

响应面法优化微波超声双辅助提取金银花绿原酸工艺

尤秀丽,池路花,曹芸梅,郑建忠,谭昌会
(闽南师范大学化学与环境学院,福建漳州 363000)

摘要:以金银花为原料,采用微波超声双辅助提取绿原酸。通过单因素实验对乙醇浓度、超声温度、超声时间、料液比、微波功率、微波时间等工艺参数进行研究,并通过响应面法优化提取工艺,建立二次多项数学模型。结果表明,单因素和响应面优化金银花绿原酸的最优工艺参数为:微波功率400W、微波时间94s、液料比42:1mL/g、乙醇浓度70%、超声温度为60℃、超声时间60min,此条件下金银花绿原酸提取率为5.45%。

关键词:响应面法,微波超声双辅助提取,金银花,绿原酸

Optimization of microwave-ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from *Flos Lonicerae* using response surface methodology

YOU Xiu-li, CHI Lu-hua, CAO Yun-mei, ZHEN Jian-zhong, TAN Chang-hui

(College of Chemistry and Environment, Minnan Normal University, Zhangzhou 363000, China)

Abstract: The microwave-ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from *Flos Lonicerae* was optimized using response surface methodology. The extraction yield of chlorogenic acid was investigated with respect to six process parameters including ethanol concentration, temperature, ultrasonic treatment time, solvent-to-solid ratio, microwave power and microwave time. As a result, a quadratic polynomial mathematical model was built. The optimal extraction conditions of RSM were determined as follows: *Flos Lonicerae* were suspended in microwave power of 400W, microwaves 94s, 70% ethanol concentration at solvent-to-solid ratio 42:1mL/g and then subjected to ultrasonic treatment for 60min at temperature of 60℃. Under the modified conditions, the extraction yield of polyphenols was 5.45%.

Key words: response surface methodology; microwave-ultrasonic-assisted extraction; *Flos Lonicerae*; chlorogenic acid

中图分类号:TS201.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2014)12-0272-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2014.12.051

金银花,又名银花、金花、忍冬花、金藤花等,为忍冬科常绿缠绕藤本忍冬的花蕾,主要分布在我国的山东、河南、河北等地,是国家首批颁布的既是食品又是药品的60种中药之一^[1],具有清热解毒、凉散风热等功效^[2-3]。金银花的主要有效成分之一为绿原酸,是植物体在有氧呼吸过程中经莽草酸途径代谢产生的一种苯丙素类化合物。绿原酸是一种强抗氧化性的新型活性物质,具有抗菌、抗病毒、增高白血球、保肝利胆、抗肿瘤、降血压、降血脂、清除自由基和兴奋中枢神经系统等药理作用^[4-7]。现代科学对绿原酸生物活性的研究已深入到食品、保健、医药和日用化工等多个领域^[8-10]。因此,众多科学家对绿原酸

的应用价值与其提取方法具有浓厚的兴趣。

传统提取绿原酸的方法有水提法^[11]、醇提法^[12],其被广泛应用,但存在耗时长、提取率低等缺点。近年来,随着微波技术和超声波提取技术的发展,因设备简单、操作快捷、适用范围广、提取率高、溶剂用量少、节时、节能、安全污染小等优点,被广泛用于天然植物有效成分的提取^[13-22]。但使用响应面法优化微波-超声双辅助从金银花中提取绿原酸的工艺研究还鲜有报道^[23-25]。因此,本文采用微波-超声双辅助乙醇提取金银花中的绿原酸,采用单因素及响应面法实验分析的方法,以绿原酸提取率为考察指标,以回归分析确定金银花绿原酸的最佳工艺条件,为绿原酸的进一步开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

金银花 漳州紫金药店,避光保存罐备用;绿原酸标准样品 中国生物制品研究所;无水乙醇 分析纯。

收稿日期:2013-08-05

作者简介:尤秀丽(1978-),女,硕士研究生,讲师,主要从事天然产物的提取、手性识别机理方面的研究。

基金项目:福建省教育厅科技项目(JA12218);漳州师范学院新世纪优秀人才支持计划(SX1101)。

P70D20TP-C6(WO)微波炉 广东格兰仕微波炉电器制造有限公司;BS110S电子天平 北京赛多利斯天平有限公司;UV-1800 PC紫外可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;XFB-200药材粉碎机 吉首市中湘制药机械厂;

SJ1A-10N真空冷冻干燥器 宁波市鄞州双嘉仪器有限公司。

1.2 绿原酸标准样品的曲线绘制

准确称取绿原酸标准样品5.0mg,用50%乙醇定容至50mL,配制成0.1mg/mL绿原酸标准溶液,分别准确量取0、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8mL的绿原酸标准溶液于10mL比色皿中,用等浓度的乙醇定容。用紫外-可见分光光度计,在波长328nm处测定溶液的吸光度,并以绿原酸质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

1.3 金银花中绿原酸的微波超声双辅助提取

将所购的金银花置于60℃恒温干燥箱中,待烘干后,用药材粉碎机粉碎,过80目筛,得金银花粉末。称取金银花粉末1.0000g,置于微波容器内,加入一定量乙醇溶液作溶剂,浸泡12h,然后设定一定的微波功率、微波时间,将处理后的微波容器置于超声波器皿中,在一定的超声温度、超声时间、液料比提取,后冷后过滤提取液,滤液转移至50mL容量瓶中,加相应浓度乙醇定容。精密吸取滤液0.2mL用乙醇定容至10mL的比色管中,在波长328nm下测其吸光度,然后由标准曲线计算出待测样品的绿原酸提取率。

$$\text{绿原酸提取率}(\%) = \frac{C \cdot n \cdot V}{W} \times 100$$

式中:C—标准曲线绿原酸的浓度($\mu\text{g/mL}$);n—稀释倍数;V—配成溶液体积(mL);W—金银花的质量(g)。

1.4 单因素实验设计

以绿原酸提取率为指标,准确称取金银花粉末1.0000g,选取乙醇浓度、超声温度、超声时间、料液比、微波功率和微波时间作为影响金银花绿原酸微波超声双辅助提取的单因素,每组实验重复5次,取其平均值。

1.5 响应面实验设计

根据Box-Behnken实验设计原理,选择影响银花绿原酸提取率的3个主要影响因素:微波功率、微波时间和料液比进行响应面组合实验,实验自变量因素编码及水平设计见表1。

表1 Box-Behnken实验自变量因素水平表
Table 1 Variables and levels for the Box-Behnken experimental design

因素	水平		
	-1	0	+1
X_1 微波功率(W)	150	400	550
X_2 微波时间(s)	60	90	120
X_3 液料比($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)	30:1	40:1	50:1

1.6 数据处理

实验数据采用Design Expert 7.0软件和Origin 7.5 Professional软件处理。

2 结果与分析

2.1 绿原酸标准曲线图

用紫外-可见分光光度计,在波长328nm处测定溶液的吸光度,并以绿原酸质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线方程为 $y=0.0620x+0.0225$, $R^2=0.9998$ 。

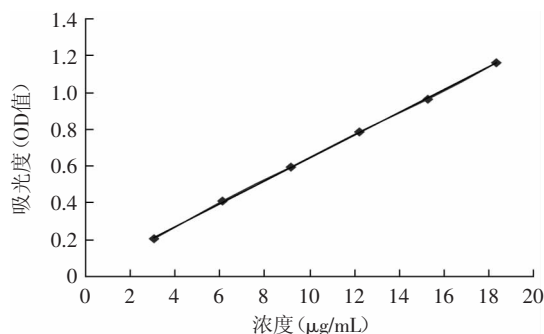


图1 绿原酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of chlorogenic acid

2.2 单因素实验结果

2.2.1 乙醇浓度对金银花绿原酸提取率的影响 当微波功率400W,微波时间30s,超声温度60℃,超声时间60min,液料比40:1 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$,考察乙醇浓度50%、60%、70%、80%、90%对绿原酸提取率的影响。结果见图2。

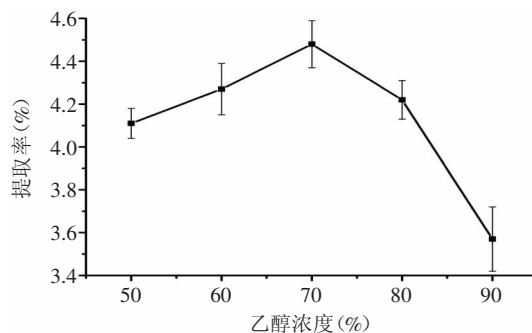


图2 乙醇浓度对绿原酸提取率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on the extraction yield of chlorogenic acid

从图2可以看出,在乙醇浓度为50%~70%之间,绿原酸的提取率随乙醇浓度的增大而增加,当乙醇浓度为70%时提取率达到最大为4.48%,这可能是由于金银花中绿原酸的极性更接近浓度为70%的乙醇的极性;随着乙醇浓度的进一步增大,绿原酸提取率反而下降,可能因为绿原酸结构中含有多个亲水性的羟基基团,随着乙醇浓度的增大,含水量减少,绿原酸的溶解度反而下降。因此,实验选取乙醇的最佳浓度为70%。

2.2.2 超声温度对金银花绿原酸提取率的影响 当微波功率400W,微波时间30s,超声时间60min,液料比40:1 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$,乙醇浓度70%,考察超声温度30、40、50、60、70℃对绿原酸提取率的影响。实验结果见图3。

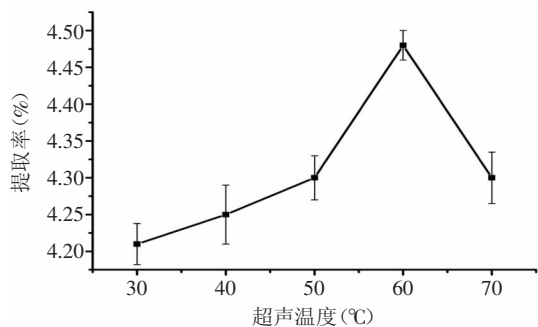


图3 超声温度对绿原酸提取率的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic treatment temperature on the extraction yield of chlorogenic acid

从图3可见,金银花绿原酸的提取率随着超声温度的升高而增大,当超声温度为60℃时,金银花绿原酸的提取率达到最大值;提取温度大于60℃后,金银花绿原酸的提取率开始下降。其原因是随着温度升高,加快分子运动速度,从而使溶出物增多、绿原酸释放加快,提取率增大;若是超声温度过高,绿原酸的邻二酚羟基结构不稳定,易被氧化分解,而使提取率下降。因此,实验选定60℃为最佳超声温度。

2.2.3 超声时间对金银花绿原酸提取率的影响 当微波功率400W,微波时间30s,液料比40:1mL·g⁻¹,乙醇浓度70%,超声温度60℃,考察超声时间40、50、60、70、80min对绿原酸提取率的影响。结果见图4。

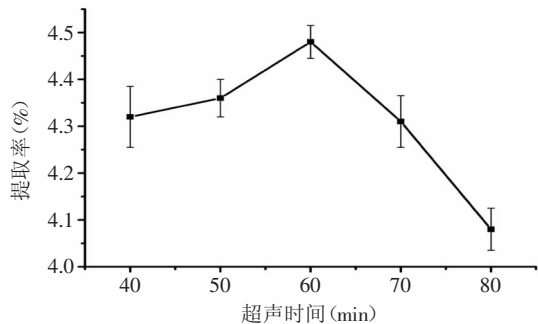


图4 超声时间对绿原酸提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic treatment time on the extraction yield of chlorogenic acid

由图4可知,随着超声时间的延长,绿原酸提取率也随之升高,当超声时间大于60min后,提取率反而呈下降的趋势,这可能是因为长时间的提取会使绿原酸物质发生部分降解,因此,选取最佳超声时间为60min。

2.2.4 液料比对金银花绿原酸提取率的影响 当微波功率400W,微波时间30s,乙醇浓度70%,超声温度60℃,超声时间60min,考察液料比20:1、30:1、40:1、50:1、60:1mL·g⁻¹对绿原酸提取率的影响。结果见图5。

由图5可以看出,随着液料比从20:1增加到40:1,绿原酸的提取率增加幅度较大,这可能是因为随着溶剂用量的增加,两相间的浓度差增大,传质推动力提高,使金银花的绿原酸充分溶出,提高提取率。当液料比大于40:1时,提取率反而下降,可能是因为溶

剂量过大金银花中的亲水物质大量溶出而影响绿原酸提取率,而且溶剂量过大会增加成本及后续液体浓缩的难度,因此,实验选取液料比40:1较为适合。

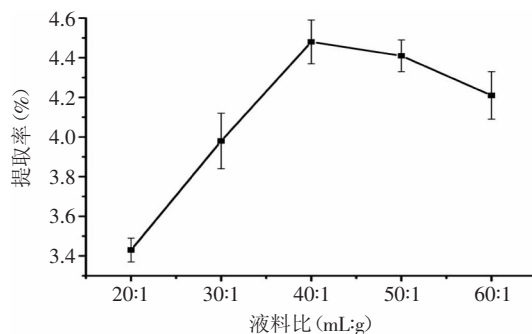


图5 液料比对绿原酸提取率的影响

Fig.5 Effect of liquid-to-solid ratio on the extraction yield of chlorogenic acid

2.2.5 微波功率对金银花绿原酸提取率的影响 当微波时间30s,乙醇浓度70%,超声温度60℃,超声时间60min,液料比40:1mL·g⁻¹,考察微波功率100、150、400、550、700W对绿原酸提取率的影响。结果见图6。

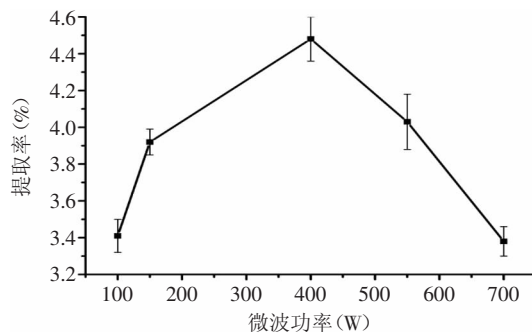


图6 微波功率对绿原酸提取率的影响

Fig.6 Effect of microwave power on the extraction yield of chlorogenic acid

由图6可知,随着微波功率从100W增加到400W,绿原酸的提取率增加幅度较大,这可能是因为随着微波功率的增大,强大的内压及分子间的摩擦力使金银花细胞破裂,绿原酸溶解速度加快,提取率升高;微波功率过大,温度较高,不稳定的绿原酸的邻二酚羟基结构易被氧化分解,从而使提取率下降。因此,实验选取最佳微波功率为400W。

2.2.6 微波时间对金银花绿原酸提取率的影响 当微波功率400W,乙醇浓度70%,超声温度60℃,超声时间60min,液料比40:1mL·g⁻¹,考察微波时间30、60、90、120、150s对绿原酸提取率的影响。结果见图7。

由图7可知,随着微波时间的延长,绿原酸提取率也随之升高,当微波时间大于90s后,提取率反而呈下降的趋势。可能是因为随着时间的增加,体系温度会不断升高,由于乙醇溶液沸点较低,体系温度的不断升高将导致爆沸,溶剂气化回流量加大,最终导致溶剂挥发加剧,从而使绿原酸提取率降低,故实验选取微波时间90s较为适合。

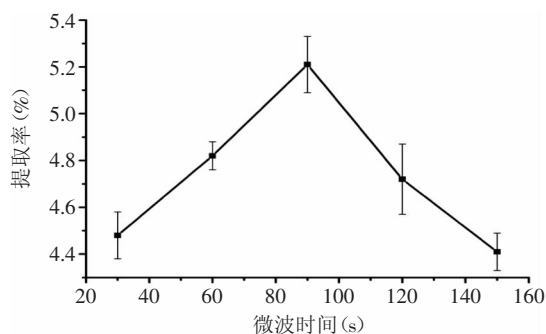


图7 微波时间对绿原酸提取率的影响

Fig.7 Effect of microwave time on the extraction yield of chlorogenic acid

2.3 响应面法实验结果与分析

利用Design Expert 7.0软件中的Box-Behnken设计^[26]的实验条件及实验结果见表2。对表2中实验数据进行回归分析,得到回归方程为: $Y=5.35+0.15X_1+0.16X_2+0.23X_3-0.05X_1X_2-0.077X_1X_3-0.16X_2X_3-0.66X_1^2-0.43X_2^2-0.41X_3^2$ 。再对该模型进行响应面分析,得出二次响应回归模型的方差分析结果见表3。

表2 RSM实验设计与结果

Table 2 Experimental design and corresponding results for RSM

实验号	X_1	X_2	X_3	Y 绿原酸提取率(%)
1	-1	0	1	4.41
2	-1	0	-1	3.84
3	-1	-1	0	3.95
4	1	-1	0	4.35
5	1	0	-1	4.33
6	0	1	-1	4.62
7	1	1	0	4.44
8	1	0	1	4.56
9	0	0	0	5.41
10	0	0	0	5.32
11	0	0	0	5.27
12	0	0	0	5.39
13	-1	1	0	4.29
14	0	-1	1	4.72
15	0	-1	-1	3.90
16	0	1	1	4.79
17	0	0	0	5.35

由表3的ANOVA方差分析可知,模型的 p 值 <0.01 ,差异极显著,说明回归模型拟合程度较好,实验误差小,可以用该模型对乙醇微波超声双辅助提取金银花绿原酸的提取率进行分析和预测。从 F 值可知,各因素对金银花绿原酸提取率的影响顺序为: $X_3>X_2>X_1$,即液料比 $>$ 微波时间 $>$ 微波功率;一次项 X_1 、 X_2 和 X_3 极显著,二次项 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 极显著,交互项 X_2X_3 显著, X_1X_3 、 X_1X_2 不显著,说明二次项响应值对实验结果影响很大,不是简单的一次线性关系。

对表3的分析结果作回归优化响应曲面,见图8。

由图8可知,响应面都是开口朝下的抛物曲面,

表3 二次响应模型方差分析

Table 3 ANOVA results of the fitted quadratic regression model

来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	4.57	9	0.51	80.23	$<0.0001^{**}$
X_1	0.18	1	0.18	27.97	0.0011^{**}
X_2	0.20	1	0.20	30.91	0.0009^{**}
X_3	0.42	1	0.42	66.81	$<0.0001^{**}$
X_1X_2	0.010	1	0.010	1.61	0.2451
X_1X_3	0.024	1	0.024	3.83	0.0912
X_2X_3	0.11	1	0.11	16.69	0.0047^{*}
X_1^2	1.56	1	1.56	247.08	$<0.0001^{**}$
X_2^2	0.79	1	0.79	125.33	$<0.0001^{**}$
X_3^2	0.70	1	0.70	109.95	$<0.0001^{**}$
残差	0.044	7	0.006328		
失拟项	0.032	3	0.011	3.40	0.1340
误差	0.012	4	0.00312		
总和	4.23	16			

注: ** ,影响极显著, $p<0.01$;*,影响显著, $p<0.05$ 。

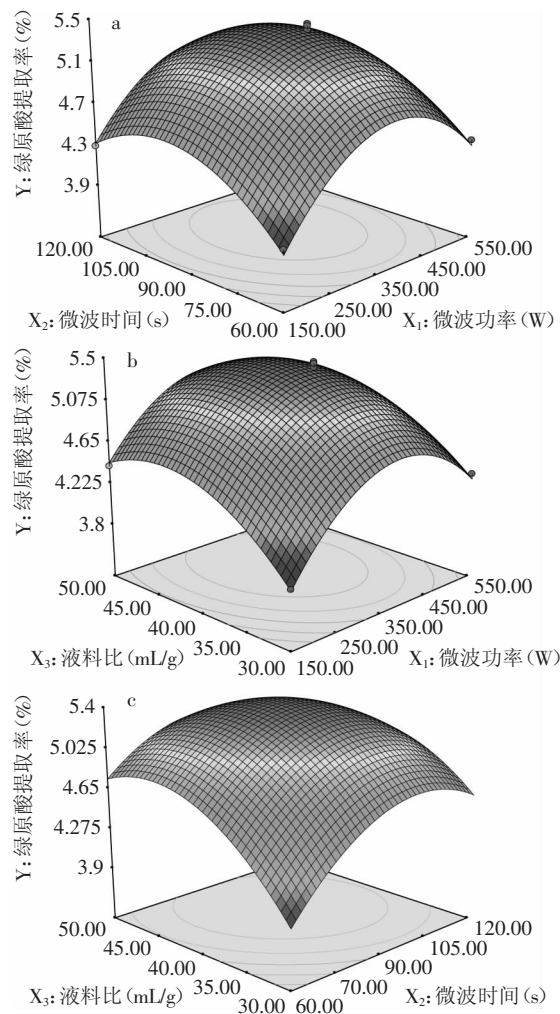


图8 X_1X_2 、 X_1X_3 和 X_2X_3 分别对绿原酸提取率影响的响应面

Fig.8 The response surface of X_1X_2 , X_1X_3 and X_2X_3 on extraction yield of chlorogenic acid

其中心位于实验考察的区域范围内,说明在实验范围内所考察指标存在最大值。

利用Design Expert 7.0软件进行工艺参数的优化组合,可得金银花绿原酸提取的最佳工艺条件为微波功率418.69W、微波时间93.90s、液料比42.52:1mL/g,在该条件下金银花绿原酸提取率预测值为5.40%。

为了检验响应面法的可靠性,在上述最佳工艺条件进行金银花中绿原酸微波超声双辅助提取的实验,平行5次,同时考虑实际操作情况,将金银花绿原酸最佳工艺条件修正为:微波功率400W、微波时间94s、液料比42:1mL/g,实际得到金银花绿原酸提取率的平均值为5.45%,与预测值基本吻合,从而证实该模型可用于金银花绿原酸的提取。与水煎煮法^[11]、乙醇回流法^[12]、超声提取法^[10]、微波法^[7]相比,微波超声双辅助提取金银花绿原酸的提取率高,提取时间短。

3 结论

以金银花为原料,采用微波超声双辅助提取绿原酸,通过单因素和Box-Behnken响应面法实验得到优化的工艺参数:微波功率400W、微波时间94s、液料比42:1mL/g、乙醇浓度70%、超声温度为60℃、超声时间60min,在该条件下验证金银花绿原酸提取率的平均值为5.45%。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:第一部[M]. 北京:化学工业出版社,2000:177.
- [2] 陈秋竹,林瑞超,王钢力,等. 金银花提取物化学成分研究[J]. 中药材,2010,33(6):920-922.
- [3] 章晓骅. 金银花活性成分提取及颗粒制剂工艺研究[D]. 长沙:中南大学,2004.
- [4] 周慧燕,陈珏. 金银花提取物中绿原酸含量测定[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(11):61-62.
- [5] 邓良,袁华. 绿原酸的研究进展[J]. 化学与生物工程,2005,14(7):426-428.
- [6] 赵群莉. 微波预处理提取植物细胞中有效成分的研究[D]. 南宁:广西大学,2003.
- [7] 王辉,田呈瑞,马守磊,等. 绿原酸的研究进展[J]. 食品工业科技,2009,30(5):341-345.
- [8] 吴江涛. 绿原酸的生物活性及其应用[J]. 现代农业科技,2009(19):349-350.
- [9] 陈少洲,吕飞杰,台建祥. 葵粕中绿原酸的研究进展与应用[J]. 食品与发酵工业,2002,28(11):51-55.
- [10] 邓良,袁华. 绿原酸的研究进展[J]. 化学与生物工程,2005,14(7):426-428.
- [11] 李荣,胡成穆,钟明媚,等. 正交设计研究金银花绿原酸煎提工艺[J]. 安徽中医学院学报,2006,25(1):39-40.
- [12] 武达,关澍男. 金银花提取工艺[J]. 黑龙江医药,2005,18(2):38-40.
- [13] 胡爱军,郑捷. 食品工业中的超声提取技术[J]. 食品与机械,2004,20(4):57-60.
- [14] 周如金,顾立军,黎周国,等. 超声强化提取核桃仁油的研究[J]. 食品科学,2003,24(10):113-117.
- [15] 秦炜,郑涛,原永辉,等. 超声场对姜黄素提取过程的强化[J]. 清华大学学报:自然科学版,1998,38(6):46-48.
- [16] 曹渊,李创举,夏之宁,等. 金银花中绿原酸的超声提取工艺优化[J]. 时珍国医国药,2002,19(12):2857-2858.
- [17] 府旗中,王伯初,许祥武. 应用超声波法提取金银花中的绿原酸[J]. 重庆大学学报,2007,30(1):123-125.
- [18] 陈业高,海丽娜,毕先均. 微波辐射在天然药用活性成分提取分离中的应用[J]. 微波学报,2003,20(2):85-89.
- [19] 郭振库,金钦汉,范国强,等. 微波帮助提取中药金银花中有效成分的研究[J]. 中国中药杂志,2002,27(3):189-192.
- [20] Fishman ML, Chan H K, Hoagland P D, et al. Microwave-assisted extraction of lime pectin[J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20(8):1170-1177.
- [21] Martino E, Ramaiola E, Urbano M, et al. Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to soxhlet and ultrasound-assisted extraction[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1125(2):147-151.
- [22] 李燕婷,周文富. 金银花中绿原酸的微波辅助提取工艺研究[J]. 化学与生物工程,2011(10):65-69.
- [23] 王文昕,董全. 响应面法优化超声辅助提取花生红衣多酚工艺[J]. 食品科学,2012,33(22):1-5.
- [24] 刘益红,周建军,徐顶巧,等. 响应面分析法优化艾叶中绿原酸提取工艺[J]. 食品工业科技,2012,33(9):263-267.
- [25] 王瑛,张本印,江进,等. 响应面分析法优化乳白香青中绿原酸提取工艺[J]. 食品工业科技,2013,34(2):238-241.
- [26] 王钦德,杨坚. 食品实验设计与统计分析[M]. 北京:中国农业大学出版社,2003.
- [5] 王莉,姚全胜. 毛蚶多糖提取工艺的研究[J]. 食品工业科技,2009,30(7):215-217.
- [6] 刘新,孔雯,邵长伦,等. 中药复方海藻制剂水煎液水相化学组成分析[J]. 中国海洋药物,2010,29(2):27-30.
- [7] 付海宁,赵峡,于广利,等. 盐藻多糖单糖组成分析的四种色谱方法比较[J]. 中国海洋药物,2008,27(4):30-34.
- [8] 王倩倩,马骥,牛俊峰,等. 荚果蕨中多糖的超声辅助处理提取及其DPPH自由基清除作用的研究[J]. 食品工业科技,2012,33(15):220-223.
- [9] Liu X, Sun Z L, Zhang M S, et al. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(4):1664-1670.
- [10] 刘新,夏雪奎,袁文鹏,等. 女贞子体外抗氧化活性研究[J]. 山东中医药大学学报,2010,34(4):364-365.
- [11] 刘新,杨海,夏雪奎,等. 黄药子体外抗氧化活性研究[J]. 中药材,2010,33(10):1612-1614.
- [12] 聂少平,谢明勇,罗珍. 用清除有机自由基DPPH法评价茶叶多糖的抗氧化活性[J]. 食品科学,2006,27(3):34-36.
- [13] 赵玉红,金秀明,韩睿. 鹿茸多糖分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2012,33(12):155-158.
- [14] 刘薇,王红霞,王立魁,等. COX-2/Nr2/ARE信号通路与体内外的抗炎、抗氧化作用机理[J]. 生命科学,2011,23(10):1027-1033.

(上接第271页)