

文章编号: 1004-4353(2018)02-0155-05

# 响应面法优化微波辅助提取榛花总黄酮的工艺研究

尹珂晴<sup>1</sup>, 唐欣<sup>1</sup>, 张莲姬<sup>1,2\*</sup>

( 1. 延边大学 理学院; 2. 延边大学 化学国家级实验教学示范中心; 吉林 延吉 133002 )

**摘要:** 以总黄酮得率为指标,采用响应面对微波辅助提取榛花总黄酮的工艺进行了探讨与优化. 结果表明:微波辅助提取榛花总黄酮的最佳工艺条件为微波功率 560 W、微波辐射时间 100 s、乙醇浓度 66%、料液比 1 : 29 (g/mL), 4 个单因素影响总黄酮提取的主次顺序为微波功率>料液比>乙醇浓度>微波时间. 在最佳工艺条件下总黄酮平均得率预测值为 7.16%,验证值为 7.14%,相对误差为 0.28%.

**关键词:** 榛花; 微波辅助; 响应面优化; 总黄酮

**中图分类号:** R284.2      **文献标识码:** A

## Optimization of processing parameters for microwave assisted extraction of total flavonoids in hazel's flowers by response surface method

YIN Keping<sup>1</sup>, TANG Xin<sup>1</sup>, ZHANG Lianji<sup>1,2\*</sup>

( 1. College of Science, Yanbian University; 2. Chemical National Experimental Demonstration Center, Yanbian University; Yanji 133002, China )

**Abstract:** The microwave assisted extraction process of total flavonoid in hazel's flowers was optimized by using response surface method. The results show that optimum parameters are as follow: microwave power is 560 W, microwave time is 100 s, ethanol concentration is 66%, and ratio of solid and ethanol is 1 : 29 (g/mL). In the four factors, microwave power is the most influence factor, second factor is ratio of solid and ethanol, third factor is ethanol concentration, fourth factor is microwave time. Under the optimal condition, extraction rate is 7.14% with relative error of 0.28%, which is very close to prediction of extraction rate (7.16%).

**Keywords:** hazel's flowers; microwave; response surface optimization; total flavonoids

### 0 引言

榛花为桦木科榛属植物榛(*Corylus heterophylla* Fisch)的雄花,具有消炎、止痛、降血糖的作用,民间多用于皮肤炎症、冻伤等治疗<sup>[1-4]</sup>. 对榛花的提取物进行研究表明,榛花的有机溶剂提取物<sup>[5]</sup>、水提取物<sup>[6]</sup>、总黄酮<sup>[7]</sup>都具有很好的抗氧化能力.

总黄酮在自然界分布广泛,具有抗肿瘤<sup>[8]</sup>、抗衰老<sup>[9]</sup>、抗病毒<sup>[10]</sup>、降血糖<sup>[11]</sup>、抗辐射<sup>[12]</sup>、调节免疫等<sup>[13]</sup>多种作用. 目前,总黄酮的提取工艺有热水提取法<sup>[14]</sup>、碱液提取法<sup>[15]</sup>、超声辅助提取法<sup>[15]</sup>、微波辅助提取法<sup>[16]</sup>等,其中微波辅助提取法具有穿透力强、快速、提取率高等优点<sup>[17-18]</sup>,广泛应用于天然活性成分的提取,但目前为止针对

收稿日期: 2018 - 01 - 08

\* 通信作者: 张莲姬(1970—),女,副教授,研究方向为天然产物的提取.

榛花总黄酮的微波辅助提取研究尚未见报道;因此,本文以榛花粉为材料,以总黄酮得率为指标,利用响应面法(response surface methodology)<sup>[19]</sup>,对榛花总黄酮提取工艺进行分析和优化,以为榛花总黄酮的进一步研究提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

榛花采集于吉林省长白山,晒干后粉碎,过 60 目筛,备用.芦丁标准品、4%氢氧化钠、10%硝酸铝、不同体积分数的乙醇(现配现用)、5%亚硝酸钠、石油醚等试剂均为分析纯.

1.2 实验仪器

HH-2 数显恒温水浴锅,浙江省温州市精密仪器有限公司生产;FA/JA 型电子天平,天津精密科学仪器有限公司生产;DGF-4A 型立式电热鼓风干燥箱,上海市精密仪器有限公司生产;V15-723 紫外分光光度计,上海精密科学仪器有限公司生产;WD700LG 微波炉,天津乐金电子电器有限公司生产.

1.3 实验方法

1.3.1 榛花总黄酮提取工艺流程 榛花→粉碎→石油醚脱脂处理→挥干溶剂→微波处理→乙醇萃取→沉降过滤→取上清液→定容→榛花总黄酮样品液→紫外分光光度分析.

1.3.2 标准曲线的绘制 分别取 0.0、2.0、4.0、8.0、10.0 mL 芦丁标准溶液 0.1 mg/mL 于 6 个 25 mL 容量瓶中,加入 0.5 mL 的 5%亚硝酸钠,放置 6 min;随后加入 0.5 mL 的 10%硝酸铝溶液,静置 6 min;再加 2.0 mL 的 4%氢氧化钠,用 60%乙醇溶液定容至刻度,摇匀,放置 15 min,得到待测溶液.以试剂空白为参比,测定 510 nm 处的吸光度 A.以浓度为横坐标,吸光度 A 为纵坐标绘制标准曲线,求得标准液浓度(C)与吸光度(A)的线性回归方程  $A=kC+b$ ,榛花总黄酮的质量浓度按照芦丁标准曲线回归方程进行计算.

1.3.3 榛花总黄酮得率的计算 总黄酮得率的计算公式为  $Y/\% = CNV/m \times 100$ ,式中 Y 为总黄酮得率(%),C 为测定样品总黄酮的质量浓度(mg/mL),N 为稀释倍数,V 为定容后的总体积(mL),m 为样品质量(mg).

1.4 单因素试验

依次对乙醇体积分数、微波功率、微波时间和料液比(g/mL)进行单因素试验,每一组试验所确定的最优值作为下一组试验的固定条件值.

微波时间的选择:在乙醇体积分数 50%,微波功率 420 W,料液比 1 : 40(g/mL)时,分别在 0.5、1、2、3、4 min 微波时间条件下提取榛花总黄酮.

微波功率的选择:在乙醇体积分数 50%,微波时间 2 min,料液比 1 : 40(g/mL)时,分别在 140、280、420、560、700 W 微波功率条件下提取榛花总黄酮.

乙醇体积分数的选择:在微波功率 420 W,微波时间 2 min,料液比 1 : 40(g/mL)时,分别在 30%、40%、50%、60%、70%、80%乙醇体积分数条件下提取榛花总黄酮.

料液比的选择:在乙醇体积分数 70%,微波时间 2 min,微波功率 420 W 时,分别在 1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35、1 : 40、1 : 45 料液比条件下提取榛花总黄酮.

1.5 实验设计因素及水平

实验设计因素及水平如表 1 所示.

表 1 实验因素水平表

水平	微波时间/ s	微波功率/ W	乙醇体积分 数/%	料液比/ (g/mL)
—1	60	280	50	1 : 25
0	120	420	70	1 : 30
1	180	560	60	1 : 35

1.6 响应面法优化实验设计

利用响应面法中 Box-Behnken 中心组合设计方法,根据单因素的实验结果,以总黄酮得率为响应值(Y),采用 Design-Expert 8.0.6 软件对数据进行处理与回归分析,以此确定最佳提取工艺.

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

按 1.3.2 的方法制备样品,将所得数据处理后得到芦丁标准曲线(如图 1)和回归方程,  $A = 12.088C - 0.0185$ ,  $R^2 = 0.9974$ ,式中 A 为 510 nm 处吸光度,C 为芦丁标准溶液浓度.计算结果

表明,在 0 ~ 0.045 mg/mL 浓度范围内,吸光度与浓度具有良好的线性关系。

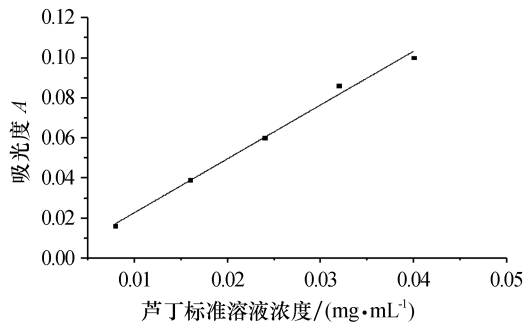


图 1 芦丁标准曲线

2.2 提取榛花总黄酮的单因素试验

微波时间、微波功率、乙醇体积分数、料液比对榛花总黄酮得率的影响如图 2 所示。

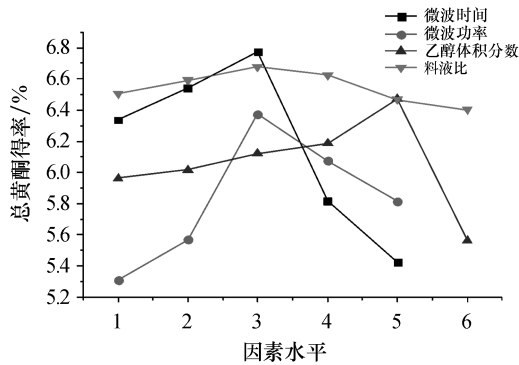


图 2 各因素水平对榛花总黄酮得率的影响

由图 2 可以看出,微波时间为 30 s、1 min、2 min 时,榛花总黄酮的得率分别为 6.33%、6.54%、6.77%,即此时段范围内总黄酮的得率随时间的增加而增大;当微波时间为 3 min 和 4 min 时,榛花总黄酮的得率分别为 5.81%和 5.4%,即随时间的增加呈下降趋势,故本文将最佳微波时间定为 2 min。

由图 2 可以看出,在微波功率为 140、280、420 W 时,榛花总黄酮的得率分别为 5.31%、5.56%、6.37%,即此范围内总黄酮的得率随微波功率的增加而增大;当微波功率为 560、700 W 时,榛花总黄酮的得率分别为 6.07%、5.81%,即随微波功率的增大呈下降趋势,故本文将最佳微波功率定为 420 W。

由图 2 可以看出,在乙醇体积分数为 30%、40%、50%、60%、70%、80%时,榛花总黄酮的得

率分别为 5.96%、6.01%、6.12%、6.18%、6.46%、5.56%,即乙醇浓度为 70%时榛花总黄酮的得率最高,故本文将最佳乙醇体积分数定为 70%。

由图 2 可以看出,料液比为 1 : 20、1 : 25、1 : 30 时,榛花总黄酮的得率分别为 6.50%、6.58%、6.67%,即此料液比范围内总黄酮的得率随料液比的增加而增大;当料液比为 1 : 35、1 : 40、1 : 45 时,榛花总黄酮的得率分别为 6.62%、6.46%、6.40%,即随料液比的增加呈下降趋势,故本文将最佳料液比定为 1 : 30。

2.3 Box-Benhknen 设计方案的试验结果

以榛花总黄酮得率为响应值 Y,微波时间 A、微波功率 B、乙醇体积分数 C、料液比 D 为自变量,进行响应面法分析实验,实验方案和结果见表 2。

表 2 榛花总黄酮的响应面设计及结果

实验次数	A 微波时间/s	B 微波功率/W	C 乙醇体积分数/%	D 液料比/(g/mL)	得率/%
1	-1	-1	0	0	6.97
2	1	-1	0	0	7.16
3	-1	1	0	0	7.11
4	1	1	0	0	7.01
5	0	0	-1	-1	6.35
6	0	0	1	-1	6.30
7	0	0	-1	1	6.07
8	0	0	1	1	5.97
9	-1	0	0	-1	6.25
10	1	0	0	-1	6.19
11	-1	0	0	1	6.44
12	1	0	0	1	6.59
13	0	-1	-1	0	5.97
14	0	1	-1	0	6.68
15	0	-1	1	0	6.78
16	0	1	1	0	6.37
17	-1	0	-1	0	6.25
18	1	0	-1	0	5.97
19	-1	0	1	0	6.11
20	1	0	1	0	6.12
21	0	-1	0	-1	5.97
22	0	1	0	-1	6.54
23	0	-1	0	1	6.70
24	0	1	0	1	6.21
25	0	0	0	0	7.11
26	0	0	0	0	7.13
27	0	0	0	0	7.14
28	0	0	0	0	7.13
29	0	0	0	0	7.09

2.4 响应面回归模型的方差分析

对表 3 的结果进行多元回归拟合分析,得回归方程: $Y=7.16-(7.500E-003)A+0.022B+0.018C+0.019D-0.060AB+0.042AC+0.030AD-0.16BC-0.15BD-(7.500E-003)CD-0.13A^2-0.032B^2-0.37C^2-0.32D^2$ ,该方程的方差分析结果见表 3.模型的  $F=4.57$ , $P<0.0037$ ,说明本实验所采用的二次模型显著性极高.在总的作用因素中,交互项  $BC$ 、二次项

$A^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  均  $P<0.05$ ,说明它们对于榛花总黄酮得率具有显著影响;其余的因素  $P>0.05$ ,说明它们对于榛花总黄酮得率的影响并不显著.微波功率、微波时间、乙醇体积分数、料液比等本文试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系,失拟项  $P=3.34$ ,在  $\alpha=0.05$  水平上不显著.通过方程的变量系数值可看出,4 个影响因素对榛花总黄酮得率影响大小的关系是:微波功率  $>$  料液比  $>$  乙醇浓度  $>$  微波时间.

表 3 回归模型的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.60	14	0.11	4.57	0.003 7	**
A	6.75E-004	1	6.750E-004	0.027	0.871 6	
B	5.633E-003	1	5.633E-003	0.23	0.641 8	
C	3.675E-003	1	3.675E-003	0.15	0.706 7	
D	4.033E-003	1	4.033E-003	0.16	0.693 5	
AB	0.014	1	0.014	0.58	0.459 8	
AC	7.225E-003	1	7.225E-003	0.29	0.598 7	
AD	3.600E-003	1	3.600E-003	0.14	0.709 6	
BC	0.11	1	0.11	4.24	0.048 6	*
BD	0.093	1	0.093	3.73	0.073 8	
CD	2.250E-004	1	2.250E-004	9.029E-003	0.925 6	
A <sup>2</sup>	0.10	1	0.10	4.14	0.041 3	*
B <sup>2</sup>	6.781E-003	1	6.781E-003	0.27	0.610 1	
C <sup>2</sup>	0.88	1	0.88	35.36	<0.000 1	**
D <sup>2</sup>	0.67	1	0.67	27.04	0.000 1	**
残差	0.35	14	0.025			
失拟项	0.31	10	0.031	3.34	0.128 0	
纯误差	0.037	4	9.320E-003			
所有项	1.94	28				

注: \*\* 表示高度显著( $P<0.01$ ), \* 表示显著( $P<0.05$ )

2.5 验证实验

利用响应面分析软件得出榛花总黄酮的最大得率为 7.16%,最优条件参数为:微波时间 100 s,微波功率 560 W,乙醇体积分数 66%,料液比 1:29 (g/mL).为了验证理论值的准确性,依据调整的实验参数实行了 3 次平行试验,结果如表 4 所示.总黄酮得率的预测值和实际值的相对误差仅为 0.28%,表明该优化方法合理.在单因素试验中榛花总黄酮的最高得率为 6.77%(2.2 中),而通过响应面法优化工艺条件后,榛花总黄酮的得率为 7.14%,即比优化前提高了 1.05 倍,因此利用响应面法优化榛花总黄酮提取工艺条件具有实

用价值.

表 4 榛花总黄酮得率的理论值与验证值 %

理论值	验证值			平均值	相对误差
7.16	7.13	7.14	7.15	7.14	0.28

3 结论

以乙醇作为溶剂从榛花中提取总黄酮,在单因素试验的基础之上,运用 Box-Benhknen 中心组合设计,得出微波辅助提取榛花总黄酮的最优提取工艺条件为:微波时间 100 s、微波功率 560

W、乙醇体积分数 66%、料液比 1 : 29(g/mL). 经验证,此条件下榛花总黄酮的得率为 7.14%,与模型预测值相比,相对误差仅为 0.28%. 试验的 4 个因素对总黄酮得率的影响次序为:微波功率>料液比>乙醇浓度>微波时间. 本文研究结果表明,利用响应面法优化榛花总黄酮的提取工艺具有可行性,可为榛花的开发利用提供理论依据. 本文实验采用微波辅助条件提取榛花总黄酮,该方法是否对榛花总黄酮的结构具有影响,有待于进一步研究.

参考文献:

[1] 薛健飞. 平榛叶化学成分及其生物活性研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2009.

[2] 彭飞, 杨越冬, 程才红, 等. 榛花挥发性成分分析[J]. 延边大学学报(自然科学版), 2017, 43(3): 238-241.

[3] 赵承雅, 韩香莲, 南征, 等. 榛花消肾安胶囊干预实验性糖尿病大鼠足细胞相关蛋白  $\alpha$ -actinin-4 的研究[J]. 天津中医药学, 2016, 33(7): 440-447.

[4] 蔡英兰, 金香子, 李善花, 等. 榛花对四氧嘧啶性糖尿病小鼠的降血糖作用及其机制的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(11): 1085-1087.

[5] 韩立杰, 李影, 刘子菱, 等. 榛花粉提取物的抗氧化性以及抗菌活性的研究[J]. 食品科技, 2013, 38(7): 235-238.

[6] 韩立杰, 李影, 刘子菱, 等. 榛花粉水和乙醇提取物抗氧化性的比较[J]. 食品科技, 2014, 39(2): 224-227.

[7] 高国粉, 南劲松, 田晓乐, 等. 榛花总黄酮的提取及抗氧化活性的研究[J]. 中华中医药杂志, 2007(8):

1673-1727.

[8] 杨楠, 贾晓斌, 张振海, 等. 黄酮类化合物抗肿瘤活性及机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(3): 373-381.

[9] 陈红红, 李助乐, 章健, 等. 山核桃叶总黄酮抗衰老作用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(5): 892-895.

[10] 苏瑞, 崔丽霞. 黄酮类化合物抑菌抗病毒活性的研究[J]. 农业技术与装备, 2011, 208(4): 30-35.

[11] 王兰, 蓝璟, 龚频, 等. 葛根异黄酮降血糖活性及作用机制的研究[J]. 食品科技, 2017, 42(3): 223-226.

[12] 李德远, 周韞珍, 余应利, 等. 银杏叶黄酮抗辐射效应研究[J]. 营养学报, 2004, 26(3): 221-222.

[13] 杨松秀. 金花葵粗黄酮提取物的免疫调节作用[J]. 中国药师, 2013, 16(9): 1307-1311.

[14] 朴春红, 刘丽苹, 初琦, 等. 热水法提取荞麦壳黄酮工艺优化及抗氧化活性[J]. 吉林农业大学学报, 2014, 36(6): 719-722.

[15] 毕洁, 杨庆利, 朱凤, 等. 超声辅助碱液提取花生壳黄酮的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 61-65.

[16] 崔鹏, 贾增杰, 李瑞杰. 响应面试验优化诺丽果黄酮微波辅助提取工艺[J]. 中国酿造, 2018, 37(1): 165-169.

[17] 吕名秀, 董雪茹, 赵龙涛, 等. 微波辅助提取茶叶黄酮的工艺研究[J]. 河南化工, 2017, 34(2): 20-23.

[18] 杜艳, 李荣, 姜子涛. 白苏叶黄酮的微波辅助提取及其纯化的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(6): 280-286.

[19] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8): 41-45.