



响应面法优化超声波辅助提取湖北海棠叶中总黄酮工艺

乔 孟, 屈晓清, 丁之恩*

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽 合肥 230036)

摘 要: 采用超声波辅助提取湖北海棠叶中总黄酮, 并利用响应面法对提取工艺参数进行优化。在料液比、乙醇体积分数、超声时间、超声功率等单因素试验基础上, 进行四因素三水平的Box-Behnken设计, 利用响应面法分析4个因素对湖北海棠叶中总黄酮得率的影响。超声波法提取湖北海棠叶中总黄酮的最佳工艺条件为液料比50:1(mL/g)、乙醇体积分数67.35%、超声时间3.2h、超声功率162.4W, 总黄酮得率预测值为12.78%, 验证值为12.76%, 与理论值的相对误差为0.02%, 表明该优化方法合理可行。

关键词: 湖北海棠叶; 总黄酮; 超声波辅助提取; 响应面优化

Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction Process for Total Flavonoids from *Malus hupehensis* Leaves by Response Surface Methodology

QIAO Meng, QU Xiao-qing, DING Zhi-en*

(College of Tea and Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Response surface methodology (RSM) was applied to optimize conditions for the ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Malus hupehensis* leaves. One-factor-at-a-time method was used to explore the effects of solvent-to-solid ratio, ethanol concentration, ultrasonic treatment time and ultrasonic power on extraction efficiency. Based on this, these process conditions were optimized using a four-variable, three-level Box-Behnken experimental design couple with response surface analysis to be 67.35% ethanol as the extraction solvent at a solvent-to-solid ratio of 50:1 (mL/g) and ultrasonic treatment for 3.2 h at 162.4 W. Under the optimized conditions, the predicted and actual yields of total flavonoids were 12.78% and 12.76% with a relative error of 0.02%. Therefore, the optimized extraction procedure is reliable.

Key words: *Malus hupehensis*; total flavonoids; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)02-0143-05

湖北海棠(*Malus hupehensis*)又名林檎茶、花红茶、野海棠、茶海棠, 属蔷薇科苹果属落叶小乔木。嫩叶可作茶, 果能消食并供酿酒^[1]。广泛生长于鄂西南部高海拔山区, 湖南、云南、陕西、重庆等地。湖北海棠是特色鲜明的食药两用植物, 其叶、果实等是土家族常用药物, 具有多种药理作用^[2-3]。植物黄酮类化合物是一类重要的天然有机化合物, 是植物长期自然选择过程中产生的一类次生代谢产物^[4], 它能清除生物体内的自由基, 具有抗氧化作用^[5]; 多项动物实验表明黄酮类化合物可以降低正常及糖尿病动物血清甘油三酯、总胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇的含量, 同时提升高密度脂蛋白胆固醇的含量^[6-8]; 其抗菌和抗病毒作用也已得到实验验证^[9-10]。

超声波能在液体中产生“空穴作用”, 破坏植物细胞的结构, 使提取液不断振荡, 有助于黄酮类化合

物的溶出和扩散, 同时产生的热效应应保持一定的水温, 大大提高了植物中有效成分的得率^[11-12]。响应面分析法(response surface analysis methodology, RSM)是利用合理的试验设计并通过对试验数据进行一定的处理, 建立影响因素与响应值之间的函数关系, 得到一个回归方程, 通过对回归方程进行分析, 选择最优工艺参数, 由于其精度高, 在目前的食品工业中应用广泛^[13-14]。随着人类活动的加剧, 湖北海棠的生存环境日益恶劣, 其数量和种类正在快速减少, 世界自然保护联盟(IUCN)已于1997年把湖北海棠列入濒危物种^[15]。传统的正交试验考察各工艺参数情况由于误差较大已不能满足实验要求, 本实验采用响应面法对超声波提取湖北海棠叶中总黄酮的工艺条件进行优化, 利用响应曲面法优化各工艺参数, 缩短了优化时间, 提高了实验结果的可信度, 并通过使用超

收稿日期: 2011-11-11

作者简介: 乔孟(1986—), 男, 硕士研究生, 主要从事食品科学研究。E-mail: qiaomeng95@163.com

*通信作者: 丁之恩(1956—), 男, 教授, 博士, 主要从事经济林产品加工及天然产物研究。E-mail: dingze08@hotmail.com



声波辅助提取,使总黄酮得率显著提高,为深度挖掘湖北海棠的经济价值,充分利用湖北海棠中的有效成分,最大限度的保护和开发湖北海棠提供了参考和依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

湖北海棠叶,采自湖北宜昌市夷陵区邓村乡海拔1000m林区,选取3个地点,每个地点挑选3颗树龄10年左右的成年湖北海棠树,每棵树分别采集500g新鲜湖北海棠叶。无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠(分析纯);芦丁(生化试剂) 中国食品药品检定研究院。

1.2 仪器与设备

BS124S分析天平 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;T6-新世纪紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;KQ-500E超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;DL-5-B低速大容量多管离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 原料预处理

将新鲜的湖北海棠叶洗净、晒干、粉碎、混合,放在干燥器中备用。

1.3.2 芦丁标准品制备

准确称取干燥至质量恒定的芦丁标准品0.5mg,用60%微热乙醇溶液定容至50mL,摇匀,得质量浓度为0.1mg/mL的标准液。

1.3.3 标准曲线的制作^[16]

准确吸取标准液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL于6只10mL比色管中,加30%乙醇溶液至5mL,加5%亚硝酸钠溶液0.3mL,摇匀,静置6min,加10%硝酸铝溶液0.3mL,摇匀,静置6min,加1mol/L氢氧化钠溶液4mL,加水定容,摇匀,静置15min。以试剂空白为参比液调零,在510nm波长处测定吸光度。以吸光度 A 为纵坐标,质量浓度 Y 为横坐标进行线性回归绘制标准曲线,得标准曲线方程: $Y=0.0882A-0.0006$, $R^2=0.9993$,线性关系良好。

1.3.4 湖北海棠叶总黄酮提取

准确称取1.0g湖北海棠叶粉碎混合后的干粉,置150mL的锥形瓶中,加入50mL体积分数为70%的乙醇溶液,在功率为150W的超声清洗器中提取3h,提取完毕后,在4200r/min离心20min,上清液于200mL容量瓶中定容。

1.3.5 样品中总黄酮含量的测定

采用硝酸铝-亚硝酸钠法^[17],取1mL定容后的提取液按1.3.3节的方法测定样品的吸光度 A ,由标准曲线方程计算出样品溶液的质量浓度 Y ,再计算出样品中总黄酮的含量。计算公式为:

$$\text{样品中总黄酮含量(以芦丁计)/\%} = \frac{YV_1V_3}{mV_2} \times 100$$

式中: Y 为依据标准曲线计算出的被测样液中黄酮质量浓度/(mg/mL); m 为称取的湖北海棠叶粉末的质量/g; V_1 为测定时比色管中溶液体积/mL; V_2 为待测样液分取的体积/mL; V_3 待测样液的总体积/mL。

1.3.6 单因素试验

1.3.6.1 提取溶剂中乙醇体积分数对湖北海棠叶总黄酮得率的影响

按照1.3.4节的方法,选择料液比1:50、超声时间1.5h、的超声功率150W,分别考察乙醇体积分数为40%、50%、60%、70%、80%和90%时对总黄酮得率的影响。

1.3.6.2 料液比对湖北海棠叶总黄酮得率的影响

按照1.3.4的方法,采用1.3.6.1节的优化结果,选择超声时间1.5h和超声功率150W,分别考察料液比(g/mL)为1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60和1:70对总黄酮得率的影响。

1.3.6.3 超声时间对湖北海棠叶总黄酮得率的影响

按照1.3.4节的方法,采用优化后的乙醇体积分数和料液比,选择超声功率为150W,分别考察超声时间为0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5h和4h的总黄酮得率的影响。

1.3.6.4 超声功率对湖北海棠叶总黄酮得率的影响

按照1.3.4节的方法,采用优化后的乙醇体积分数、料液比和超声时间,分别考察超声功率为100、150、200、250、300、350W和400W对总黄酮得率的影响。

1.3.7 Box-Behnken试验设计

综合各单因素试验结果所确定的水平范围,以湖北海棠叶总黄酮得率为指标值,利用Design-Expert 7.0.1软件进行Box-Behnken试验设计^[12]。

2 结果与分析

2.1 超声波提取湖北海棠叶中总黄酮的单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对湖北海棠叶中总黄酮得率的影响

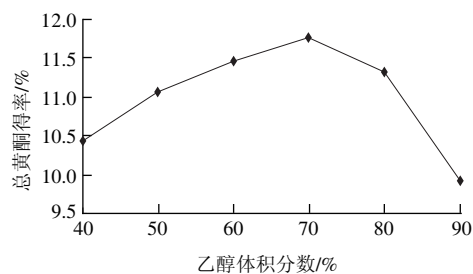


图1 乙醇体积分数对提取率的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on the extraction yield of total flavonoids

由图1可知,在乙醇体积分数为40%~70%的范围内,随着乙醇体积分数的增加,总黄酮得率也相应提

高。当乙醇体积分数超过70%以后,总黄酮得率随之降低。这是因为黄酮是一大类极性范围很广的化合物,随乙醇体积分数的变化,溶剂的极性改变,70%乙醇的极性与湖北海棠叶中黄酮类化合物的极性相似;但随着乙醇体积分数的升高,脂溶性物质、糖类及黏性物质大量析出,影响了黄酮类物质的溶出^[18]。

2.1.2 液料比对湖北海棠叶中总黄酮得率的影响

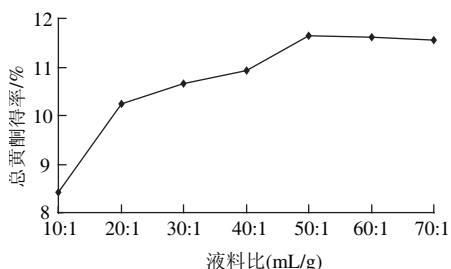


图2 液料比对提取率的影响

Fig.2 Effect of solvent-to-solid on the extraction yield of total flavonoids

由图2可知,随着液料比的增大,总黄酮得率相应提高,在液料比为50:1时,黄酮得率达到最大并趋于平衡。原因可能是随着溶剂量的增加,增大了物料与溶剂的接触面,当溶剂量达到一定程度,溶剂将物料充分包裹时,再增加的溶剂量,对提高黄酮得率没有作用。因此从节约溶剂角度考虑,考察液料比的范围定为40:1~60:1。

2.1.3 超声时间对湖北海棠叶中总黄酮得率的影响

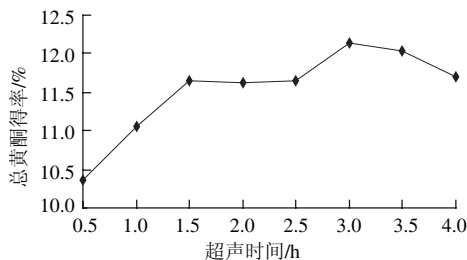


图3 超声时间对提取率的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic treatment time on the extraction yield of total flavonoids

由图3可知,随着超声时间的延长,总黄酮得率随之提高,在超声时间为1.5~2.5h时,总黄酮得率趋于平衡,随着超声时间进一步延长,超过2.5h后,总黄酮得率显著提高,在3h时达到最大值,随着超声时间再延长,总黄酮得率随之下降。原因可能是超声1.5h时,细胞外的黄酮类化合物全部溶出,当超声时间超过2.5h后,细胞结构被超声波所破坏,细胞内的黄酮类化合物也随之溶出,并在3h时,黄酮得率达到最大,随着超声时间的进一步延长,一部分的黄酮类物质被超声波所分解,使得总黄酮得率下降。因此考察超声时间的范围定为2.5~3.5h。

2.1.4 超声功率对湖北海棠叶中总黄酮得率的影响

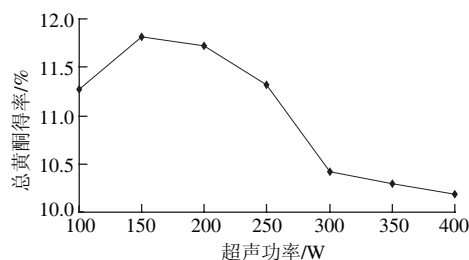


图4 超声功率对提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic power on the extraction yield of total flavonoids

由图4可知,在超声功率达到150W之前,总黄酮得率随之提高,当超声波功率大于150W,总黄酮得率下降。原因是随着超声功率的增强,细胞内物质不断被释放,同时一些能使黄酮类物质分解的酶也被充分释放出来,从而导致其含量下降^[19]。超声作用也可能导致目标产物发生降解而影响提取率^[20-21]。因此考察超声波功率的范围定为100~200W。

2.2 Box-Behnken试验设计结果

Box-Behnken试验因子及编码值见表1,试验设计排列组合见表2。

表1 湖北海棠叶总黄酮提取因素水平编码表

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

编码值	A液料比(mL/g)	B乙醇体积分数/%	C超声时间/h	D超声功率/W
1	60:1	80	3.5	200
0	50:1	70	3	150
-1	40:1	60	2.5	100

表2 湖北海棠叶总黄酮提取试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	A	B	C	D	Y总黄酮得率/%
1	-1	-1	0	0	11.9905
2	1	-1	0	0	12.3787
3	-1	1	0	0	11.7434
4	1	1	0	0	11.8846
5	0	0	-1	-1	11.5846
6	0	0	1	-1	11.6728
7	0	0	-1	1	11.6199
8	0	0	1	1	12.6257
9	-1	0	0	-1	11.8492
10	1	0	0	-1	11.6199
11	-1	0	0	1	12.0257
12	1	0	0	1	12.3080
13	0	-1	-1	0	12.0610
14	0	1	-1	0	11.3023
15	0	-1	1	0	12.7257
16	0	1	1	0	12.2199
17	-1	0	-1	0	11.4434
18	1	0	-1	0	11.9022
19	-1	0	1	0	12.2728
20	1	0	1	0	11.9552
21	0	-1	0	-1	12.3081
22	0	1	0	-1	10.6494
23	0	-1	0	1	11.9199
24	0	1	0	1	11.7581
25	0	0	0	0	12.7308
26	0	0	0	0	12.3975
27	0	0	0	0	12.7404
28	0	0	0	0	12.7475
29	0	0	0	0	12.7563

2.3 响应面试验结果分析

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model					
方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	6.485	14	0.463	11.116	<0.0001
A	0.044	1	0.044	1.047	0.3236
B	1.220	1	1.220	29.278	<0.0001
C	1.055	1	1.055	25.328	0.0002
D	0.552	1	0.552	13.243	0.0027
AB	0.015	1	0.015	0.366	0.5548
AC	0.151	1	0.151	3.617	0.0780
AD	0.065	1	0.065	1.571	0.2306
BC	0.016	1	0.016	0.384	0.5454
BD	0.560	1	0.560	13.444	0.0025
CD	0.210	1	0.210	5.052	0.0412
A ²	0.684	1	0.684	16.417	0.0012
B ²	0.931	1	0.931	22.334	0.0003
C ²	0.678	1	0.678	16.268	0.0012
D ²	1.646	1	1.646	39.508	<0.0001
残差	0.583	14	0.042		
失拟项	0.487	10	0.049	2.024	0.2592
纯误差	0.096	4	0.024		
总差	7.068	28			

经Design-Expert 7.0.1软件对表2中的试验数据进行方差分析(表3),以总黄酮得率(Y)为响应值,经二次回归拟合后,得到总黄酮得率的回归方程:

$$Y=12.67+0.060A-0.32B+0.30C+0.21D-0.062AB-0.19AC+0.13AD+0.063BC+0.37BD+0.23CD-0.32A^2-0.38B^2-0.32C^2-0.50D^2$$

由表3可知,影响湖北海棠叶总黄酮得率的因素依次为乙醇体积分数(B)>超声时间(C)>超声功率(D),其作用达到极显著水平,在二次项中,这4个因素都表现为极显著,在交互项中,乙醇体积分数与超声功率的交互作用和超声时间和超声功率的交互作用也表现为极显著水平,其三维响应曲面图及等高线见图5、6。响应面图形是响应值Y对应于试验因素A、B、C、D所构成的三维空间的曲面图及其在二维平面上的等高线图,响应面图形可以直观的反映各因素及它们之间的交互作用对响应值的影响。将其中两个因素固定在零水平可作出另外两个因素交互作用的响应曲面图及等高线图。由图5可知,超声时间与超声功率的交互作用表现为极显著水平,随着超声时间和超声功率的增加,湖北海棠叶总黄酮得率先缓慢提高,当总黄酮得率达到最大值后,开始缓慢降低,表明总黄酮得率可以忍受超声时间和超声功率的微小变化,而不至于产生较大的影响,同时在适当的超声时间和超声功率下,可以一定程度上提高总黄酮得率使其达到最大值。由图6可知,乙醇体积分数和超声功率的交互作用表现为极显著水平,随着乙醇体积分数的降低,总黄酮得率先快速提高,当总黄酮得率达到最大值

后开始缓慢降低,表明乙醇体积分数在60%~80%之间细微的变化对总黄酮得率的影响较大,当选择了适当的乙醇体积分数和超声功率后,可以一定程度上提高总黄酮得率,并能使总黄酮得率达到最大值。而模型的P值远小于0.05,表现为极显著,而失拟项检验的P值大于0.05,表现为不显著,且该模型的 $R^2=0.9175>0.9$,表明模型充分拟合试验数据,是用于优化超声波提取湖北海棠叶总黄酮工艺条件的合适的数学模型。

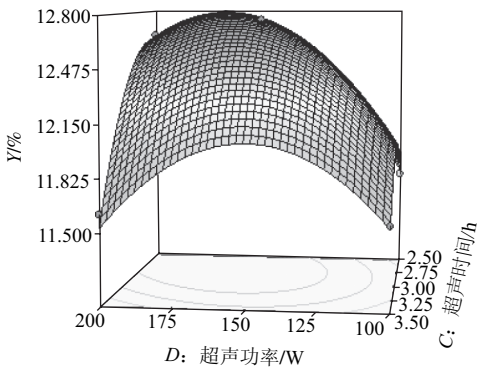


图5 超声功率与超声时间交互影响黄酮得率的响应面图
Fig.5 Response surface for the effects of ultrasonic power and ultrasonic treatment time on the extraction yield of total flavonoids

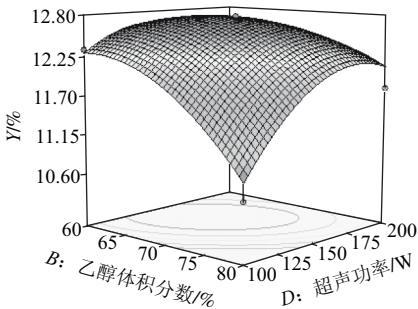


图6 乙醇体积分数与超声功率交互影响黄酮得率的响应面图
Fig.6 Response surface for the effects of ethanol concentration and ultrasonic power on the extraction yield of total flavonoids

2.4 验证实验

通过响应面优化得出的最佳提取工艺条件为乙醇体积分数67.35%、超声时间3.2h、超声功率为162.4W、液料比50:1(mL/g)。采用最佳提取工艺条件进行3次验证实验,得到的总黄酮得率的实际值为12.7586%、12.7693%、12.7625%,平均后得到的实际值为12.76%。与回归方程得出的预测值12.78%相差0.02%,实际值与预测值很好的吻合。

2.5 湖北海棠叶中总黄酮含量

通过响应面法对实验条件进行优化,在最优条件下得到的最大总黄酮得率约为12.76%。由于湖北海棠叶样品均为精确称取的1g干粉,通过上述分析测定可知1g湖北海棠叶干物质中约含有总黄酮0.12g。



3 结 论

利用超声波产生的“空穴作用”，加速黄酮类物质的溶出与扩散，采用响应面法优化超声提取湖北海棠叶中总黄酮的工艺参数，并通过方差分析，得出乙醇体积分数与超声功率、超声功率与超声时间对湖北海棠叶总黄酮得率的影响存在显著的交互作用，同时可以表明影响湖北海棠叶总黄酮得率的因素主次关系为乙醇体积分数(B)>超声时间(C)>超声功率(D)>料液比(A)。通过解回归方程得出提取湖北海棠叶中总黄酮的最佳提取工艺参数为乙醇体积分数67.35%、超声时间3.2h、超声功率162.4W、液料比50:1(mL/g)。采用最佳工艺参数进行验证实验得到的实际值为12.76%，与预测值相差0.02%。说明响应面模型与实际情况拟合良好，能较好的优化提取湖北海棠叶总黄酮的工艺条件。实验结果表明通过响应面优化得出的提取条件能显著提高湖北海棠叶中总黄酮的提取率，并具有方法简便、成本低廉的特点，为更好的开发利用湖北海棠提供了实验参考和依据。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第二册)[M]. 北京: 高等植物出版社, 1970: 235-236.
- [2] 张宏岐, 汪鋆植, 邹坤, 等. 湖北海棠提取物的体外抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2008, 33(11): 183-186.
- [3] DENG Gaigai, WANG Junzhi, ZHANG Qiaoyin, et al. Hepatoprotective effects of phloridzin on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride against oxidative stress-triggered damage and fibrosis in rats[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2012, 36(7): 1118-1125.
- [4] MORIMOTO M, TANIMOTO K, NAKANO S, et al. Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(2): 389-393.
- [5] COSKUN O, KANTER M, KORKMAZ A, et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas[J]. Pharmacological Research, 2005, 51(2): 117-123.
- [6] ADENEYE A A. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of methanol seed extract of *Citrus paradisi* Macfad (Rutaceae) in alloxan-induced diabetic Wistar rats[J]. Nigerian quarterly journal of hospital medicine, 2008, 18(4): 211-215.
- [7] MULVIHILE E E, ALLISTER E M, SUTHERLAND B G, et al. Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance[J]. Diabetes, 2009, 58(10): 2198-2210.
- [8] SOTO C P, PEREZ B L, FAVARI L P, et al. Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1998, 119(2): 125-129.
- [9] MAVEL S, DIKIC B, PALAKAS S, et al. Synthesis and biological evaluation of a series of flavone derivatives as potential radioligands for imaging the multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1/ MRP1)[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, 14(5): 1599-1607.
- [10] LOTITO S B, FREI B. Dietary flavonoids attenuate TNF α -induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells: Structure-function relationships and activity after first-pass metabolism[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(48): 1-20.
- [11] 霍丹群, 张文, 李奇琳, 等. 超声波法和热提取法提取山楂总黄酮的比较研究[J]. 中成药, 2004, 26(12): 1063-1065.
- [12] WEI Lingyun, WANG Jianhua, ZHENG Xiaodong, et al. Studies on the extracting technical conditions of inulin from *Jerusalem artichoke* tubers[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 79(3): 1087-1093.
- [13] 杨文雄, 高彦祥. 响应面法及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2005(2): 62-71.
- [14] GUAN J, FANG Q, HANNA M A. Selected functional properties of extruded starch acetate and natural fibers foams[J]. 2004, 99(2): 199-206.
- [15] WALTER K S, GILLET H J. 1997 IUCN red list of threatened plant compiled by the world conservation monitoring centre[M]. Gland Switzerland and Cambridge, UK: UCN- The World Conservation Union, 1998.
- [16] 孙业良, 姜明杉, 陈暄, 等. 基于响应面分析法对绿茶中黄酮提取工艺的优化[J]. 经济林研究, 2009, 27(3): 33-37.
- [17] 何舒美, 刘敬兰. 茶叶中总黄酮含量测定方法的研究[J]. 分析化学, 2007, 35(9): 1365-1368.
- [18] BARRY D, OSAWA T, NAMIKI M A. Epimerization of lactose to free lactulose in heated modes milk solutions[J]. Dairy Res, 1985(12): 409-417.
- [19] 董发明, 白喜婷. 响应面法优化超声提取杜仲雄花中黄酮类化合物的工艺参数[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 227-231.
- [20] 任国艳, 李八方, 赵雪, 等. 海蜇头糖蛋白超声辅助提取工艺研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(2): 255-258.
- [21] 石太渊, 毛红艳, 马涛, 等. 响应面法优化提取辽五味子黄酮工艺参数研究[J]. 中国酿造, 2011(2): 96-99.