

Optimizing of Ultrasonic-Assisted Extraction Technology of Total Flavonoids from *Bambusae caulis* in Taenias Based on Response Surface Methodology

Hongmei Guan, Chong Wu, Dengzhao Jiang*

School of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang Jiangxi
Email: jiangdengzhao@126.com

Received: Jun. 12th, 2017; accepted: Jun. 26th, 2017; published: Jul. 4th, 2017

Abstract

Objective: To optimize of ultrasonic-assisted extraction technology of total flavonoids from *Bambusae caulis* in taenias based on response surface methodology. **Method:** On the basis of single-factor experiment, four parameters including ethanol concentration, solid-liquid ratio, ultrasonic power and ultrasonic time were selected as influencing factors and the optimum conditions for total flavonoids extract were obtained through Box-Behnken center united experiment designed by response surface methodology. **Results:** The optimum conditions were as follows; the ethanol concentration was 67%; the solid-liquid ratio was 1:25; the ultrasonic power was 330 W and the ultrasonic time was 26 min. Under the conditions, the extraction rate of total flavonoids could be reached to 3.557%. **Conclusion:** This method is simple, rapid and reliable which could provide reference for the producing of total flavonoids from *Bambusae caulis* in taenias.

Keywords

Bambusae caulis in Taenias, Total Flavonoids, Ultrasonic-Assisted, Response Surface Methodology

响应面法优化超声辅助竹茹总黄酮提取工艺研究

管红梅, 吴冲, 姜登钊*

九江学院药学与生命科学学院, 江西 九江

Email: jiangdengzhao@126.com

收稿日期: 2017年6月12日; 录用日期: 2017年6月26日; 发布日期: 2017年7月4日

摘要

目的: 研究超声辅助提取竹茹总黄酮的最佳工艺条件。方法: 在单因素试验基础上, 选取乙醇浓度、料液比、超声功率及超声时间为影响因素, 采用中心组合实验设计, 以竹茹总黄酮提取率为响应值进行响应面分析。结果最佳工艺条件为: 乙醇浓度67%、料液比1:25、超声功率330 W、超声时间26 min, 竹茹总黄酮得率为3.557%。结论: 该工艺提取率高、操作简便, 可为竹茹总黄酮的提取提供参考。

关键词

竹茹, 总黄酮, 超声辅助, 响应面法

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

竹茹(*Bambusae caulis in taenias*)为禾本科植物青秆竹 *Bambusatuldoides* Munro、大头典竹 *Sinocalamus beecheyanus* (Munro) McClure var. *pubescens* P. F. Li 或淡竹 *Phyllostachys nigra* (Lodd.) Munro var. *henonis* (Mitf.) Stapf ex Rendle 的茎秆的干燥中间层[1]。竹茹性微寒, 味甘, 归肺、胃、心、胆经, 临床用于痰热咳嗽, 胆火挟痰, 烦热呕吐, 惊悸失眠, 中风痰迷, 舌强不语, 胃热呕吐, 妊娠恶阻和胎动不安等症[1]。现代研究表明, 竹茹中主要含有木栓酮、木栓醇、羽扇豆稀酮、羽扇豆稀醇和香树脂醇为主的五环三萜类化合物[2] [3], 并具有良好的降脂、降压、抗疲劳、抗肿瘤等活性[4] [5] [6]。而最新的研究表明竹茹中的多糖类成分具有显著的免疫调节活性[7]。而我们在前期研究中发现, 竹茹中还存在大量的黄酮类成分, 本研究在单因素实验的基础上, 采用中心组合(Box-Benhnken)实验设计, 优化超声辅助提取竹茹总黄酮的最佳工艺条件, 为进一步研究竹茹的化学成分提供实验依据。

2. 材料与仪器

2.1. 实验材料

竹茹为江西省樟树市庆仁中药饮片有限公司生产饮片, 经九江学院刘可越教授鉴定为淡竹 *Phyllostachys nigra* (Lodd.) Munro var. *henonis* (Mitf.) Stapf ex Rendle 茎秆的干燥中间层。芦丁对照品购自大连美仑生物技术有限公司(含量≥98%), 95%乙醇, 亚硝酸钠, 氢氧化钠, 硝酸铝均为分析纯试剂。

2.2. 实验仪器

SB25-12DTD 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司); JSP-200 型高速多功能粉碎机(浙江永康市金穗机械制造有限公司); GZX-9030MBE 电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); EV341 旋转蒸发仪(北京莱伯泰科仪器股份有限公司); UV9100 全自动紫外可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器股份有限公司); BS224S 电子分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)。

3. 实验方法

3.1. 标准曲线的建立

精密称取芦丁对照品 10.0 mg, 置 25 ml 容量瓶中, 加入 80% 乙醇溶液定容, 得到 400 $\mu\text{g/ml}$ 的芦丁母液。精密吸取 0、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 芦丁标准液于 10 ml 容量瓶内, 各加 80% 乙醇至 5 ml, 5% 的 NaNO_2 0.5 mL, 摇匀静置 6 min, 加入 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.5 mL, 摇匀静置 6 min, 加入 4% 的 NaOH 4 mL, 摇匀静置 15 min [8]。在 510 nm 波长处测定吸光度(A), 以吸光度(A)为纵坐标, 对照品浓度(C)为横坐标绘制标准曲线, 实验结果见图 1。

3.2. 单因素实验

以料液比(1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30)、乙醇浓度(40%, 50%, 60%, 70%, 80%)、超声功率(120, 180, 240, 300, 360W)、超声时间(10, 15, 20, 25, 30 min)为因素进行单因素实验, 考察各个因素分别对竹茹总黄酮得率的影响。

3.3. Box-Behnken 试验设计与数据处理

在单因素实验基础上, 采用中心组合(Box-Behnken)试验设计方法, 确定自变量, 以竹茹总黄酮得率为响应值, 采用响应面分析法安排实验以获取最佳提取条件, 并用 Design-Expert 8.0 软件进行数据分析, 实验设计因素水平见表 1。

3.4. 最佳工艺验证实验

精密称取竹茹粉末 3.00 g (平行 3 份), 根据 2.3 所得最佳提取工艺条件下提取竹茹总黄酮, 计算总黄酮提取率。

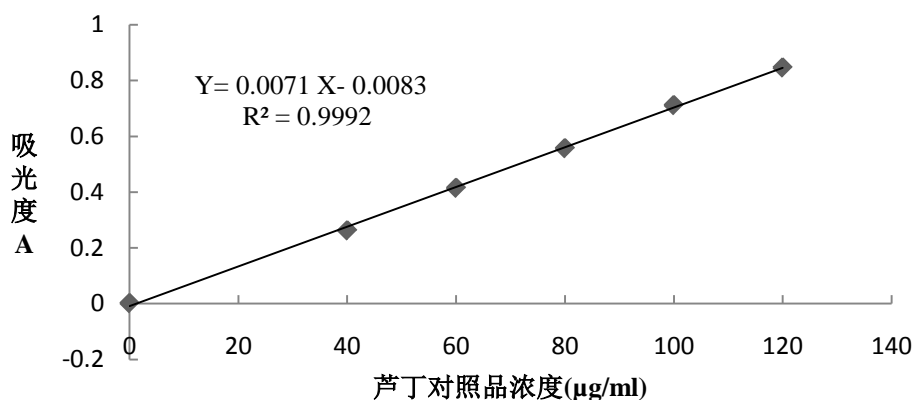


Figure 1. The standard curve of rutin

图 1. 芦丁标准曲线

Table 1. Response surface analysis of test design factors and levels

表 1. 响应面分析试验设计因素和水平

水平	因素			
	A 料液比(1:X)	B 乙醇浓度(%)	C 超声功率(W)	D 超声时间(min)
-1	20	60	240	20
0	25	70	300	25
1	30	80	360	30

4. 结果与分析

4.1. 单因素实验结果

4.1.1. 料液比对竹茹总黄酮的提取影响

在超声时间 15 min、乙醇浓度 60%、超声功率 240 W 的条件下,考察料液比(1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30)对竹茹总黄酮提取率的影响,实验结果见图 2。由图 2 可见,随料液比的增加,竹茹总黄酮提取率明显升高,当料液比大于 1:25 (g/mL)时,提取率增加趋于平缓。

4.1.2. 乙醇浓度对竹茹总黄酮的提取影响

在超声时间 15 min,超声功率 240 W,料液比 1:20 的条件下,考察乙醇浓度(40%, 50%, 60%, 70%, 80%)对竹茹总黄酮得率的影响,实验结果见图 3。由图 3 可见,随着乙醇浓度的提高,竹茹总黄酮的提取率也随之升高,70%乙醇的提取率最高。

4.1.3. 超声功率对竹茹总黄酮的提取影响

在乙醇浓度 60%,超声时间 15 min,料液比 1:20 的条件下,考察超声功率(120, 180, 240, 300, 360 W)对竹茹总黄酮提取率的影响,实验结果见图 4。由图 4 可见,随超声功率的增加,竹茹总黄酮提取率明显升高,当超声功率大于 300 W 时,提取率增加趋于平缓。

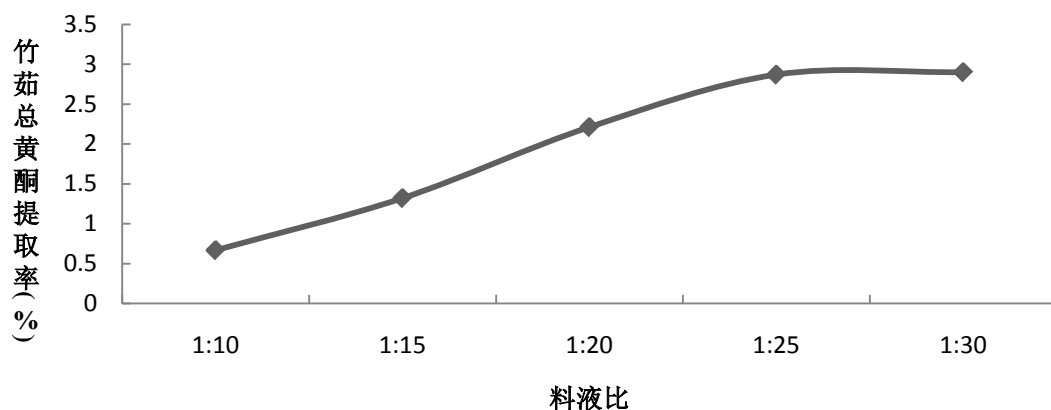


Figure 2. Effect of solid-liquid ratio on extraction of total flavonoids

图 2. 料液比对竹茹总黄酮的提取影响

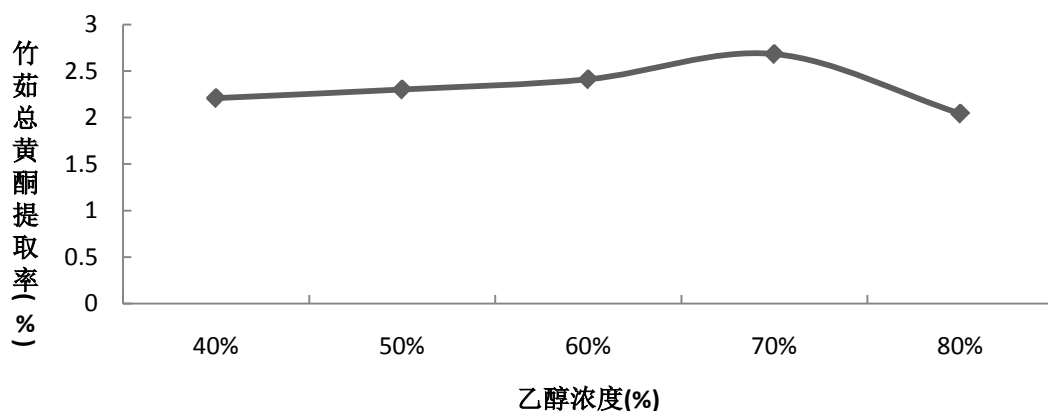


Figure 3. Effect of ethanol concentration on extraction of total flavonoids

图 3. 乙醇浓度对竹茹总黄酮的提取影响

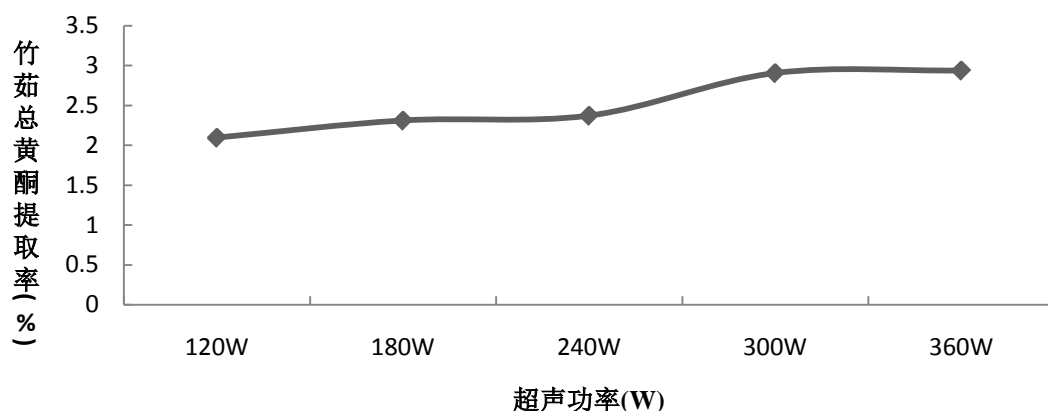


Figure 4. Effect of ultrasonic power on extraction of total flavonoids

图 4. 超声功率对竹茹总黄酮的提取影响

4.1.4. 超声时间对竹茹总黄酮的提取影响

在乙醇浓度 60%，超声功率 240 W，料液比 1:20 的条件下，考察超声时间(10, 15, 20, 25, 30 min)对总黄酮得率的影响，实验结果见图 5。由图 5 可见，随着超声时间的增加，竹茹总黄酮提取率先升高后降低，提取时间为 25 min 时达到最高值。

4.1.5. 响应面 Box-Behnken 分析

响应面 Box-Behnken 实验设计及结果见表 2，回归模型方差分析结果见表 3。由表 3 的方差分析可知，模型的 F 检验结果 $P < 0.01$ ，为差异有统计学意义；失拟度得出的 F 检验结果 $P > 0.05$ ，为差异无统计学意义，这两者说明实验数据与模型相符，模型选择正确；各项的方差分析表明 C, A^2 , B^2 , C^2 对总黄酮得率有显著的影响。各个因素对类黄酮提取率影响的程度大小的次序为超声功率>乙醇浓度>超声时间>料液比。

以竹茹总黄酮的提取率 Y 为响应值，各因素经回归拟合后的二次多项回归方程为：

$$\begin{aligned} \text{黄酮提取率}(\%) Y = & -32.27022 + 0.84342A + 0.34647B + 0.059524C + 0.28788D \\ & + 1.80 \times 10^{-3} AB - 1.70 \times 10^{-4} AC - 0.018281A^2 \\ & - 2.89275 \times 10^{-3} B^2 - 8.35833 \times 10^{-5} - 5.566 \times 10^{-3} D^2 \end{aligned}$$

根据回归方程作响应面和等值线图，见图 6 和图 7。等高线图同一曲线上总黄酮得率相同，图形中心得率最高。两因素之间交互作用可以直观的通过中心区域的等值线圆形程度和位置来判断，等值线圆形形状越扁，且越偏离中心位置交互作用越大，对总黄酮得率的影响越显著。

4.1.6. 验证试验

对实验模型分析，得出最佳料液比为 1:24.86，乙醇浓度为 67.63%，超声功率为 330.78 W，超声时间为 25.86 min，求得理论总黄酮得率为 3.495%。将条件修正料液比为 1:25，乙醇浓度为 68%，超声功率为 330 W，超声时间为 26 min，并在此条件下进行验证试验，平行三次，测得竹茹总黄酮提取率平均值为 3.557%，与理论值相对误差为 1.77% [9]，表明该工艺稳定，重现性好。

5. 讨论

本研究采用响应面法优化超声辅助提取竹茹总黄酮的生产工艺。响应面法采用多元二次回归方法作为函数估算工具，利用多项式近似拟合多因子实验中因素和指标的相互关系，并对函数的等高线和响应面进行分析，研究响应面和因子，因子和因子之间的相互关系[10]。与正交试验设计相比，Box-Behnken

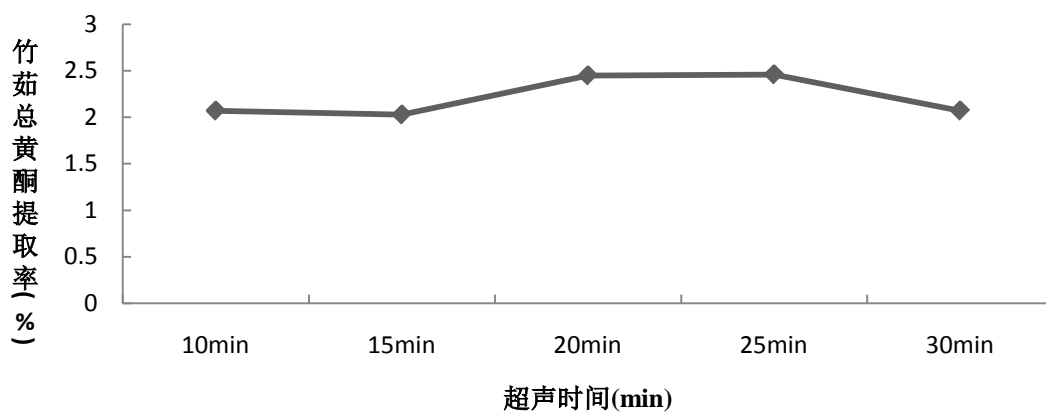


Figure 5. Effect of ultrasonic time on extraction of total flavonoids

图 5. 超声时间对竹茹总黄酮的提取影响

Table 2. Box-Behnken experimental design and results

表 2. 响应面 Box-Behnken 实验设计及结果

序号	料液比(A)	乙醇浓度(B)	超声功率(C)	超声时间(D)	总黄酮提取率(%) (Y)
1	0	0	0	0	3.338
2	0	-1	-1	0	2.729
3	-1	-1	0	0	2.723
4	-1	0	0	-1	2.645
5	0	1	0	-1	3.243
6	0	0	0	0	3.296
7	-1	0	-1	0	2.205
8	1	1	0	0	2.507
9	1	-1	0	0	2.588
10	0	0	-1	-1	2.500
11	0	0	-1	1	2.784
12	0	0	1	1	3.113
13	0	1	-1	0	2.286
14	0	0	0	0	3.338
15	0	0	0	0	3.478
16	0	0	1	-1	2.928
17	-1	0	0	1	2.886
18	-1	0	1	0	3.302
19	1	0	-1	0	2.450
20	0	0	0	0	3.529
21	1	0	0	1	2.775
22	0	-1	0	1	3.244
23	1	0	0	-1	2.642
24	-1	1	0	0	2.282
25	0	1	0	1	2.931
26	0	1	1	0	2.785
27	0	-1	1	0	3.172
28	1	0	1	0	3.343
29	0	-1	0	-1	3.200

Table 3. Regression model variance analysis results
表 3. 回归模型方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
模型	3.2901	10	0.3290	6.7663	0.0002	显著
A-料液比	0.0057	1	0.0057	0.1176	0.7356	
B-乙醇浓度	0.2192	1	0.2192	4.5088	0.0478	显著
C-超声功率	1.1340	1	1.1340	23.322	0.0001	显著
D-超声时间	0.0275	1	0.0275	0.5666	0.4613	
AB	0.0324	1	0.0324	0.6663	0.4250	
AC	0.0104	1	0.0104	0.2139	0.6492	
A ²	1.3548	1	1.3548	27.863	<0.0001	显著
B ²	0.5427	1	0.5427	11.162	0.0036	显著
C ²	0.5872	1	0.5872	12.078	0.0027	显著
D ²	0.1255	1	0.1255	2.5829	0.1254	
残差	0.8752	18	0.0486			
失拟项	0.8341	14	0.0595	5.7926	0.0512	不显著
纯误差	0.0411	4	0.0102			
总变异	4.1653	28				

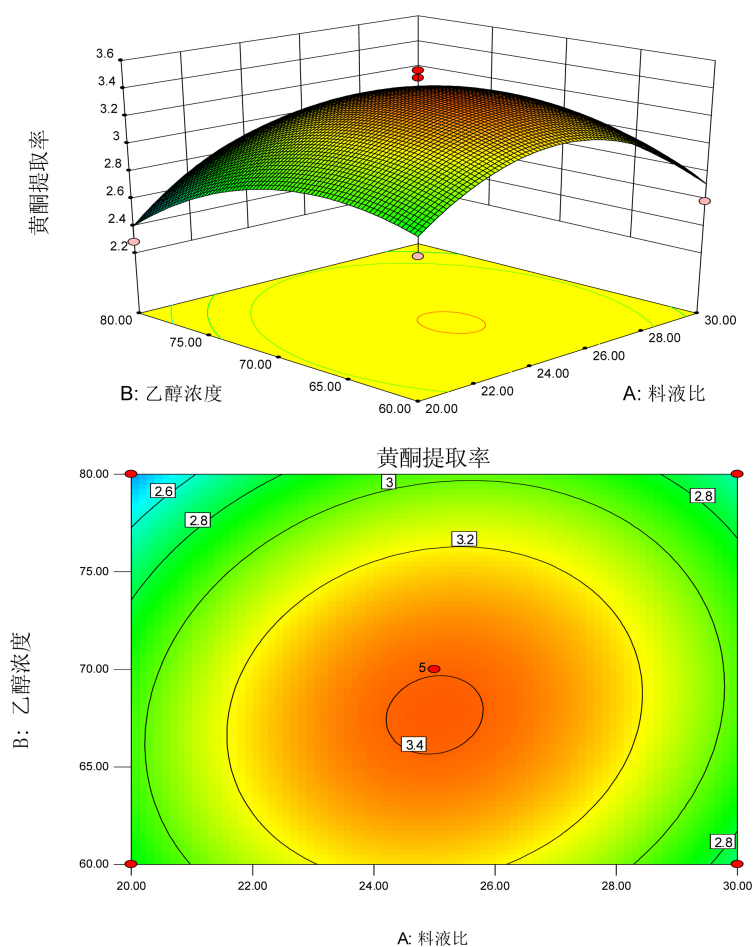


Figure 6. Response faces and contour lines of solid-liquid ratio and ethanol concentration on the total flavonoids extraction

图 6. 料液比和乙醇浓度对竹茹总黄酮提取率交互作用的响应面图和等高线

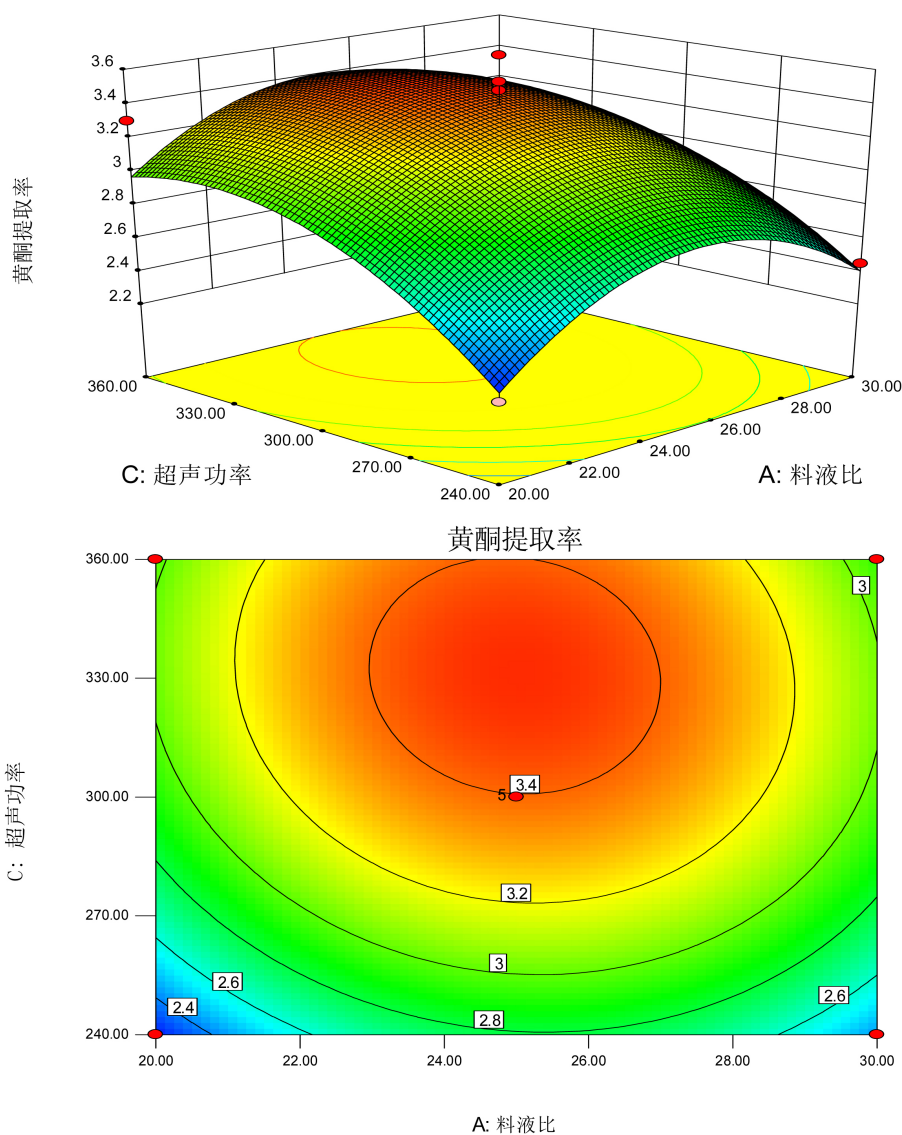


Figure 7. Response faces and contour lines of solid-liquid ratio and ultrasonic power on the total flavonoids extraction

图 7. 料液比和超声功率对竹茹总黄酮提取率交互作用的响应面图和等高线

设计可以评价指标和因素间的非线性关系，对实验影响因素的研究更为全面，能够精确反映提取工艺的最佳条件，并能从图形分析寻求最优实验考察因素值，具有周期短，回归方程精度高，条件预测性好等优点，对于非线性影响因素的预测指导性更强，因此具备更好的推广应用价值[11]。

本研究采用 4 因素 3 水平响应面法对竹茹总黄酮的提取工艺进行优化，最终确定了最佳提取条件，验证实验测得竹茹总黄酮提取率平均值为 3.557%，与理论值相对误差为 1.77%，充分验证了所建立的模型的正确性。实验表明超声辅助提取竹茹总黄酮效率高、操作简便，可为其生产及进一步研究提供参考。

参考文献 (References)

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 139.
- [2] 姚晓宝. 竹茹中三萜类化合物的研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2004.

- [3] 楼鼎鼎. 竹茹超临界萃取物的组成分析和功能性研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [4] Jiao, J., Zhang, Y., Lou, D., *et al.* (2007) Antihyperlipidemic and Antihypertensive Effect of a Triterpenoid-Rich Extract from Bamboo Shavings and Vasodilator Effect of Friedelin on Phenylephrine-Induced Vasoconstriction in Thoracic Aortas of Rats. *Phytotherapy Research*, **21**, 1135-1141. <https://doi.org/10.1002/ptr.2223>
- [5] Zhang, Y., Yao, X., Bao, B., *et al.* (2006) Anti-Fatigue Activity of a Triterpenoid-Rich Extract from Chinese Bamboo Shavings (*Caulis bambusae in taeniam*). *Phytotherapy Research*, **20**, 872-876. <https://doi.org/10.1002/ptr.1965>
- [6] Lu, B., Liu, L., Zhen, X., *et al.* (2013) Anti-Tumor Activity of Triterpenoid-Rich Extract from Bamboo Shavings (*Caulis bambusae in Taeniam*). *African Journal of Biotechnology*, **9**, 6430-6436.
- [7] 黄菊青. 竹茹多糖的化学结构和免疫活性研究[D]: [博士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [8] 陈红梅, 谢翎. 响应面法优化半枝莲黄酮提取工艺及体外抗氧化性分析[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 45-50.
- [9] 杨仙凌. 响应面法优化拳参总蒽醌超声提取工艺的研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 408-410.
- [10] Yan, Y., Yu, C., Chen, J., *et al.* (2011) Ultrasonic-Assisted Extraction Optimized by Response Surface Methodology, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Tremella mesenterica*. *Carbohydrate Polymer*, **83**, 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.045>
- [11] 严云良, 余陈欢. 响应面分析法优化小鱼仙草总黄酮的提取工艺研究[J]. 数理医药学杂志, 2010, 23(2): 194-197.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: pi@hanspub.org