

响应面法优化超声-微波提取甘草渣总黄酮工艺

袁茹楠¹, 胡浩斌^{1,2*}, 韩舜禹¹, 王宗博³

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070; 2. 陇东学院化学化工学院, 甘肃庆阳 745000; 3. 庆阳市中凯农产品有限责任公司, 甘肃庆阳 745000)

摘要: 目的 通过响应面法优化超声-微波提取甘草渣总黄酮工艺。方法 在单因素试验基础上, 以微波功率、提取时间、液料比、乙醇体积分数为影响因素, 总黄酮提取率为评价指标, 响应面法优化提取工艺。结果 最佳条件为微波功率 125 W, 提取时间 32 min, 液料比 28.4 : 1, 超声功率 300 W, 乙醇体积分数 79%, 总黄酮提取率 2.59%。结论 该方法稳定可靠, 可用于提取甘草渣总黄酮。

关键词: 甘草渣; 总黄酮; 超声-微波提取; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)03-0504-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.012

Optimization of ultrasound-microwave extraction for total flavonoids from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* residue by response surface method

YUAN Ru-nan¹, HU Hao-bin^{1,2*}, HAN Shun-yu¹, WANG Zong-bo³

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Longdong University, Qingyang 745000, China; 3. Qingyang Zhongkai Agricultural Products Co., Ltd., Qingyang 745000, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the ultrasound-microwave extraction for total flavonoids from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* residue by response surface method. **METHODS** In addition to the index of extraction rate of total flavonoids for evaluation, the microwave power, extraction time, liquid-solid ratio and ethanol concentration were taken into consideration as influencing factors for the extraction optimization by response surface method on the basis of single factor test. **RESULTS** The optimal conditions, determined to be 125 W for microwave power, 32 min for extraction time, 28.4 : 1 for liquid-solid ratio, 79% for ethanol concentration, and 300 W for extraction power, could bring forth a 2.59% extraction rate of total flavonoids. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for extracting total flavonoids from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* residue.

KEY WORDS: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* residue; total flavonoids; ultrasound-microwave extraction; response surface method

甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 又名甜草根、灵通、国老等, 为豆科蝶形花亚科甘草属多年生草本植物^[1], 也是近年来国内外重点开发的食药同源植物^[2], 甘草酸和黄酮是其主要有效成分^[3], 其中甘草黄酮具有抑菌、抗癌、抗 HIV、抗氧化、保肝等广泛的药理活性^[4]。长久以来, 工业化生产着重提取甘草中甘草酸, 而将提取后的残渣弃去^[5], 但其中含有大量黄酮类化合物, 其化学结

构与甘草中的相关成分基本相似^[6]。本实验以工业化提取甘草酸剩余的废渣为原料, 优化提取甘草渣总黄酮工艺, 可有效避免环境污染和甘草资源浪费^[7-8]。

目前, 有多种黄酮提取方法^[9], 如溶剂提取法、超声波提取法、微波提取法、酶提法、超临界 CO₂ 萃取法、闪式提法、半仿生提取法、基质固相分散法等。其中, 超声-微波协同提取可以实现这

收稿日期: 2016-07-04

基金项目: 甘肃省科技支撑项目 (1604NKCM082); 庆阳市科技合作项目 (kh2014-03)

作者简介: 袁茹楠 (1992—), 女, 硕士生, 研究方向为营养与食品卫生学。E-mail: 18153950877@163.com

* 通信作者: 胡浩斌 (1969—), 男, 博士, 教授, 研究方向为营养与食品卫生学。E-mail: 2396402556@qq.com

两种技术的优势互补,超声波产生的振荡和搅拌作用能有效弥补微波传热、传质不均匀等缺陷,而微波极佳的热效也弥补了超声波供热不足的问题,使得提取时间更短,效率更高^[10-11]。

响应面法是以多元二次回归方程为函数估算工具^[12-13],通过对回归方程的分析优化工艺参数,并预测响应值的统计方法^[14],该方法操作简便,预测准确,在工艺优化中的应用日益广泛。本实验以其对甘草渣总黄酮的超声-微波提取工艺进行优化^[15],为该成分药理活性的深入研究和甘草资源的有效利用提供实验依据^[16]。

1 材料、试剂和仪器

甘草渣由庆阳市中凯农产品有限责任公司提供,经摘净、晾干后,用粉碎机粉碎,过60目筛。芦丁(批号100080-2001408)对照品购自中国食品药品检定研究院。氢氧化钾、无水乙醇、甲醇、石油醚均为分析纯,购自西安化学试剂厂。NJL07-5型实验室超声微波炉(南京杰全微波设备有限公司);7230G型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);SPECORD-50型紫外分光光度仪(德国耶拿公司);RE-5203型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);FZ102型微型植物试样粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司);SHZ-D型循环水式真空泵(河南省巩义市英峪仪器一厂);BS110S型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

2 方法和结果

2.1 超声-微波提取 精密称取烘干的甘草渣粉(60目)2.00 g,置于100 mL烧杯中,加入60 mL 80%乙醇,提取(300 W)30 min,过滤,滤渣加入40 mL 80%乙醇提取1次,合并2次提取液,80%乙醇稀释至刻度,定容。

2.2 总黄酮含量测定

2.2.1 对照品溶液配制 精密称取芦丁对照品约0.01 g,80%乙醇定容至100 mL,摇匀,制得0.10 mg/mL溶液,即得。

2.2.2 最大吸收波长确定 精密吸取“1.2.2.1”项下对照品溶液和提取液各1.00 mL,置于10 mL量瓶中,加入0.50 mL 10% KOH溶液作为显色剂,室温下放置5 min,80%乙醇稀释定容至刻度,摇匀,于200~500 nm波长处扫描,发现在409 nm波长处有最大吸收,故选择其作为最大吸收波长。

2.2.3 标准曲线绘制 精密吸取“1.2.2.1”项下对照品溶液0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00 mL,置于10 mL量瓶中,加入0.50 mL 10%

KOH溶液,充分摇匀显色5 min后,80%乙醇定容至10 mL,摇匀。在409 nm波长处测定其吸光度(A),以其对质量浓度(C)绘制标准曲线,通过最小二乘法^[17],得回归方程 $C = 32.336A - 0.0129$ ($R^2 = 0.9945$),在5.40~32.40 μg/mL范围内线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 取“1.2.2.1”项下对照品溶液1.00 mL,按“2.2.3”项下方法显色稳定5 min后,连续测定5次,测得吸光度RSD为1.7%,表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 精密称取样品溶液1.00 mL,置于10 mL量瓶中,按“2.2.3”项下方法显色后,于80 min内每隔10 min在409 nm波长处测定,测得总黄酮含量RSD为1.3%,表明溶液在80 min内稳定性良好。

2.2.6 重复性试验 精密称取同一甘草渣粉末6份,制成样品溶液,按“2.2.3”项下方法测定,测得吸光度RSD为1.6%,表明该方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 精密吸取6份总黄酮含量已知的提取液1.00 mL,加入“1.2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.2.3”项下方法测定,测得平均加样回收率为97.83%,RSD为1.33%。

2.2.8 样品含量测定 精密称取甘草渣粉末2.00 g,置于100 mL烧杯中,加入60 mL 80%乙醇,提取30 min,提取2次,合并提取液,80%乙醇稀释并定容至100 mL,按“2.2.3”项下方法显色,在409 nm波长处测定吸光度,按下式计算总黄酮含量(C),平行3次,取平均值。

$$C = \frac{V \times X \times n}{1000 \times A \times W} \times 100\%$$

其中,n为稀释体积(mL),V为提取液体积(mL),X为比色液中黄酮含量(mg/mL),A为取样体积(mL),W为甘草渣质量(g)。

结果,总黄酮含量分别为2.25%、2.22%、2.23%,平均2.23%,RSD 1.53%。

2.3 单因素试验

2.3.1 液料比 固定超声功率300 W、提取时间30 min、微波功率120 W、乙醇体积分数80%,考察液料比15:1、20:1、25:1、30:1、35:1对总黄酮提取率的影响,结果见图1。由图可知,当液料比从15:1增加到30:1时,总黄酮提取率显著增加,在30:1时达到最大,表明随着溶剂增加,固液两相接触面积增大,有利于总黄酮溶出;

但当其超过 30 : 1 时, 随着提取溶剂增多, 超声波和微波很难作用于物料, 总黄酮溶出速度减慢, 而且乙醇用量过大会增加热负荷, 延长提取时间。最终, 选择液料比为 30 : 1。

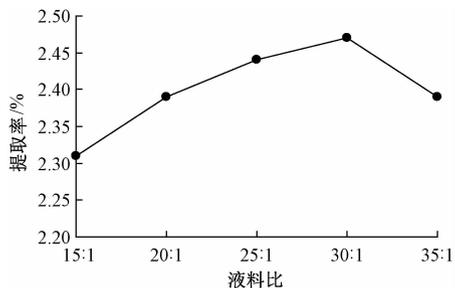


图1 液料比对总黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effect of liquid-to-solid ratio on the extraction rate of total flavonoids

2.3.2 提取时间 固定超声功率 300 W、液料比 30 : 1、微波功率 120 W、乙醇体积分数 80%，考察提取时间 10、20、30、40、50 min 对总黄酮提取率的影响, 结果见图 2。由图可知, 随着提取时间增加, 总黄酮提取率先升高后降低, 在 30 min 时最高, 这是因为超声处理使得细胞破碎, 更多乙醇渗透到植物细胞内, 黄酮提取率明显提高; 但当其进一步延长时, 甘草中其他成分溶出, 同时可能对黄酮结构造成破坏^[18]。最终, 选择提取时间为 30 min。

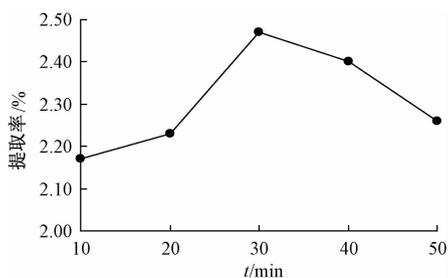


图2 提取时间对总黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on the extraction rate of total flavonoids

2.3.3 微波功率 固定超声功率 300 W、液料比 30 : 1、提取时间 30 min、乙醇体积分数 80%，考察微波功率 90、120、150、180、210 W 对总黄酮提取率的影响, 结果见图 3。由图可知, 随着微波功率增加, 总黄酮提取率先升高后降低, 这是因为在一定时间内随着微波功率增加, 温度也随之升高, 分子热运动加速, 有利于总黄酮溶出; 但当其进一步增加时, 温度过高, 将使得乙醇挥发, 溶剂

减少, 黄酮溶出降低。最终, 选择微波功率为 120 W。

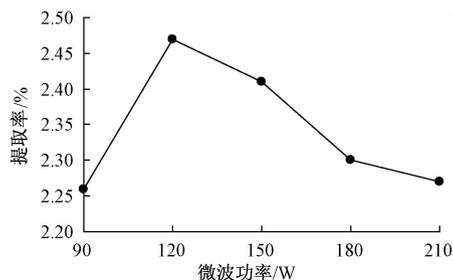


图3 微波功率对总黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effect of microwave power on the extraction rate of total flavonoids

2.3.4 乙醇体积分数 固定超声功率 300 W、液料比 30 : 1、提取时间 30 min、微波功率 120 W, 考察乙醇体积分数 60%、70%、80%、90%、100% 对总黄酮提取率的影响, 结果见图 4。由图可知, 随着乙醇体积分数增加, 总黄酮提取率升高后降低, 其原因可能是乙醇体积分数越高, 对氢键的断裂作用越强, 提取率越高; 但当其超过 80% 时, 产生了较大渗透压, 影响总黄酮提取浓度, 导致其提取率反而下降^[19]。因此, 选择乙醇体积分数为 80%。

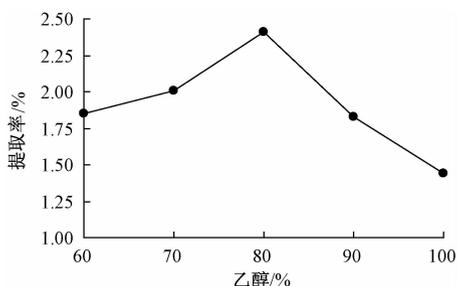


图4 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响

Fig. 4 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of total flavonoids

2.3.5 超声功率 固定微波功率 120 W、液料比 30 : 1、提取时间 30 min、乙醇体积分数 80%，考察超声功率 200、300、400、500、600 W 对总黄酮提取率的影响, 发现超声功率对其影响并不显著。从节约能耗的角度考虑, 最终选择超声功率为 300 W。

2.4 响应面法 在单因素试验基础上, 固定超声功率 300 W, 以微波功率 (X_1)、提取时间 (X_2)、液料比 (X_3)、乙醇体积分数 (X_4) 为影响因素, 总黄酮提取率 (Y) 为评价指标, 进行响应面分

析。因素水平见表1, 设计结果见表2。

表1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
X ₁ 微波功率/W	90	120	150
X ₂ 提取时间/min	20	30	40
X ₃ 液料比	25 : 1	30 : 1	35 : 1
X ₄ 乙醇/%	70	80	90

表2 试验设计和结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	总黄酮提取率/%
1	0	-1	1	0	2.36
2	0	0	0	0	2.63
3	1	1	0	0	2.48
4	0	1	-1	0	2.51
5	0	0	0	0	2.58
6	0	-1	0	1	2.23
7	0	-1	-1	0	2.40
8	1	0	0	-1	2.34
9	-1	0	-1	0	2.44
10	0	1	0	-1	2.33
11	-1	0	0	1	2.22
12	0	0	-1	1	2.31
13	-1	1	0	0	2.39
14	0	1	1	0	2.41
15	-1	0	1	0	2.39
16	0	0	1	1	2.26
17	0	1	0	1	2.26
18	0	0	1	-1	2.25
19	1	0	1	0	2.39
20	0	0	0	0	2.57
21	0	0	0	0	2.57
22	1	0	-1	0	2.49
23	-1	-1	0	0	2.32
24	1	-1	0	0	2.40
25	1	0	0	1	2.18
26	0	0	-1	-1	2.34
27	0	-1	0	-1	2.24
28	0	0	0	0	2.57
29	-1	0	0	-1	2.23

通过 Design Expert 8.0.6 软件对表2 数据进行分析, 得到回归方程为 $Y = 2.58 + 0.024X_1 + 0.036X_2 - 0.036X_3 - 0.023X_4 + 2.5 \times 10^{-3} X_1X_2 - 0.013X_1X_3 - 0.037X_1X_4 - 0.015X_2X_3 - 0.015X_2X_4 + 1.0 \times 10^{-2} X_3X_4 - 0.099X_1^2 - 0.091X_2^2 - 0.064X_3^2 - 0.23X_4^2$ 。再进行方差分析, 结果见表3。

表3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.44	14	0.031	49.06	<0.000 1
X ₁	7.008×10^{-3}	1	7.008×10^{-3}	11.02	0.005 1
X ₂	0.015	1	0.015	24.23	0.000 2
X ₃	0.015	1	0.015	24.23	0.000 2
X ₄	6.075×10^{-3}	1	6.075×10^{-3}	9.55	0.008 0
X ₁ X ₂	2.500×10^{-5}	1	2.500×10^{-5}	0.039	0.845 7
X ₁ X ₃	6.250×10^{-4}	1	6.250×10^{-4}	0.98	0.338 3
X ₁ X ₄	5.625×10^{-3}	1	5.625×10^{-3}	8.85	0.010 1
X ₂ X ₃	9.000×10^{-4}	1	9.000×10^{-4}	1.42	0.254 0
X ₂ X ₄	9.000×10^{-4}	1	9.000×10^{-4}	1.42	0.254 0
X ₃ X ₄	4.000×10^{-4}	1	4.000×10^{-4}	0.63	0.441 0
X ₁ ²	0.063	1	0.063	99.29	<0.000 1
X ₂ ²	0.054	1	0.054	84.77	<0.000 1
X ₃ ²	0.026	1	0.026	41.34	<0.000 1
X ₄ ²	0.35	1	0.35	556.90	<0.000 1
残差	8.903×10^{-3}	14	6.360×10^{-4}	—	—
失拟项	6.183×10^{-3}	10	6.183×10^{-4}	0.91	0.591 6
纯误差	2.720×10^{-3}	4	6.800×10^{-4}	—	—
总和	0.45	28	—	—	—

由表可知, X₁、X₂、X₃、X₄、X₁²、X₂²、X₃²、X₄² 均呈极显著影响 ($P < 0.01$), X₁X₄ 呈显著影响 ($P < 0.05$), 模型有极显著差异 ($P < 0.000 1$), 回归系数 R^2 为 0.980 0, 表明模型相关度良好; 校正决定系数 R_{adj}^2 为 0.960 1, 表明模型拟合度理想, 误差小; 失拟项 $P > 0.05$, 表明模型预测值与实际值能较好地契合。综上所述, 可以用该模型进行分析与预测。

各因素交互作用的响应面图见图5, 可知微波功率 (X₁) 和乙醇体积分数 (X₄) 的交互作用最为显著。由此可得, 最优工艺为液料比28.35 : 1, 提取时间 32.32 min, 微波功率 124.83 W, 乙醇体积分数 79.24%, 总黄酮提取率 2.597%。

2.5 验证试验 根据优化工艺进行3次验证试验, 测得总黄酮平均提取率为 2.59%, 与理论值 (2.597%) 接近, 表明该方法准确可靠。

3 讨论和结论

本实验通过紫外光谱分析, 确定了甘草渣总黄酮的最大吸收波长为 409 nm。再采用响应面法, 在单因素试验的基础上优化其提取工艺, 经回归分析并结合实际操作, 最终确定最佳提取工艺为料液比 28.4 : 1, 提取时间 32 min, 微波功率 125 W, 乙醇体积分数 79%, 总黄酮提取率为 2.59%, 与预测值很接近, 进一步证明了模型的可靠性。同时, 通过超声波振荡和微波热效应的结合, 可缩短提取时间, 提高该成分提取率。

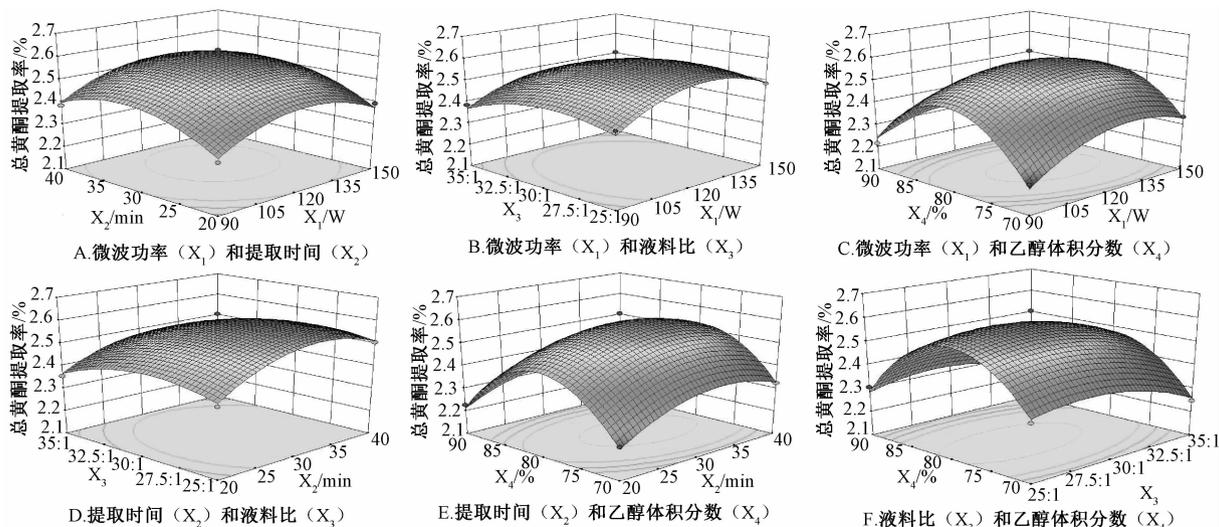


图5 响应面图

Fig. 5 Response surface graphs

此外，在模拟人体胃液的情况下，以优化工艺下的甘草渣总黄酮提取液来研究其对亚硝化反应的抑制能力。结果，该成分能够有效抑制亚硝化反应，其清除率和阻断率分别高达 81.13% 和 74.48%，可为甘草资源的进一步利用提供参考。

参考文献:

[1] 谷会岩. 中国甘草资源生态学研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2001.

[2] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 北京学苑出版社, 1997, 1256-1279.

[3] 崔永明. 甘草次生代谢产物分离纯化研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2005.

[4] 张庆乐, 吴守林, 张丽青, 等. 植物黄酮在抑制亚硝化反应中的应用[J]. 医学导报, 2009, 28(6): 733-734.

[5] 马子娇, 许颖, 刘佳, 等. 甘草废渣中甘草黄酮提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 15-19.

[6] Trupti W C, Virendra K R. Separation of glycyrrhizic acid from licorice root extract using macroporous resin[J]. *Food Bioprod Process*, 2015, 93: 51-57.

[7] 吴伟康, 奉建芳, 黄小蕊, 等. 甘草提取工艺的初步研究[J]. 中草药, 2001, 32(3): 211-212.

[8] 李炳奇, 汪河滨, 李学禹, 等. 超声法联合提取甘草黄酮和甘草酸的研究[J]. 山东中医杂志, 2005, 24(1): 38-40.

[9] 杨慧. 对甘草中总黄酮提取工艺的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2013.

[10] Cristina L, Timothy J M. Microwave and ultrasonic processing;

now a realistic option for industry [J]. *Chem Eng Process: Process Inten*, 2010, 49(9): 885-900.

[11] Chen Y Y, Gu X H, Huang S Q, et al. Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 46(4): 429-435.

[12] Khuri A I, Mukhopadhyay S. Response surface methodology [J]. *Wiley Interdis Rev: Comput. Statist*, 2010, 2(2): 128-149.

[13] Zhang Z, Zheng H. Optimization for decolorization of azo dye acid green 20 by ultrasound and H_2O_2 using response surface methodology [J]. *J Hazard Mater*, 2009, 172(2-3): 1388-1393.

[14] Zhong K, Wang Q. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 80: 19-25.

[15] 贺寅, 王强, 钟葵. 响应面优化酶法提取龙眼多糖工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 79-83.

[16] 徐春燕, 张娜, 韩爱荣, 等. 甘草渣黄酮回流提取的工艺优化及预处理方法研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(2): 222-226.

[17] 吴春霞, 宋曼曼, 阿不都拉·阿巴斯, 等. 小甘菊不同部位总黄酮含量测定及其薄层色谱法的初步分析[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 430-433.

[18] 吴佳, 解成喜. 石榴皮总黄酮的提取工艺及抑制亚硝化反应[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 111-114.

[19] 常婧. 甘草中类黄酮有效成分的提取、含量测定和抗氧化性研究[D]. 太原: 中北大学, 2014.