

## 响应面法优化微波提取小香薷籽总黄酮工艺及数学模型研究

张雪辉, 张丽娟, 徐芳, 王琦, 吴少雄, 张忠华, 高小娇, 海寿益, 殷建忠  
(昆明医科大学营养与食品研究所, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 利用响应面法优化小香薷籽总黄酮工艺. **方法** 在单因素实验的基础上, 选择乙醇浓度、预浸时间、料液比、微波提取时间 4 个主要影响因素, 以总黄酮得率为响应值, 采用响应曲面法中的 Box-Behnken 模式对提取工艺进行研究. **结果** 最佳工艺条件为乙醇浓度 97.51%, 预浸时间 5.34 min, 料液比 1:47.5, 微波时间 5.76 min, 总黄酮提取含量预测值为 6.67%. **结论** 此条件下小香薷籽总黄酮提取含量为 6.42%, 与预测值比较接近, 误差为 3.7%; 优选得到的工艺稳定可行, 可为工业生产提供参考依据.

**[关键词]** 小香薷籽; 总黄酮; 微波; 响应面法; Box-Behnken 设计

**[中图分类号]** TS 201.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 05-0066-06

## Study on Technique Condition of Extracting Total Flavones from *Micromeria Barosma* (W.W.Smith) Hand.-Mazz. Seed via Response Surface Methodology Optimizing Microwave and Its Mathematical Model

ZHANG Xue-hui, ZHANG Li-juan, XU Fang, WANG Qi, WU Shao-xiong, ZHANG Zhong-hua,  
GAO Xiao-jiao, HAI Shou-yi, YIN Jian-zhong  
(Research Institute of Nutrition and Food Science, Kunming Medical University,  
Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To optimize the extraction technology of total flavonoids from *Micromeria barosma* (W.W.Smith) Hand.-Mazz. Seed. **Methods** Based on the single factor analysis, ethanol concentration, presoaking time, solid-liquid ratio to liquid and microwave heating time were chosen as main factors to evaluate the effects on the extraction of the total flavonoids. **Results** The optimized extraction conditions were as follows: ethanol concentration 97.51%, presoaking time 5.34 min, solid-liquid ratio 1:47.5, microwave heating time 5.76 min. The predictive value of total flavonoid content was 6.67%. **Conclusions** Under the optimal conditions, the yield of total flavonoids was 6.42%, close to predictive value error =3.7%. The extraction technology is feasible and stable and could be helpful to the factory production and better than orthogonal design.

**[Key words]** *Micromeria barosma* (W.W.Smith) Hand.-Mazz. seed; Total flavonoids; Microwave-assisted extraction; Response surface method (RSM); Box-Behnken design

香薷为常用中药, 我国明代医学家李时珍在其著作《本草纲目》中对香薷的药用价值有详细叙述<sup>[1]</sup>. 云南香薷植物资源在滇西北尤为丰富. 小香薷 [*Micromeria barosma* (W.W.Smith) Hand.-Mazz.] 属于唇形科姜味草属, 生于谷地干旱多砾石草地及

石灰岩岩隙上, 海拔 2 300 ~ 3 800 m, 小坚果长圆状三棱形, 长 1 ~ 2 mm, 黑褐色, 花期 7 ~ 8 月, 果期 9 ~ 10 月<sup>[2]</sup>. 目前对小香薷的研究主要是香薷籽油的营养成分、功效及急性毒性、调节血脂等方面<sup>[2-4]</sup>.

**[基金项目]** 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (5Y0281C, 08Y0239); 昆明医科大学研究生创新基金资助项目 (2009J12)

**[作者简介]** 张雪辉 (1975 ~), 男, 云南个旧市人, 医学学士, 实验师, 主要从事营养与食品科学研究工作.

**[通讯作者]** 殷建忠. E-mail: yinjianzhong2005@sina.com

黄酮类化合物是一类广泛存在植物中的天然化合物, 对人体有抗炎、抗氧化、抗癌、降低胆固醇、改善血液循环等多种功效, 在传统医学用于多种疾病的治疗<sup>[1]</sup>, 目前也有不少关于黄酮功效的新研究, 黄酮对心肌凋亡有抑制作用<sup>[6]</sup>. 已经有很多有效的方法从植物中提取天然黄酮, 如大孔树脂是提取贯叶连翘中黄酮的一种有效方法<sup>[7]</sup>, 近年来, 对小香薷籽中黄酮类化合物的提取研究还鲜有报道. 与天然产物的传统提取方法比较, 微波辅助提取技术具有方便、省时、能耗少等优点<sup>[8]</sup>. 响应曲面试验设计法可在连续范围内进行分析, 优于现在普遍采用的只能分析离散条件的正交实验设计. 目前, 应用响应面法优化香薷中成分的研究仅有香薷中挥发油提取的报道<sup>[9]</sup>, 而响应面法优化微波提取小香薷籽中总黄酮尚无报道.

本研究采用微波辅助提取云南野生香薷籽中的总黄酮, 采用 Box-Behnken 的中心组合设计响应面法进行工艺优化, 应用 Design-Expert 8.0 软件 trial 版进行数据拟合, 获得最佳工艺条件下的小香薷籽总黄酮提取含量, 所得结果更具参考性.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

野生小香薷籽采自云南丽江宁蒗彝族自治县大兴镇安乐村、下仁和村; 红旗乡白牛厂、羊窝子村、官地坝村. 芦丁对照品, 购于中国药品生物制品检定所; 试剂: 无水乙醇、三氯化铝、醋酸、冰醋酸均为分析纯.

### 1.2 仪器

微波炉 (顺德格兰仕电器厂); FA1004 电子天平 (上海分析仪器厂); 722 型分光光度计 (上海分析仪器厂).

### 1.3 方法与步骤

**1.3.1 标准曲线的绘制<sup>[10]</sup>** 采用三氯化铝分光光度法测定小香薷籽中总黄酮的含量. 精密称取干燥至恒重的芦丁对照品 5.00 00 mg, 用无水乙醇溶解、摇匀, 定容至 100 mL, 得 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  芦丁对照品溶液备用. 精密吸取此对照品溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 6 支 10 mL 容量试管中, 加 0.1 mol/L 的三氯化铝溶液 3 mL, 用 pH 值为 5.8 的 HAc-NaAc 缓冲溶液定容至 10 mL, 摇匀, 得芦丁对照品浓度梯度溶液. 30 min 后用试剂空白作背景, 在 420 nm 波长下对分别对上述芦丁对照品浓度梯度进行比色. 用吸光度 A 作为纵坐标, 以显色液中芦丁的浓度 C (mg/mL) 作为横坐标得到回

归方程,  $Y = 33.58X - 0.0119$  ( $r = 0.9993$ ). 标准曲线见图 1.

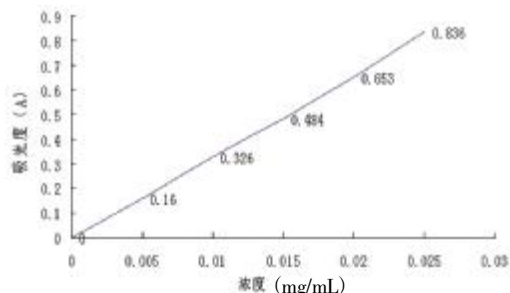


图 1 芦丁对照品标准曲线

Fig. 1 Standard curve of rutin

**1.3.2 微波辅助提取黄酮类化合物** 提取工艺流程: 野生香薷籽→磨粉→预浸 (按不同料液比浸泡于不同浓度乙醇溶液中)→微波加热→过滤→滤液→加试剂反应→比色→计算提取黄酮含量.

操作方法<sup>[10]</sup>: 精密称取 1 g 干燥的小香薷籽粉末, 按一定的料液比加入不同浓度的乙醇溶液, 预浸一定时间, 在设定的不同微波功率条件下加热提取一定的时间, 待冷却后定容, 过滤, 取滤液. 准确吸取 1 mL 的提取液, 用相应浓度的乙醇定容至 10 mL 的容量试管后, 准确吸取 1 mL, 顺次加入 0.1 mol/L 的三氯化铝溶液 3 mL, 用 pH 值为 5.8 的 HAc-NaAc 缓冲溶液定容至 10 mL, 摇匀, 30 min 后在 420 nm 波长下测定吸光度, 由回归方程计算总黄酮含量.

$$\text{总黄酮提取含量}(\%) = \frac{\text{溶液中总黄酮含量}}{\text{样品质量}} \times 100\%$$

**1.3.3 单因素试验** 单因素包括乙醇浓度、预浸时间、料液比、微波时间、提取次数、微波功率 6 个因素, 分别确定这些参数的最佳水平.

**1.3.4 二次通用旋转组合设计及响应面分析** 在单因素实验的基础上, 选择浓度、预浸时间、料液比、微波提取时间 4 个主要影响因素, 按照 Box-Behnken 的中心组合设计, 设计 4 因素 3 水平的响应面试验.

### 1.4 统计学处理

实验数据处理采用 Design-Expert 8.0 统计分析软件 trial 版, 方差分析, logistic 回归进行统计分析.

## 2 结果

### 2.1 单因素试验结果

**2.1.1 料液比对总黄酮提取含量的影响** 称取小香薷籽粉 6 份, 料液比分别为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60, 用 80% 的乙醇溶液预浸 5 min, 288 W 微波加热 5 min, 提取 1 次. 料液比与总黄酮提取含量间的关系见图 2, 料液比到 1:20 之后就趋于平缓, 在 1:40 的时候达到最高点 1.032%, 故选取料液比 1:40 为最佳.

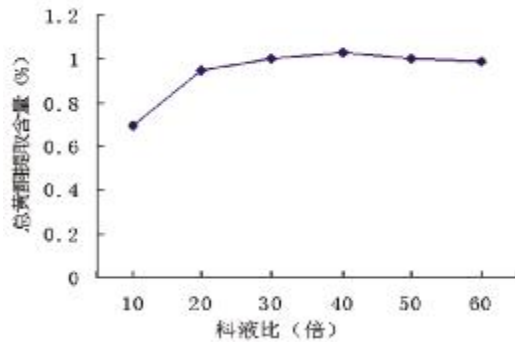


图 2 料液比对总黄酮提取含量的影响

Fig. 2 Effects of solid-liquid ratio on the yield of total flavonoids

**2.1.2 预浸时间对总黄酮提取含量的影响** 以料液比 1:40、80% 的乙醇分别预浸样品 2 min、3 min、4 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min 后, 288 W 微波加热 5 min, 提取 1 次, 预浸时间对总黄酮提取含量的影响见图 3. 随着预浸时间的增加, 总黄酮提取含量交替升降, 在 5 min 时达到最高点, 提取率为 0.697%, 故选取最佳的预浸时间为 5 min.

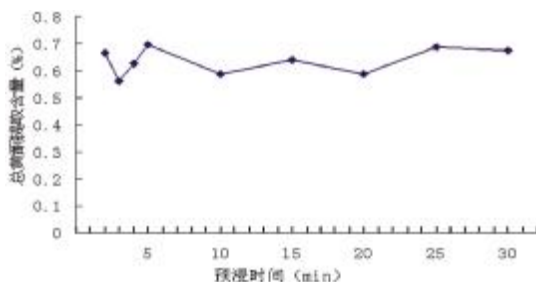


图 3 预浸时间对总黄酮提取含量的影响

Fig. 3 Effects of presoaking time on the yield of total flavonoids

**2.1.3 微波功率对总黄酮提取含量的影响** 以料液比 1:40、80% 乙醇浓度预浸 5 min, 以 144 W、288 W、464 W、648 W、800 W 5 个功率分别加热 5 min, 提取 1 次, 两者关系见图 4. 在微波功率为 464 W 时, 总黄酮提取含量为 1.098%, 达到最

高点, 故选取 464 W 为最佳微波功率.

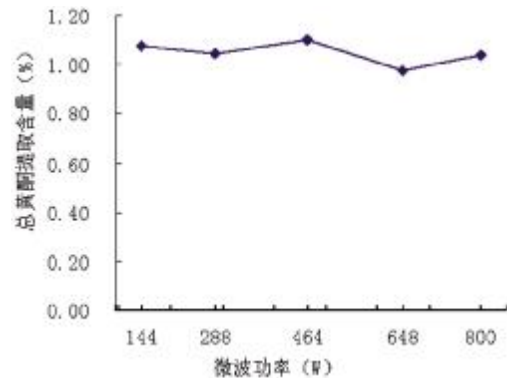


图 4 微波功率对总黄酮提取含量的影响

Fig. 4 Effects of microwave power on the yield of total flavonoids

**2.1.4 乙醇浓度对总黄酮提取含量的影响** 分别以 80%、85%、90%、95%、99.7% 浓度的乙醇溶液, 以 1:40 的料液比, 预浸 5 min, 464 W 微波加热 5 min, 提取 1 次. 在乙醇浓度为 95% 时总黄酮提取含量达到最高值 4.157%, 故选 95% 乙醇浓度为最佳 (见图 5).

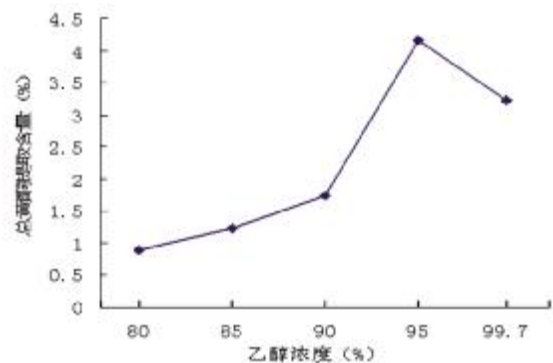


图 5 乙醇浓度对总黄酮提取含量的影响

Fig. 5 Effects of ethanol concentration on the yield of total flavonoids

**2.1.5 微波加热时间对总黄酮提取含量的影响** 以 1:40 料液比, 95% 的乙醇浓度, 预浸 5 min, 464 W 微波分别加热样品 3 min、5 min、7 min、10 min、15 min、20 min 后, 提取 1 次, 结果在 5 min 时的总黄酮提取含量最高 (见图 6). 微波加热到 5 min 时有一个高峰, 考虑到加热时间越长, 对结果的影响越大, 故选取加热时间 5 min 为最佳.

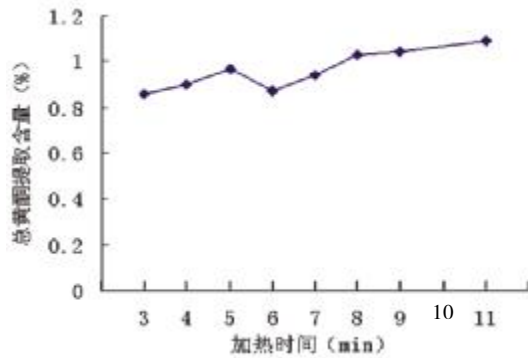


图 6 微波加热时间对总黄酮提取含量的影响

Fig. 6 Effects of microwave heating time on the yield of total flavonoids

2.1.6 提取次数对总黄酮提取含量的影响 固定料液比 1:40, 预浸时间 5 min, 微波功率 464 W, 95%乙醇浓度, 加热 5 min; 对样品提取 1 次、2 次、3 次、4 次, 结果见图 7. 提取 1 次之后, 2~4 次的总黄酮提取含量都较低, 且都趋于平行, 故选取 1 次为提取次数.

综上所述, 单因素最佳参数水平分别为: 料液比 1:40, 预浸时间 5 min, 微波功率 464 W, 乙醇浓度 95%, 微波时间 5 min, 提取次数 1 次.

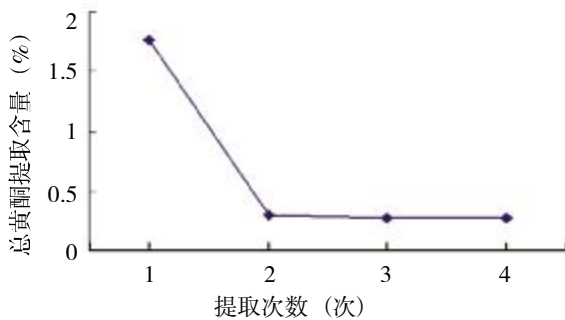


图 7 提取次数对总黄酮提取含量的影响

Fig. 7 Effects of extraction times on the yield of total flavonoids

## 2.2 提取工艺条件优化数学模型的建立及统计检验

Box-Behnken Design 中心组合因素水平见表 1, 结果见表 2, 采用 Design-Expert8.0 软件对结果进行多元回归拟合<sup>[11,12]</sup>, 检验回归模型拟合度及其显著性, 同时对回归模型方程中各项进行方差分析, 结果见表 3. 得到以黄酮提取率为目标函数的二次回归方程:

$$Y=5.685+1.554X_1-0.054X_2+0.616X_3+0.177X_4-0.042X_1X_2+0.261X_1X_3+0.226X_1X_4-0.160X_2X_3+0.119X_2X_4+0.608X_3X_4-1.408X_1^2-0.178X_2^2-0.329X_3^2-0.276X_4^2$$

(R<sup>2</sup> = 0.9433)

表 1 Box-Behnken Design 中心组合因素水平表

因素	水平		
	-1	0	1
乙醇浓度 (%)	90	95	99.7
预浸时间 (min)	4	5	6
料液比	1:30	1:40	1:50
微波时间 (min)	3	5	7

表 2 Box-Behnken Design 中心组合实验设计及结果

Tab. 2 The Box-Behnken experimental design and results

试验号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	总黄酮提取含量 (%)
1	-1	-1	0	0	2.060
2	-1	1	0	0	2.143
3	1	-1	0	0	5.871
4	1	1	0	0	5.788
5	-0	0	-1	-1	4.529
6	0	0	1	-1	4.540
7	0	0	-1	1	4.136
8	0	0	1	1	6.580
9	-1	0	0	-1	2.631
10	-1	0	0	1	2.155
11	1	0	0	-1	5.109
12	1	0	0	1	5.538
13	0	-1	-1	0	3.975
14	0	-1	1	0	6.193
15	0	1	-1	0	4.198
16	0	1	1	0	5.776
17	-1	0	-1	0	2.867
18	-1	0	1	0	2.917
19	1	0	-1	0	5.011
20	1	0	1	0	6.103
21	0	-1	0	-1	5.609
22	0	-1	0	1	5.633
23	0	1	0	-1	5.145
24	0	1	0	1	5.645
25	0	0	0	0	5.788
26	0	0	0	0	5.716
27	0	0	0	0	5.550

注: X<sub>1</sub>- 乙醇浓度, X<sub>2</sub>- 预浸时间, X<sub>3</sub>- 料液比, X<sub>4</sub>- 微波时间.



由表 3 可知, 所建立的回归模型有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 失拟项无统计学意义 ( $P > 0.05$ ).  $R^2 = 0.9433$ , 说明回归方程对数据的拟合度良好, 实验误差小, 可用此模型对小香薷籽总黄酮的提取进行分析和预测. 从表 3 的回归模型系数假设检验可知, 模型一次项  $X_1$  极显著,  $X_3$  显著; 交互项  $X_3 X_4$  显著; 二次项  $X_1^2$  极显著, 从  $F$  值可以看出, 单因素对提取总黄酮的影响顺序依次是  $X_1 > X_3 > X_4 > X_2$ , 即乙醇浓度 > 料液比 > 微波时间 > 预浸时间.

表 3 回归模型系数显著性检验结果

Tab. 3 Regression coefficients and its significant levels of the regression model

可选变量	b	Sb	F	P
Intercept	5.68	0.28	14.27	< 0.000 1**
$X_1$	1.55	0.14	122.53	< 0.000 1**
$X_2$	-0.054	0.14	0.15	
$X_3$	0.62	0.14	19.26	0.000 9*
$X_4$	0.18	0.14	1.59	
$X_1 X_2$	-0.042	0.24	0.0029	
$X_1 X_3$	0.26	0.24	1.15	
$X_1 X_4$	0.23	0.24	0.87	
$X_2 X_3$	-0.16	0.24	0.43	
$X_2 X_4$	0.12	0.24	0.24	
$X_3 X_4$	0.61	0.24	6.26	0.027 8*
$X_1^2$	-1.41	0.21	44.70	< 0.000 1**
$X_2^2$	-0.18	0.21	0.71	
$X_3^2$	-0.33	0.21	2.44	
$X_4^2$	-0.28	0.21	1.71	

\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .

### 2.3 小香薷籽总黄酮含量的响应面分析与优化

根据回归分析结果作出响应曲面图, 分别表示以乙醇浓度、料液比、微波时间、预浸时间为 0 水平时, 其中两个因素对提取总黄酮的影响 (见图 8~13). 比较可知, 存在极值的条件应该在圆心处, 乙醇浓度对总黄酮含量的影响最为显著, 曲线较陡, 微波时间和料液比的影响曲线较为平缓, 预浸时间的最小.

### 2.4 最优条件的选择

由 Design-Expert8.0 软件 trial 版对实验参数进一步优化, 得出最佳条件为: 乙醇浓度 97.51%, 预浸时间 5.34 min, 料液比 1:47.5, 微波时间 5.76 min, 在此条件下, 总黄酮提取含量理论值为 6.67%. 为检验响应曲面法所得结果的可靠性, 采用上述优化条件进行提取, 进行 3 次平行对照实

验, 得出的实际平均含量为 6.42%, 与预测值相比, 其误差约为 3.7%.

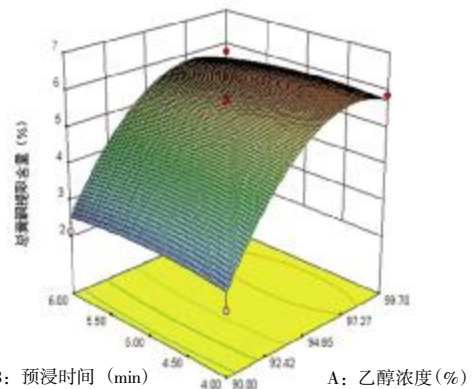


图 8 预浸时间和乙醇浓度交互作用的响应面  
Fig. 8 3D response surface graph of the interaction between pre-soaking time and ethanol concentration

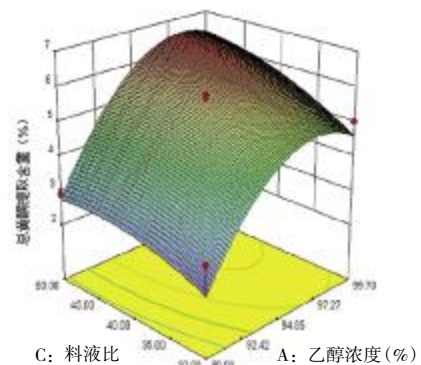


图 9 乙醇浓度和料液比交互作用的响应面  
Fig. 9 3D response surface graph of the interaction between ethanol concentration and solid-liquid ratio

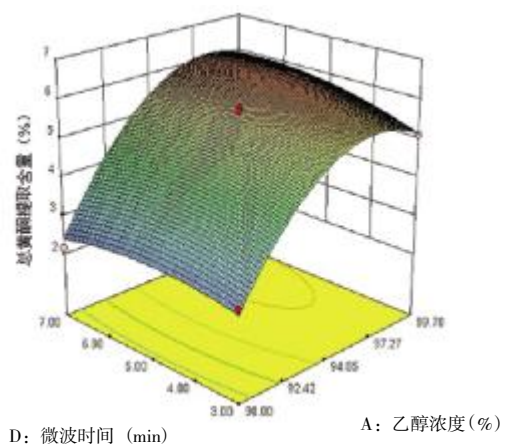


图 10 微波时间和乙醇浓度交互作用的响应面  
Fig. 10 3D response surface graph of the interaction between microwave heating time and ethanol concentration

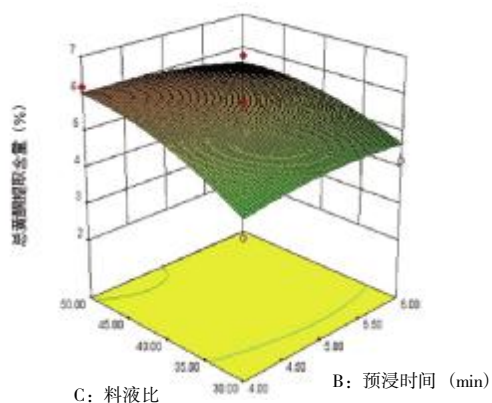


图 11 料液比和预浸时间交互作用的响应面

Fig. 11 3D response surface graph of the interaction between solid-liquid ratio and presoaking time

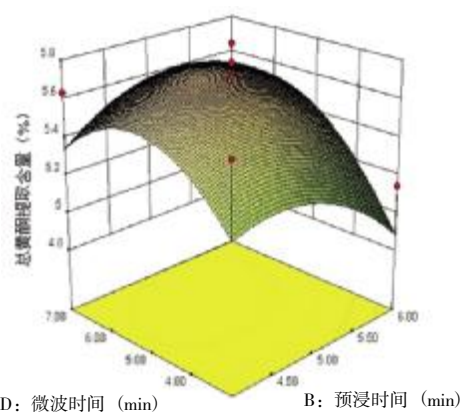


图 12 微波时间和预浸时间交互作用的响应面

Fig. 12 3D response surface graph of the interaction between microwave heating and presoaking time

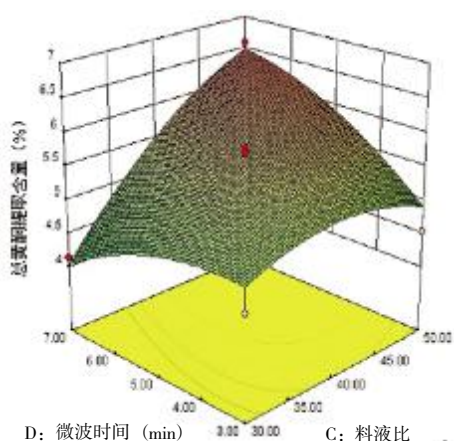


图 13 微波时间和料液比交互作用的响应面

Fig. 13 3D response surface graph of the interaction between the time of microwave extraction and solid-liquid ratio

### 3 讨论

根据响应面法对小香薷籽中总黄酮提取影响因素进行分析, 固定微波功率为 464 W 及提取次数为 1 次, 确定最佳提取工艺为乙醇浓度 97.51%, 预浸时间 5.34 min, 料液比 1:47.5, 微波时间 5.76 min, 在此条件下, 总黄酮提取含量为 6.42%, 与预测值比较接近. 本研究结果有助于优化小香薷籽总黄酮提取工艺, 为小香薷的开发利用及植物黄酮的提取提供依据.

#### [参考文献]

- [1] 丁晨旭, 纪兰菊. 香薷化学成分及药理作用研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(5): 63 - 65.
- [2] 殷建忠, 赵云丽, 周建于, 等. 丽江野生香薷籽油急性毒性和对高脂血症小鼠血脂水平的影响 [J]. 实用预防医学, 2009, 16(1): 9 - 10.
- [3] 殷建忠, 张雪辉, 周建于, 等. 丽江野生香薷籽油理化性质及营养成分分析与评价 [J]. 现代食品科技, 2009, 25(1): 101 - 102.
- [4] 张忠华, 殷建忠. 唇形科香薷属植物化学成分药理作用及开发应用研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2008, 29(8): 48 - 50.
- [5] LOPEZ-LAZARI M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin [J]. Mini Rev Med Chem, 2009, 9(1): 31 - 59.
- [6] 欧阳平, 贝伟剑. 柿叶黄酮对缺氧复氧以及晚期糖基化终产物诱导的乳鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(7): 682.
- [7] 汪茜, 何宇新, 邓芸. 大孔吸附树脂纯化贯叶连翘总黄酮工艺研究 [J]. 成都医学院学报, 2008, 3(4): 258.
- [8] 黎海彬, 王邕, 李俊芳, 等. 微波辅助提取技术在天然产物提取中的应用 [J]. 现代食品科技, 2005, (21)3: 148 - 150.
- [9] 杨美艳, 聂少平, 李景恩, 等. 利用响应面分析法优化香薷中挥发油提取工艺 [J]. 食品科学, 2008, 29(9): 222 - 225.
- [10] 王琦, 周建于, 吴少雄, 等. 微波辅助水提取云南凤尾茶总黄酮工艺的研究 [J]. 现代食品科技, 2009, 25(5): 550 - 552.
- [11] 李晓军, 潘宏利, 陈花, 等. 响应面法优化超声波辅助提取金银花总黄酮 [J]. 陕西师范大学学报, 2009, 37(2): 81 - 90.
- [12] 梅洪, 汪坤, 金文英, 等. Box-Behnken 响应面法优化超声提取蚕沙中叶绿素的工艺研究 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(3): 207 - 209.

(2012 - 02 - 17 收稿)