

响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究

肖卫华^{1,2} 韩鲁佳^{1,2} 杨增玲^{1,2} 刘贤^{1,2}

(1. 中国农业大学 工学院, 北京 100083; 2. 现代精细农业系统集成研究教育部重点实验室, 北京 100083)

摘要 为确定黄芪中黄酮类成分乙醇回流提取的最佳工艺条件,采用高效液相色谱法对4种黄芪黄酮(毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素和芒柄花苷)的含量进行测定;以黄酮得率为指标,采用响应面法对主要工艺参数进行优化并得到回归模型。方差分析结果表明:回归模型较好地反映了黄芪黄酮得率与浸提时间、浸提温度、乙醇体积分数和液固比的关系;最优工艺条件为,提取温度75℃,提取时间2.5h,乙醇体积分数88.3%,液固比25 mL/g。此工艺条件下提取黄芪黄酮得率为0.977 mg/g,回归模型的预测值与实测值的相对误差<1%,该回归方程与实际情况拟合较好。

关键词 黄芪;黄酮;提取工艺;参数优化;响应面法

中图分类号 R 284.2

文章编号 1007-4333(2007)05-0052-05

文献标识码 A

Optimization of alcohol extraction techniques of flavonoids from Radix Astragali using response surface methodology

Xiao Weihua^{1,2}, Han Lujia^{1,2}, Yang Zengling^{1,2}, Liu Xian^{1,2}

(1. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Key Laboratory of Modern Precision Agriculture System Integration, Ministry of Education, Beijing 100083, China)

Abstract To optimize the alcohol reflux process of flavonoid from Radix Astragali response surface methodology (RSM) was employed to investigate the influence of the four main factors including temperature, time, concentration of ethanol, ratio of solvent to raw material on the yield of flavonoid using High-performance liquid chromatography (HPLC). Regression coefficient and analysis showed the regression model fitted the actual process well. Based on the results of response surface methodology, the best extraction processing parameter was ascertained as follows: temperature 75℃, time 2.5 h, concentration of ethanol 88.3% (v/v), ratio of solvent to raw material 25 mL/g. Yield of that optimized procedure was 0.977 mg/g. The experimental values agreed with those predicted within a 1% relative error, thus indicating the suitability of RSM in optimizing the extraction of flavonoid from Radix Astragali.

Key words Radix Astragali; flavonoids; extraction process; optimize; response surface methodology

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,具有补气固表、利尿脱毒、排脓、敛疮生肌等功效。黄芪中的主要有效成分为多糖、皂苷和黄酮类化合物,其中黄酮类化合物主要包括毛蕊异黄酮及其糖苷以及芒柄花素和芒柄花苷等^[1]。研究表明黄芪中的黄酮类成分具有多种药

理活性,可以清除氧自由基,抑制脂质过氧化,增强免疫力,抗病毒以及促进细胞增殖等^[2-3]。

目前对黄芪生物活性成分提取的研究多集中在多糖和皂苷的提取工艺方面^[4-6],对黄芪黄酮提取工艺的研究较少。现有黄芪黄酮提取方法主要为甲醇索氏法或超声法^[7-8],索氏法仅适于小规模提取,不适于工业化生产,而超声提取由于噪声污染等问题应用受到限制。回流提取是目前工业化生产应用

收稿日期: 2007-04-08

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划课题(2001B501A30);北京市科技计划项目课题(Y704003040511)

作者简介: 肖卫华,博士研究生, E-mail: xwhddd@163.com; 韩鲁佳,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事生物物质资源开发利用的研究, E-mail: hanlj@cau.edu.cn

较为广泛的一种提取方法,对黄芪黄酮的乙醇回流提取工艺进行研究具有重要的现实意义。

本研究采用高效液相色谱法(HPLC)测定黄芪黄酮含量,应用响应面法考察黄芪黄酮乙醇提取工艺中各因素对黄芪黄酮类化合物提取效果的影响,对黄芪黄酮乙醇提取工艺进行优化,旨在为黄芪黄酮的进一步开发利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

材料:黄芪饮片,购自北京同仁堂医药股份有限公司,为山西产蒙古黄芪。将黄芪饮片在 60 ℃ 下干燥,粉碎后过 10 目筛。

主要试剂:毛蕊异黄酮(质量分数 90.3%)购自上海中药标准化研究中心;毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷(质量分数 98.0%)购于北京天宝物华生物技术有限公司;芒柄花素(质量分数 96.6%)和芒柄花苷(质量分数 99.2%)标准品,购自美国 CHROMADDEX 公司;乙腈,色谱纯,美国 FISHER 公司。

仪器:日立高效液相色谱仪(MODEL L-7200 自动进样器,L-7420/L-7420S 型紫外可见检测器,MODEL L-7300 柱温箱,MODEL L-7100 泵;L-7610 真空脱气机),WML-2001 通用型威玛龙色谱数据工作站,南宁市威玛龙色谱科技有限公司;MILLIPORE 超纯水机;KQ-500DV 台式数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;FW135 型中草药高速万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司。

1.2 试验方法

1) 黄芪黄酮含量测定。毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷(以下简称为毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、芒柄花素和芒柄花苷的测定参考文献[9]的方法获得标准曲线的回归方程(表 1)。

表 1 黄芪黄酮 HPLC 标准曲线的回归方程

Table 1 Data from calibration curves and linear range of Radix Astragali flavonoids

标准品	回归方程	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$y = 4 \times 10^{-5} x + 0.82$	0.999	15 ~ 120
芒柄花苷	$y = 3 \times 10^{-5} x + 0.64$	0.998	5.5 ~ 44
毛蕊异黄酮	$y = 4 \times 10^{-5} x + 6.82$	0.999	35 ~ 280
芒柄花素	$y = 3 \times 10^{-5} x + 3.17$	1.000	28 ~ 224

毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素和芒柄花苷均在表 1 所示质量浓度范围内线性关系良好。将待测液按上述方法测得 4 种黄酮化合物的质量浓度,其总和记为黄酮得率。

2) 试验方案。在单因素实验基础上选取浸提时间、浸提温度、乙醇体积分数、液固比 4 因素(表 2),采用响应面法试验设计优化黄芪黄酮的乙醇回流提取工艺参数。精密称取 10.0 g 黄芪粉,按试验方案中的条件乙醇回流反复提取 2 次,取上清液浓缩蒸干加甲醇定容按 1) 的方法测定黄酮得率。

表 2 黄芪黄酮提取响应面法试验因素水平表

Table 2 Levels and factors of Radix Astragali flavonoids extraction experiment

水平	因素(实际值)			
	浸提时间 X_1/h	浸提温度 $X_2/$	乙醇体积 分数 $X_3/\%$	液固比 $X_4/$ (mL/g)
+2	2.5	75	100	25
+1	2.0	65	90	20
0	1.5	55	80	15
-1	1.0	45	70	10
-2	0.5	35	60	5
水平间距	0.5	10	10	5

3) 统计方法。以测得的黄芪黄酮得率为目标函数,浸提时间、浸提温度、乙醇体积分数、液固比为自变量,采用 SAS 以及 Matlab 分析结果。

2 结果与分析

2.1 回归方程的建立及统计检验

试验方案及结果见表 3。将所得的试验数据采用 SAS 统计软件分析,剔除不显著项,得到以黄酮得率为目标函数的二次回归方程

$$Y = 0.6473 + 0.0367 X_1 + 0.0414 X_2 + 0.0145 X_3 + 0.0256 X_4 + 0.0274 X_1 X_2 + 0.0152 X_1 X_3 - 0.0270 X_3^2 \quad (1)$$

式中,浸提时间 X_1 、浸提温度 X_2 、乙醇体积分数 X_3 和液固比 X_4 在设计中均经量纲 1 线性编码处理,因此,方程中各项系数绝对值的大小直接反映了各因素对指标值的影响程度,系数的正负反映了影响的方向。由式(1)可知,浸提温度和浸提时间两线性项、浸提时间和浸提温度的交互项以及乙醇体积分数的二次项对黄酮得率影响最大。

表3 黄芪黄酮提取响应面设计试验方案及结果

Table 3 RSM Experimental designs and results for Radix Astragali flavonoids extraction

试验号	浸提时间 X_1/h	浸提温度 $X_2/$	乙醇体积分数 $X_3/\%$	液固比 $X_4/(mL/g)$	得率 $Y/(mg/g)$	试验号	浸提时间 X_1/h	浸提温度 $X_2/$	乙醇体积分数 $X_3/\%$	液固比 $X_4/(mL/g)$	得率 $Y/(mg/g)$
1	1	45	70	10	0.561	17	0.5	55	80	15	0.556
2	1	45	70	20	0.609	18	2.5	55	80	15	0.775
3	1	45	90	10	0.588	19	1.5	35	80	15	0.576
4	1	45	90	20	0.620	20	1.5	75	80	15	0.779
5	1	65	70	10	0.595	21	1.5	55	60	15	0.579
6	1	65	70	20	0.627	22	1.5	55	100	15	0.586
7	1	65	90	10	0.598	23	1.5	55	80	5	0.638
8	1	65	90	20	0.632	24	1.5	55	80	25	0.751
9	2	45	70	10	0.537	25	1.5	55	80	15	0.649
10	2	45	70	20	0.583	26	1.5	55	80	15	0.668
11	2	45	90	10	0.611	27	1.5	55	80	15	0.675
12	2	45	90	20	0.649	28	1.5	55	80	15	0.686
13	2	65	70	10	0.645	29	1.5	55	80	15	0.679
14	2	65	70	20	0.727	30	1.5	55	80	15	0.694
15	2	65	90	10	0.722	31	1.5	55	80	15	0.673
16	2	65	90	20	0.799						

为了检验方程的有效性,对黄芪黄酮提取的数学模型进行方差分析,并对各因子的偏回归系数进行检验,结果(表4)表明:一次项中 X_1 、 X_2 和 X_4 的偏回归系数极显著,说明浸提时间、浸提温度、液固

比对黄酮得率有极显著影响; X_3 的偏回归系数显著,说明乙醇体积分数对黄酮得率有显著影响;交互项 $X_1 X_2$ 和 $X_1 X_3$ 的偏回归系数显著,说明浸提时间和浸提温度、浸提时间和乙醇体积分数的交互项对黄酮的得率有显著影响;二次项中 X_3^2 的偏回归系数达极显著水平,其他各项的偏回归系数均未达到显著水平,剔除不显著项后即得到回归式(1)。

表4 黄芪黄酮提取工艺优化数学模型方差分析

Table 4 Analysis of mean square deviation for Radix Astragali flavonoids extraction

变异来源	自由度	平方和	均方	F	$P_r > F$
X_1	1	0.032 3	0.032 3	40.658 2	0.000 1***
X_2	1	0.041 1	0.041 1	51.652 9	0.000 1***
X_3	1	0.005 1	0.005 1	6.380 4	0.022 5*
X_4	1	0.015 8	0.015 8	19.812 8	0.000 4***
X_{12}	1	0.000 1	0.000 1	0.121 4	0.732 0
X_{22}	1	0.000 0	0.000 0	0.048 6	0.828 4
X_{32}	1	0.014 6	0.014 6	18.342 4	0.000 6***
X_{42}	1	0.000 8	0.000 8	1.053 1	0.320 1
$X_1 X_2$	1	0.012 0	0.012 0	15.960 1	0.001 3**
$X_1 X_3$	1	0.003 7	0.003 7	4.639 8	0.046 8*
$X_1 X_4$	1	0.000 6	0.000 6	0.739 3	0.402 6
$X_2 X_3$	1	0.000 0	0.000 0	0.034 7	0.854 7
$X_2 X_4$	1	0.000 2	0.000 2	0.292 4	0.596 1
$X_3 X_4$	1	0.000 0	0.000 0	0.057 3	0.813 9
回归检验	14	0.127	0.009 1	11.448 0	0.000 1***
失拟检验	10	0.010 6	0.001 1	2.990 3	0.096 4

注:***,差异极显著($P < 0.001$);**,差异高度显著($P < 0.01$);

*,差异显著($P < 0.05$)。

由表4可见,回归方程失拟检验不显著,说明未知因素对试验结果干扰很小。拟合检验极显著,同时决定系数达0.918,说明该方程与实际情况拟合很好,较好地反映了黄芪黄酮得率与浸提时间、浸提温度、乙醇体积分数和液固比的关系,因此所得的回归方程能较好的预测黄芪黄酮提取得率随各参数的变化规律。

2.2 黄芪黄酮提取的响应面分析

根据回归方程预测4个因素对黄酮得率的影响(图1)。由图1(a)可见,黄酮得率随提取时间的延长和温度的提高快速增加,且二者有明显的交互作用。黄酮得率在高温、长时间条件下增加极显著,这一结果与袁建等^[10]的结论一致。根据浸提动力学理论,时间的延长有助于黄酮的充分扩散溶出,同时温度的升高使得分子解附和扩散运动速度加快,从而提高了黄酮的浸出速率和得率。因此适当延长时间和提高温度有助于提高黄酮的得率。

由图1(b)可见,黄酮得率与乙醇体积分数具有

明显的二次抛物线关系,在 85%~90% 附近出现峰值,这与张吉刚等^[11]的试验结果基本一致。根据相似相溶原理可以认为,黄芪黄酮极性与此范围乙醇溶液的极性相当,因此在这一体积分数溶液中溶解性较好。黄酮得率随温度的增加显著增加,呈直线上升趋势。

浸提时间较长、乙醇体积分数较高条件下黄酮得率较高(图 1(c));在长时间低乙醇体积分数区域和短时间高乙醇体积分数区域得率较低,即两因素间有显著的交互效应。分析其主要原因是,乙醇体

积分数较低时黄酮溶解度较差,提取时间的延长使大量水溶性杂质如多糖溶出,提取液变得黏稠对黄酮产生吸附作用,不利于黄酮的快速扩散溶出;根据单因素试验结果当乙醇体积分数较高(>90%)时黄芪黄酮溶解性较差,因此得率也较低。

黄酮得率随液固比的增加呈直线上升趋势(图 1(d))。液固比的增加能降低浸提溶液中黄酮的含量,从而增加液固两相黄酮的浓度梯度,进而提高黄酮溶出的速度,最终提高得率。

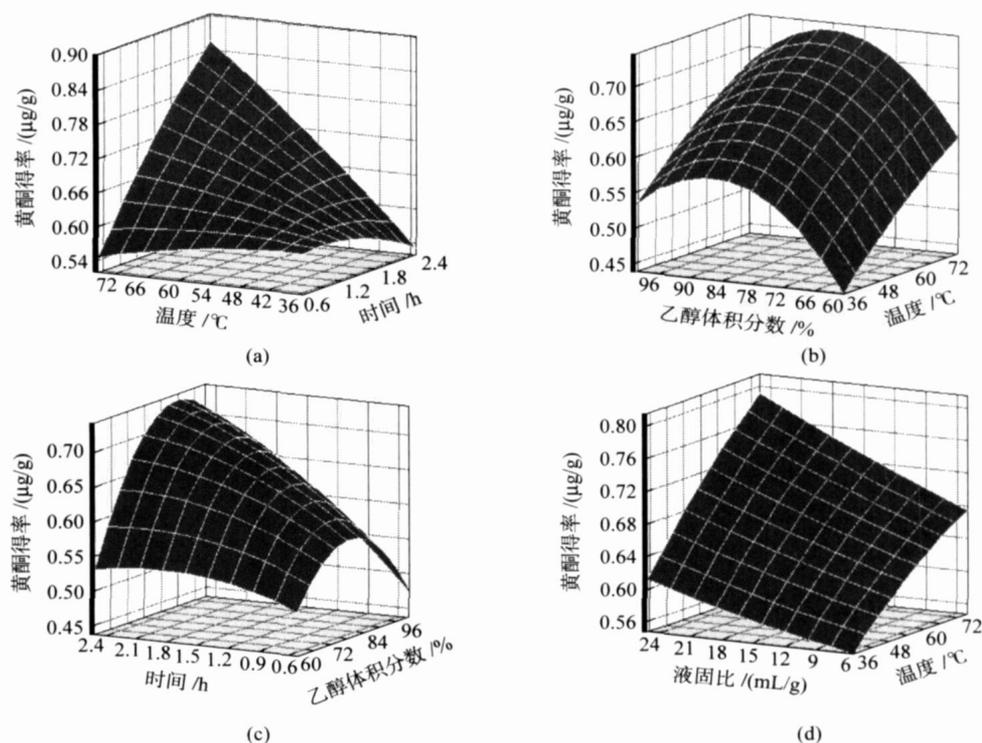


图 1 浸提时间、浸提温度、乙醇体积分数和液固比对黄酮得率的影响

Fig. 1 Surface plots of the yield of flavonoids from Radix Astragali as affected by extraction time, temperature, ethanol concentration, and liquid/solid ratio

2.3 试验验证

采用 Matlab 求式(1)的极值,在试验所设定的参数范围内,黄酮得率最大为 0.977 mg/g,所对应的工艺参数为:浸提时间 2.5 h、浸提温度 75℃、乙醇体积分数 88.3%、液固比 25 mL/g。对优化结果进行试验验证结果表明:优化工艺的黄酮得率为 0.977 mg/g,与预测值(0.983 mg/g)基本一致(相对误差 0.6%),说明该方程与实际情况拟合很好,充分验证了所建模型的正确性,说明响应面法适用于对黄芪黄酮的乙醇回流提取工艺进行回归分析和参数优化。

3 结论

采用响应面设计方法得出的黄芪黄酮回流提取工艺参数的回归方程为

$$Y = 0.6473 + 0.0367X_1 + 0.0414X_2 + 0.0145X_3 + 0.0256X_4 + 0.0274X_1X_2 + 0.0152X_1X_3 - 0.0270X_3^2$$

方差分析结果表明:拟合检验极显著,决定系数达 0.918,该方程能较好的预测黄芪黄酮提取得率随各参数变化的规律。

优化得到的最佳工艺条件为:浸提时间 2.5 h、

浸提温度 75 ℃、乙醇体积分数 88.3%、液固比 25 mL/g,此工艺条件下的黄酮得率为 0.977 mg/g,与预测值(0.983 mg/g)的相对误差为 0.6%,说明该方程与实际情况拟合很好。

响应面法能较好地对黄芪黄酮的乙醇回流提取工艺进行回归分析和参数优化。

参 考 文 献

- [1] 姚美村,齐莹,毕开顺,等. 黄芪药效物质基础研究[J]. 中国野生植物资源,2000,19(2):33-36
- [2] 汪德清,田亚平,宋淑珍,等. 黄芪总黄酮抗突变作用实验研究[J]. 中国中药杂志,2003,28(12):1164-1167
- [3] 汪德清,田亚平,向兰. 黄芪总黄酮生物学活性作用的化学成分基础研究[J]. 军医进修学院学报,2006,27(1):13-15
- [4] 阎巧娟,韩鲁佳,江正强,等. 黄芪皂甙的提取方法[J]. 中国农业大学学报,2000,5(6):61-65
- [5] 阎巧娟,韩鲁佳,江正强,等. 黄芪多糖的分子量分布[J]. 食品科学,2004,25(8):27-30
- [6] 韩鲁佳,阎巧娟,江正强,等. 黄芪多糖及皂甙提取工艺研究[J]. 农业工程学报,2000,5(9):118-121
- [7] Anetai M, Katsura E, Katoh Y, et al. Chemical evaluation of Astragali Radix[J]. Natural Medicines, 1994, 48: 244-252
- [8] 纪松岗. 正交设计法确定黄芪中黄酮类成分的超声提取条件[J]. 第二军医大学学报,2005,26(10):1168-1170
- [9] Wu Tao, Annie Bligh S W, Gu Lihua, et al. Simultaneous determination of six isoflavonoids in commercial Radix Astragali by HPLC-UV[J]. Fitoterapia. Elsevier, Amsterdam, Netherlands: 2005,76(2):157-165
- [10] 袁建,鞠兴荣,王立峰,等. 水媒法提取大豆异黄酮的工艺优化研究[J]. 中国油脂,2006,31(12):52-55
- [11] 张吉刚,林朝朋. 黄芪总黄酮的醇提工艺研究[J]. 现代食品科技,2006,22(3):158-162

www.cnki.net