

回流提取长白楸木嫩芽皂苷、黄酮工艺研究

孟宪军, 刘 欣, 冯 颖*
(沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要: 根据中心组合(Box-Behnken)试验设计原理采用响应面分析法, 在单因素试验基础上, 分别对回流法提取长白楸木中的皂苷与黄酮的工艺参数进行优化。结果表明: 回流法提取长白楸木中皂苷的最优工艺参数组合为乙醇体积分数 80%、料液比 1:65.3(g/mL)、时间 2h、温度 94.1℃, 预测皂苷最大提取量为 74.65mg/g, 实际测得皂苷最大提取量为 70.25mg/g; 回流法提取长白楸木中黄酮的最优工艺参数组合为乙醇体积分数 60%、料液比 1:60(g/mL)、时间 4h、温度 100℃, 预测最大提取量为 20.56mg/g, 实际测得最大提取量为 19.86mg/g。

关键词: 长白楸木; 回流提取; 皂苷; 黄酮; 响应面法

Optimization of Refluxing Extraction for Saponins and Flavonoids from *Aralia continentalis*

MENG Xian-jun, LIU Xin, FENG Ying*
(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: On the basis of single factor tests, response surface methodology based on Box-Behnken design principle was used to optimize the process parameters of refluxing extraction for saponins and flavonoids from *Aralia continentalis*, respectively. Results showed that the optimal extraction conditions for saponins were ethanol concentration of 80%, material-liquid ratio of 1:65 (g/mL), extraction time of 2 h and extraction temperature of 94.1 °C; the optimal extraction conditions for flavonoids were ethanol concentration of 60%, material-liquid ratio of 1:60, extraction time of 4 h and extraction temperature of 100 °C. The yields of saponins and flavonoids were 74.65 mg/g and 19.86 mg/g, respectively, which were consistent with the predicted values of 70.25 mg/g and 20.56 mg/g.

Key words: *Aralia continentalis*; refluxing saponins; flavonoids; response surface methodology

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)10-0051-06

长白楸木(*Aralia continentalis*)属五加科楸木属, 又名草本龙芽, 草本刺老芽, 东北土当归。在其根、茎、叶、花和果实中还含有丰富的皂苷、黄酮、木质素、生物碱、挥发油等成分^[1-4]。具有医药功效, 历代本草记载有“楸木, 治水瘤、除风疾”, “补腰肾、壮筋骨^[5-6]”, 是一种集营养保健和治疗于一身的天然保健食品。

近年来许多研究机构都着手于长白楸木根茎中的功能成分的研究^[7], 关于其嫩芽中的皂苷、黄酮报道比较少见。而通过对一些资料的研究发现其嫩芽中的皂苷、黄酮总量数目也相当可观^[8-9], 因此本实验着以长白楸木嫩芽为原料采用热回流提取方法, 研究提取过程中提取液浓度、料液比、提取时间、提取温度对提取量的影

响, 通过响应面分析方法优化皂苷、黄酮提取工艺^[10-11]。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

长白楸木 沈阳农业大学园艺学院; 无水乙醇、香草醛冰醋酸、高氯酸、乙酸乙酯、氢氧化钠、亚硝酸钠、亚硝酸铝均为分析纯。

索氏提取器; 电热恒温水浴锅 常州国华电器有限公司; UV-1600 紫外分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 皂苷和黄酮的提取

收稿日期: 2011-05-31

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31000803)

作者简介: 孟宪军(1960—), 男, 教授, 博士, 研究方向为果蔬加工。E-mail: mengxjsy@126.com

* 通信作者: 冯颖(1975—), 女, 副教授, 博士后, 研究方向为果蔬加工。E-mail: fywjg@sina.com

取 1g 干燥粉碎后的长白楸木嫩芽粉末, 用滤纸包好, 放入索氏提取器样品室内, 加入一定量一定体积分数的乙醇提取剂, 水浴加热回流提取一定时间后, 收集提取液, 过滤, 将滤液收集至容量瓶中, 用相应体积分数的提取液定容至 100mL。

1.2.2 皂苷和黄酮含量的测定

按照文献[1]的方法进行测定。

1.2.3 响应面试验

选择乙醇体积分数、提取时间、料液比、提取温度进行单因素试验, 确定其对热回流提取皂苷、黄酮的影响关系。在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 设计法(表 1), 设计响应面试验(采用真实值代码), 对提取工艺进行优化试验。模型通过最小二乘法拟合, 二次多项方程可表达为: $Y = A_0 + \sum A_i X_i + \sum A_{ii} X_i^2 + \sum A_{ij} X_i X_j$ 。

表 1 Box-Behnken 设计响应面试验因素及水平表

Table 1 Factors and levels in Box-Behnken central composite design

水平	因素			
	X_1 乙醇体积分数/%	X_2 料液比(g/mL)	X_3 时间/h	X_4 温度/℃
1	50	1:60	2	80
2	70	1:70	3	90
3	95	1:80	4	100

2 结果与分析

2.1 单因素试验分析

2.1.1 原料粉碎粒度对提取量的影响

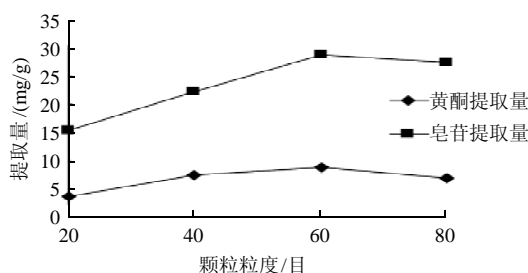


图 1 颗粒粒度对提取率的影响

Fig.1 Effect of particle size on extraction rate of saponins and flavonoids

从图 1 可以看出, 皂苷得率高于黄酮, 而且原料粉碎粒度在过 20~60 目筛范围内, 随着粉碎粒度的减小皂苷、黄酮得率逐渐增大, 而在过 80 目筛后得率反而降低。原因可能是粉碎粒度太细导致原料表面张力增大, 不利于有效成分的溶出。故原料粉碎粒度选择过 60 目筛为宜。

2.1.2 乙醇体积分数对提取量的影响

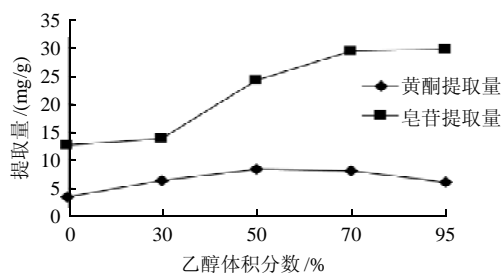


图 2 乙醇体积分数对提取量的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on extraction rate of saponins and flavonoids

由图 2 可知, 随乙醇体积分数增加, 提取剂沸点越来越低, 达到回流越来越容易, 多次的回流使物料与提取液充分接触, 提高了提取量^[12]。但当乙醇体积分数达到 95% 时, 皂苷提取量不再增加, 而黄酮提取量则呈现下降趋势。说明二者的极性不同, 黄酮的极性更大, 而 95% 乙醇极性较小不利于黄酮的提取。

2.1.3 料液比对提取量的影响

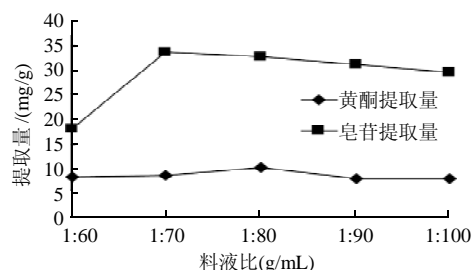


图 3 料液比对提取量的影响

Fig.3 Effect of material-liquid ratio on extraction rate of saponins and flavonoids

由图 3 可知, 随提取剂体积的增加, 皂苷和黄酮的提取量均呈现先增加后降低的趋势。其中皂苷提取量受到的影响更大。

2.1.4 提取时间对提取量的影响

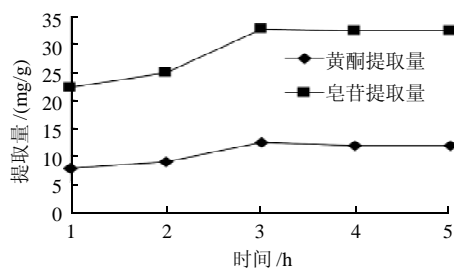


图 4 提取时间对提取量的影响

Fig.4 Effect of extraction time on extraction rate of saponins and flavonoids

由图4可知,提取时间越长,提取剂回流次数越多,提取室内提取剂与物料接触时间长提取效果好^[13]。当时间达到一定程度后,提取量趋于稳定。由图可知在3h后提取基本充分。

2.1.5 提取温度对提取量的影响

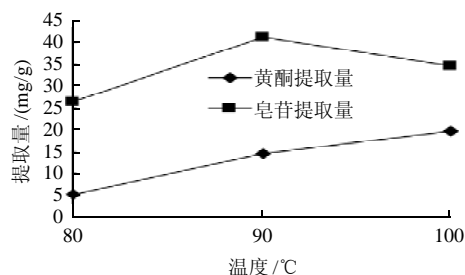


图5 提取温度对提取量的影响

Fig.5 Effect of extraction temperature on extraction rate of saponins and flavonoids

由图5可知,温度升高提取量会逐渐增大,因为温度越高提取剂沸腾的越快。越容易进入到提取室中与物料接触进行提取。但由图中可以看出皂苷的热稳定性比较差,在高温下容易分解,所以提取温度不宜过高。

2.2 拟合模型的建立及方差分析

表2 响应面法试验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface tests

试验号	因素				皂苷提取量/(mg/g)	黄酮提取量/(mg/g)
	X ₁ 乙醇体积分数/%	X ₂ 料液比(g/mL)	X ₃ 时间/h	X ₄ 温度/℃		
1	95	70	3	80	17.9172	2.7573
2	70	70	2	100	52.8256	15.1691
3	95	70	2	90	68.9036	12.6461
4	70	80	4	90	42.4732	9.4148
5	50	60	3	90	23.9235	8.9869
6	70	70	3	90	50.5387	8.9722
7	70	80	2	90	58.0157	10.9641
8	95	70	3	100	43.2768	14.5575
9	50	80	3	90	36.8212	13.1411
10	70	80	3	100	16.8733	14.4166
11	50	70	3	80	7.4653	3.3065
12	70	60	2	90	47.6382	10.0345
13	70	70	4	80	20.0635	2.4655
14	70	70	3	90	46.4230	9.2378
15	0	60	4	90	62.5548	12.2477
16	70	70	4	100	29.8428	16.6117
17	70	70	3	90	53.5422	9.7689
18	70	70	2	80	18.9890	5.0541
19	50	70	3	100	24.7154	17.1790
20	95	60	3	90	62.4364	10.1231
21	50	70	4	90	53.0561	12.9559
22	50	70	2	90	40.9244	8.3083
23	70	60	3	80	8.4312	4.0901
24	95	70	4	90	60.5548	8.1050
25	95	80	3	90	35.9773	8.1312
26	70	80	3	80	13.3720	3.8819
27	70	60	3	100	19.100	17.9172

对表2进行回归分析,获得皂苷和黄酮提取的二次多元回归方程分别为:

$$Y_{\text{皂苷}} = 50.17 + 8.51X_1 - 2.68X_2 - 1.563X_3 + 9.33X_4 - 2.16X_1^2 - 6.76X_2^2 + 7.82X_3^2 - 26.10X_4^2 - 9.84X_1X_2 - 5.12X_1X_3 + 2.03X_1X_4 - 7.62X_2X_3 - 4.70X_2X_4 - 6.01X_3X_4$$

$$Y_{\text{黄酮}} = 9.33 - 0.63X_1 - 0.2X_2 - 0.031X_3 + 6.1X_4 + 0.30X_1^2 + 0.56X_2^2 + 0.78X_3^2 - 0.18X_4^2 - 1.54X_1X_2 - 2.30X_1X_3 - 0.52X_1X_4 - 0.94X_2X_3 - 0.55X_2X_4 + 1.00X_3X_4$$

2.2.1 皂苷提取拟合模型的建立及方差分析

表3 皂苷提取回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance of the developed regression equation for saponins

来源	自由度	平方和	调整平方和	调整均方	P值	显著性
回归	14	8358.76	8358.76	597.05	0.000	**
线性	4	2030.34	2030.34	507.59	0.000	**
平方	4	5355.23	5355.23	1338.81	0.043	*
交互作用	6	937.19	937.19	162.20	0.001	**
残差误差	12	271.02	271.02	18.09		
失拟	10	191.47	191.47	19.15	0.465	
纯误差	2	25.55	25.55	12.77		
合计	26	8575.78				

注: **.差异极显著, $P \leq 0.01$; *.差异显著, $P \leq 0.05$ 。下同。

从表3可看出,回归方程描述各因素与响应值之间关系时,起因变量和全体自变量之间的线性关系显著。失拟项大于0.05不显著,表明该方程对实验拟合较好,可以反映出实验结果。

表4 皂苷提取回归方程系数显著性检验

Table 4 Significant test of regression coefficients

项	系数	系数标准误	P值	显著性
常量	50.168	2.455	0.000	**
X ₁	8.513	1.228	0.000	**
X ₂	-2.679	1.228	0.050	*
X ₃	-1.563	1.228	0.227	
X ₄	9.333	1.228	0.000	**
X ₁ ²	-2.160	1.841	0.263	
X ₂ ²	-6.755	1.841	0.003	**
X ₃ ²	7.823	1.841	0.001	**
X ₄ ²	-26.09	1.841	0.000	**
X ₁ X ₂	-9.839	2.126	0.001	**
X ₁ X ₃	-5.120	2.126	0.033	*
X ₁ X ₄	2.027	2.126	0.015	*
X ₂ X ₃	-7.615	2.126	0.004	**
X ₂ X ₄	-4.691	2.126	0.048	*
X ₃ X ₄	-6.014	2.126	0.359	

$$R^2 = 97.47\%, R^2_{\text{预测}} = 86.47\%, R^2_{\text{Adj}} = 94.52\%$$

从表4可以看出,除时间一次项、乙醇体积分数二次项、时间与温度交互项不显著外,其他各项均呈

显著或极显著的关系。表明该方程不是简单的线性关系,交互作用影响很大。与模型检验结果相符合。

2.2.2 黄酮提取拟合模型的建立及方差分析

表5 黄酮提取回归模型方差分析

Table 5 Analysis of variance of the developed regression equation for flavonoids

来源	自由度	平方和	调整平方和	调整均方	P值	显著性
回归	14	497.783	497.783	35.556	0.000	**
线性	4	451.839	451.839	1.376	0.000	**
平方	4	5.504	5.504	112.960	0.096	
交互作用	6	40.440	40.440	6.740	0.000	**
残差误差	12	6.204	6.204	0.165		
失拟	10	0.329	0.329	0.620	0.228	
纯误差	2	6.533	6.533	0.544		
合计	26	504.316				

从表5可看出,回归方程描述各因素与响应值之间关系时,起因变量和全体自变量之间的线性关系显著。失拟项大于0.05不显著,表明该方程对实验拟合较好,可以反映出实验结果。

表6 黄酮提取回归方程系数显著性检验

Table 6 Significant test of regression coefficients

项	系数	系数标准误	P值	显著性
常量	9.32631	0.4260	0.000	**
X_1	-0.62980	0.2130	0.012	*
X_2	-0.19673	0.2130	0.374	
X_3	-0.03129	0.2130	0.886	
X_4	6.10057	0.2130	0.000	**
X_1^2	0.30423	0.3195	0.360	
X_2^2	0.56203	0.3195	0.104	
X_3^2	0.77660	0.3195	0.032	*
X_4^2	-0.18081	0.3195	0.582	
X_1X_2	-1.53651	0.3689	0.001	**
X_1X_3	-2.29718	0.3689	0.000	**
X_1X_4	-0.51806	0.3689	0.186	
X_2X_3	-0.94060	0.3689	0.018	*
X_2X_4	-0.55083	0.3689	0.161	
X_3X_4	9.32631	0.4260	0.000	**

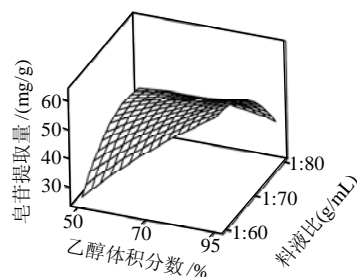
$$R^2 = 98.70\%, R^2_{\text{预测}} = 92.77\%, R^2_{\text{Adj}} = 97.19\%$$

从表6可以看出,温度对黄酮提取量的影响极显著,时间的二次项、乙醇体积分数影响显著,乙醇体积分数与料液比、乙醇体积分数与时间、时间与温度交互作用极显著,料液比与时间交互作用影响显著,与模型检验结果相符合,交互作用影响很大。

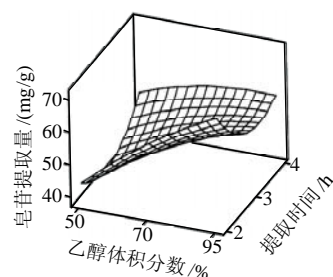
2.2.3 响应面图形分析

如果一个响应曲面坡度相对平缓,表明其可以忍受处理条件的变异,而不影响到相应值的大小,相反,

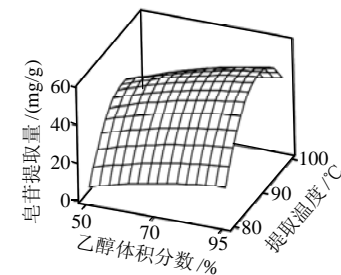
如果一个响应曲面坡度非常陡峭,表明响应值对于处理条件的改变非常敏感^[14-15]。



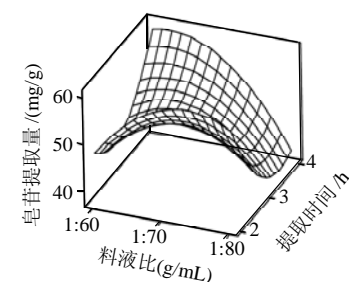
a. 乙醇体积分数与料液比



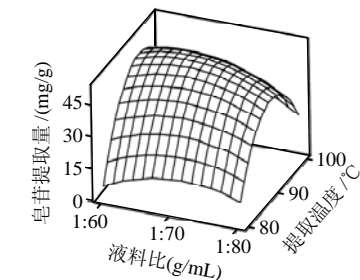
b. 乙醇体积分数与提取时间



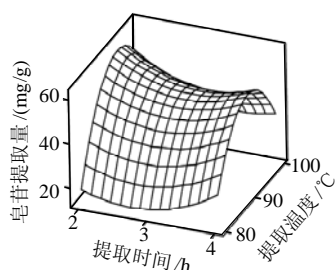
c. 乙醇体积分数与提取温度



d. 料液比与提取时间



e. 料液比与提取温度

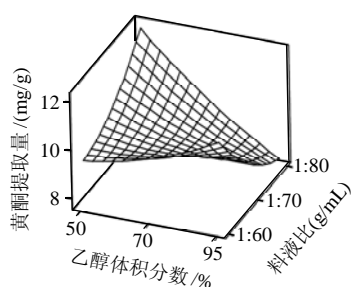


f.提取时间与提取温度

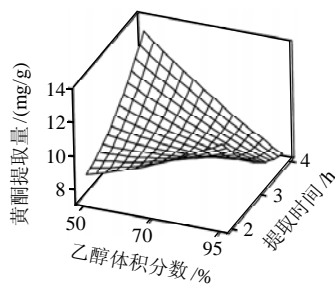
固定水平：乙醇体积分数 70%；料液比 1:70；时间 3h；温度 90℃。

图6 各两因素交互作用对皂苷提取量的影响

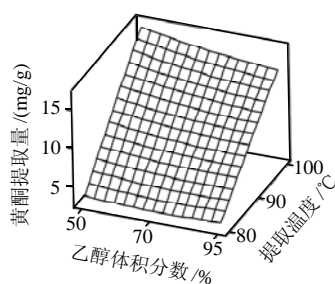
Fig.6 The effect of cross-interaction among factors on extraction rate of saponins



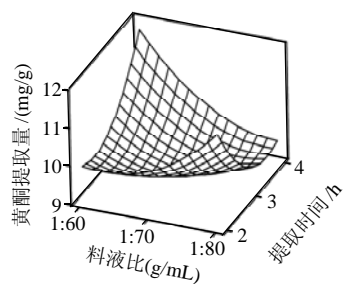
a.乙醇体积分数与料液比



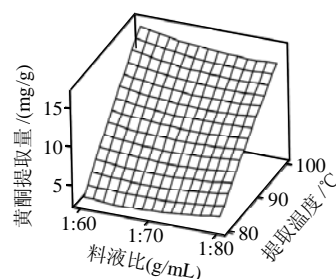
b.乙醇体积分数与提取时间



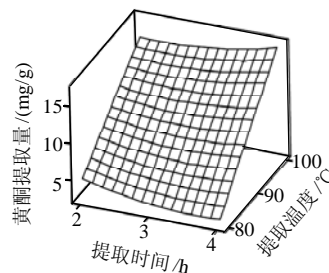
c.乙醇体积分数与提取温度



d.料液比与提取时间



e.料液比与提取温度



f.提取时间与提取温度

固定水平：乙醇体积分数 70%；料液比 1:70；时间 3h；温度 90℃。

图7 各两因素交互作用对黄酮提取量的影响

Fig.7 The effect of cross-interaction among factors on extraction rate of flavonoids

从图6a和图7a可以看出，乙醇体积分数对皂苷和黄酮提取量的影响均受到料液比交互作用的影响。当料液比较小时，随乙醇体积分数升高提取量均增大；而当料液比较大时，随乙醇体积分数增大，皂苷提取量变化不大，黄酮提取量则下降。由图6b和图7b可知，乙醇体积分数对皂苷和黄酮提取量的影响均受到提取时间交互作用的影响。当乙醇体积分数较小时，随提取时间增大，提取量均增大；当乙醇体积分数较大时，随时间增加，皂苷提取量先下降后上升，而黄酮提取量则呈下降趋势。由图6c和图7c可以看出，乙醇体积分数对皂苷、黄酮提取量的影响不受提取温度的影响，无论乙醇体积分数怎样变化，随温度的增加，皂苷提取量都呈先增加后降低的趋势，而黄酮提取量都是呈上升的趋势。由图6d和图7d可知，料液比对皂苷和黄酮提取量的影响均受提取时间交互作用的影响，且变化趋势一致。即提取时间较短时，随料液比增大，提取量增加；提取时间较长时，随料液比增加，提取量下降。由图6e可知，提取温度对皂苷提取量的影响受料液比的交互作用影响。当料液比较小时，随提取温度的增加，提取量增加。当料液比较大时，随提取温度的增加，提取量先上升再下降，在90℃处达到最大值。由图7e可知，随温度的升高，黄酮提取量不断升高，料液比的交互作用影响较小。由图6f可知，随着提取温度的升高皂苷先上升后下降，受到提取时间的交互影响作用

较小。由图 7f 可知, 提取时间对黄酮提取量的影响受提取温度交互作用的影响。当提取温度较低时, 随着时间的延长, 提取量降低。当提取温度较高时, 随提取时间的延长, 提取量升高。

2.2.4 提取工艺优化及验证

通过软件 Design-Expert 求解方程, 得到优化的皂苷提取条件为乙醇体积分数 80%、料液比 1:65.3、时间 2h、温度 94.1℃, 预测结果为 74.65mg/g。考虑实际操作条件分别选择参数为乙醇体积分数 80%、料液比 1:65、时间 2h、温度 94℃进行验证实验, 重复 3 次, 测得平均值为 70.25mg/g。

得到优化的黄酮提取条件为乙醇体积分数 60%、料液比 1:60、时间 4h、温度 100℃, 预测结果为 20.56mg/g。按照上述操作条件进行验证实验, 重复 3 次, 测得平均值为 19.86mg/g。

3 结 论

本实验在单因素试验的基础上, 结合响应面分析法分别研究了乙醇体积分数、料液比, 回流提取时间、提取温度及其相互间的交互作用对回流法提取长白槲木中的皂苷、黄酮的影响效果进行了比较, 结果发现各因素及其相互间的交互作用对两种活性成分提取效果的影响并不完全相同, 特别是交互作用的影响差异较大。

采用热回流方法来提取长白槲木中的皂苷、黄酮, 通过单因素试验和 Box-Behnken 试验以及响应面分析对提取方法进行优化, 得出皂苷最优提取工艺条件为乙醇体积分数 80%、料液比 1:65.3、时间 2h、温度 94.1℃, 预测结果为 74.65mg/g。此条件下皂苷提取率为 70.25mg/g, 符合率达 94.10%。黄酮最优提取条件为乙醇体积分数 60%、料液比 1:60、时间 4h、温度 100℃, 预测结果

为 20.56mg/g。此条件下黄酮提取率为 19.86mg/g, 符合率达 96.59%。

参考文献:

- [1] 冯颖, 李天来, 范文丽, 等. 长白槲木生物活性成分的初步研究[J]. 江苏农业科学, 2009(5): 256-258.
- [2] 范文丽, 侯德明, 赵英明. 药食兼用野生植物资源长白槲木研究概述[J]. 辽宁农业科学, 2010(6): 47-48.
- [3] 王广树, 陈燕平, 徐景达. 长白槲木根挥发油成分的研究[J]. 人参研究, 1991(1): 32-33.
- [4] 杜凤国, 姜炳文, 胡荣. 长白槲木挥发油成分分析[J]. 植物研究, 2001(1): 110-112.
- [5] 李时珍. 本草纲目: 第二册[M]. 北京: 人民出版社, 1977.
- [6] 江苏新医学院. 中药大辞典: 下[M]. 上海: 上海人民出版社, 2005.
- [7] 李宝仁, 杨立学, 程政军. 长白槲木研究进展[J]. 中国科技信息, 2006, 23(2): 56-57.
- [8] HAN G J, SHIN D S, JANG M S. A Study of the nutritional composition of *Aralia continentalis* Kitagawa and *Aralia cotinentalis* Kitagawa Leaf[J]. Korean Journal of Food science and Technology, 2008, 40(6): 69-72.
- [9] KIM J S, KANG S S, CHOI J S, et al. Antioxidant components from *Aralia continentalis*[J]. Korean Journal of Pharmacognosy, 1998, 29(1): 178-179.
- [10] NIE W, LUO J G, WANG X B, et al. An insight into enrichment and separation of oleanane-type triterpenoid saponins by various chromatographic materials[J]. Separation and Purification Technology, 2009, 65(3): 93-95.
- [11] LI Yongdi, YAO Yadong, SHAO Wei, et al. Preparation of titanium carbonitride nanoparticles from a novel refluxing-derived precursor[J]. Materials Letters, 2009, 63(22): 112-114.
- [12] 韩本勇. 仙人掌总皂苷提取纯化工艺的研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2008.
- [13] 肖卫华, 韩鲁佳. 黄芪黄酮乙醇回流提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2008(1): 233-235.
- [14] 陈莉, 屠康, 王海, 等. 采用响应曲面法对蔡侯红富士苹果热处理条件的优化[J]. 农业工程学报, 2006, 22(2): 159-163.
- [15] DING Youliang, LI Aiqun, DENG Yang. A new look at the response surface method for reliability analysis using chaos theory[J]. Earthquake Engineering and Engineering Vibration, 2008(7): 329-335.