

# 油松花粉中总黄酮提取的响应面优化

杨志岩<sup>1</sup>, 尹树花<sup>2</sup>, 白明<sup>2</sup>, 郭丽梅<sup>2</sup>

(1. 天津科技大学现代分析技术研究中心, 天津 300457)

(2. 天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 以总黄酮得率为响应值, 采用响应面实验设计方法(RSD)对油松花粉中总黄酮提取工艺进行研究。其最优提取条件为: 温度为80℃, 溶剂乙醇浓度为56%, 液固比为17.9:1, 加热3.2 h回流提取。在此条件下, 用NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaOH显色法测定的总黄酮为1.49%。

**关键词:** 油松花粉; 总黄酮; 提取; 响应面

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)03-0253-05

## Optimization of Extraction of Total Flavonoids from Chinese Pine Pollen by Response Surface Design (RSD)

YANG Zhi-yan<sup>1</sup>, YIN Shu-hua<sup>2</sup>, BAI Ming<sup>2</sup>, GUO Li-mei<sup>2</sup>

(1. Research Center of Modern Analysis, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

(2. College of Material Science and Chemical Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The optimization of extraction of total flavonoids from Chinese pine pollen were studied by Response surface design (RSD). Results showed that the optimal reflux temperature, ethanol content, ratio of the liquid to solid and reflux extraction time were 80 °C, 56%, 17.9:1 and 3.2 h, respectively. Under these conditions, the yield of flavonoids was 1.49%.

**Key word:** Chinese pine pollen; total flavonoids; extraction; response surface

花粉是花蕊的精细胞, 营养丰富, 成分均衡, 具有很高的药用价值和保健功能, 广泛应用于保健品、药品、化妆品和饲料添加剂等领域<sup>[1-3]</sup>。油松花粉营养丰富、全面, 含多种维生素、蛋白质、氨基酸、不饱和脂肪酸、单糖、多糖、黄酮、核酸、膳食纤维等营养物质被称“花粉之王”。黄酮具有很好的生理功能<sup>[4-7]</sup>, 油松花粉中黄酮含量丰富, 含量达1.6%<sup>[8]</sup>, 本文采用响应面设计方法(RSD)<sup>[9]</sup>对影响总黄酮得率的关键因素进行了条件优化研究, 并用“NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaOH”方法测定了油松花粉中总黄酮的含量, 为进一步分析研究油松花粉的营养成份奠定了基础。

响应面设计方法RSD是利用合理的试验设计采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系, 通过回归方程寻求最优工艺参数的一种实验设计方法和数据统计方法。

收稿日期: 2007-11-01

作者简介: 杨志岩(1956-), 男, 汉, 河北滦南县人, 高级实验师, 主要从事天然植物成分提取、分离和分析方法的研究

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

芦丁对照品, 中国(天津)药品生物制品检定所提供; 油松花粉: 河北承德畅达天然营养品有限公司提供; 正己烷, 95%乙醇, 氢氧化钠, 亚硝酸钠, 硝酸铝等试剂均为分析纯。

D-8401 多功能搅拌器; VIS-723G 可见分光光度计; SHB-IV 双循环水式多用真空泵; TDA-8 002 水浴锅; FA2004N 电子天平(分析)。

### 1.2 样品总黄酮的测定: 参见文献<sup>[10]</sup>

#### 1.2.1 标准曲线的绘制

##### 1.2.1.1 对照样品溶液的制备

精密称取在120℃减压干燥至恒重的芦丁对照品200 mg, 置100 mL容量瓶中, 加乙醇70 mL, 置水浴上微热使溶解放冷, 加乙醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取10 mL, 置于100 mL容量瓶中, 加水稀释至刻度, 即得0.2 mg/mL的无水芦丁溶液。

##### 1.2.1.2 标准曲线的制备

精密吸取芦丁对照溶液0.0 mL, 1.0 mL, 2.0 mL, 3.0 mL, 4.0 mL, 5.0 mL和6.0 mL, 分别置于25 mL容量瓶中, 往容量瓶中加入5% NaNO<sub>2</sub>溶液1 mL, 使混匀, 静置6 min, 加往容量瓶中10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>溶液1 mL, 摇匀, 静置6 min, 往容量瓶中加入4% NaOH溶液10 mL, 再加95%乙醇定容至刻度, 摇匀, 静置15 min, 以水作参比, 在510 nm的波长处测定吸光度。芦丁溶液形成络合物后显色的紫外吸收图见图1。

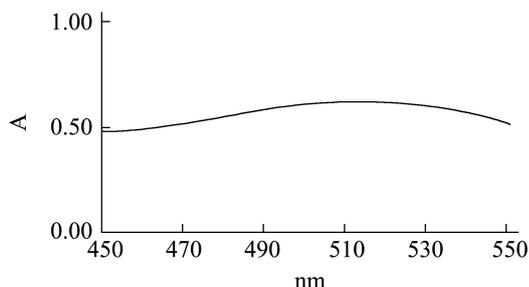


图1 芦丁溶液显色后的紫外吸收图

Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of rutin solution

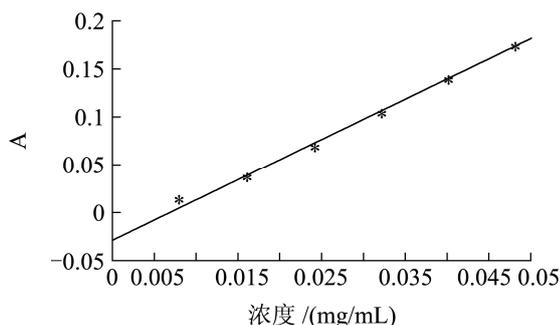


图2 芦丁对照品标准曲线

Fig.2 The calibration curve of control substance of rutin

以吸光度为横坐标, 浓度为纵坐标绘制标准曲线, 如图2。用MATLAB线性回归, 得芦丁浓度Y(mg/mL)与吸光度X的关系为:  $Y = -0.35 + 4.286X$  ( $r = 0.9998$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素的确定

#### 2.1.1 乙醇浓度对黄酮得率的影响

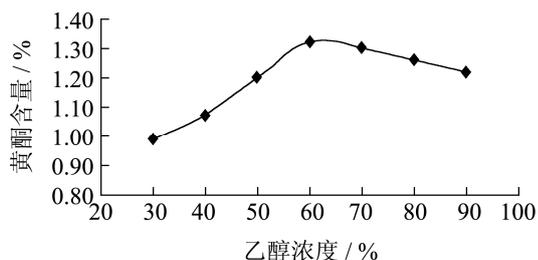


图3 乙醇浓度对提取黄酮的影响

Fig.3 Influence of ethanol concentration to flavonoids

#### extraction

称取10 g花粉, 液固比为10, 分别用30%、40%、50%、60%、70%、80%、95%的乙醇, 在水浴50 °C下回流提取2 h, 过滤得滤液, 减压蒸干液体, 得样品, 并测定样品的黄酮含量, 结果见图3。

从图3可以看出, 当乙醇浓度达到60%时, 黄酮的得率最高, 因此选取适宜的乙醇提取浓度为50%~70%。

#### 2.1.2 温度对提取黄酮的影响

称取10 g花粉, 液固比为10, 分别在常温, 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C相同浓度的乙醇溶剂条件下回流提取2 h, 过滤得滤液, 减压蒸干液体, 得样品, 并测定样品的黄酮得率, 结果见图4。

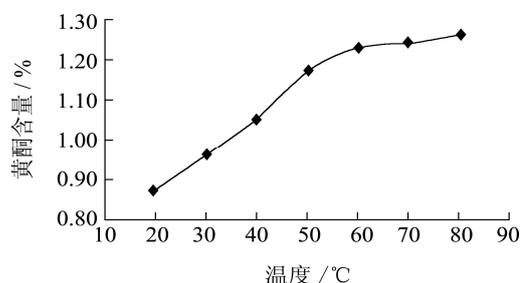


图4 温度对提取黄酮的影响

Fig.4 Influence of temperature to flavonoids extraction

从图4知随着温度的逐渐升高黄酮得率随之升高, 考虑到乙醇沸点(78.31 °C), 温度过高溶剂挥发严重, 因此选适宜提取温度为60 °C~80 °C。

#### 2.1.3 提取时间对提取黄酮的影响

称取10 g花粉, 液固比为10, 在水浴50 °C下分别回流提取1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h过滤得滤液, 减压蒸干液体, 得样品, 并测定样品的黄酮得率, 结果见图5。

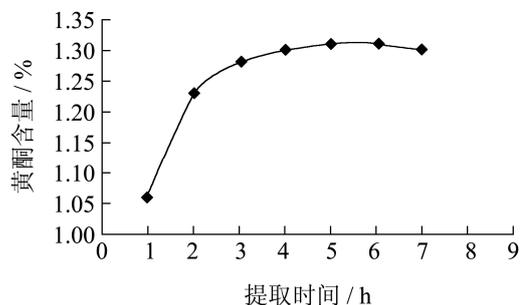


图5 提取时间对提取黄酮的影响

Fig.5 Influence of time to flavonoids extraction

从图5知提取时间延长, 黄酮得率升高, 4 h后黄酮得率基本变化不大, 因此选适宜提取时间范围为2 h~4 h。

#### 2.1.4 液料比对提取黄酮的影响

称取 10 g 花粉, 液料比分别为 5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、40:1、在水浴 50 °C 条件下回流提取 2 h, 过滤得滤液, 减压蒸干液体, 得样品, 并测定样品的黄酮得率, 结果见图 6。

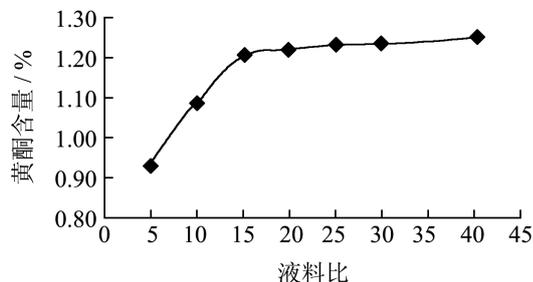


图6 液料比对提取黄酮的影响

Fig.6 Influence of liquid-solid to flavonoids extraction

从图 6 知随着液固比的不断加大, 黄酮得率随之升高, 达到 20:1 后, 得率增长缓慢, 过大的溶剂用量加大回收溶剂时的能耗, 因此选 15~25 为适宜液固比范围。

2.2 实验条件的优化

根据提取时间、溶剂浓度、温度、液固比4个单因素试验所确定的水平范围, 使用Design-Expert 7.0.2 为辅助手段设计响应面实验, 选用中心复合模型 (CCD), 以总黄酮得率为响应值 (指标值), 做四因素三水平共30个实验点 (6个中心点) 的响应面分析实验, 表1为响应面实验因素水平表。表2为响应面实验数据表, 表3为方差分析表。

为了处理数据的方便, 各因素水平要化为标准函数。水平变换公式如下:

时间:  $A=A'-3$

溶剂浓度:  $B=(B'-60)/10$

温度:  $C=(C'-70)/10$

液固比:  $D=(D'-20)/5$

注: A'、B'、C'、D'均为实际水平, A、B、C、D 则为参与分析的逻辑水平

从表3可以看出, 模型是显著的 ( $p<0.0001$ ), 回归模型的决定系数为B (乙醇浓度)、C (水浴温度)、AB (时间与乙醇浓度的交互作用)、CD (温度与液固比的交互作用), 它们的“Prob>F”值分别为0.0048、<0.0001、0.0133、0.0280, 对黄酮得率影响显著, 说明该模型的拟合度较好, 可用此模型得黄酮得率 1.49%。

经回归拟合后, 试验因素对响应值的影响可用回归方程表示为:  $Y=1.34+0.046A-0.073B+0.12C+0.026D-0.066AB-0.044AC+0.012AD-0.006BC+$

$0.029BD-0.057CD-0.068A^2-0.12B^2+0.032C^2-0.063D^2$

表1 响应面实验因素水平表

Table 1 Factorial levels of RSD

因素水平	-1	0	+1
A:时间 t/h	2	3	4
B:乙醇浓度/%	50	60	70
C:温度 T/°C	60	70	80
D:液固比	15	20	25

表2 响应面实验数据表

Table 2 Datas of RSD

Std	Run	Type	A	B	C	D	总黄酮含量
11	1	Fact	-1	1	-1	1	1.05
30	2	Center	0	0	0	0	1.41
18	3	Axial	1	0	0	0	1.29
7	4	Fact	-1	1	1	-1	1.31
12	5	Fact	1	1	-1	1	1.06
24	6	Axial	0	0	0	1	1.21
15	7	Fact	-1	1	1	1	1.21
21	8	Axial	0	0	-1	0	1.31
22	9	Axial	0	0	1	0	1.41
3	10	Fact	-1	1	-1	-1	0.67
20	11	Axial	0	1	0	0	1.19
28	12	Center	0	0	0	0	1.21
26	13	Center	0	0	0	0	1.31
2	14	Fact	1	-1	-1	-1	1.17
17	15	Axial	-1	0	0	0	1.23
10	16	Fact	1	-1	-1	1	1.21
4	17	Fact	1	1	-1	-1	0.89
19	18	Axial	0	-1	0	0	1.23
16	19	Fact	1	1	1	1	1.11
14	20	Fact	1	-1	1	1	1.49
5	21	Fact	-1	-1	1	-1	1.36
23	22	Axial	0	0	0	-1	1.32
27	23	Center	0	0	0	0	1.39
25	24	Center	0	0	0	0	1.41
1	25	Fact	-1	-1	-1	-1	0.86
6	26	Fact	1	-1	1	-1	1.39
8	27	Fact	1	1	1	-1	1.04
13	28	Fact	-1	-1	1	1	1.12
9	29	Fact	-1	-1	-1	1	1.01
29	30	Center	0	0	0	0	1.34

经软件对表 2 中实验数据分析后发现用二阶多项

式回归模型较优。

表3 方差分析表

Table 3 Analyze of mean square

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob>F
Model	0.87	14	0.062	7.14	0.0003
A	0.038	1	0.038	4.37	0.0539
B	0.095	1	0.095	10.90	0.0048
C	0.27	1	0.27	31.02	<0.0001
D	0.012	1	0.012	1.34	0.2645
AB	0.069	1	0.069	7.88	0.0133
AC	0.032	1	0.032	3.60	0.0771
AD	2.256E-003	1	2.256E-003	0.26	0.6189
BC	7.563E-004	1	7.563E-004	0.086	0.7728
BD	0.014	1	0.014	1.58	0.2282
CD	0.052	1	0.052	5.92	0.0280
A2	0.012	1	0.012	1.35	0.2626
B2	0.036	1	0.036	4.10	0.0611
C2	2.715E-003	1	2.715E-003	0.31	0.5857
D2	0.010	1	0.010	1.16	0.2981
残差	0.13	15	8.748E-003		
失拟性	0.10	10	0.010	1.69	0.2925
纯误差	0.030	5	0.006		
总差	1.01	29			

注：“Prob>F”值如果小于 0.05，说明对应的因素对响应值影响显著。

从表 3 的分析中得出本实验中显著的交互影响是 AB 的交互作用和 CD 的交互作用，实验结果见图 7、8。从图 7 看出，随着 A（时间）的增加黄酮的得率增加，达到 0.5 后增加的趋势减慢，并趋于平缓，而 B（乙醇浓度）对黄酮得率影响的变化趋势则是随着 B 的增加先增加后降低，从相应面的图示可以看出，B 在 0 到 -1.0 的范围内，由 A 的交互作用，黄酮的得率较高。从图 8 看出，随着 C（温度）的增加黄酮得率增加。D（液固比）对黄酮得率影响的变化趋势，受 C 的交互作用的影响，当 C 在很低的数值时，随 D 值的增加而增加，当 C 值增加到一定数值时，随 D 值的增加先增加后减小。

从上述回归模型中求最优后所得条件为：反应时间为 3.2 h，乙醇浓度为 56%，反应温度为 80 °C，固液比为 17.9，预测黄酮得率最大值为 1.5133%。实验进行

验证，得黄酮得率分别为 1.49%，1.51%，1.48%，重复性较好。

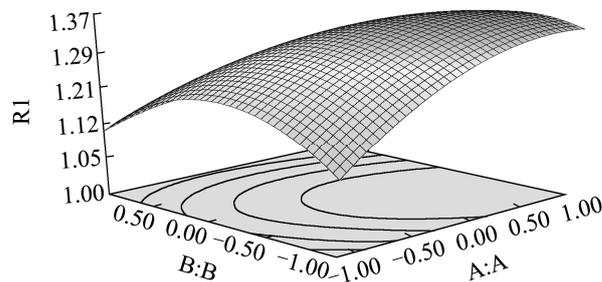


图7 时间与浓度交互作用对黄酮得率影响响应面

Fig.7 Response Surface of interrelated influence of time and concentration to flavonoids rate

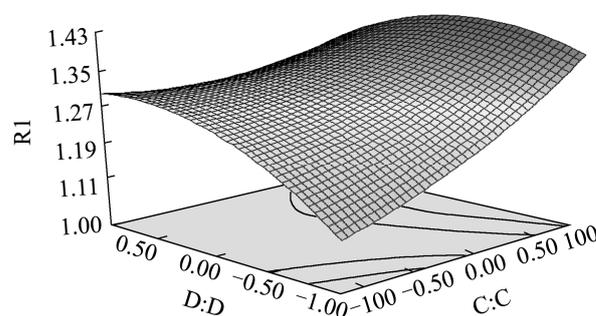


图8 温度与液固比交互作用对黄酮得率影响响应面

Fig.8 Response Surface of interrelated influence of temperature and liquid-solid to flavonoids rate

### 3 小节

响应面法克服了正交设计只能处理离散的水平值，而无法找出整个区域上因素的最佳组合和响应值的最优值的缺陷。本文考察了油松花粉总黄酮的提取，通过单因素实验考察了提取时间、乙醇浓度、水浴温度、液固比对总黄酮得率的影响，应用响应面设计法优化出其最佳提取乙醇浓度 56%，提取时间 3.2 h，液固比 17.9，水浴温度 80 °C，得到油松花粉中的总黄酮含量为 1.49%。

### 参考文献

[1] 王开发.花粉营养成分与花粉资源利用[M].上海:复旦大学出版社,1993.1-52  
 [2] 王开发.我国蜜源花粉资源及几种蜜源花粉的营养成分研究[J].植物学通报,1988,5:163-166  
 [3] 王开发,王隆华,等.玉米花粉黄酮类物质对SD大鼠降血脂作用的研究[J].放射免疫学杂志,2002,358-371

(下转第252页)