

# 响应曲面法优化荞麦总黄酮的提取工艺

孙美<sup>1</sup>, 黄艳菲<sup>1</sup>, 赵小燕<sup>1</sup>, 王静霞<sup>1</sup>, 许云章<sup>1</sup>, 彭镰心<sup>2</sup>, 刘圆<sup>1</sup>

(1. 西南民族大学民族医药研究院, 四川成都 610041) (2. 成都大学生物产业学院, 四川成都 610106)

**摘要:** 以米荞1号种子为原料, 优化荞麦总黄酮的提取工艺条件。在单因素试验基础上, 分别考察提取温度、提取时间、料液比和乙醇体积分数对荞麦总黄酮得率的影响, 确定各因素的适宜水平。再根据Box-Behnken试验设计原理, 利用Design-Expert 7软件进行响应曲面法试验, 并建立总黄酮得率的二次回归方程, 确定最佳提取条件。荞麦总黄酮的最佳提取工艺条件为提取温度68.5℃、提取时间90 min、料液比1:42 (g/mL)、乙醇体积分数69%, 在此条件下得到的实际总黄酮得率为2.157%, 总黄酮得率的预测值为2.291%, 两者基本吻合, 表明此方法应用于荞麦总黄酮提取工艺的优化筛选可行。

**关键词:** 荞麦; 总黄酮; 响应曲面法; 提取工艺

文章编号: 1673-9078(2012)12-1714-1718

## Optimization of Extraction Process for Total Flavonoids from Buckwheat by Response Surface Analysis

SUN Mei<sup>1</sup>, HUANG Yan-fei<sup>1</sup>, ZHAO Xiao-yan<sup>1</sup>, WANG Jing-xia<sup>1</sup>, XU Yun-zhang<sup>1</sup>, PENG Lian-xin<sup>2</sup>, LIU Yuan<sup>1</sup>

(1. Ethnic Medicine Institute, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

(2. College of Biotechnology Industries, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

**Abstract:** The extraction of total flavonoids from *Fagopyrum* of Miqiao 1 was optimized based on one-factor-at-a-time experiments. The effects of extraction temperature, extraction time, material-to-liquid ratio and ethanol concentration on the extraction rate of total flavonoids from buckwheat were investigated. A 4-variable, 3-level was generated by the Design-Expert 7 software and experimental data obtained were subjected to quadratic regression analysis to create a model to find optimal conditions for the extraction of total flavonoids. The optimal extraction conditions were found as: ethanol concentration 69%, material-to-liquid ratio 1:42 (g/mL), extraction temperature 68.5 °C and extraction time 90 min. Under these conditions, the predicted and experimental extraction rate of total flavonoids were 2.291% and 2.157%, respectively. The deviation between the predicted and experimental extraction rate of total flavonoids was small, showing that this method applied to optimization of extraction process for total flavonoids from buckwheat is feasible.

**Key words:** buckwheat; total flavonoids; response surface analysis; extraction process

荞麦为蓼科(*Polygonaceae*)荞麦属(*Fagopyrum Gaertn*)双子叶药食两用作物。主要有两个栽培种, 分别为鞑靼荞麦(苦荞) *Fagopyrum tataricum* L. Gaertn 和普通荞麦(甜荞) *Fagopyrum esculentum* Moench。我国荞麦分布较广, 但华北、西北、东北地区多种植甜荞, 而西南地区的四川、云南、贵州等省则多种植苦荞<sup>[1-2]</sup>。

收稿日期: 2012-08-03

基金项目: 西南民族大学研究生创新型科研项目(CX2013SZ20); 国家科技支撑计划项目(2012BAI27B07); 四川省科技支撑计划项目(2011SZ20233); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(GARS-08-D-3); 四川中医药管理局课题(2010-78)

作者简介: 孙美(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为民族药物; 黄艳菲(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向为民族药物

通讯作者: 彭镰心(1981-), 男, 硕士, 研究方向为食品质量评价; 刘圆(1968-), 女, 博士, 教授, 研究方向为民族药物

荞麦富含蛋白质、维生素、矿质元素等, 最为重要的是含有极为丰富的生物活性成分-黄酮类化合物<sup>[3-4]</sup>, 尤其是苦荞, 相比甜荞黄酮含量要高10~100倍<sup>[5-6]</sup>。现代医学研究表明荞麦具有抗氧化、抗炎症、抗肿瘤、降血糖、降血脂等作用, 而荞麦之所以具有这些药理作用正是由于其所含的黄酮类化合物<sup>[7-9]</sup>。

目前对荞麦总黄酮的提取工艺还主要集中在正交法上, 响应曲面法(Response surface analysis, RSA)与正交法相比采用了更为合理的试验设计, 用最经济方式寻求最优工艺, 具有试验周期短, 求得的回归方程精度高, 对因子及其交互作用也可以进行评价等优点<sup>[10-11]</sup>。

本试验选用了四川省成都市成都大学新培育的苦荞品种米荞1号, 以总黄酮得率为考察指标, 在单因素试验基础上, 采用响应曲面法Box-Behnken试验设计对

荞麦总黄酮提取工艺条件进行优化, 确定最优工艺条件, 为荞麦不同种、不同部位及商品苦荞茶的总黄酮含量测定及进一步开发利用提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

米荞1号, 采于四川省成都市成都大学的荞麦试验田。

无水乙醇、甲醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

Unicam UV-500 (Thermo electron corporation) 紫外可见分光光度计; METTLER AE240 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); W201B 恒温水浴锅(上海申顺生物科技有限公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 总黄酮提取工艺流程

米荞1号干粉→乙醇回流提取→显色→离心→滤液→紫外检测→测定总黄酮含量

#### 1.3.2 总黄酮含量测定

以芦丁为标样, 按照文献<sup>[1,2]</sup>方法测定总黄酮含量。称取芦丁25.05 mg作为对照品, 加入体积分数69%的乙醇溶液定容于50 mL容量瓶中, 得质量浓度为0.501 mg/mL的对照品溶液。精密移取标准溶液6份, 分别稀释成0.1503 mg/mL、0.06012 mg/mL、0.03006 mg/mL、0.01503 mg/mL、0.007515 mg/mL、0.003006 mg/mL的对照品溶液。分别精密吸取5 mL上述对照品溶液置于10 mL比色管中, 加入5%亚硝酸钠0.5 mL并放置6 min, 再加10%硝酸铝0.5 mL并放置6 min, 最后加入4%氢氧化钠4 mL, 摇匀, 放置15 min后于510 nm处测定吸光度A。绘制标准曲线, 得回归方程为:  $A=4.9848x-0.0006$  (线性范围为0.003006~0.1503 mg/mL),  $R^2=0.9999$ 。根据回归方程计算总黄酮含量。

$$\text{总黄酮得率}(\%) = \frac{\text{提取液中总黄酮含量}}{\text{原料质量}} \times 100\%$$

#### 1.3.3 单因素试验

分别以不同的提取溶剂、提取方法、乙醇溶剂体积分数、提取时间、提取温度、料液比、提取次数为对象进行试验, 考察各个因素对荞麦总黄酮得率的影响。

#### 1.3.4 Box-Behnken试验设计

在单因素试验基础上, 采用Box-Behnken试验设计方法, 确定自变量, 以荞麦总黄酮得率为响应值, 采用响应面分析法安排试验, 以获取最佳工艺参数。数据处理采用Design-Expert 7统计软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 提取溶剂的选择

苦荞总黄酮的提取多采用甲醇或乙醇, 故选取体积分数90%甲醇、70%甲醇、90%乙醇和70%乙醇为考察对象。在提取时间均为30 min、料液比均为1:50 (g/mL)、提取方法均采用超声提取的条件下, 分别加入上述不同体积分数的甲醇及乙醇。由图1可知, 体积分数70%乙醇的提取效果最好。

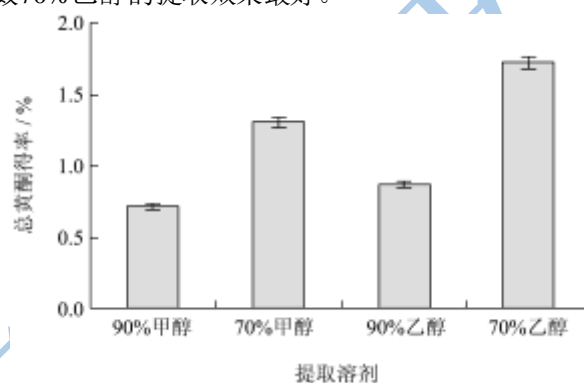


图1 提取溶剂对总黄酮得率的影响

Fig.1 Effect of extraction solvent type on the extraction rate of total flavonoids

#### 2.1.2 提取方法的选择

苦荞总黄酮的提取多采用超声提取或回流提取, 故本试验对这两种提取方法进行比较。在溶剂均为体积分数70%乙醇、提取时间均为30 min、料液比均为1:50 (g/mL)的条件下, 分别采用超声提取和回流提取, 测得总黄酮得率依次为1.708%、1.900%, 表明回流提取效果较超声提取要好。因此, 选用回流提取进行后续的研究。

#### 2.1.3 乙醇体积分数对提取效果的影响

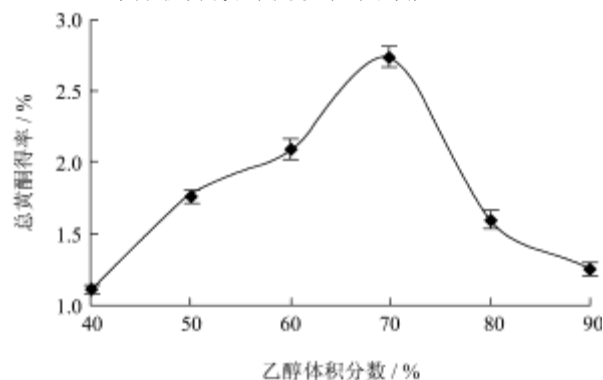


图2 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of total flavonoids

在提取温度为70 ℃、提取时间为90 min、提取次数为1次、料液比为1:50 (g/mL)的条件下, 分别加入体

积分分别为40%、50%、60%、70%、80%、90%的乙醇溶液进行回流提取, 所得结果见图2。

如图2所示, 随乙醇体积分数的增大, 总黄酮得率成上升趋势, 当乙醇体积分数为70%时达到最高, 但随后又下降。这可能由于乙醇体积分数过低时, 水溶性物质大量溶出, 使得提取液黏度较大, 过滤、浓缩、分离均较困难; 而随着乙醇体积分数的升高, 一些醇溶性杂质和脂溶性物质的溶出量增多, 这些成分与黄酮类化合物竞争, 与乙醇-水分子体系结合, 影响黄酮的溶出, 从而导致总黄酮得率下降, 所以最终确定乙醇体积分数为70%。

#### 2.1.4 提取时间对提取效果的影响

在乙醇体积分数为70%、提取次数为1次、提取温度为70℃、料液比为1:50 (g/mL)的条件下, 分别在30 min、60 min、90 min、120 min、150 min的提取时间下进行回流提取, 所得结果见图3。

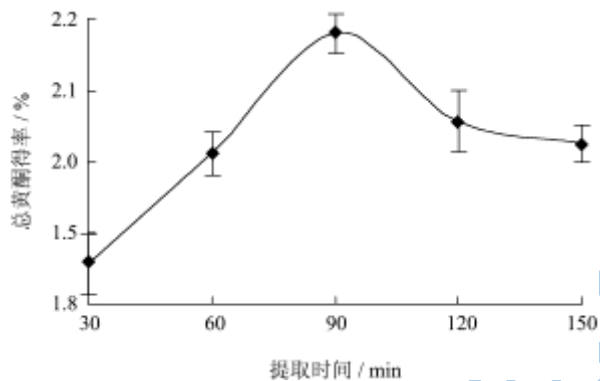


图3 提取时间对总黄酮得率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on the extraction rate of total flavonoids

如图3所示, 随着提取时间的延长, 总黄酮得率增大, 90 min时达到最大值, 继续延长提取时间则有所下降。这是由于在一定范围内延长提取时间可以增加原料与提取液的接触时间, 提高黄酮类物质在乙醇中的溶解度, 但当提取时间过长时, 原料中的其他醇溶性物质也会被溶解提取出来, 造成总黄酮得率的下降。因此, 选取提取时间为90 min为宜。

#### 2.1.5 提取温度对提取效果的影响

在其他条件与上述相同的情况下, 分别考察50℃、60℃、70℃、80℃、90℃的提取温度时对总黄酮得率的影响, 所得结果见图4。

如图4所示, 温度对总黄酮得率影响较大, 在提取温度低于70℃时, 随着提取温度的上升, 总黄酮得率也随之增加, 高于70℃后, 总黄酮得率略有下降。这可能是由于黄酮在乙醇中的溶解度随温度的升高而增加, 同时由于温度升高, 提取液黏度减小, 扩散系数增加, 促使提取速度加快, 但当温度超过70℃后, 由

于温度过高, 使得黄酮类物质易于氧化, 结构受到破坏, 并且温度过高, 杂质的溶出量也会增加, 给后续的分离提纯操作带来不便, 成本费用增大, 造成溶剂损失。综合各方面考虑, 温度以70℃为宜。

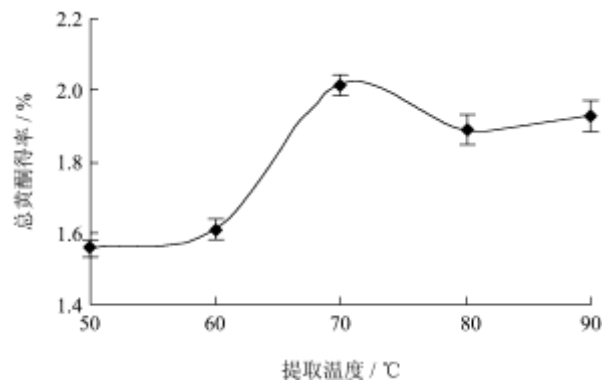


图4 提取温度对总黄酮得率的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on the extraction rate of total flavonoids

#### 2.1.6 料液比对提取效果的影响

其他条件保持不变, 考察在不同料液比为1:10 (g/mL)、1:20 (g/mL)、1:30 (g/mL)、1:40 (g/mL)、1:50 (g/mL)时对总黄酮得率的影响, 所得结果见图5。

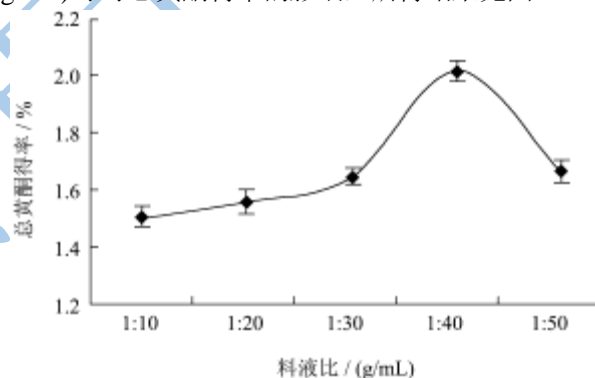


图5 料液比对总黄酮得率的影响

Fig.5 Effect of material-to-liquid ratio on the extraction rate of total flavonoids

如图5所示, 总黄酮得率随着料液比的增大而增大, 在料液比超过1:40 (g/mL)后, 总黄酮得率下降。在一定范围内, 增加溶剂用量利于黄酮类物质的溶出, 然而料液比的增加, 会给后续处理增加困难, 加大生产成本, 因此综合考虑料液比应选取为1:40 (g/mL)。

#### 2.1.7 提取次数对提取效果的影响

在提取条件相同的情况下, 分别考察提取1次、2次、3次、4次时对总黄酮提取效果的影响, 所得结果见图6。

如图6所示, 随着提取次数的增加, 总黄酮得率增加, 但比较提取第3次和第4次的总黄酮得率, 增幅很小, 此时荞麦中残留的黄酮类物质已经很少, 再增加提取次数已无意义, 同时考虑到增加提取次数, 会增

加溶剂的使用量,并增加提取的难度。因此,从减少操作环节及节约成本考虑,黄酮重复提取2次为宜。

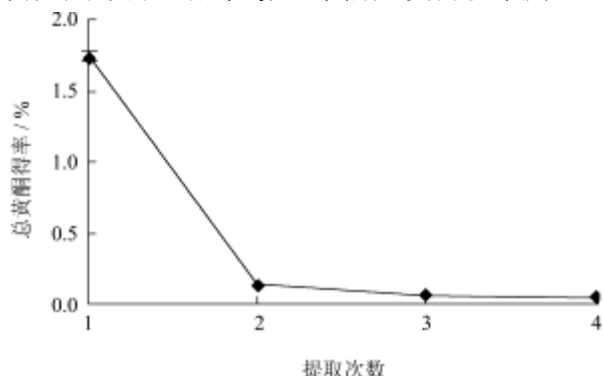


图6 提取次数对总黄酮得率的影响

Fig.6 Effect of extraction number on the extraction rate of total flavonoids

2.2 响应曲面优化试验

2.2.1 设计响应曲面试验

在单因素试验基础上,根据Box-Behnken试验设计原理,选择提取时间(A)、提取温度(B)、料液比(C)、乙醇体积分数(D)进行四因素三水平的响应面分析方法,确定黄酮最佳提取条件,试验因素水平编码设计见表1,试验结果见表2。

表1 响应面优化试验因素水平表

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in response surface analysis

水平	因素			
	A (提取时间/min)	B (提取温度/°C)	C [料液比/(g/mL)]	D (乙醇体积分数/%)
-1	60	60	1:30	60
0	90	70	1:40	70
1	120	80	1:50	80

采用Design-Expert 7软件进行统计分析,得到荞麦总黄酮得率对提取时间(A)、提取温度(B)、料液比(C)和乙醇体积分数(D)的二次多项回归方程:

$$\text{总黄酮得率} = 2.27 + 5.833E-003A - 0.12B + 0.084C - 0.062D + 0.016AB - 8.000E-003AC + 0.043AD - 0.10BC + 5.750E-003BD + 1.250E-003CD - 0.23A^2 - 0.46B^2 - 0.24C^2 - 0.34D^2$$

由回归模型的方差分析结果可知,提取温度、料液比及乙醇体积分数对总黄酮得率的影响极显著;提取时间对总黄酮得率的影响不显著;二次项对总黄酮得率均达到极显著水平;交互项AB、AC、AD、BD、CD对总黄酮得率不显著,BC对总黄酮得率极显著。

由表3可知,模型P<0.0001,表明响应回归模型达到了极显著水平,具有统计学意义;信噪比Adeq

Precision的值很高为21.090,即该模型可用于预测;失逆项F值为2.02,表明使用该方程进行的拟合的效果较好;模型的校正确定系数R<sup>2</sup>=0.9754,说明预测值与试验值之间有良好的相关性,试验误差小;模型的修正相关系数R<sup>2</sup><sub>Adj</sub>=0.9508, R<sup>2</sup><sub>Pred</sub>=0.8753,它们之间相差不大,表明该方程较好地反映了提取时间、提取温度、料液比和乙醇体积分数与总黄酮得率的关系。因此可用此模型对不同提取条件下荞麦总黄酮得率进行预测。

表2 黄酮提取响应面分析方案及结果

Table 2 Flavonoids from the analysis of programs and results by response surface

试验号	A	B	C	D	总黄酮得率/%
1	0	0	-1	1	1.587
2	0	-1	1	0	1.932
3	0	1	-1	0	1.391
4	-1	0	1	0	1.864
5	0	0	-1	-1	1.724
6	0	0	1	-1	1.824
7	0	0	0	0	2.205
8	0	-1	0	-1	1.595
9	1	0	-1	0	1.736
10	1	0	1	0	1.844
11	0	0	0	0	2.277
12	1	-1	0	0	1.740
13	0	0	0	0	2.241
14	0	1	1	0	1.463
15	0	-1	0	1	1.539
16	1	0	0	1	1.611
17	0	-1	-1	0	1.455
18	0	0	1	1	1.692
19	-1	0	-1	0	1.724
20	1	0	0	-1	1.720
21	-1	0	0	-1	1.864
22	-1	1	0	0	1.438
23	0	0	0	0	2.313
24	-1	0	0	1	1.583
25	0	1	0	-1	1.363
26	0	0	0	0	2.321
27	-1	-1	0	0	1.675
28	0	1	0	1	1.330
29	1	1	0	0	1.567

2.2.2 建立模型方程与显著性检验

对该回归模型进行方差分析,结果见表3。



表3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis for the established regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2.29	14	0.16	39.63	<0.0001	**
A	4.08E-004	1	4.08E-004	0.099	0.7579	
B	0.16	1	0.16	38.63	<0.0001	**
C	0.084	1	0.084	20.25	0.0005	**
D	0.047	1	0.047	11.28	0.0047	**
AB	1.02E-003	1	1.02E-003	0.25	0.6264	
AC	2.56E-004	1	2.56E-004	0.062	0.8071	
AD	7.40E-003	1	7.40E-003	1.79	0.2023	
BC	0.041	1	0.041	9.92	0.0071	**
BD	1.32E-004	1	1.32E-004	0.032	0.8606	
CD	6.25E-006	1	6.25E-006	1.51E-003	0.9695	
A <sup>2</sup>	0.33	1	0.33	80.05	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	1.38	1	1.38	332.97	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	0.38	1	0.38	91.98	<0.0001	**
D <sup>2</sup>	0.76	1	0.76	184.21	<0.0001	**
残差	0.058	14	4.13E-003			
失逆项	0.048	10	4.83E-003	2.02	0.2596	
纯误差	9.56E-003	4	2.39E-003			
总变异	2.35	28				

R<sup>2</sup>=0.9754, Adeq Precision=21.090, R<sup>2</sup><sub>Adj</sub>=0.9508, R<sup>2</sup><sub>Pred</sub>=0.8753, CV=3.68%。

注：\*表示显著水平(P<0.05); \*\*表示极显著水平(P<0.01)。

### 2.2.3 响应曲面分析

各因素间交互作用的响应曲面图见图7。

由图7a可以看出,随提取时间和提取温度的增加总黄酮得率先增加而后再下降,当提取时间89.87 min、提取温度68.51 °C时达到最大值;由等高线图可知,提取温度对总黄酮得率的影响比提取时间对总黄酮得率的影响大。图7b表明,总黄酮得率随提取时间的增加和料液比的提高快速增加,在料液比1:42.03(g/mL)、提取时间89.87 min附近可达到响应值最高点;由等高线图可知,料液比对总黄酮得率的影响比提取时间对总黄酮得率的影响大。图7c表明,总黄酮得率随料液比和提取温度的增加先增大后减小,最优点在料液比1:42.03(g/mL)、提取温度68.51 °C;等高线图表明,提取温度对总黄酮得率的影响比料液比对总黄酮得率的影响大。图7d表明,在乙醇体积分数69.07%、提取时间89.87 min附近可达到响应值最高点;通过等高线图可知,乙醇体积分数对总黄酮得率的影响比提取时间对总黄酮得率的影响大。图7e表明,在乙醇体积分数69.07%、温度68.51 °C附近可达到最高点;等高线图表

明,提取温度对响应值的影响比乙醇体积分数对响应值的影响大。图7f显示在乙醇体积分数为69.07%、料液比为1:42.03(g/mL)附近可达到响应值最高点;由等高线图可知,乙醇体积分数对总黄酮得率的影响比料液比对总黄酮得率的影响大。

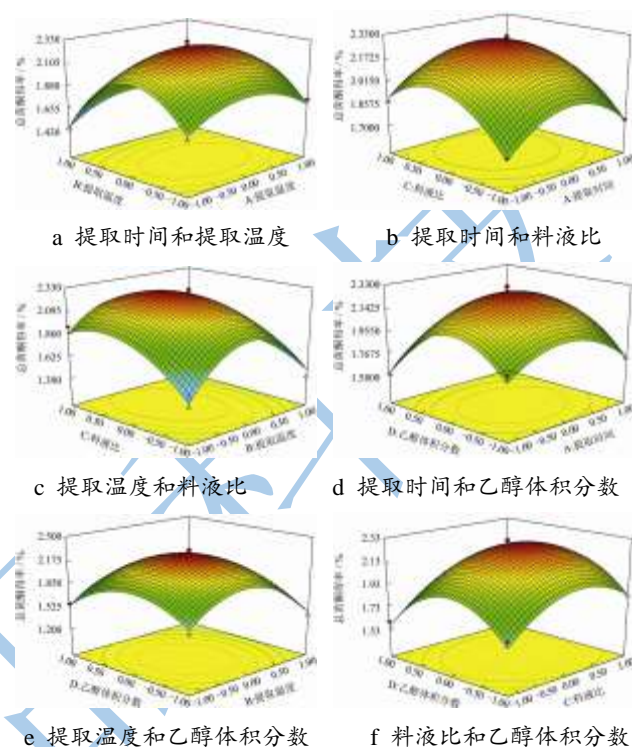


图7 各两因素交互作用对总黄酮得率影响的响应曲面

Fig.7 Response surface plots showing the effects of pairwise interactions of the factors on the extraction rate of total flavonoids

通过Design-Expert 7软件进行统计分析,荞麦总黄酮的最佳提取工艺条件为提取时间89.87 min、提取温度68.51 °C、料液比1:42.03 (g/mL)、乙醇体积分数69.07%,总黄酮得率的预测值为2.291%。考虑实际操作,将实验条件修改为提取时间90 min、提取温度68.5 °C、料液比1:42 (g/mL)、乙醇体积分数69%。

### 2.3 荞麦总黄酮最佳提取条件验证实验

在提取时间90 min、提取温度68.5 °C、料液比1:42 (g/mL)、乙醇体积分数69%的条件下重复回流提取2次,测定实际提取总黄酮得率为2.157%,与预测值2.291%基本吻合,偏差较小。说明得到的回归模型与实际情况拟合很好,进一步验证了该模型的可行性。

### 3 结论

本试验首先通过单因素试验分别考察乙醇体积分数、提取时间、提取温度和料液比对荞麦中总黄酮得率的影响,在此基础上,采用Design-Expert 7软件的Box-Behnken试验方法设计响应曲面试验,得到了较优

的提取工艺条件, 并进行验证实验, 得到最佳提取工艺修正条件为提取时间90 min、提取温度68.5 °C、料液比1:42 (g/mL)、乙醇体积分数69%。

### 参考文献

- [1] 林汝法.中国荞麦[M].北京:中国农业出版社,1994
- [2] 宾婕,刘洁,陈克麟,等.不同来源苦荞中芦丁和槲皮素的含量测定[J].现代食品科技,2011,27(1):117-119
- [3] 郎桂常.苦荞麦的营养价值及其开发应用[J].中国粮油学报,1996,11(3):9-14
- [4] 赵钢,唐宇,王安虎.苦荞的成分功能研究与开发应用[J].四川农业大学学报,2001,19(4):355-368
- [5] Tomomi Mukoda, Buxiang Sun, Aya Ishiguro. Antioxidant activities of buckwheat hull extract toward various oxidative stress in vitro and in vivo [J]. Biological Pharmaceutical Bulletin, 2001,24(3):209-213
- [6] 徐宝才,丁霄霖.苦荞壳中黄酮提取工艺的研究[J].食品工业科技,2002,23(8):40-43
- [7] Sun-Lim Kim, Sung-Kook Kim, Cheol-Ho Park. Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable [J]. Food Research International, 2004, 37(4): 319-327
- [8] Bonafaccia G, Marocchini M, Kreft I. Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat [J]. Food Chemistry, 2003, 80(1):9-15
- [9] 王元颖,郝再彬,李子院,等.不同花中总黄酮的提取及其抗氧化强度的比较[J].现代食品科技,2008,24(11):1145-1147
- [10] 熊子文,罗丽萍,张丽丽.响应面法优化野艾蒿总黄酮的超声波提取工艺[J].食品科学,2010,31(8):38-42
- [11] 杨维,夏杏洲,韩维栋,等.响应面法优化白骨壤果实中黄酮类化合物的提取工艺[J].现代食品科技,2011,27(2):191-195
- [12] 刘玉芬,夏海涛,杨树平.紫外分光光度法测定剑麻花中总黄酮的含量[J].食品科学,2005,26(9):418-419