

文章编号:1671-6833(2010)06-0095-05

## 响应面法优化芹菜总黄酮的微波提取工艺研究

张泽志<sup>1,2</sup>, 王福安<sup>1</sup>, 高霞<sup>2</sup>, 林钰<sup>2</sup>, 赵建宏<sup>1</sup>

(1. 郑州大学 化工与能源学院, 河南 郑州 450001; 2. 河南教育学院 化学系, 河南 郑州 450014)

**摘 要:** 为研究响应面法优化芹菜总黄酮的最佳微波提取工艺, 在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken Design 试验设计, 研究了微波功率、提取时间、液固比等条件对总黄酮得率的影响。建立了总黄酮得率与因素变量的二次回归模型方程, 该模型回归显著。响应面分析结果表明, 最佳提取条件为: 80% 的乙醇为提取溶剂, 微波功率 520 W, 提取时间 9 min, 液固比 32:1 mL/g, 在此工艺条件下芹菜总黄酮得率为 2.443 mg/g。

**关键词:** 芹菜; 总黄酮; 响应面法; 微波辅助提取

**中图分类号:** TS201.1 **文献标识码:** A

### 0 前言

芹菜(Celery)又名旱芹, 药芹, 为伞形科草本植物, 1 年或 2 年生, 我国各地均有栽培。芹菜含有丰富的黄酮类化合物, 资料<sup>[1-3]</sup>显示, 黄酮类化合物有较好的抗病毒、抗癌症、抗衰老、降低胆固醇及预防心血管疾病等多种药理活性, 其良好的药用价值已引起广泛的关注。因此, 提取芹菜黄酮类物质对开发该药物资源具有一定的指导作用。目前提取芹菜黄酮的方法主要有水浸取法、索氏提取法等传统固-液浸提法<sup>[4-6]</sup>。但这些方法原料消耗大, 产率较低、提取时间长且易造成污染。微波辅助提取(MAE)是近年来发展较快的新型提取方法, 具有高效性和强选择性, 提取时间短、能耗低、节约溶剂等特点, 广泛应用于天然化合物及生物活性成分等物质的提取<sup>[7-9]</sup>。

笔者在单因素试验的基础上, 利用响应面分析法 RSA(Response Surface Analysis)对微波提取芹菜总黄酮得率的影响因素作了系统研究, 建立了总黄酮得率与因素变量的二次回归模型方程, 优化了芹菜总黄酮的最佳微波提取条件, 为芹菜黄酮的开发利用提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

芹菜(市售)、芦丁(中国药品生物制品检定

所, 化学对照品)、95% 乙醇、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{NaOH}$ 、 $\text{NaNO}_2$ 、乙酸乙酯、石油醚等, 均为分析纯。水为石英亚沸 2 次蒸馏水。

TU-1901 紫外-可见光度计, 北京谱析通用仪器有限公司; 微波提取设备为自制改装设备; HR1727 粉碎机, 珠海飞利浦有限公司。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 芦丁标准曲线的制作及回归方程

根据文献[8]方法制作芦丁标准曲线, 回归得到吸光度  $A$  与黄酮浓度  $c$  的线性方程:  $A = 11.70878c - 0.02936$ , 相关系数  $R = 0.9990$ 。

##### 1.2.2 芹菜总黄酮含量的测定

芹菜洗净晾干后切碎, 65℃ 干燥 14 h, 冷却粉碎过孔径尺寸为 0.425 mm 筛备用。准确称取芹菜样品 1.0 g, 置于 150 mL 平底烧瓶中, 按一定液固比加入溶剂。设定微波参数, 提取后取出冷却静置, 抽滤, 滤液定容至 50 mL 作为待测液。取待测液 2 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 用溶剂补充至 3 mL, 加入 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液 0.5 mL, 摇匀后放置 6 min; 然后加入 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液 0.5 mL, 摇匀后放置 6 min; 最后加入 1 mol/L  $\text{NaOH}$  溶液 4 mL, 补充溶剂至刻度, 摇匀后放置 15~20 min, 于 510 nm 处测定其吸光度  $A$ 。

##### 1.2.3 芹菜总黄酮得率计算

由样品提取液吸光度  $A$  计算黄酮的浓度  $c$ , 按下式计算芹菜总黄酮得率。

收稿日期: 2010-05-06; 修订日期: 2010-07-26

基金项目: 河南省社发攻关项目(092102310348)

作者简介: 张泽志(1971-), 男, 河南柘城人, 郑州大学化工与能源学院博士研究生, 主要从事应用化工研究, Email:

zhangzezhi@zzu.edu.cn.

$$Y = [(c \times 10 \times 50/2)/m] \times 100\% \quad (1)$$

式中: $c$ 为黄酮浓度,mg/mL; $m$ 为芹菜样品质量,g.

#### 1.2.4 响应面法优化芹菜总黄酮提取工艺

在单因素试验结果基础上,采用BBD(Box-Behnken Design)试验设计方案,以微波功率、提取时间、液固比等因素为考察变量,以总黄酮得率 $Y$ 为响应值,应用Design-Expert 7.1软件,建立数学回归模型确定芹菜总黄酮的最佳微波提取工艺条件.

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 提取溶剂对芹菜总黄酮得率的影响

不同结构和状态的黄酮类化合物在不同溶剂中的溶解度存在较大差异.分别用80%乙醇、蒸馏水、石油醚、乙酸乙酯等作溶剂试验.结果表明80%乙醇作为提取剂时黄酮得率最大.因此试验采用80%乙醇作为提取剂.

#### 2.1.2 微波提取时间对芹菜总黄酮得率的影响

在乙醇浓度为80%,微波功率为500 W,液固比为30:1 mL/g的条件下,考察微波提取时间对总黄酮得率的影响,结果见图1.

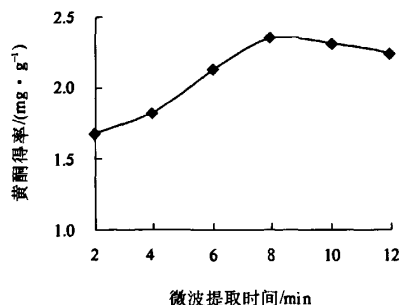


图1 微波提取时间对黄酮得率的影响

Fig.1 Effect of extraction time to flavones yields

从图中可以看出,微波提取时间在8 min内,随着时间的增加,总黄酮得率逐渐增加;提取时间延长,总黄酮得率有所降低.这说明在8 min内时,黄酮逐渐被提取出来;8 min时,黄酮类物质已提取完毕;提取时间增加会导致芹菜糊化而增加溶液的黏度,黄酮被纤维素等吸附反而造成得率减少.

#### 2.1.3 微波功率对芹菜总黄酮得率的影响

固定其他试验参数,不同微波功率对芹菜总黄酮得率的影响结果见图2.总黄酮得率随微波功率的增加先增大而后趋弱,当微波功率为500 W时总黄酮得率最高.低功率微波对细胞的破坏

作用较弱,极性分子运动不剧烈,黄酮浸出少而得率不高;随着微波功率不断增加,溶解渗透、扩散作用加强,细胞膜破裂程度加大,黄酮提取率增加;若微波功率太大,溶剂乙醇易暴沸而不易控制,同时还可能造成黄酮成分发生变性破坏而无法检测.

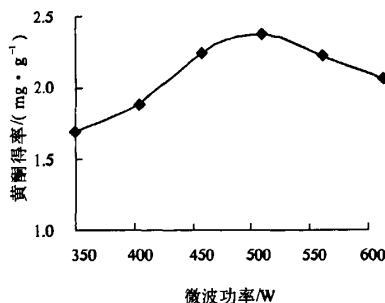


图2 微波功率对黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of microwave powers to flavones yields

#### 2.1.4 液固比对芹菜总黄酮得率的影响

固定其他条件,考察液固比对芹菜总黄酮得率的影响.若溶剂太少无法浸没物料,故选择液固比分别为10:1,20:1,30:1,40:1,50:1 mL/g,结果见图3.

由图3可知,在一定范围内液固比增大,芹菜总黄酮得率呈现由低到高的趋势.溶剂对微波提取产生双重影响:一方面溶剂用量增加提高了液固浓度差,同时增大样品与溶剂的接触面,有利于黄酮扩散速度的提高;另一方面,过多的溶剂会吸收较多微波能,导致物料粉末对微波能吸收减少,细胞破裂不完全,黄酮不能充分溶出.试验选取液固比为30:1 mL/g.

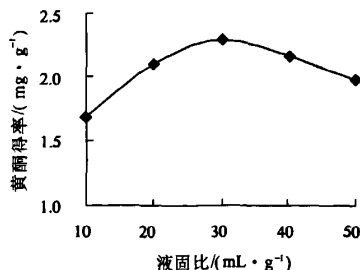


图3 液固比对黄酮得率的影响

Fig.3 Effect of liquid-solid ratio to flavones yields

### 2.2 响应面法对芹菜总黄酮的微波提取工艺优化

#### 2.2.1 响应面分析因素水平的选取

根据BBD试验设计原理,选取微波功率 $X_1$ 、提取时间 $X_2$ 、液固比 $X_3$ 等对总黄酮提取影响显著的3个因素,在单因素试验的基础上采用3因

素 3 水平的响应面分析方法. 试验因素与水平设计见表 1.

表 1 Box-Behnken 试验因素及水平			
Tab. 1 Factors and levels of Box-Behnken design			
水平	因素		
	微波功率 $X_1/W$	处理时间 $X_2/min$	液固比 $X_3/(mL \cdot g^{-1})$
-1	450	6	20:1
0	500	8	30:1
1	550	10	40:1

2.2.2 响应面分析试验结果

根据相应的方案进行试验, 方案及结果见表 2. 将试验数据进行多元回归拟合, 得到以芹菜黄酮得率  $Y$  为目标函数的二次回归方程模型为

$$Y = 2.31 + 0.22X_1 - 0.58X_2 + 0.011X_3 + 0.16X_1X_2 + 0.017X_1X_3 - 0.10X_2X_3 - 0.21X_1^2 - 0.80X_2^2 - 0.10X_3^2$$

(2)

式中:微波功率  $X_1$ 、提取时间  $X_2$  和液固比  $X_3$  在设计中均经量纲线性编码处理, 故方程中各项系数绝对值的大小直接反映了各因素对指标值的影响程度, 系数的正负反映了影响的方向.

试验分析方案及结果如表 2 所示. 对微波提取芹菜黄酮数学模型进行方差分析, 以检验方程的有效性和各因子的偏回归系数, 结果见表 3.

表 2 试验分析方案及结果				
Tab. 2 Box-Behnken design arrangement and the experimental data				
编号	微波功率 $X_1/W$	提取时间 $X_2/min$	液固比 $X_3/(mL \cdot g^{-1})$	黄酮得率 $Y/(mg \cdot g^{-1})$
1	450	10	30:1	1.874
2	500	10	40:1	2.246
3	550	8	20:1	2.176
4	500	6	40:1	2.108
5	500	6	20:1	1.840
6	450	8	20:1	1.907
7	500	8	30:1	2.409
8	500	8	30:1	2.397
9	550	8	40:1	2.289
10	500	8	30:1	2.411
11	500	8	30:1	2.415
12	450	6	30:1	1.823
13	550	6	30:1	1.935
14	550	10	30:1	2.298
15	500	10	20:1	2.180
16	500	8	30:1	2.338
17	400	8	40:1	1.953

从表 3 可以看出, 一次项中  $X_1$ 、 $X_2$  的回归系数极显著, 说明微波功率和提取时间对黄酮得率有极显著影响; 交互项  $X_1X_2$  的偏回归系数显著, 说明微波功率和提取时间的交互项对黄酮的得率有显著影响. 回归方差分析显著性检验结果表明, 该模型回归极显著, 且失拟项不显著, 说明该方程对试验拟合较好.

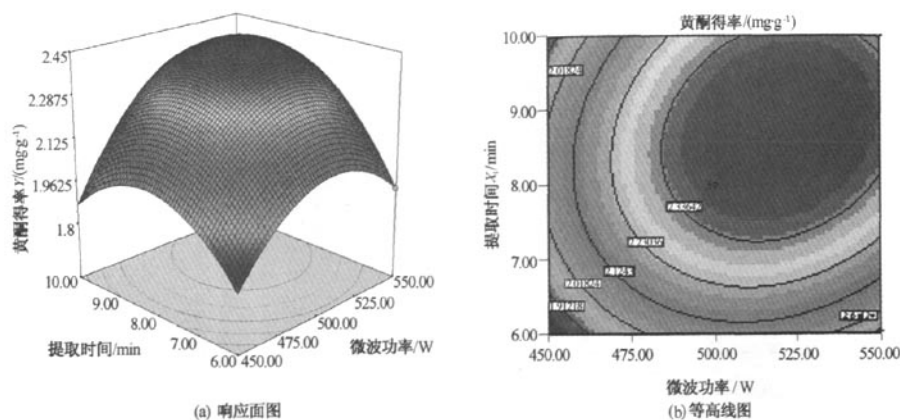
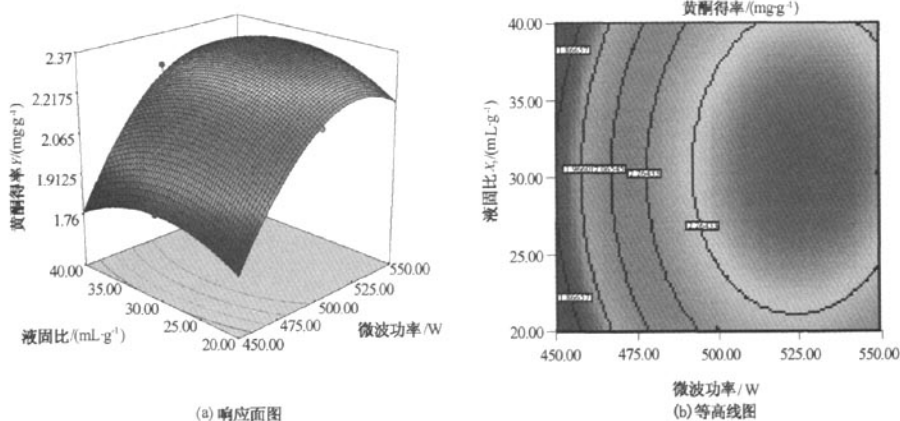
表 3 方差分析表					
Tab. 3 Analysis of mean square					
来源	总和	自由度	均方	F 值	Pr > F
$X_1$	0.13	9	0.13	99.75	<0.000 1
$X_2$	0.077	1	0.077	59.56	<0.000 1
$X_3$	0.000 33	1	0.000 33	0.25	0.629 2
$X_1X_2$	0.024	1	0.024	18.55	0.003 5
$X_1X_3$	0.001 1	1	0.001 1	0.87	0.382 9
$X_2X_3$	0.010	1	0.010	7.87	0.026 3
$X_1^2$	0.19	1	0.19	145.91	<0.000 1
$X_2^2$	0.17	1	0.17	129.53	<0.000 1
$X_3^2$	0.043	1	0.043	33.08	0.000 7
残差	0.009 0	7	0.001 2	—	—
失拟项	0.004 9	3	0.001 6	1.62	0.319 5
净误差	0.004 1	4	0.001 0	—	—
总离差	0.78	16	—	—	—

注:  $Pr < 0.001$  为差异极显著;  $Pr < 0.01$  为差异高度显著;  $Pr < 0.05$  为差异显著

将表 2 中的试验数据对此方程所代表的曲面进行分析, 可以推测出最佳条件在试验中所覆盖的区域. 根据回归方程做出响应曲面和等高线, 考察拟合响应曲面的形状, 分析微波功率、提取时间和液固比对芹菜黄酮得率的影响, 结果见图 4 和图 5. 响应曲面和等高线图直观地反映出各因素交互作用对响应值的影响.

由图 4 可以看出, 黄酮得率随微波功率和提取时间的增加而提高, 两者交互作用显著. 根据动力学理论, 提取功率和时间的延长有助于黄酮的充分扩散析出, 因此适当增加微波功率和提取时间有助于提高黄酮的得率.

由图 5 可知, 在一定范围内黄酮得率随微波功率和液固比的增加呈上升趋势. 液固比的增加能增大液-固两相黄酮的浓度梯度, 从而提高黄酮溶出的速率及其得率. 但随着溶剂量的增加, 回收溶剂耗时耗能造成资源浪费.

图4 微波功率  $X_1$  和提取时间  $X_2$  对黄酮得率  $Y$  交互影响的响应面图和等高线图Fig. 4 Contour and response surface plots of  $Y=f(X_1, X_2)$ 图5 微波功率  $X_1$  和液固比  $X_3$  对黄酮得率  $Y$  交互影响的响应面图和等高线图Fig. 5 Contour and response surface plots of  $Y=f(X_1, X_3)$ 

### 2.2.3 提取工艺条件的优化

采用软件中 Optimization 的 Numerical 功能,在模型浓度范围内选择最低点为出发点,使用最大值优化,优化得微波提取芹菜黄酮的理论工艺条件为:微波功率 520.31 W,提取时间 8.65 min,液固比 32.59:1 mL/g,该条件下芹菜黄酮得率为 2.449 mg/g.

为检验响应曲面法的可靠性,采用上述优化条件进行微波提取黄酮试验,考虑到实际操作的便利,将提取工艺参数修正为微波功率 520 W,提取时间 9 min,液固比 32:1 mL/g,实际测得的平均得率 2.443 mg/g,与理论预测值相比,其相对误差约为 0.02%. 可见,基于响应面法优化所得的微波提取工艺参数准确可靠,具有实用价值.

## 3 结论

采用微波辅助提取技术对芹菜总黄酮进行提

取,以乙醇为提取剂,通过单因素试验和 BBD 试验设计以及 RSA 方法对微波提取工艺进行优化,得出最佳提取条件:乙醇浓度为 80%,微波功率 520 W,提取时间为 9 min,液固比 32:1 mL/g,芹菜中的总黄酮得率为 2.443 mg/g.

建立了芹菜总黄酮得率与各因素变量的二次回归模型方程,该模型回归极显著,且失拟项不显著,说明该方程对试验拟合较好,具有一定应用价值.

## 参考文献

- [1] 延玺,刘会青,邹永青,等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J]. 有机化学, 2008, 28 (9): 1534 ~ 1544.
- [2] 严建刚. 芹菜黄酮提取及其抗氧化与降血脂作用研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学食品科学与工程学院, 2004: 56 ~ 63.

- [3] ELENA A, ALICIA Z, MARTA I, et al. Flavonoids inhibit hypoxia - induced vascular endothelial growth factor expression by a HIF-1 independent mechanism [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 79(11):1600 - 1609.
- [4] 易建华,朱振宝. 酶法提取芹菜黄酮的研究[J]. *食品科技*, 2008(8):144 - 146.
- [5] 许琦. 芹菜总黄酮的提取及含量测定[J]. *食品科技*, 2006(7): 241 - 243.
- [6] 丁爱凤,汪海峰,杨晓蓉,等. 芹菜中木犀草素提取工艺探讨[J]. *中国粮油学报*, 2005, 20(4): 92 - 95.
- [7] 刘世民. 微波法提取芹菜中黄酮类物质的探讨[J]. *食品研究与开发*, 2004, 25(3):48 - 50.
- [8] 高岐,刘宏文. 洋葱中总黄酮的微波提取法[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(1):218 - 219.
- [9] 易军鹏,朱文学,马海乐,等. 响应面法优化微波提取牡丹籽油的工艺研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(14): 99 - 104.

### Optimization of Microwave-assisted Extraction of Flavones from Celery Using Response Surface Analysis

ZHANG Ze - zhi<sup>1,2</sup>, WANG Fu - an<sup>1</sup>, GAO Xia<sup>2</sup>, LIN Yu<sup>2</sup>, ZHAO Jian - hong<sup>1</sup>

(1. School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Department of Chemistry, Henan Institute of Education, Zhengzhou 450014, China)

**Abstract:** The extraction process of total flavones from celery by microwave-assisted extraction using response surface analysis (RSA) was studied. Based on single factor test, Box-Benhnken Design (BBD) was applied to the study of the effects of microwave power, extraction time and liquid-solid ratio on the extraction rate of total flavones. Quadratic regression model equation between the extraction rate of total flavones and the factors was established, and the regression model was significant. The optimal extraction conditions were then determined by RSA as follows: 80% ethanol as solvent, microwave power 520 W, extraction time 9 min and liquid-solid ratio 32:1 ml/g. In this case, the extraction rate of total flavones from celery sample reaches 2.443 mg/g.

**Key words:** celery; total flavones; response surface analysis (RSA); microwave - assisted extraction (MAE)