DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2018.01.014

响应曲面法优化超声辅助提取诸葛菜总黄酮工艺及抗氧化活性研究

赛春梅　崔琳琳▲　杨　梦▲　周明哲▲　金信表▲　王建安
（济宁医学院药学院，日照 276826）

摘　要　目的　采用响应曲面法优化超声提取诸葛菜总黄酮工艺及研究其抗氧化活性。**方法**　在单因素试验基础上，以料液比、提取时间、超声温度、乙醇浓度为自变量，总黄酮提取率为响应指标，采用响应曲面法研究各自变量及其交互作用对总黄酮提取率的影响。通过测定诸葛菜总黄酮对 DPPH 自由基清除率来考察其抗氧化生物活性。**结果**　优化超声提取诸葛菜总黄酮的工艺为：料液比 1∶50，超声时间 51min，超声温度 38 ℃，乙醇浓度 70%，得到诸葛菜总黄酮平均提取率为 21.76mg/g。抗氧化试验结果表明，供试品浓度在 10 ~ 50μg/ml 时，对 DPPH 自由基清除能力均随着样品溶液浓度增大而增加。**结论**　响应曲面法优化超声提取诸葛菜总黄酮的工艺具有可行性。诸葛菜总黄酮有一定的抗氧化活性。

关键词　诸葛菜；总黄酮；响应曲面法；抗氧化活性
中图分类号：TQ460.72　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-9760(2018)02-053-06

Optimization of ultrasound assisted extraction technology of total flavonoids from orychophragmus violaceus by response surface method and study on the antioxidant activity

SAI Chunmei, CUI Linlin, YANG Meng, JIN Xinbiao, ZHOU Mingzhe, WANG Jianan
(*School of Pharmaceutical Science, Jining Medical University, Rizhao* 276826, *China*)

Abstract: ***Objective***　To optimize the conditions of the ultrasound assisted extraction for the extraction of total flavonoids from Orychophragmus violaceus by response surface methodology, and study on the antioxidant activity. ***Methods***　On the basis of single factor experiment, the liquid ratio, extraction time, temperature, concentration of ethanol was used as independent variables. The extraction yield of total flavonoids as index parameter, the variables and their interactions on extraction yield of total flavonoids were studied by response surface methodology. The antioxidant bioactivity was investigated by the scavenging free radical test on DPPH of the total flavonoids. ***Results***　The optimal conditions obtained were as follows: ratio of material to liquid 1∶50, ultrasonic extraction time 51 min, extraction temperature 38 ℃, ethanol concentration 70%, and the yield of total flavonoids from Orychophragmus violaceus was 21.76 mg/g. The results of antioxidant tests showed that the scavenging capacity on DPPH was increased in dose-dependent with the concentration of the sample solution at 10 ~ 50 μg/ml. ***Conclusion***　The method of response surface methodology to optimize ultrasonic extraction of total flavonoids is feasible. The flavonoids of Orychophragmus violaceus have certain antioxidant activity.

Keywords: Orychophragmus violaceus; Total flavonoids; Response surface method; Antioxidant Activity

诸葛菜（*Orychophragmus violaceus* L. Schulz）别名二月兰，系十字花科诸葛菜属植物，是一种分布广泛，生态适应性强的野生植物[1-2]。诸葛菜嫩叶

▲ 崔琳琳，济宁医学院药学院 2013 级学生
杨梦，周明哲，济宁医学院药学院 2015 级学生
金信表，济宁医学院药学院 2014 级学生

和茎可食用,含胡萝卜素等多种营养成分,全草入药具有开胃下气、利湿解毒的功效[3],现代药理研究表明,诸葛菜还有抑菌、抗肿瘤、促进消化、降低胆固醇等作用。总黄酮是其重要的生理活性物质,具有抗炎、抗辐射、抗氧化、免疫调节等作用。

超声辅助技术在中药提取中具有提取效率高,提取时间短,提取条件温和,绿色环保等优势[4-5]。本文采用超声辅助提取诸葛菜中总黄酮,通过 Box-Behnken 实验设计(Box-Behnken design, BBD)[6-7],设计四因素三水平响应曲面分析方法优选超声提取工艺参数,并研究其抗氧化活性,为诸葛菜进一步的开发利用提供依据和参考。响应曲面法通过建立连续变量的模型,对各影响因素及交互作用进行优化和评价,同时用曲面图和等高线图表示出来,比正交设计更直观、精确。该方法现已广泛用于中药提取、食品工业等领域的工艺优化。

1　仪器与材料

1.1　仪器

102-2A 型电热鼓风干燥箱(龙口市先科仪器公司);JJ224BC 电子天平(美国 G&G 公司);JDH-2G 微波干燥杀菌箱(广州永泽微波能设备有限公司);CS-700 高速多功能粉碎机(永康市天棋盛世工贸有限公司);KQ-500DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UV-1901 双光束紫外可见分光光度计(郑州科泰实验设备有限公司)。

1.2　材料

诸葛菜(本品于 2017 年 4 月、5 月、6 月采集于济宁医学院日照校区本草园,经济宁医学院药学院王建安副教授鉴定为十字花科诸葛菜属植物诸葛菜 *Orychophragmus violaceus* L. Schulz,干燥,粉碎,过 60 目筛,置干燥器内保存备用);芦丁对照品(批号:20150701)购于中国食品药品检定研究院;D4313 DPPH(批号:AYSJB-IQ)购于东京化成工业株式会所;AR 抗坏血酸(批号:20120910)购于江苏强盛功能化学股份有限公司;亚硝酸钠、氢氧化钠、硝酸铝、乙酸钠、结晶乙酸钠、三氯化铝、乙酸试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　诸葛菜总黄酮的测定

2.1.1　对照品溶液的制备　精密称定芦丁对照品 20.00mg 于 100ml 容量瓶中,加入 60% 乙醇溶解,定容至刻度,摇匀,即得浓度为 0.20mg/mL 的芦丁对照品溶液。

2.1.2　供试品溶液的制备　将采集于济宁医学院日照校区本草园花蕾期的诸葛菜,低温干燥,粉碎,过 60 目筛,精密称取 0.5000g 置于 50ml 具塞锥形瓶中,加入 60% 乙醇 20ml,超声提取 30min,抽滤,即得供试品溶液。

2.1.3　标准曲线的绘制和线性范围　精密吸取芦丁标准溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5ml 于 25ml 容量瓶中,用 60% 乙醇补充至 5.0ml,加入 0.1mol/L $AlCl_3$ 溶液 4.0ml,pH 5.4 NaAc-HAc 缓冲溶液 4.0ml,40 ℃水浴显色 20min,室温放置 10min 后用 60% 乙醇定容至刻度,采用紫外可见分光光度计于 410nm 处测其吸光度,以芦丁对照品浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线得线性回归方程为 $y = 26.786x + 0.0199$ ($R^2 = 0.9992$),结果表明芦丁在 4 ~ 28 g/ml 范围内线性关系良好。

2.1.4　精密度试验　取同一供试品溶液,按 2.1.3 项下的方法,连续测定 6 次,计算总黄酮吸光度的 RSD 为 0.61% (n = 6),表明精密度良好。

2.1.5　稳定性试验　取同一供试品溶液,按 2.1.3 项下的方法,分别在 0、10、20、30、60、90、120min 时各测定 1 次,计算总黄酮吸光度的 RSD 为 1.07% (n = 6),结果表明供试品溶液在 120min 内稳定性良好。

2.1.6　重复性试验　精密称定诸葛菜粉末 6 份,每份 0.5000g 于 50ml 具塞锥形瓶中,分别加入 20ml 60% 乙醇,超声提取 30min,抽滤,记录滤液体积,精密吸取上述样品溶液 1.0ml 置 25ml 容量瓶中,用 60% 乙醇补足至 5.0ml,按 2.1.3 下的显色方法显色,在 410nm 处测定吸光度,计算总黄酮平均含量为 14.15mg/g,RSD 为 1.03% (n = 6),表明该方法重复性良好。

2.1.7　加样回收率试验　精密称定已知含量的诸葛菜粉末 6 份,每份 0.2500g,分别精密加入一定量的芦丁对照品,依法制备供试品溶液进行测定,测得芦丁的平均回收率为 102.22%,RSD 为 1.63%,表明该方法准确性良好。

2.2　超声提取诸葛菜总黄酮工艺研究

2.2.1　单因素试验　1)超声温度对总黄酮提取率的影响 采用乙醇浓度 60%,料液比 1∶40,超声

时间 30min，超声提取诸葛菜总黄酮，考察不同超声温度（20、30、40、50、60、70 ℃）对总黄酮提取率的影响。见图 1。

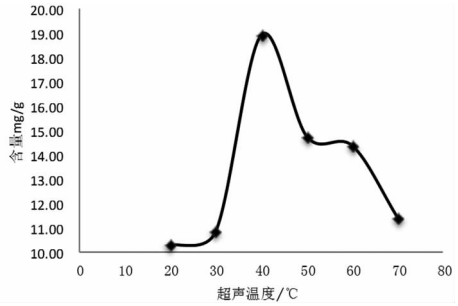

图 1　超声温度对总黄酮提取率的影响

图 1 表明，随超声温度的增加，总黄酮提取率逐渐提高，当温度达到 40 ℃，总黄酮提取率达到最大，之后总黄酮提取率随温度升高而降低，因此最佳超声温度选择 40 ℃。

2）料液比对总黄酮提取率的影响：采用乙醇浓度 60%，超声温度 40 ℃，超声时间 30min 条件提取诸葛菜总黄酮，考察不同料液比 1∶30、1∶40、1∶50、1∶60、1∶70 对总黄酮提取率的影响。见图 2。

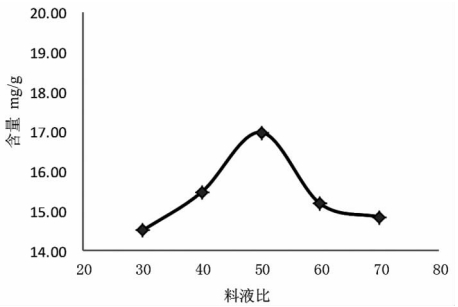

图 2　料液比对总黄酮提取率的影响

由图 2 可知，诸葛菜总黄酮提取率随料液比的增加而升高，当料液比为 1∶50 时总黄酮提取率达到最高，其后随料液比升高提取率下降，因此最佳料液比选取 1∶50。

3）超声时间对总黄酮提取率的影响：采用料液比 1∶50，乙醇浓度 60%，超声温度 40 ℃ 条件超声提取总黄酮，考察不同超声时间 30、40、50、60、70min 对诸葛菜总黄酮提取率的影响。见图 3。

图 3 表明，随超声时间的延长，诸葛菜总黄酮提取率逐渐增大，总黄酮提取率在 50min 时达到最大，其后随时间的增加总黄酮提取率逐渐降低，因此 50min 为最佳提取时间。

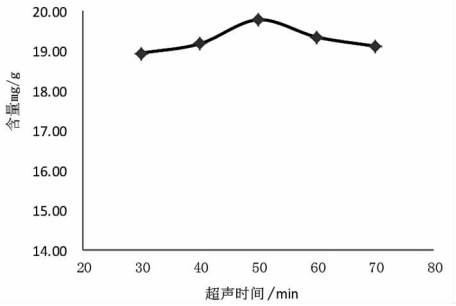

图 3　料液比对总黄酮提取率的影响

4）乙醇浓度对总黄酮提取率的影响：采用料液比 1∶50，超声温度 40 ℃，超声时间 50min 条件提取总黄酮，研究乙醇浓度 40%、50%、60%、70%、80%、90% 对总黄酮提取率的影响。见图 4。

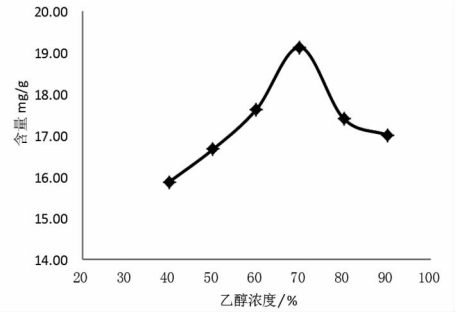

图 4　乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

图 4 表明，随着乙醇浓度的增大，诸葛菜中总黄酮提取率逐渐升高，当乙醇浓度达 70% 时，总黄酮提取率达到最高，其后随乙醇浓度的增大，总黄酮提取率降低，因此最佳乙醇浓度为 70%。

2.2.2　响应曲面优化试验　在单因素试验的基础上，利用 Design Expert 8.0.6 软件，依据 Box-Behnken 试验设计原理，选择料液比（A）、超声时间（B）、乙醇浓度（C）、超声温度（D）影响总黄酮提取率的四个主要因素，以诸葛菜总黄酮含量为响应值，进行试验分析。试验因素水平编码设计及试验结果见表 1、2、3。

表 1　响应曲面设计因素与水平表

水平	因素	料液比(A)(g/ml)	超声时间(B)(min)	乙醇浓度(C)(%)	超声温度(D)(℃)
-1	1∶40	40	50	30	
0	1∶50	50	70	40	
1	1∶60	60	90	50	

表 2　响应曲面中心组合方案与响应值

编号	料液比 (g/ml)	超声时间 (min)	乙醇浓度 (%)	超声温度 (℃)	含量 (mg/g)
1	1	0	1	0	14.35
2	0	0	1	1	9.95
3	0	0	0	0	21.46
4	0	−1	1	0	13.47
5	−1	0	0	1	10.51
6	−1	−1	0	0	14.36
7	0	0	0	0	21.18
8	−1	0	0	−1	15.49
9	−1	1	0	0	14.95
10	0	1	0	−1	16.48
11	0	−1	0	−1	14.17
12	0	0	0	0	21.54
13	0	1	−1	0	16.79
14	0	0	1	−1	12.90
15	0	0	0	0	21.37
16	0	−1	−1	0	15.03
17	1	0	0	1	12.24
18	0	0	0	0	21.50
19	1	1	0	0	15.85
20	−1	0	−1	0	16.57
21	0	1	1	0	12.63
22	0	1	0	1	10.19
23	1	0	0	−1	16.01
24	−1	0	1	0	11.21
25	1	−1	0	0	15.75
26	0	0	−1	−1	15.60
27	0	0	−1	1	14.13
28	1	0	−1	0	15.59
29	0	−1	0	1	10.81

表 3　二次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*	显著性
模型	338.68	14	24.19	47.63	< 0.0001	显著
A	3.74	1	3.74	7.37	0.0168	
B	0.91	1	0.91	1.79	0.2026	
C	30.72	1	30.72	60.49	<0.0001	
D	43.40	1	43.40	85.44	< 0.0001	
AB	0.060	1	0.060	0.12	0.7361	
AC	4.24	1	4.24	8.36	0.0119	
AD	0.37	1	0.37	0.72	0.4102	
BC	1.69	1	1.69	3.33	0.0895	
BD	2.15	1	2.15	4.23	0.0590	
CD	0.55	1	0.55	1.08	0.3167	
A^2	62.52	1	62.52	123.10	<0.0001	
B^2	75.19	1	75.19	148.04	<0.0001	
C^2	88.18	1	88.18	173.62	<0.0001	
D^2	156.03	1	156.03	307.22	<0.0001	
残差	7.11	14	0.51			
差拟项	5.34	10	0.53	1.21	0.4642	不显著
纯误差	1.77	4	0.44			
总离差	345.79	28				

如表 3 方差分析所示，乙醇浓度（$P<0.001$）、超声温度（$P<0.001$）对诸葛菜总黄酮提取率有极显著性影响，料液比（$P<0.05$）对诸葛菜总黄酮提取率有显著性影响，而超声时间影响不显著，AC、A^2、B^2、C^2、D^2 是显著型模型。

以总黄酮含量为响应值，经回归拟合后，得到回归方程：总黄酮含量 $=21.51+0.56A+0.28B-1.60C-1.90D-0.12AB+1.03AC+0.3AD-0.65BC-0.73BD-0.37CD-3.10A^2-3.40B^2-3.69C^2-4.90D^2$，根据方差结果显示，$F_{回归}=47.63$，$P<0.0001$，表明二次多元回归方程与响应值之间的关系模型显著，差拟项检验值 $P=0.4642>0.05$（不显著），$R^2=0.9031$，说明模型充分拟合试验数据，可用此回归方程确定诸葛菜总黄酮的最佳提取工艺。

2.2.3　效应面分析　通过多元回归方程绘制效应曲面图，可以直观的反应各因素及两两因素间的交互作用对响应值的影响，效应曲面图见图 5。

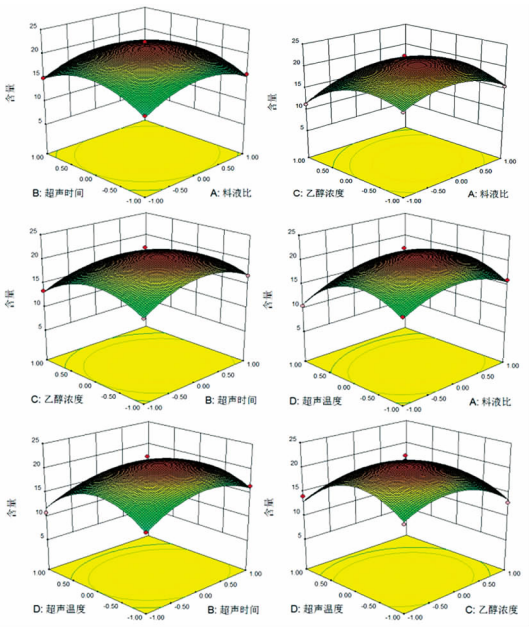

图 5　料液比（A）、超声时间（B）、乙醇浓度（C）与超声温度（D）两两交互作用对总黄酮提取率影响的效应曲面图

如图 5 所示，三维空间曲面直观反映了各变量交互作用对总黄酮提取率的影响，随着 A、B、C、D 值的增大，总黄酮提取率逐渐提高，当达到最大值后，随着各变量值的继续增大，总黄酮提取率有所下降。通过 Design-Expert 8.0.6 软件进行分析，诸葛菜总黄酮最佳提取工艺条件为料液比 1∶50，超

声时间 50.80min，乙醇浓度 67.92%，超声温度 38.09℃，此条件下总黄酮提取率为 21.88mg/g，考虑到实际操作需要，将实验条件修订为料液比 1∶50，超声时间 51min，乙醇浓度 70%，超声温度 39℃。在此最优实验条件下进行 3 次验证试验，诸葛菜总黄酮平均提取率为 21.83mg/g，与理论预测值 21.88 基本吻合，偏差很小，说明该模型可靠，利用响应面分析法优化得到的超声提取工艺参数准确，具有可行性。

2.3　诸葛菜总黄酮含量及抗氧化活性结果比较

2.3.1　体外抗氧化活性测定　精密称取 DPPH 8.0mg 于 100ml 棕色容量瓶中，用无水乙醇溶解并定容到刻度，配成浓度为 2.0×10^{-4} mol/L DPPH 溶液，将样品溶液配成浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.1、0.15mg/ml，分别加入 DPPH 溶液或无水乙醇后避光反应 60min 后于 510nm 处测定吸光度。按照以下公式计算诸葛菜总黄酮对 DPPH · 清除率[8-10]。用相同浓度 Vc 做阳性对照。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率}\% = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%$$

A_1：样品溶液 + DPPH 溶液，A_2：样品溶液 + 无水乙醇，A_0：无水乙醇 + DPPH 溶液

2.3.2　不同生长时期诸葛菜总黄酮含量及抗氧化活性比较　将诸葛菜花蕾期、初花期、大花期及结果期的新鲜药材置于阴凉通风处干燥，粉碎，过 60 目筛，分别精密称定上述干燥药材粉末 3 份，每份 0.5000g 于 50ml 具塞锥形瓶中，加入 70% 乙醇 25ml，在 38℃ 下超声提取 51min，抽滤，取滤液，显色后测定吸光度，计算总黄酮含量，按 2.3.1 测定体外抗氧化活性。见图 6，7。

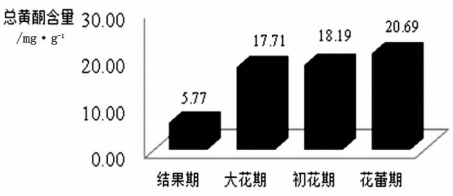

图 6　不同生长期诸葛菜总黄酮含量比较

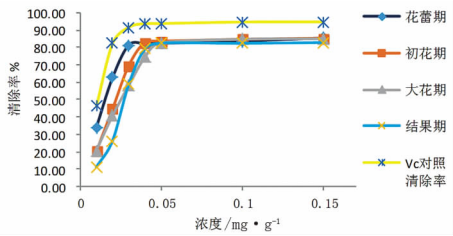

图 7　不同生长期诸葛菜抗氧化活性比较

由图 6 可知，不同生长期诸葛菜总黄酮含量：花蕾期 > 初花期 > 大花期 > 结果期，由图 7 所示，不同生长期诸葛菜总黄酮对 DPPH 自由基清除能力均随着样品溶液浓度增大而增加，在 10 ~ 50μg/ml 增长幅度较大，超过 50μg/ml 时，逐渐趋于平缓。由此可知，花蕾期总黄酮含量及抗氧化活性最高。

2.3.3　不同药用部位诸葛菜总黄酮含量及抗氧化活性比较　将大花期诸葛菜新鲜药材根、茎、叶、花、果实分离，分别置微波干燥杀菌箱中 45℃ 下微波干燥，将干燥后药材分别粉碎，过 60 目筛，按 2.3.1 方法测定总黄酮含量及体外抗氧化活性。结果见图 8，9。

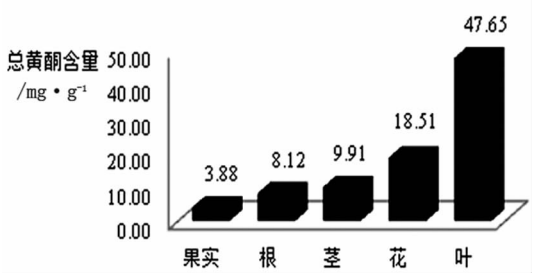

图 8　不同药用部位诸葛菜总黄酮含量比较

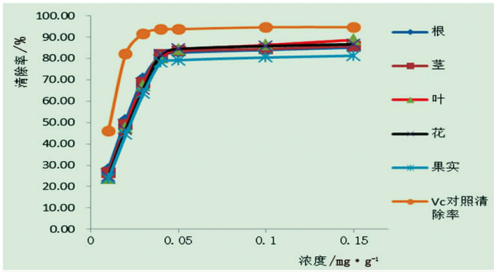

图 9　不同药用部位诸葛菜抗氧化活性比较

由图 8 可知，不同药用部位诸葛菜总黄酮含量：叶 > 花 > 茎 > 根 > 果实，由图 9 可知，不同药用部位诸葛菜总黄酮对 DPPH 自由基清除能力均随着样品溶液浓度增大而增加，在 10 ~ 50μg/ml 增长幅度较大，超过 50μg/ml 时，逐渐趋于平缓。由此可知，叶的总黄酮含量及抗氧化活性最高。

2.3.4　不同干燥方法诸葛菜总黄酮含量及抗氧化活性比较　将置于不同干燥方法下干燥后的大花期诸葛菜药材粉碎，过 60 目筛，按 2.3.1 方法测定总黄酮含量及体外抗氧化活性。结果见图 10，11。

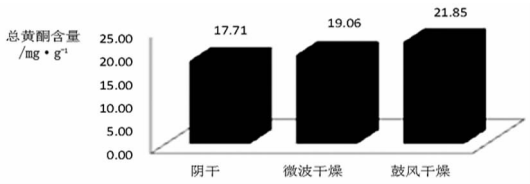

图 10　不同干燥方法诸葛菜总黄酮含量比较

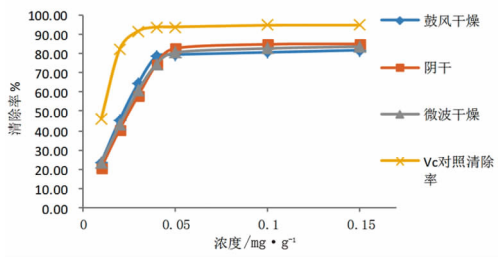

图 11　不同干燥方法诸葛菜抗氧化活性比较

由图 10 可知，不同干燥方法诸葛菜总黄酮含量：低温鼓风干燥 > 微波干燥 > 阴干，由图 11 所示，不同干燥方法诸葛菜总黄酮对 DPPH 自由基清除能力在 10 ~ 50μg/ml 范围内呈较好的量效关系。阴干法清除能力可达 84.96%，微波干燥法为 83.58%，低温鼓风干燥为 81.76%。虽然阴干法抗氧化活性最高，但总黄酮含量相对较低；低温干燥法和微波干燥法抗氧化活性差异较小，其中，阴干法总黄酮含量相对较高，因微波干燥法所需时间较短，因此选择微波法作为诸葛菜最佳干燥方法。

3　讨论

本课题在单因素试验的基础上，采用响应曲面法优化诸葛菜总黄酮超声提取工艺，试验结果表明：在料液比 1∶50、超声时间 51min、超声温度 38℃、乙醇浓度 68% 条件下，诸葛菜中总黄酮含量为 21.83mg/g，与模型预测值基本相近，从而说明该方法可行。通过对比不同干燥方法，不同药用部位和不同生长期诸葛菜总黄酮含量和抗氧化活性，选择微波法干燥，叶和花蕾期总黄酮含量和抗氧化活性相对较高。本文通过对诸葛菜总黄酮提取工艺及抗氧化活性的研究，为诸葛菜有效成分的进一步开发利用提供理论依据。

参考文献：

[1]　张婷婷，马国需，许福泉，等. 诸葛菜水溶性化学成分的研究[J]. 中国药学杂志，2014，49(24)：2165-2167.

[2]　王欣，李向，王红庆. 诸葛菜中黄酮类化合物提取方法和抗氧化性研究[J]. 安徽农业科学，2007，35(27)：8667-8669.

[3]　李孟良，江东国. 不同施氮量对诸葛菜生长及产量的影响[J]. 安徽科技学院学报，2016，30(5)：12-16.

[4]　刘杰，胡志平，邓莹. 超声波提取总黄酮的工艺研究现状[J]. 黔南民族医专学报，2016，29(4)：308-309.

[5]　Vardanega R, Santos DT, Meireles MA. Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation[J]. Pharmacogn Rev, 2014, 8(16)：88-95. DOI：10.4103/0973-7847.134231.

[6]　叶耀辉，郑红梅，张博文，等. Box-Behnken 响应面法优化鳖血柴胡炮制工艺[J]. 中药材，2017，40(2)：334-337.

[7]　张百霞，郭庆梅，王真真，等. 响应曲面法优化金银花总酚酸提取工艺[J]. 中成药，2013，35(10)：2144-2148.

[8]　林三清，周中流，杨红艳，等. 柠檬桉叶总黄酮提取工艺及其清除自由基活性研究[J]. 中国药业，2017，26(6)：5-8.

[9]　薛梅，李晓英，周卫平. 龙牙百合花总黄酮提取工艺及抗氧化性[J]. 江苏农业科学，2017，45(2)：182-184.

[10]　王晓林，王文姣，钟方丽，等. 表面活性剂辅助提取黄芪茎总黄酮及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发，2017，38(1)：28-33.

（收稿日期　2018-01-09）

（本文编辑：石俊强）