云南师范大学学报(自然科学版)
2014 年 9 月 34 卷 5 期(Vol. 34 No. 5)
Journal of Yunnan Normal University
DOI:10.7699/j.ynnu.ns-2014-074

响应面法优化多刺绿绒蒿中总黄酮的提取工艺*

罗云演[1,2], 张秋龙[3,4], 丁晨旭[3]

(1. 青海民族大学 化学与生命科学学院,青海 西宁 810007;
2. 青海省青藏高原植物资源化学研究重点实验室,青海 西宁 810007;
3. 中国科学院 西北高原生物研究所,青海 西宁 810001;4 中国科学院 研究生院,北京 100049)

摘 要: 利用响应面法优化多刺绿绒蒿中总黄酮的提取工艺. 在单因素试验的基础上,选择乙醇浓度、液料比和提取时间为自变量,以总黄酮提取率为响应值,进行 Box-Behnken 中心组合实验设计,采用响应面法(RSM)分析这些因素对总黄酮提取率的影响. 响应面优化设计得出的最佳工艺为乙醇浓度 64%,液料比 30:1,提取时间 66 min,总黄酮提取率达 1.521%.

关键词: 响应面分析法;多刺绿绒蒿;总黄酮;提取

中图分类号: Q946.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-9793(2014)05-0074-05

多刺绿绒蒿(*Meconopsis horridula* Hook. f. & Thomson)为一年生罂粟科绿绒蒿属草本植物,高约 15~20 cm,全株包被黄褐色或淡黄色坚硬而平展的刺,主要分布于中国青海、西藏、云南和甘肃,缅甸、印度东北部、不丹、锡金和尼泊尔也有分布,生长于海拔 3 000~5 000 米的山坡石缝中. 多刺绿绒蒿味苦,有活血化瘀、止痛功效,主要用于治疗头伤、跌打损伤等症[1-3]. 通过查阅相关文献[5-11],绿绒蒿属植物含有大量的黄酮类化合物,多刺绿绒蒿的化学成分主要为黄酮、生物碱和挥发油,其中以黄酮类化合物居多,而近年来的研究表明,黄酮类化合物具有广泛的生物学活性[12-14].

为了充分开发利用藏药多刺绿绒蒿,本文运用响应面分析法对多刺绿绒蒿总黄酮的提取条件进行优化.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

T6 新世纪紫外-可见分光光度计:北京谱析通用仪器有限责任公司生产;HH-6 数显恒温水浴锅:国华电器有限公司;AL204 电子天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司.

多刺绿绒蒿,采自青海省海北门源地区,由当地藏医鉴定;芦丁对照品:上海顺勃生物工程有限公司(含量大于 98%),批号:201203;亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠和乙醇均为分析纯.

1.2 标准曲线的制备

1.2.1 芦丁贮备液配制

精密称取芦丁对照品 8.75 mg,用 30%乙醇溶解于 25 mL 容量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 0.35 mg/mL 贮备液.

1.2.2 制备标准曲线[4]

分别吸取贮备液 0.0 mL、0.5 mL、1 mL、1.5 mL、2 mL、2.5 mL,置于 6 个 25 mL 容量瓶中,再分别用 30%乙醇约定容至 10 mL,摇匀,随后加入 5% $NaNO_2$ 溶液 1.0 mL,摇匀,静置 4 min,加入 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液 1.0 mL,摇匀,静置 10 min,加入 1 mol/L NaOH 溶液 5 mL,摇匀,最后 30%乙醇定容至刻度,充分混匀,放置 15 min,得相应浓度的对照品溶液. 500 nm 处测吸光度值,以该系列中 1 号对照品液(0 mg/mL)为参比,芦丁浓度 C(mg/mL)为横坐标,相应的吸光度值 A 为纵坐标,作标准曲线,得标准曲线方程为:$y=20.614x+0.0001$,$R^2=0.9992$.

* 收稿日期:2014-07-30
基金项目:教育部重点科技资助项目(212188).
作者简介:罗云演(1988-),女,湖北松滋人,硕士研究生,主要从事藏药及其开发方面研究.
通信作者:丁晨旭,副研究员,主要从事藏药及开发方面研究. E-mail: 13709710391@163.com.

1.3　多刺绿绒蒿中总黄酮的提取

称取多刺绿绒蒿药材粉末（过 40 目筛）1 g，加入 60%乙醇 25 mL，超声 5 min，后于 70 ℃热回流 70 min，提取 2 次，合并滤液. 浓缩滤液，并用 30%乙醇 10 mL 溶解，精密量取 0.5 mL 于 25 mL容量瓶中，按“1.2.2”项下方法操作，测量吸光度.

1.4　多刺绿绒蒿中总黄酮的提取工艺设计

选择乙醇浓度(A)、液料比(B)和提取时间(C)等影响总黄酮提取率较大的因素，并根据影响多刺绿绒蒿中总黄酮提取因素考察试验的结果选择相应的实验水平. 采用Design expert. V. 8. 0. 6软件中Box-Behnken 中心组合实验设计三因素三水平方案，以多刺绿绒蒿总黄酮提取率为考察指标，通过软件分析得出提取多刺绿绒蒿中总黄酮的最优工艺参数. 实验设计见表 1.

表 1　中心组合设计表

Table 1　The central composite design

实验因素	水平		
	−1	0	1
乙醇浓度(A)/%	50	60	70
液料比(B)/(ml/g)	20	25	30
提取时间(C)/min	60	70	80

2　结果与分析

2.1　影响多刺绿绒蒿中总黄酮提取因素考察试验

2.1.1　乙醇浓度考察试验

称取药材粉末 1 g，按“1.3”项下方法，于 70 ℃，料液比 1∶25 的条件下，乙醇浓度分别为 40%、50%、60%、70% 和 80%，热回流提取 70 min，考察试验结果如图 1 所示.

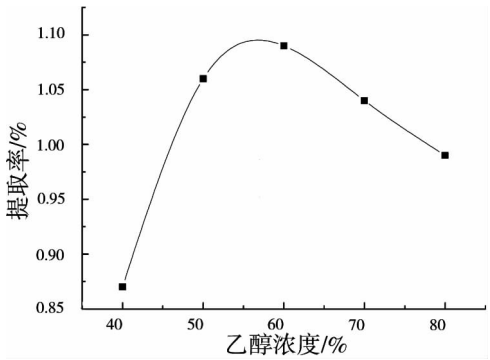

图 1　乙醇溶液浓度考察试验结果

Fig. 1　The test results of ethanol concentration

由图 1 可知，在乙醇浓度小于 60%时，提取率随着乙醇浓度的增大而增大，当乙醇浓度大于 60%时，提取率反而随之下降，且叶绿素等物质的溶出增加，不利于测定，故选择乙醇浓度为 60%左右.

2.1.2　液料比考察试验

称取药材粉末 1 g，按“1.3”项下方法，于 70 ℃，乙醇浓度 60%条件下，液料比分别为 10∶1、15∶1、20∶1、25∶1 和 30∶1，热回流提取 70 min，考察试验结果如图 2 所示.

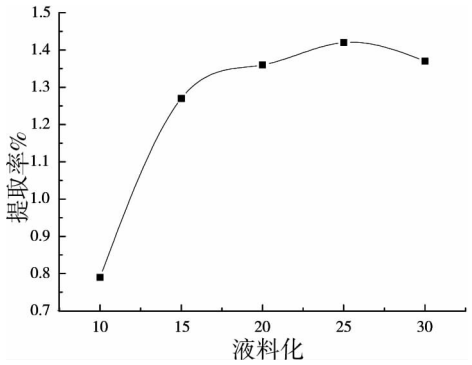

图 2　液料比考察试验结果

Fig. 2　The test results of ratio of liquid to solid

由图 2 可以看出，当液料比达到 20∶1 左右时，随着提取剂用量增加，提取率变化不大，而 25∶1之后，可能是杂质的溶出增加，影响了总黄酮的溶出，提取率故略有所下降，所以选择液料比为 25∶1 左右.

2.1.3　提取时间考察试验

称取药材粉末 1 g，按“1.3”项下方法，于 70 ℃，乙醇浓度 60%，液料比 25∶1 条件下，分别热回流提取 50 min、60 min、70 min、80 min 和 90 min，考察试验结果如图 3 所示.

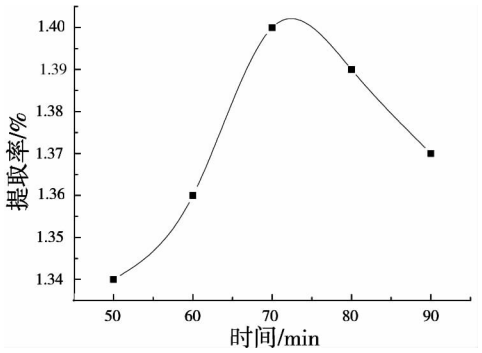

图 3　提取时间考察试验结果

Fig. 3　The test results of extracting time

由图 3 可知，提取时间在由 50 min 逐渐上升至 70 min 时，总黄酮提取率显著增加，而 70 min 后，随着提取时间的延长提取率有所下降，可能是

多刺绿绒蒿中黄酮类物质结构对热具有一定的不稳定性,故选择提取时间为 70 min 左右.

2.1.4 提取温度考察试验

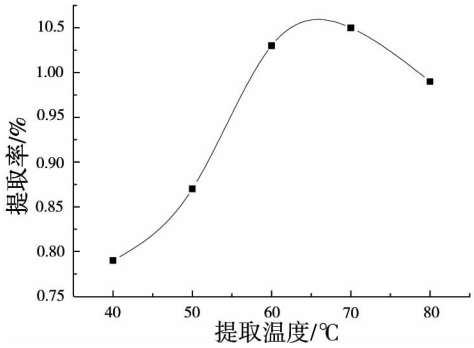

图 4 提取温度考察试验结果

Fig. 4 The test results of temperature

称取药材粉末 1 g,按"1.3"项下方法,于乙醇浓度 60%,液料比 25∶1 条件下,分别于 40 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃和 80 ℃水浴中浸提 70 min,考察试验结果如图 4 所示.

由图 4 可见,70 ℃以后,随着提取温度的升高,提取率有所下降,可能是多刺绿绒蒿中黄酮类物质结构遭到破坏所致,另一方面杂质的溶出量增加,影响测定,所以选择提取温度为 70 ℃左右.

2.2 响应面实验方案与相关数据分析结果

本文采用 DesignExpert. V. 8. 0. 6 软件,对表 2 中响应面实验数据进行分析,得出回归方程方差分析表及相应的响应曲面图.

表 2 响应面实验方案及实验结果

Table 2 The experiment designs and results of RSM

实验编号	乙醇浓度	液料比	提取时间	提取率
1	−1	−1	0	1.174
2	1	0	1	1.297
3	0	−1	1	1.223
4	−1	1	0	1.362
5	−1	0	1	1.055
6	1	−1	0	1.468
7	0	−1	−1	1.356
8	0	1	1	1.312
9	0	0	0	1.464
10	0	1	−1	1.526
11	1	0	−1	1.441
12	−1	0	−1	1.292
13	0	0	0	1.436
14	1	1	0	1.483
15	0	0	0	1.352
16	0	0	0	1.408
17	0	0	0	1.397

响应面软件程序对表 2 中实验结果进行二次回归响应面分析,得到的回归方程:多刺绿绒蒿总黄酮的提取率 = 1.41 + 0.10 ∗A + 0.058 ∗B − 0.091 ∗C − 0.043 ∗A ∗B + 0.023 ∗A ∗C − 0.020 ∗B ∗C − 0.061 ∗A2 + 0.022 ∗B2 − 0.079 ∗C2

表 3　回归方程方差分析表

Table 3　ANOVA for quadratic polynomial model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.23	9	0.026	23.20	0.000 2	* * *
A	0.081	1	0.081	73.56	<0.000 1	* * *
B	0.027	1	0.027	24.17	0.001 7	* *
C	0.066	1	0.066	60.01	0.000 1	* *
AB	7.482E−003	1	7.482E−003	6.78	0.035 3	*
AC	2.162E−003	1	2.162E−003	1.96	0.204 4	
BC	1.640E−003	1	1.640E−003	1.49	0.262 3	
A^2	0.016	1	0.016	14.34	0.006 8	* *
B^2	1.978E−003	1	1.978E−003	1.79	0.222 5	
C^2	0.026	1	0.026	23.70	0.001 8	* *
残差	7.728E−003	7	1.104E−003			
失拟项	6.085E−004	3	2.028E−004	0.11	0.947 4	Not significant
净误差	7.119E−003	4	1.780E−003			
总误差	0.24	16				
$R^2=0.967\ 6$		$R^2_{Adj}=0.925\ 9$				

注：* * *，P<0.001，**差异极显著**；* *，P<0.01，**差异高度显著**；*，P<0.05，**差异显著差异显著**；P>0.1，**差异不显著**.

由表 3 可知，三个因素对提取率影响优先顺序为：乙醇浓度>液料比>提取时间，回归模型 P 值小于 0.000 1 达到极显著水平，方程相关系数 $R^2=0.925\ 9$，说明该模型拟合度较好，失拟项 P=0.947 4(P>0.1)不显著，表明本实验所得二次回归方程高度显著，实验设计可靠. 两因素交互作用对总黄酮提取率影响的响应面图如图 5－7.

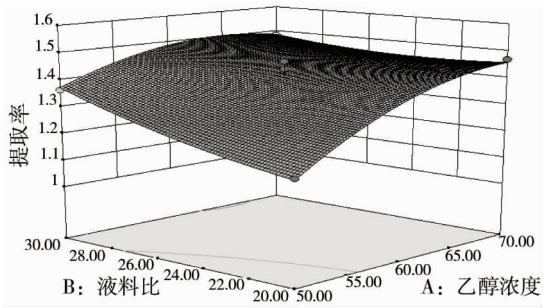

图 5　乙醇浓度与液料比交互作用对总黄酮提取率影响的响应面图

Fig. 5　Response surface curve for extraction yield of total flavonoids showing interaction between concentration of ethanol and ratio of liquid to solid

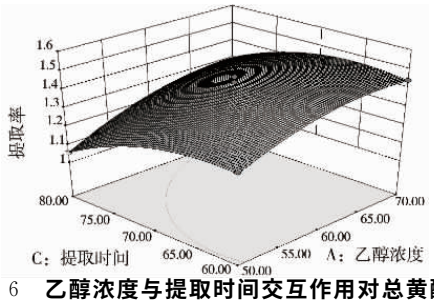

图 6　乙醇浓度与提取时间交互作用对总黄酮提取率影响的响应面图

Fig. 6　Response surface curve for extraction yield of total flavonoids showing interaction between concentration of ethanol and extracting time

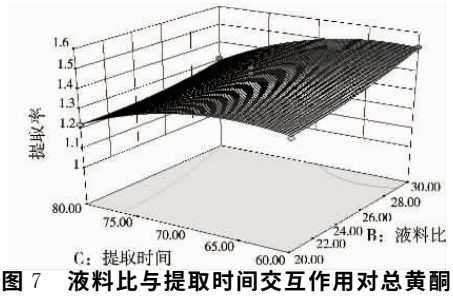

图 7　液料比与提取时间交互作用对总黄酮提取率影响的响应面图

Fig. 7　Response surface curve for extraction yield of total flavonoids showing interaction between ratio of liquid to solid and extracting time

3 验证实验

为了验证根据模型优化条件得到的最佳理论工艺条件(乙醇浓度 64.36%、液料比 29.88∶1,提取时间 66.01 min 时,总黄酮提取率理论值为 1.530%)的可靠性,实际操作中将工艺修正为乙醇浓度 64%、液料比 30∶1 和提取时间 66 min 进行实验,总黄酮得率为 1.521%(n=3,RSD=0.399%)与预测值相差不大.

4 结 论

采用响应面法优化乙醇热回流提取多刺绿绒蒿中总黄酮,得出最优工艺条件为乙醇浓度 64%,液料比 30∶1,提取时间 66 min,经检验,在此工艺条件下,总黄酮提取率为 1.521%(n=3),与预测值相差不大,表明该模型是合理可靠的,具有一定的应用价值.

参 考 文 献:

[1] 孙红祥,奚镜清.多刺绿绒蒿的考释[J].中国中药杂志,1993,18(8):454.

[2] 刘松渝.绿绒篙属植物的生物碱[J].华西药学杂志,1987 (3):173-175.

[3] 王彬,宋学华,蹼社班.藏药"欧贝"和"刺儿恩"的性状鉴定研究[J].江苏药学与临床研究,2003,11(3):23-25.

[4] 张秋龙,梁永欣,李文聪,等.响应面法优化细果角茴香中总黄酮的超声提取条件[J].天然产物研究与开发,2013,25:841-845.

[5] 马明芳,丁克毅,丁立生,等.多刺绿绒蒿的化学成分研究[J].华西药学杂志,2009,24(3):227-229.

[6] 吴海妹,袁瑞瑛,小尼玛顿珠,等.多刺绿绒蒿的化学成分[J].药学与临床研究,2012,20(4):314-316.

[7] 袁瑞瑛,旦欧,次登,等.藏药多刺绿绒蒿化学成分研究现状[J].西藏科技,2012,230(5):64-66.

[8] 李启发.通关藤和多刺绿绒蒿的化学成分研究.西南民族大学硕士学位论文[D].成都:西南民族大学,2007.

[9] 吴海峰,潘莉,邹多生,等.3 种绿绒蒿挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J].中国药学杂志,2006,41(17):1298-1300.

[10] 吴海峰.五种绿绒蒿藏药材化学成分研究[D].西宁:中国科学院西北高原生物研究所,2009.

[11] 马应龙.多刺绿绒蒿化学成分的研究[D].西宁:青海师范大学,2008.

[12] 云南蜂胶和山东蜂胶醇提物对小鼠学习记忆的影响[J].云南师范大学学报:自然科学版,2013,33(2):70-73.

[13] 吕海英,林雨,潘云,等.黑果枸杞叶总黄酮抗氧化和降血脂成分测定[J].新疆师范大学学报:自然科学版,2012,31(2):43-48.

[14] 孟庆华,于晓霞,张海凤,等.天然黄酮类化合物清除自由基机理及其应用进展[J].云南民族大学学报:自然科学版,2012,21(2):79-83.

Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from *Meconopsis horridula* Hook. f. & Thomson by Response Surface Methodology

LUO Yun-yan[1,2], ZHANG Qiu-long[3,4], DING Chen-xu[3]

(1. College of Life Science and Chemistry, Qinghai University for Nationalities, Xining 810007, China;

2. Key Laboratory of Plant Resources of Qinghai-Tibet Plateau in Chemical Research, Xining 810007, China;

3. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

4. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Response surface method (RSM) is applied to optimize the extraction of total flavonoids from *Meconopsis horridula* Hook. f. & Thomson. On the basis of single factor experiment, selecting ethanol concentration, solid-liquid ratio, extracting time as influencing factors, the total flavonoids extraction yield as response value. Box-Benhnken central combination experimental is used to set a mathematical model for response surface analysis. The results of RSM shows that the optimal extraction conditions are: ethanol concentration 64%, liquid-solid ratio 30∶1 and extraction time 66 min. In these conditions, the extraction yield of total flavonoids is as high as 1.521%.

Keywords: RSM; *Meconopsis horridula* Hook. f. & Thomson; Total flavonoids; Extraction