independent factors included microwave power (A), extraction time (B), and raw material to water ratio (C). The experimental values were fitted to a second-order polynomial equation using multiple regression analysis and a statistical method. Analysis of Variance results indicated that all factors had an impact on *Oxytropis falcata* Bunge flavonoids extraction. The optimal conditions for efficient yield of flavonoids, giving a maximum yield of 1.58%, were: A = 731 W, B = 26 min and C = 26 g/mL. The obtained yields 1.56% were comparable with the optimized condition, which indicated that our model is accurate.

**Key words:** *Oxytropis falcata* Bunge; flavonoids; microwave extraction; Response Surface Method

藏药镰形棘豆 (*Oxytropis falcata* Bunge) (藏药名为莪达夏) 是豆科 (*Leguminosae*) 棘豆属 (*Oxytropis* D. C.) 多年生草本植物。生长在 2700 ~ 4300 m 的河滩、沙地、山坡、草甸, 产于青藏高原<sup>[1]</sup>。镰形棘豆主要具有抗炎止痛、清热解毒、止血等功效。用于利便、除毒、消肿、止血, 可治疗麻风病、流感及扁桃体炎等多种病症。由于其突出的疗效, 具有“草药之王”的美誉<sup>[2,3]</sup>。镰形棘豆是藏医常用的三大抗炎药之一, 藏医在临床上使用广泛, 它是六味镰形棘豆散、九味青鹏散、奇正藏贴、奇正消痛贴膏的多种藏药复方或藏成药的主要药物, 是一味非常具有研究和开发价值的天然药物。同时, 镰形棘豆属于疯草类植物, 生长速度快。而且家畜误食后常引起中

毒甚至死亡, 给畜牧业造成了巨大的损失。镰形棘豆目前不仅是草药之王, 同时也是毒草, 所以该植物具有的活性特征是双重性的。

黄酮类成分是棘豆属植物的主要化学成分之一, 该属植物中黄酮类化合物苷元主要为芹菜素、木犀草素、山奈酚、槲皮素、杨梅素、鼠李素、异鼠李素, 糖取代基有葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖, 其黄酮苷为氧甙。从棘豆属植物中分离得到的黄酮类及其衍生物共五六十之多<sup>[4-6]</sup>。黄酮类化合物的生理活性与其独特的化学结构密切相关, 随着对其功效关系的深入研究, 发现了部分药理作用的作用机制, 为其在医药、食品领域的应用提供了理论依据, 加快了黄酮类化合物的开发和利用。研究表明, 镰形棘豆中黄酮类化合物是主要的抗炎成分, 黄酮类化合物的药理效应是通过神经内分泌调节, 激活下丘脑-垂体-肾上腺轴, 改善体内应激状态来实现抗炎作用。

目前, 镰形棘豆中黄酮提取方法主要为热回流

提取,该方法能耗较高,不能满足环保的要求,因此急需一种镰形棘豆中黄酮提取的有效方法。本文拟采用响应面优化设计镰形棘豆中黄酮化合物的提取工艺,进一步开发和利用镰形棘豆。

## 1 材料、试剂与仪器

镰形棘豆于2016年8月采自青海省海北州,经中国科学院西北高原生物研究所孙菁副研究员鉴定;芦丁标准品购自中国药品检定所(批号:100080-200707,含量为90.5%),乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠均为分析纯。自制超纯水。

微波提取仪(RWBC,南京苏恩瑞公司)METTLER TOLEDO PL203和XS204电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);TU-1901型紫外可见分光光度计;

## 2 实验方法

### 2.1 对照品溶液的制备

取芦丁对照品20 mg,精密称定,置50 mL量瓶中,加75%乙醇使溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取25 mL,置50 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得200 μg/mL芦丁储备液。

### 2.2 标准曲线绘制

精密量取对照品溶液1、2、3、4、5、6 mL,分别置25 mL量瓶中,各加30%乙醇至6 mL,加5%亚硝酸钠溶液1 mL,混匀,放置6 min,再加10%硝酸铝溶液1 mL,摇匀,放置6 min,加氢氧化钠试液10 mL,再加30%乙醇至刻度,摇匀,放置15 min,以相应试

剂为空白,照紫外-可见分光光度法(中国药典2015年版四部),在500 nm的波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,对照品溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线。

### 2.3 样品溶液的制备

准确称取2.000 g干燥的镰形棘豆原料,置于50 mL圆底烧瓶中。在一定的微波功率(200~1000 W)、料液比(1:5~1:40 mL/mg)、提取时间(10~40 min)、乙醇浓度(75%)等条件进行微波提取,提取液过滤并定容至50 mL,即为样品溶液。

### 2.4 总黄酮提取率计算

精密量取样品溶液2 mL,置25 mL量瓶中,加30%乙醇至6 mL,照标准曲线制备项下的方法,自“加5%亚硝酸钠溶液1 mL”起,依法测定吸光度,同时取供试品溶液2 mL,除不加氢氧化钠试液外,其余同上操作,作为空白,从标准曲线上读出供试品溶液中含芦丁的浓度,根据下列公式计算,即得。

$$A(\%) = BCm/D \times 100$$

式中:B为供试液中芦丁的含量(μg/mL),C为最终定容体积(mL),D为稀释倍数,m为原料质量(g)。

### 2.5 试验设计

通过单因素预实验,选择微波功率、提取时间、料液比3个因素,采用Design Expert 8.0.5统计分析软件,设计3因素3水平的响应面试验,把镰形棘豆中总黄酮提取率作为响应指标,从而确定镰形棘豆中总黄酮的最佳提取条件。实验因素与水平设计见表1。

表1 响应面实验因素与水平表

Table 1 Levers and code of response surface experiments

水平 Level	A	B	C
	微波功率 Power(W)	提取时间 Time(min)	料液比 Ratio of solid to liquid(mL/g)
-1	600	30	20
0	700	35	25
1	800	40	30

### 2.6 镰形棘豆中黄酮提取优化工艺的验证

根据响应面优化法进行试验后获得的最佳工艺条件,适当修正后进行验证试验,并对试验得到的实验测定值和理论提取率。

## 3 结果与分析

### 3.1 单因素试验

#### 3.1.1 微波功率对总黄酮提取率的影响

准确称取2.000 g干燥的镰形棘豆原料,置于

圆底烧瓶中,提取 40 min,料液比为 20:1,乙醇浓度为 75% 的条件下,考察不同微波功率对总黄酮提取率的影响。结果表明,在 200 w ~ 700 w 范围内,随微波功率的增高,提取率呈上升趋势;在微波功率达

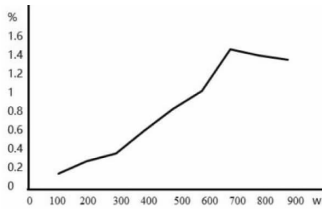


图 1 微波功率对黄酮提取率影响

Fig. 1 The influence of power

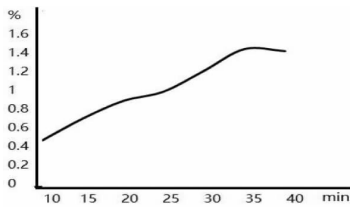


图 2 提取时间对黄酮提取率影响

Fig. 2 The influence of time

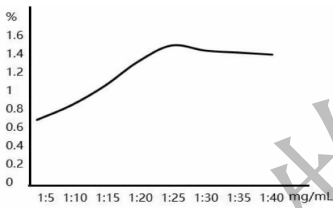


图 3 料液比对黄酮提取率影响

Fig. 3 The influence of ratio of solid to liquid

到 700 w 左右时,提取率达到最大;在 700 ~ 900 w 范围内,随着微波功率的继续增大,提取率反而降低(如图 1 所示)。

### 3.1.2 提取时间对总黄酮提取率的影响

准确称取 2.000 g 干燥的镰形棘豆原料,置于圆底烧瓶中,乙醇浓度为 75%,料液比为 20:1,微波功率为 700 w 时,考察不同提取时间对总黄酮提取率的影响。结果表明,在 10 ~ 30 min 范围内,随提取时间的增大,提取率呈明显上升趋势,当提取时间为 30 ~ 35 min 时,提取率上升趋势则趋于平缓,当提取时间为 35 ~ 40 min 时,提取率变化平缓,(如图 2 所示)。

### 3.1.3 料液比对总黄酮提取率的影响

准确称取 2.000 g 干燥的镰形棘豆原料,置于圆底烧瓶中,微波功率为 700 w,提取 35 min,乙醇浓度为 75% 时,考察不同料液比对总黄酮提取率的影响。结果表明,在料液比为 1:5 ~ 1:25 内,随着料液比的升高,提取率不断上升;当料液比为 1:25 时,提取率达到最高值。在料液比为 1:25 ~ 1:40 内,提取率有下降趋势(如图 3 所示)。

## 3.2 响应面工艺优化试验结果

### 3.2.1 响应面设计与回归模型的建立

综合考虑单因素试验结果,响应面分析结果见表 2。从表 2 可以看出,微波功率、提取时间、料液比的中心点试验值(总黄酮提取率)均高于析因点试验,这与单因素试验的结果相吻合,说明该响应面设计的 17 个试验点可信度较高。

表 2 回归分析结果响应面试验数据表

Table 2 Data of RSD

组别 level	因素			总黄酮提取率 Extraction rate (%)
	微波功率 Power (w)	提取时间 Time (min)	料液比 Ratio of solid to liquid (g/mL)	
1	600	30	25	1.14
2	800	30	25	1.52
3	600	40	25	1.38
4	800	40	25	1.42
5	600	35	20	1.26
6	800	35	20	1.32
7	600	35	30	1.43
8	800	35	30	1.43
9	700	30	20	1.29
10	700	40	20	1.32
11	700	30	30	1.38

续表 2(Continued Tab. 2)

组别 level	因素			总黄酮提取率 Extraction rate (%)
	微波功率 Power(w)	提取时间 Time(min)	料液比 Ratio of solid to liquid (g/mL)	
12	700	40	30	1.39
13	700	35	25	1.58
14	700	35	25	1.60
15	700	35	25	1.59
16	700	35	25	1.47
17	700	35	25	1.62

### 3.2.2 回归模型的方差分析

利用 Design Expert 8.0.5 软件对表 2 试验数据进行回归分析,得二次多元回归模型为: $y = 1.57 + 0.06A + 0.022B + 0.055C - 0.085AB - 0.015AC - 0.005BC - 0.095A^2 - 0.11B^2 - 0.12C^2$ ,对模型进行方差分析,结果见表 3。由表 3 可以得出:模型显著;模型失拟度不显著;该模型拟合程度良好,

实验误差较小,可以用此模型对微波提取镰形棘豆中总黄酮提取率进行分析及预测。

模型回归方程的系数显著性检验如下:一次项 A( $P < 0.05$ ),二次项  $B^2$ ( $P < 0.02$ )、 $C^2$ ( $P < 0.02$ )均达到显著水平,表明微波功率、提取时间、料液比对黄酮提取率有显著影响;二次项  $AB < 0.05$ ,表明微波功率与提取时间对黄酮提取率影响显著。

表 3 回归分析结果

Table 3 Results of regression analysis

方差来源 Variables	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F F-value	P P-value	显著性 significance
模型	0.25	9	0.028	5.88	0.0146	显著
A	0.029	1	0.029	6.14	0.0424	
B	4.050E-003	1	4.050E-003	0.86	0.3838	
C	0.024	1	0.024	5.16	0.0574	
AB	0.029	1	0.029	6.16	0.0421	
AC	9.000E-004	1	9.000E-004	0.19	0.6746	
BC	1.000E-004	1	1.000E-004	0.021	0.8881	
$A^2$	0.038	1	0.038	8.10	0.0248	
$B^2$	0.051	1	0.051	10.86	0.0132	
$C^2$	0.056	1	0.056	11.87	0.0108	
残差	0.033	7	4.693E-003			
失拟度	0.019	3	6.417E-003	1.89	0.2728	不显著
纯误差	0.014	4	3.400E-003			
总离差	0.28	16				

### 3.2.3 响应面工艺优化分析

从图 4 可知,在提取时间与功率的因素影响下,提取率随提取时间的升高先升高后降低,成抛物线趋势,提取功率的增大,提取率不断增大,当提取功率继续增大时,提取率增大趋势不明显;在料液比与功率的因素影响下,料液比和提取功率对提取率的影响均成抛物线形,即随料液比和提取功率增大,提取率呈先增大后降低的趋势;在料液比与提取时间

的因素影响下,料液比和提取时间对提取率的影响均成抛物线形,即随料液比和提取时间增大,提取率呈先增大后降低的趋势;

利用 Design Expert 8.0.5 软件对回归模型进行进一步的典型性分析,得到最优提取工艺条件为:微波提取功率为 730.92 w,提取时间为 26.10 min,料液比 26.10,总黄酮理论提取率可达 1.58%。

### 3.2.4 最佳工艺验证试验

根据最佳预测提取条件,本实验设定提取工艺条件为:微波提取功率为 731 w,提取时间为 26

min,料液比为 1:26,最优工艺条件的验证试验结果如表 4 所示,3 次重复试验的平均值为 1.56%,略低于理论值,说明所确定的最优工艺条件稳定可靠。

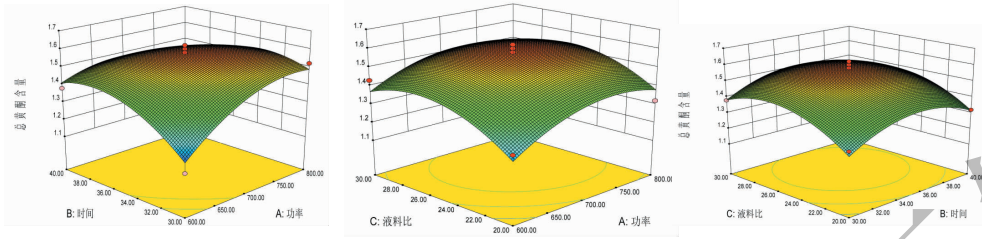


图 4 不同因素对镰形棘豆总黄酮提取率影响

Fig. 4 Response surface showing the effect of the extraction time, microwave power, and water to raw material ratio

表 4 最佳工艺的验证

Table 4 Verification of the optimum conditions

试验编号 NO	总黄酮提取率 (%) Extraction rate (%)	平均值 (%) Means
1	1.55	
2	1.56	1.56
3	1.58	

## 4 结论

该研究是将乙醇作为提取溶剂提取镰形棘豆中总黄酮,分别探究了微波功率、提取时间、料液比 3 个因素对黄酮提取过程中不同影响作用。在单因素试验的基础上采用响应面法优化了从镰形棘豆中微波提取总黄酮的各工艺因素,最佳的提取工艺条件为:微波提取功率为 731 w,提取时间为 26 min,料液比 26,在此条件下镰形棘豆中总黄酮理论提取率可达 1.58%,实际测得值为 1.56%,两者较接近,因此,验证试验所得模型方程能较好地预测实验结果。本研究应用响应面分析法优化的微波提取镰形棘豆总黄酮工艺及技术参数,为应用微波提取技术规模化提取镰形棘豆中总黄酮提供理论依据。

目前,提取镰形棘豆中黄酮方法主要为热回流提取法,该方法设备简单,但是效率不高,能耗较高。本文采用乙醇为提取溶剂提取镰形棘豆中黄酮可以有效缩短提取时间,降低能耗,而且提取物中黄酮含

量较高。镰形棘豆黄酮具有多种生物活性,具有深入开发利用研究的价值。

### 参考文献

- Luo SD (罗尚达). China Traditional Tibetan Herbal (中华藏本草). Beijing: Nation Press, 1997.
- Wei XL (魏学红), Jin L (金莉). The research progress of Tibetan medicine *Oxytropis falcata*. *Chinese Pharmacological Bulletin* (中国药理学通报), 2010(26): 1535-1538.
- Chen ZP (陈志朋), Qu MM (曲敏明), Chen HX (陈鸿轩), et al. The studies of anti-inflammatory and analgesic activities and pharmacokinetics of *Oxytropis falcata* Bunge extraction after transdermal administration in rats. *Fitoterapia*, 2011(82): 426-433.
- Chen ZP (陈志朋), Zhai MM (翟敏明), Liu D (刘丹), et al. Preparation of ointment contains *Oxytropis falcata* total flavonoids. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2012, (1): 50-54.
- Yang GM (杨光明), Wang D (王栋), Tang W (唐炜), et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Oxytropis falcata* fractions and its possible anti-inflammatory mechanism. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2010, (4): 285-292.
- Yang GM (杨光明), Wang D (王栋), Zhang FF (张芳芳), et al. Determination of total flavonoids and phenolic acids from *Oxytropis falcata*. *Pharm Clinical Res* (药学与临床研究), 2009(17): 376-379.