

响应面法优化微波—辅助提取金银花中绿原酸工艺研究

侯敏娜, 侯少平, 刘艳红, 王珊, 许海燕, 彭修娟

(陕西国际商贸学院, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 研究目的是借助响应面数学模型, 来优选金银花中绿原酸的微波辅助提取工艺。以绿原酸标准品为基准, 考察影响金银花中绿原酸提取率的四个因素, 即为提取溶液的 pH 值、时间、乙醇浓度和料液比。最终优选出的提取工艺参数为: 溶液的 pH 值为 5, 乙醇浓度为 80%, 料液比为 1:10($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 时间为 20 min。经三次平行试验验证后, 得到金银花中绿原酸的提取率为 9.77266%, 与预测值相差极小。说明该模型预测的金银花中绿原酸提取工艺可行。

关键词: 金银花; 绿原酸; 微波法; 响应面法; 提取工艺

金银花 (*Lonicera Japonica*), 又称双花、金花、银花, 为忍冬科忍冬属忍冬组植物忍冬 (*Lonicera japonica* Thunb.) 的干燥花蕾或带初开的花^[1]。具有清热解毒、消肿止痛的功效^[1], 主要用于治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒痢、风热感冒和温病发热等症^[2~4]。植物中的绿原酸具有抗菌、抗病毒等药理活性, 也是金银花中主要成分, 也是市售中成药感冒药中含有的成分。随着医学发展的研究, 人们对于金银花的理解也越来越深, 对金银花的利用程度也随之提高。笔者研究利用微波法从金银花中提取得到的绿原酸工艺, 将为金银花药材合理、广泛利用提供实验技术参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

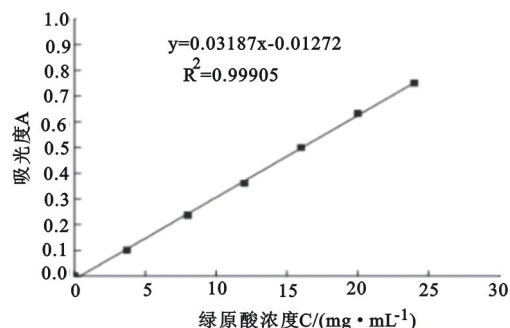
金银花(购于河南省密县, 经我院中药学教研室雷国莲教授鉴定为 *Lonicera japonica*); 绿原酸标准品(中国药品生物制品检定研究院, 批号: 110753-201415); 95% EtOH(天津市天力化学试剂有限公司); NaOH(天津市河东区红岩试剂厂)等, 试剂均为市售分析纯。

TU-1810 型紫外—可见分光光度计(上海长城制造有限公司); FA2004A 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司); HH-2 型恒温水浴锅(江苏金坛市亿通电子有限公司生产); XH-

200A 型微波萃取仪(北京祥鹤科技发展有限公司); SHZ-D 型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); TDL-60B 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂制造)等。

1.2 实验方法

1.2.1 金银花中绿原酸标准曲线的制作 绿原酸标准溶液的制备 将绿原酸标准品放入恒温干燥箱中, 于 105℃ 干燥后常温放凉以备用。准确称取预先处理好的绿原酸标准品 0.005 g, 先加入少量 70% 的乙醇使其充分溶解, 随后再定容至刻度。分别精密移取上述配置好的标准品溶液 1、2、3、4、5、6 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 用 70% 乙醇定容至刻度, 于用波长为 327 nm 处的紫外光光下, 测各吸光度^[5,6]。以吸光度 A(y) 和浓度 C(x) 在 excel 表格中绘作其标准曲线, 结果见图 1。由图 1 可知, 绿原酸浓度在 4~24 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 与吸光度线性关系良好。



收稿日期: 2020-03-14 修回日期: 2020-04-10

基金项目: 陕西省教育厅项目(编号: 18JK0955); 陕西国际商贸学院中药质量标志物创新团队(编号: SSS18TD02); 陕西省大学生创新创业训练计划项目(编号: 201849006); 陕西省科研平台项目(编号: 2019XT-2-202); 陕西省科技厅项目(编号: 2020SF-323)。

第一作者简介: 侯敏娜(1981-), 女, 陕西咸阳市人, 硕士, 副教授, 主要从事中药活性成分的研究工作。

图1 绿原酸的标准曲线

1.2.2 金银花中绿原酸提取方法及含量计算

称取 100 g 金银花清洗,低温烘干,粉碎,过二号筛,封存备用。精确称取 2.000 g 金银花粉末,于 100 mL 烧杯中,加入适量一定浓度的乙醇,浸泡 10 min,使其充分浸透后,经微波提取后过滤,滤液定容至 250 mL 容量瓶中。从其中移取 2 mL,定容于 50 mL 容量瓶中。在波长 327 nm 处,测其吸光度,根据公式,计算,可得绿原酸提取率(Y)^[6~8]。

$$\text{绿原酸提取率}(Y) = \frac{CVn}{1000m} \times 100\%$$

其中,C为样品溶液浓度, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;V为体积,mL;n表示样品转为原液的倍数;m表示金银花粉末的量, $\text{g}^{[8]}$ 。

1.2.3 单因素考察^[9~12] 精确称取金银花粉末

表1 实验因素水平

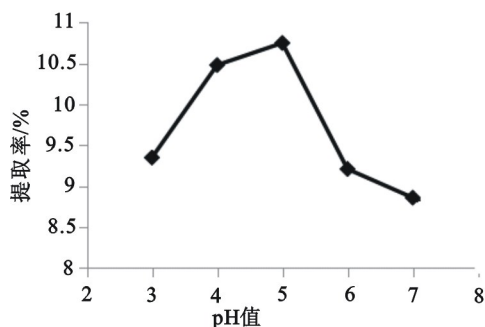
水平	因素			
	溶液的 pH 值 (A)	乙醇浓度/% (B)	料液比/($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (C)	提取时间/min (D)
-1	4	60	1:10	20
0	5	70	1:12	30
1	6	80	1:14	40

1.2.5 数据处理 采用 Design—Expert8.0.6 软件分析、处理实验数据。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果与分析

2.1.1 溶液的 pH 值对金银花中绿原酸提取率的影响 由图 2 可明显看出,PH 值在小于 5 时提取率随着 pH 值升高而增加,且增加趋势度较快,在曲线上显示为斜率较大;但超过 5 以后,提取率开始逐渐减小,且 pH 值为 5~6 之间下降最大,负斜率超过了增加时的斜率。故选择溶液的 pH 值等于 5 时,为金银花中绿原酸提取溶液 pH 值的最优取值。



适量,于 100 mL 烧杯中,加入适量一定浓度的乙醇,浸泡 10 min,使其充分浸透后,经微波法提取。通过考察溶液的 pH 值(3、4、5、6、7);乙醇浓度(50%、60%、70%、80%、90%);料液比(1:6 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1:8 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1:10 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1:12 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1:14 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和提取时间(10 min、20 min、30 min、40 min、50 min)等因素,对金银花中绿原酸提取率(Y)的影响。

1.2.4 响应面实验优化 通过单因素实验考察结果及响应面中心组合的方法,以金银花中绿原酸提取率为响应值(Y),以溶液的 pH 值(A)、乙醇浓度(B)、料液比(C)和提取时间(D)为选取的对金银花中绿原酸的提取率(Y)的影响较大的四个因素。每个因素水平分别用 -1、0 和 1 表示低、中、高三个水平,设计 29 组实验。见表 1。

图 2 溶液的 PH 值对金银花中绿原酸提取率的影响

2.1.2 乙醇浓度对金银花中绿原酸提取率的影响 由图 3 可明显看出,横坐标上乙醇浓度分数变大,金银花中的绿原酸提取率在最初先上升随后出现了下降的情况,当达到中值 70% 的时候,与此对应的绿原酸的提取率达到了该条件下的最大值。当高于 70% 时呈明显急剧下降趋势,可能是由于乙醇浓度高时引入的杂质比较多或抑制了一部分绿原酸的溶出。故选择 70% 的乙醇,为提取金银花中绿原酸的最优乙醇浓度取值。

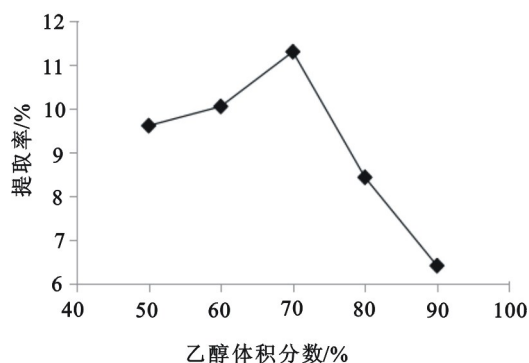


图3 乙醇浓度对绿原酸提取率的影响

2.1.3 料液比对金银花中绿原酸提取率的影响

由图 4 可明显看出,随着横坐标上料液比越来越大,金银花中绿原酸提取率越来越高,当料液比小于 1:12 $g \cdot mL^{-1}$,提取率成正增长趋势;当料液比大于 1:12 $g \cdot mL^{-1}$ 时提取率逐渐降低趋势。故选择料液比为 1:12 $g \cdot mL^{-1}$,为金银花中绿原酸的最优溶剂提取用量取值。

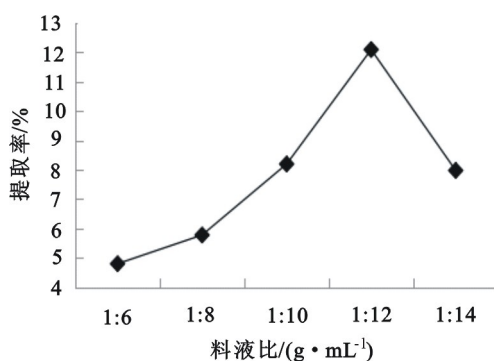


图 4 料液比对金银花中绿原酸提取率的影响

2.1.4 提取时间对金银花中绿原酸提取率的影响

由图 5 可明显看出,在其他条件恒定不变的情况下,当微波时间为 30 min 时,提取出的金银花绿原酸量最多,在 20 min 和 30 min 之间斜率最大,但提取时间超过 30 min 后,可能随着时间的增加,绿原酸会部分分解使提取率开始逐渐减小。故选择时间为 30 min,为金银花中绿原酸的最优提取时间取值。

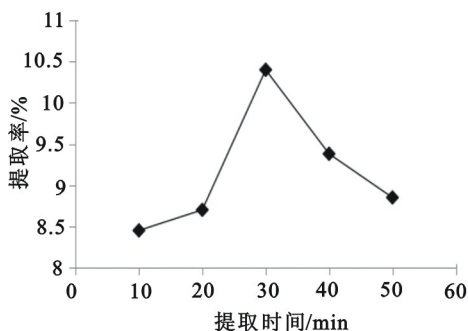


图 5 提取时间对金银花中绿原酸提取率的影响

2.2 响应面法优化实验结果与分析

2.2.1 二次回归模型方程的建立及方差分析

以金银花中绿原酸提取率(Y)为考察指标,结合单因素实验结果,对溶液 pH 值(A)、乙醇浓度(B)、料液比(C)和提取时间(D)四个因素对金银花中绿原酸的提取率(Y)的影响,设计 29 组实

验,结果见表 2。

表 2 响应面设计实验数据

序号	A	B	C	D	Y/%
1	0	0	0	0	9.65
2	-1	1	0	0	9.49
3	1	0	0	1	9.51
4	0	1	-1	0	9.84
5	0	1	0	1	9.55
6	1	0	0	-1	9.73
7	-1	-1	0	0	8.99
8	-1	0	0	1	9.35
9	0	0	0	0	9.65
10	0	0	1	-1	9.44
11	1	-1	0	0	9.71
12	1	0	1	0	9.39
13	0	0	0	0	9.58
14	0	-1	1	1	9.41
15	0	-1	0	1	9.75
16	0	1	1	0	9.39
17	1	1	0	0	9.51
18	-1	0	1	0	8.94
19	0	-1	0	-1	9.52
20	0	0	-1	-1	9.64
21	0	0	1	1	9.39
22	0	0	-1	1	9.53
23	1	0	-1	0	9.54
24	0	0	0	0	9.64
25	0	1	0	-1	9.42
26	0	1	1	-1	9.72
27	-1	0	0	-1	9.24
28	0	0	0	0	9.71
29	-1	0	-1	0	9.36

利用 Design-Expert8.0.6 软件对表 2 的数据进行统计分析,得到 Y(金银花中绿原酸的提取率)与 A(溶液的 pH 值)、B(乙醇浓度)、C(料液比)和 D(提取时间)的二次多元回归方程如下:

$$Y = +9.65 + 0.17A + 0.030B - 0.12C + 2.979E - 003D - 0.18AB + 0.068AC - 0.083AD - 0.087BC - 0.039BD + 0.015C^2 - 0.19A^2 - 0.022B^2 - 0.12C^2 - 0.024D^2$$

表 3 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性
模型	1.18	14	0.064	19.47	<0.000 1	**
A	0.111	1	0.111	7.17	0.017 9	**
B	0.467	1	0.467	16.98	0.000 1	*
C	0.061	1	0.061	7.87	0.019 9	
D	0.111	1	0.111	16.32	0.004 8	**
AB	0.015	1	0.015	1.75	0.167 1	
AC	0.017	1	0.017	1.08	0.709 1	**
AD	0.111	1	0.111	7.17	0.017 9	*
BC	0.071	1	0.071	4.11	0.006 8	**
BD	0.017	1	0.017	1.09	0.771 7	
CD	0.010	1	0.010	0.66	0.047 7	*
A1	1.018	1	1.018	67.44	0.001 4	*
B1	0.178	1	0.178	16.61	0.001 1	**
C1	0.464	1	0.464	11.11	0.000 1	*
D1	0.150	1	0.150	17.11	0.001 4	**
模型	1.057	17	0.147	8.14	0.000 1	**
残差	0.150	14	0.017			
失拟性	0.174	11	0.011	3.16	0.159 6	
纯误差	0.016	7	0.004			
总差	1.411	18				

注: * 差异显著($P < 0.05$), ** 差异极显著($P < 0.01$)

由表 3 数据显示,可以明显看出,模型组的 P 值小于 0.0001,说明该回归方程有显著性,同时 R^2 为 0.9653,说明了有 96.53% 的数据合理有效; $F=3.16$ 、 $P=0.1596$,大于 0.01,代表了失拟项并不显著,说明了方程可以较好的模拟试验内容,且变异系数远小于 10% 的阈值,说明此回归

方程的精度较高。综上所述,可以认为回归方程合理、精确,可以用于预测金银花中绿原酸微波提取工艺、说明实验的可行性。

2.2.2 响应面分析与优化 根据回归分析结果,使用 Design-Expert 8.0.6 软件绘制出相应的响应面图和等高线图,结果见图 6~图 9。

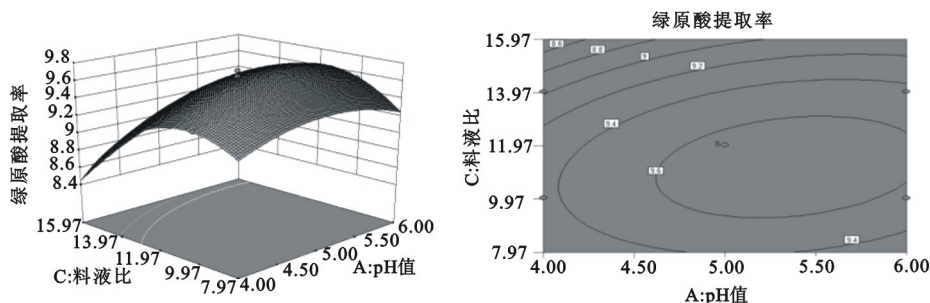


图 6 溶液的 pH 值和料液比对金银花中绿原酸提取率的响应面和等高线

根据图 6 可知,溶液的 pH 值和料液比都显得很陡峭,这说明 pH 值和料液比的交互作用对最终结果的影响非常大。从等高线图可知,相对来说料

液比对结果的影响更大。由此,可确定溶液的 pH 值在 5.0~5.50 和料液比在 1:10~1:14 $g \cdot mL^{-1}$ 范围时,金银花中绿原酸提取率达到了最高水平。

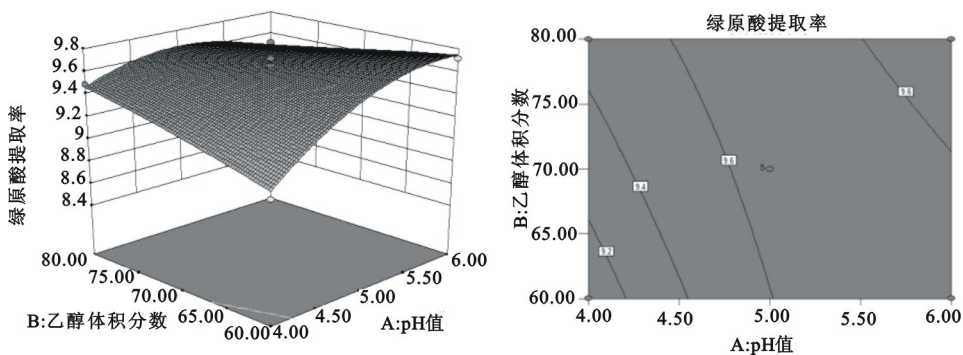


图 7 溶液 pH 值和乙醇浓度对金银花中绿原酸提取率的响应面和等高线

根据图 7 的分析得出,溶液的 pH 值以及乙醇浓度的响应面曲线均比较尖锐,说明溶液的 pH 值和乙醇浓度对金银花中绿原酸提取率影响均比较大。且乙醇浓度对其影响更大一些。由

此,可确定溶液的 pH 值在 5.0~5.50 和乙醇的浓度 60%~80% 范围时,金银花中绿原酸提取率达到了最高水平。

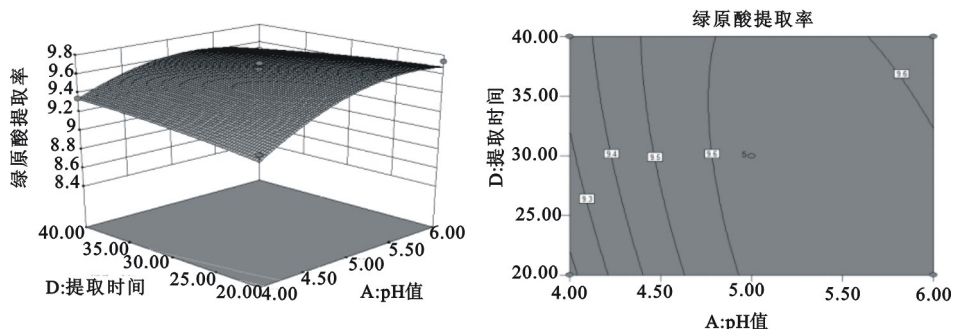


图 8 溶液 pH 值和提取时间对金银花中绿原酸提取率的响应面和等高线

由图 8 可知,响应面曲线中溶液的 pH 值和提取时间都显得很陡峭,说明溶液 pH 值和提取时间的交互作用对最终结果的影响非常大。由等高线图分析,可知提取时间其影响更为明显一些。

由此,可确定溶液的 pH 值在 5.0~5.50 和提取时间在 20~35 min 范围时,金银花中绿原酸提取率达到了最高水平。

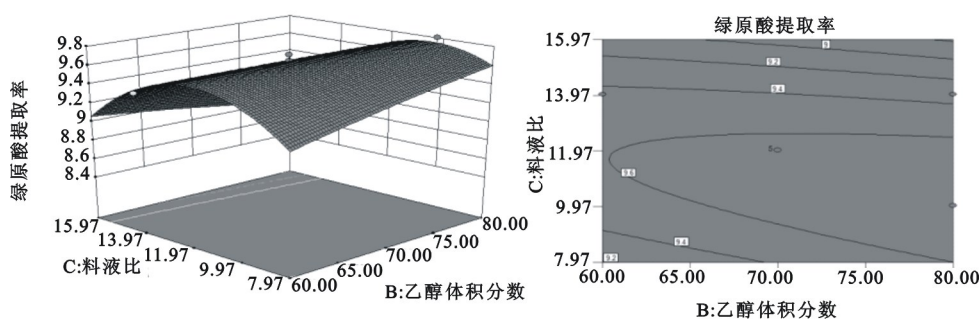


图 9 料液比和乙醇浓度对金银花中绿原酸提取率的响应面图和等高线

由图 9 响应面图可以明显看出,乙醇浓度和料液比的曲面都比较陡,说明乙醇浓度和料液比对金银花中绿原酸提取率影响均较大,且料液比的影响更为显著一些。由此,可确定乙醇浓度在 60%~80% 和料液比在 1:10~1:14 g·mL⁻¹ 范围时,金银花中绿原酸提取率达到了最高水平。

上述最优结果进行微波辅助提取,平行操作三次,按“1.2.2”项下方法测定金银花中绿原酸的提取率(结果见表 4),经计算可得其实际得率为 9.77266%,与理论值相差 0.00019%,说明响应面法得出的试验条件具有很高的可靠性。

表 4 工艺验证结果

N (试验次数)	取样量	绿原酸 提取率/%	平均提 取率/%
1	2.01	9.772 36	
2	2.03	9.772 82	9.772 66
3	2.02	9.772 81	

经求得得出最优工艺,即溶液的 pH=5.03,提取时间 20 min,乙醇的浓度 80%,料液比 1:10.11 g·mL⁻¹ 时,金银花中绿原酸提取率预测值为 9.77285%。

2.3 工艺验证

综合考虑操作的可行性,在对最优结果进行验证时,将实验各因素修正为:溶液的 pH 值=5.0,提取时间 20 min,乙醇浓度 80%,料液比 1:10 g·mL⁻¹。基于修正过的数据,开展三次平行验证试验。称取 2.00 g 的金银花粉末,按照

3 结论

笔者研究了微波法提取金银花中绿原酸工艺。通过单因素实验考察,以金银花中绿原酸提

取率为响应值,结合响应面法四因素三水平,共设计了 29 组实验。综合考虑把修正后实验因素,经三次平行操作验证,得到的最佳提取工艺参数为,即溶液的 pH = 5、乙醇浓度为 80%,料液比为 1:10 g · mL⁻¹,提取时间为 20 min 时,金银花中绿原酸实际提取率为 9.772 66%,与预测值 9.772 85%,相差很小。说明该方法可行、可用于金银花中绿原酸提取。通过笔者试验研究可以为金银花中药材临床合理、有效、广泛利用,提供了实验技术支持。

参 考 文 献:

[1] 任美玲. 金银花有效成分提取技术研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2017.
 [2] 李军芳. 忍冬种质资源评价与道地金银花化学指纹图谱建立研究[J]. 河南师范大学, 2012, 38(02): 44-47.
 [3] 孙元鹏,程正,刘于思,等. 中药材金银花的农业知识产权保护与科技创新研究[J]. 山东农业科学, 2019(04):157-161.
 [4] 刘颖,郭明晔,白根本. 绿原酸的研究进展[J]. 中药材, 2012, 35(07):1 180-1 185.
 [5] 何德贵,周芳勇,李仕先,等. 金银花不同提取工艺

及优选条件探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001 (01):6-7.
 [6] 阎巧娟,韩鲁佳,江正强. 金银花中绿原酸提取纯化工艺的优化[J]. 中国农业大学学报, 2002(02): 22-26.
 [7] 张燕,陈艳,姜玮,等. 微波技术辅助提取蓝莓枝干黄酮工艺优化研究[J]. 食品与发酵科技, 2019, 55 (01):5-10.
 [8] 舒孝顺,卿婉华,许凯扬,等. 微波法辅助提取红腺忍冬花绿原酸[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(10): 250-253.
 [9] 杨蓓蓓,刘超,王素娟,等. 高效液相色谱法测定金银花药材中 3 种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(02):168-171.
 [10] 范毅,陈玲,李晓,等. 不同产地金银花提取物的指纹图谱及绿原酸、木犀草苷含量测定[J]. 河南科学, 2019, 37(01):53-59.
 [11] 刘倩,张敏敏,李圣波,等. HPLC-DAD 法测定西藏产区金银花花蕾及叶中化学成分含量[J]. 山东科学, 2018, 31(04):20-25.
 [12] 景晓明,杨学军,赵莉,等. 金银花中绿原酸的分离与测定方法[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2006(06):1 181-1 184.

(上接第 11 页)

种,更需要农机和农艺两大学科有机结合的联合攻关研究。

参 考 文 献:

[1] 余松烈,于振文,董庆裕,等. 小麦亩产 789.9 公斤高产栽培技术思路[J]. 山东农业科学, 2010(04): 11-12.
 [2] 于振文,田奇卓,潘庆民,等. 黄淮海区冬小麦高产栽培的理论与实践[J]. 作物学报, 2002, 28(05): 577-585.
 [3] 余松烈. 小麦高产途径的商榷—兼论穗、粒、重的矛盾[J]. 科学通报, 1975(04):156-161.
 [4] 田文仲,张园,余四平,等. 冬小麦超高产栽培技术研究[J]. 耕作与栽培, 2014(06):29-31.
 [5] 王龙俊,陈维新,唐明臻,等. 小麦高产群体质量栽培的应用基础, I: 小麦高产群体质量的调控指标[J]. 江苏农业科学, 1996(01):5-9.
 [6] 王龙俊,陈维新,唐明臻,等. 小麦高产群体质量栽培的应用基础, II: 小麦高产群体质量的调控技术 [耕作与栽培, 1996(02):12-15.
 [7] 荆家海. 植物生理学[M]. 西安:陕西科学技术出版社, 1994.

[8] 张继林,孙元敏,郭绍铮,等. 高产小麦营养生理特性与高效施肥技术研究[J]. 中国农业科学, 1988, 21 (04):39-45.
 [9] H. 费西克. 六角形单粒穴播法[J]. 农业科学译报, 1960(02):70-71.
 [10] 范福仁,莫惠栋,秦泰辰,等. 玉米种植方式研究 [J]. 作物学报, 1963(04):399-408.
 [11] 范福仁,莫惠栋,秦泰辰,等. 玉米密植程度研究 [J]. 作物学报, 1963(04):381-398.
 [12] 张永科,王立祥,廖允成. 植物站位立体营养调控研究[J]. 江西农业学报, 2012, 24(09):10-14.
 [13] 张永科,王立祥. 玉米蜂巢式高产栽培技术研究及其应用[J]. 作物杂志, 2008(02):81-83.
 [14] 张永科,孙茂,张雪君,等. 玉米密植和营养改良之研究: I 密度对玉米产量和营养的效应[J]. 玉米科学, 2005, 13(03): 87-90.
 [15] 张永科,孙茂,张雪君,等. 玉米密植和营养改良之研究: II 行距对玉米产量和营养的效应[J]. 玉米科学, 2006, 14(02): 108-111.
 [16] 张永科,孙茂,张雪君,等. 玉米密植和营养改良之研究: III 玉米营养面积和玉米生长的相关分析 [J]. 玉米科学, 2006. 15(03):12-132.