

星点设计-响应面分析法优化西芹叶中总黄酮的提取工艺

王志波^{1,2,3}, 李成思^{1,2,3}, 张金魁^{1,2,3}, 林鹏程^{1,2,3}

(1. 青海民族大学药学院, 西宁 810007; 2. 青海省青藏高原植物资源化学研究重点实验室, 西宁 810007; 3. 青海省药物分析重点实验室, 西宁 810007)

摘要:以青海西芹叶为研究对象,通过星点设计-响应面分析法优化西芹叶中总黄酮的提取工艺,并以乙醇体积分数、提取时间、料液比为考察要素,进行三因素五水平星点试验设计,同时通过方差分析回归建立数学模型,响应面分析法优化西芹叶中总黄酮的提取工艺。结果显示,料液比和提取时间对西芹叶的总黄酮提取影响极其显著,最优提取工艺为提取时间 50 min,乙醇体积分数 50%,料液比 1:20 (g/mL)。在此条件下,相对误差为 1.24%,与模型预测值相符,总黄酮得率为 18.36 mg/g。该工艺合理、快速,为今后西芹叶中总黄酮研究奠定基础。

关键词:西芹叶;星点设计;响应面法;总黄酮

中图分类号:TB115

文献标志码:A

引言

西芹(*Apiumgraveolens* L.)为伞形花科旱芹属植物,原产自地中海沿岸,是一种药食同源蔬菜。西芹营养丰富,其中黄酮类化合物含量很高,具有多种药理作用和生物活性,对一些常见疾病有很好的治疗和预防作用,如抗癌防癌、降低血脂、治疗高血压,及保护心血管和增强机体免疫力等作用^[1]。

本文采用的星点设计-响应面分析法,是一种可以将数学和统计方法结合起来的新型实验方法,其优点是克服正交试验设计的精密度不足,操作繁琐的缺陷。同时又能较好的对实验结果进行预测^[2]。并且,查阅文献得知,近年关于西芹叶中总黄酮的研究还未见报道,因此本文通过星点设计-响应面分析法对西芹叶中总黄酮的提取工艺进行优化,可为药用西芹叶的质量评价及进一步的研究开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

西芹叶采于青海省互助县(经青海民族大学药学院鉴定为伞形科植物西芹);芦丁购于中国药品生物制品鉴定所;蒸馏水自制;其余所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器

UV-5100B 分光光度计(上海重逢科技有限公司);FA1064N 型电子天平(上海精密仪器);DFY-200C 粉碎机(上海谷宁实业有限公司);KQ-300B 型超声波提取器(昆山市超声仪器)。

1.3 方法

1.3.1 待测溶液的制备

取干燥的西芹叶样品粉末 1.0 g,置于 100 mL 圆底烧瓶中,加入 20 mL 60% 乙醇超声提取 30 min,待提取液冷却后,过滤取其滤液,既得待测溶液。

收稿日期:2017-01-14

基金项目:青海民族大学创新项目(DCXM-2014-013)

作者简介:王志波(1991-),男,山东菏泽人,硕士生,主要从事药物化学方面的研究,(E-mail)18297004813@163.com;

林鹏程(1966-),男,青海西宁人,教授,博士,博导,主要从事天然药用植物资源开发与利用方面的研究,(E-mail)qhlpc@126.com

1.3.2 标准曲线的绘制

将精密称取的 3.25 mg 芦丁用 70% 乙醇定容于 25 mL 容量瓶中。然后,分别精密吸取 0 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL 芦丁溶液,于 25 mL 容量瓶中。依据显色条件依次加入 NaNO_2 溶液、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液、 NaOH 溶液,并在 510 nm 波长处依次测定吸光度^[3],得到回归方程为: $y = 27.288x - 0.0269$, $R^2 = 0.9998$,表明线性关系较好。

1.3.3 总黄酮含量测定

准确移取 1.0 mL 待测溶液,按照 1.3.2 的方法进行实验。最终得出西芹叶总黄酮量的计算公式为^[4]:

$$Y = \frac{(A + 0.0269) \times 25 \times 20}{27.288 \times m}$$

其中, Y :黄酮提取量(mg/g); A :吸光度; m :样品质量(g)。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

在选定的条件下,即分别固定 50% 乙醇、提取时间 50 min、料液比 1:20 (g/mL),对乙醇体积分数、提取时间、料液比分别进行考察^[5],结果如图 1 所示。

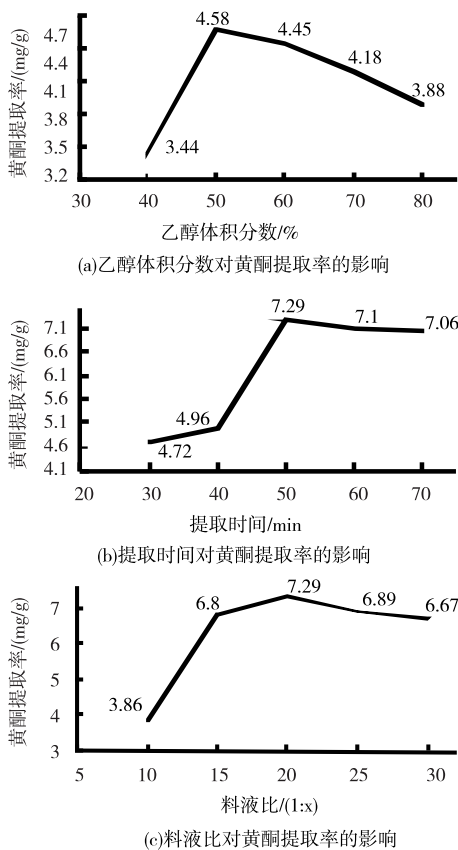


图 1 各因素对总黄酮提取率的影响折线图

依据单因素试验结果初步选定乙醇体积分数 50%, 提取时间 50 min、料液比 1:20 (g/mL) 为最佳提取条件^[6],采用星点设计-响应面分析法对其进行优化^[7]。

2.2 星点设计试验

2.2.1 实验设计与结果

依据星点实验设计的方法原理,以提取率为参考指标^[8]。用 X_1, X_2, X_3 表示所设因素,各个因素设五水平,并以 1.73、1.0、-1、-1.73 表示自变量的水平,表 1 为各要素水平编码表,表 2 为星点实验设计及结果^[9]。

表 1 因素水平

因素	水平			
	-1.732	-1	0	1
X_1 乙醇体积分数/%	40	44.2	50	55.8
X_2 料液比/(g/mL)	1:15	1:17.1	1:20	1:22.9
X_3 提取时间/min	40	44.2	50	55.8

表 2 实验设计与结果

试验号	X_1	X_2	X_3	黄酮提取率/(mg/g)
1	-1	-1	-1	17.03
2	1	-1	-1	16.50
3	-1	1	-1	16.65
4	1	1	-1	15.48
5	-1	-1	1	16.78
6	1	-1	1	17.80
7	-1	1	1	16.31
8	1	1	1	16.60
9	-1.732	0	0	16.06
10	1.732	0	0	15.72
11	0	-1.732	0	17.80
12	0	1.732	0	16.80
13	0	0	-1.732	16.47
14	0	0	1.732	17.38
15	0	0	0	18.49
16	0	0	0	18.38
17	0	0	0	18.49
18	0	0	0	18.48
19	0	0	0	18.52
20	0	0	0	18.59

2.2.2 模型拟合

以总黄酮提取率为参考指标^[10],用 Design Expert 软件分析试验结果,经拟合回归,得模型方程^[11]:

$$Y = 18.56 + 0.46X_1 - 0.46X_2 + 0.97X_3 + 0.025X_1X_2 + 0.38X_1X_3 + 1.11X_2X_3 - 1.91X_1^2 - 1.27X_2^2 - 2.20X_3^2$$

该模型方差分析和显著性检验结果见表 3。由表 3 可知,模型的 P 值小于 0.0001,说明模型方差极显著;各自变量 P 值 < 0.05 ,说明本实验所考察的各单因素对西芹叶总黄酮提取率影响显著^[12];综合分析二次项中 X_1, X_2, X_3 的响应值,得出试验所考察的三个因素对总黄酮提取率的影响是一种二次曲线关系,并非简单的线性关

系^[13];方程的失拟项 P 值 $0.0733 > 0.05$ 不显著,表明其他未知因素的影响可以忽略不计^[14]。

表3 响应面分析试验方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值	显著性
模型	19.95	9	187.71	<0.0001	**
X_1	0.19	1	15.85	0.0026	*
X_2	1.21	1	102.61	<0.0001	**
X_3	0.55	1	46.38	<0.0001	**
X_1X_2	0.50	1	42.17	<0.0001	**
X_1X_3	1.96	1	166.05	<0.0001	**
X_2X_3	0.14	1	11.80	0.0064	*
X_1^2	11.78	1	997.12	<0.0001	**
X_2^2	2.43	1	206.08	<0.0001	**
X_3^2	4.50	1	380.80	<0.0001	**
残差	0.12	10			
失拟项	0.095	5	4.12	0.0733	不显著
纯误差	0.023	5			
总差	20.07	19			

注: ** : 差异极显著, $p < 0.0001$; * : 差异显著, $p < 0.05$ 。

2.2.3 响应面优化和预测

根据回归方程,利用 Design Expert 软件,得出交互作用影响极显著的 3D 响应面图,如图 2、图 3 所示。

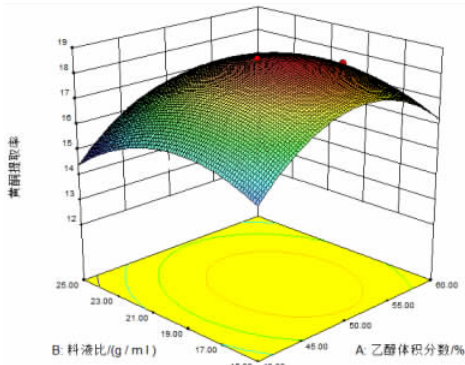


图2 乙醇体积分数和料液比影响总黄酮提取率的响应面图

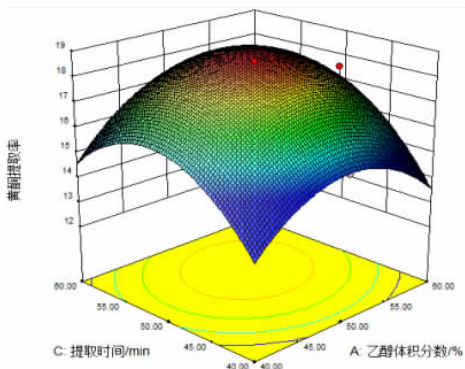


图3 乙醇体积分数和提取时间影响总黄酮提取率的响应面图

通过图 2、图 3 的曲面走势可知,各自变量对总黄酮的影响都呈现先增大后减小的趋势^[15]。同时依据曲面

的陡峭程度得出,乙醇体积分数、提取时间、料液比的交互作用对西芹叶总黄酮提取率的影响极其显著^[16]。故全面分析该回归模型,最终确定最佳提取工艺为:乙醇体积分数 49.65%,料液比 1:19.86 (g/mL),提取时间 48.4 min,总黄酮提取率 18.59 (mg/g)。

2.3 验证试验

为了验证模型的准确度,以得出的最优工艺为前提条件做 6 次平行试验。总黄酮平均收率为 18.36 (mg/g),相对误差 1.24%,与预测值基本一致。

3 结束语

文献检索表明,西芹叶总黄酮的提取工艺未见使用星点设计-响应面优化法,因此难找到一种确切的函数式来表达各因素和响应值之间的关系,也就无法找到考察各因素在整个区域上的最佳组合,并对响应值的最优值进行预测。

本实验采用星点设计-响应面优化法,用二次多项式进行拟合,结果显示,该方法不仅提高了试验的精确度,还得到了最佳的模型拟合度。同时证实星点设计-响应面优化法得到的最佳工艺参数可靠准确,最终优化得到西芹叶总黄酮的最优提取工艺为乙醇体积分数 50%,料液比 1:20 (g/mL),提取时间 50 min,总黄酮得率为 18.36 (mg/g),为今后西芹叶中总黄酮研究奠定了科学有效的基础。

参考文献:

- [1] 许伟东,陈铸洪,刘加建,等.8 个西芹品种比较试验[J].中国热带农业,2015(4):84-86.
- [2] 兰艳素,王爱东,牛江秀.广豆根总黄酮的超声提取工艺及抗氧化活性[J].中成药,2016,38(3):698-702.
- [3] 范家佑,郁建平,刘剑.草珊瑚总黄酮提取及含量检测[J].中华现代中西医杂志,2009,7(2):81-85.
- [4] 钟文,翟瑶,卢永昌.藏药宽筋藤中总黄酮和芦丁含量的测定[J].湖北农业科学,2013,52(9):2151-2152.
- [5] 兰艳素,李长江,宋坤鹏,等.星点设计-效应面法优化百蕊草总黄酮提取工艺[J].中成药,2014,36(12):2629-2632.
- [6] 公衍玲,王沙沙,刘洋.响应面法优化猪毛菜总黄酮提取工艺[J].化学与生物工程,2016,33(6):25-29.
- [7] 千春录,侯顺超,殷健东,等.响应面试验优化水芹黄酮超声波辅助提取工艺及其抗氧化性[J].食品科学,2016,37(10):76-81.

- [8] 陈帅,王慧竹,姜昆,等.星点设计-响应面法优化千斤拔黄酮- β -环糊精包合工艺[J].食品工业科技,2016,37(2):281-286.
- [9] 王欢,郭婕,周云雷.竹柏叶总黄酮不同提取方法比较[J].天然产物研究与开发,2016(3):409-415.
- [10] 陈程,冯锁民,罗国平,等.Box-Behnken 设计响应面法优选水杨梅总黄酮提取工艺研究[J].中国药师,2016,19(2):241-243.
- [11] 陈学智,温成平,尚涛,等.响应面优化超声微波双辅助提取三脚风炉总黄酮工艺[J].中华中医药杂志,2016(9):3525-3527.
- [12] 冯海燕,何敬宇,杨晓辉,等.响应面法优化莲须总黄酮超声提取工艺[J].中成药,2016,38(10):2291-2294.
- [13] 赵文亭.响应面法优化超声波辅助提取板蓝根中黄酮工艺及其抗氧化活性研究[J].中国现代应用药学,2016,33(3):313-317.
- [14] 孙艳,杨志伟.火龙果总黄酮提取工艺优化[J].南方农业学报,2016,47(6):1001-1008.
- [15] 黄菊,何伟平.响应面法优化乙醇提取芹菜中黄酮的工艺研究[J].食品研究与开发,2016,37(14):46-51.
- [16] 邓梦琴,何夏怡,何慕怡,等.响应面法优化菠萝蜜果皮黄酮提取工艺[J].食品工业科技,2016,37(5):222-227.

Application of CCD-RSM for Optimization of Total Flavonoids Extraction in Celery Leaves

WANG Zhibo^{1,2,3}, LI Chengsi^{1,2,3}, ZHANG Jinkui^{1,2,3}, LIN Pengcheng^{1,2,3}

(1. College of Pharmacy, Qinghai Nationalities University, Xining 810007, China; 2. Key Laboratory of Plant Resources of Qinghai-Tibet Plateau in Chemical Research, Xining 810007, China; 3. Key Laboratory of Pharmaceutical Analysis in Qinghai, Xining 810007, China)

Abstract: The extraction process of total flavonoids from celery leaves is optimized by CCD-RSM. The effects of ethanol concentration, extraction time, material liquid ratio are taken as the factors of investigation to lead three-factor five-level star-point test design. Simultaneously, the mathematical model is established by regression analysis of variance, and the extraction process of total flavonoids from celery leaves is optimized by the Response Surface Methodology. The results show that material liquid ratio and extraction time have significant effects on the extraction of flavonoids from celery leaves. And the optimum conditions are extraction time of 50 min, 50% ethanol concentration and material liquid ratio of 1:20 (g/mL). The relative error of validation test is 1.24%, which is coincident with the predicted value. And the total yield of flavonoids was 18.36mg/g. The method is reasonable and rapid, which lays a foundation for the study of total flavonoids in celery leaves.

Key words: celery leaves; CCD; RSM; total flavonoids