

响应面法优化枳椇子总黄酮超声波提取工艺

于修焯, 王 玲, 杜双奎, 李志西*, 张静亚

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 为了更好开发和利用枳椇子资源, 以枳椇子为原料, 利用响应面设计对超声波法提取枳椇子总黄酮工艺进行优化。结果表明: 在提取温度 65℃、提取时间 60min 条件下, 影响提取率的主次因素依次为乙醇体积分数>液料比>超声波功率, 最佳超声波提取条件为超声波功率 374.4W、液料比 69.4:1(mL/g)、乙醇体积分数 64.5%。验证总黄酮得率达到(0.819 ± 0.003)%, 接近于预测值 0.823%。研究表明, 优化得到的回归模型是可行的, 具有良好预测能力。

关键词: 枳椇子; 超声波; 提取; 响应面; 总黄酮

Optimization of Ultrasonic Extraction Process for Total Flavonoids from *Hovenia* Seeds by Response Surface Methodology

YU Xiu-zhu, WANG Ling, DU Shuang-kui, LI Zhi-xi*, ZHANG Jing-ya

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Response surface methodology was used to optimize the ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Hovenia* seeds. A regression model describing total flavonoid yield with respect to ultrasonic power, material-to-liquid ratio and ethanol concentration was established. Ethanol concentration was the most important affecting factor of the total flavonoid yield resulting from 60 min extraction at 65 °C, followed by material-to-liquid ratio and ultrasonic power. The optimal extraction conditions for total flavonoids from *Hovenia* seeds were ultrasonic power of 374.4 W, material-to-liquid ratio of 1:69.4 (g/mL), ethanol concentration of 64.5%, extraction temperature of 65 °C and extraction time of 60 min, and the resultant total flavonoid yield was (0.819 ± 0.003)%, which was close to the predicted value of 0.823%. Therefore, the established regression model is feasible and has good prediction capability.

Key words: *Hovenia* seeds; ultrasonic; extraction; response surface; total flavonoids

中图分类号: O623.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)12-0125-05

枳椇为鼠李科(Rhamnaceae)拐枣属(*Hovenia* Thunb.)落叶乔木, 始载于《唐本草》, 又名拐枣、金钩子、甜半夜等。枳椇子系枳椇植物干燥成熟的种子, 有清热利尿, 解酒毒之功效, 主治烦热、口渴、呕吐、二便不利等症^[1]。许多学者研究认为枳椇子的疗效与其所含成分的抗氧化作用密切相关, 其中以黄酮类物质尤为重要^[2-9]。超声波是一种频率高于 20kHz 弹性机械振动波, 利用超声波产生的强烈振动、高的加速度、强烈的空化效应和搅拌作用等, 破坏植物细胞和细胞膜结构, 增加细胞内容物的穿透力, 提高黄酮类化合物溶出速度; 超声波的热效应对原料有一定水浴作用, 缩短

了提取时间, 提高了黄酮类化合物的提出率和有效保护提出物的有效成分^[10-11]。与常规提取法相比, 该法具有提取时间短, 提取率高, 无需加热等优点^[12]。国内枳椇子总黄酮提取主要以回流法为主, 回流法需要时间长、温度高, 容易破坏总黄酮中的有效成分, 超声波法提取枳椇子总黄酮可以较好克服上述不足。唐巧玉等^[13]比较不同提取溶剂对金橘皮中总黄酮提取效果的影响, 结果表明影响总黄酮提取效果的依次顺序为甲醇>无水乙醇>氯仿>乙酸乙酯>丙酮。考虑安全、环保等因素, 选择乙醇作为枳椇子黄酮的提取溶剂^[14-15]。本实验采用超声波法乙醇作为提取溶剂提取枳椇子总黄酮并对

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划项目

作者简介: 于修焯(1974—), 男, 副教授, 博士, 主要从事功能性油脂及其安全检测研究。

E-mail: xiuzhu1004@hotmail.com

* 通信作者: 李志西(1958—), 男, 教授, 博士, 主要从事粮食工程与发酵技术创新研究。E-mail: lizhixi@nwsuaf.edu.cn

其工艺条件进行优化, 以期为枳椇子总黄酮规模化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

枳椇子, 采集于陕西省西安市临潼区, 干燥、粉碎, 过 40 目筛, 置于回流器中以 45℃ 乙醚回流 8 h 脱脂后, 于通风橱中挥发去大部分残留乙醚后, 于 50℃ 烘 4~5 h, 备用。

芦丁(98% 生化试剂) 天津金测分析技术有限公司; 乙醚、乙醇、醋酸、三氯化铝、醋酸钠均为分析纯西安化学试剂厂。

UV-mini1240 型紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; KQ-600DB 型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; FW100 型高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; ER-52A 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; KDC-40 型低速离心机 安徽科大创新股份有限公司中佳分公司。

1.2 方法

1.2.1 总黄酮测定方法

铝络合物显色法^[16-17]: 准确吸取一定体积样液, 置于 25mL 比色管中, 加入 1.5% AlCl_3 8mL 和醋酸-醋酸钠的缓冲液(pH5.5)4mL, 并用 50% 乙醇水溶液定容至刻度, 摇匀, 静置 0.5h。于 415nm 波长处测定吸光度。样品中总黄酮质量浓度与吸光度在一定条件下遵从朗伯-比耳定律, 以芦丁为基准物质, 参照芦丁标准曲线方程, 计算总黄酮的得率。

1.2.2 芦丁标准溶液的配制及标准曲线

准确称取 105℃ 干燥至质量恒定的芦丁标准品 0.1000g, 用 50% 乙醇溶解, 定容于 100mL 容量瓶中, 再取 10mL 此标准液于 100mL 容量瓶中, 稀释, 定容, 制成 0.1g/L 的芦丁标准溶液。

准确吸取芦丁标准溶液 0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0mL, 分别置于 25mL 比色管中, 按 1.2.1 节中总黄酮测定方法测定吸光度。以 25mL 比色管中芦丁对照品质量浓度(mg/mL)为横坐标(x), 吸光度为纵坐标(y), 绘制标准曲线, 其标准曲线为 $y=28.451x+0.001$ ($R^2=0.9999$)。

1.2.3 黄酮得率的计算公式

$$W/\% = \frac{2.5 \times C \times V_1}{V_2 \times m} \times 100 \quad (1)$$

式中: W 为总黄酮得率/%; C 为比色管(25mL)中总黄酮质量浓度/(mg/mL); V_1 为提取液总体积/mL; V_2 为加入比色管(25mL)的提取液体积/mL; m 为枳椇子样品质量/g。

1.2.4 超声波法与回流法的提取效果比较

准确称量 10.000g 样品 3 份, 分别采用回流法(80% 乙醇 500mL, 在索氏抽提器中回流 1h, 温度 70℃)、超声波法(80% 乙醇 500mL, 提取温度 70℃, 超声波功率 420W, 提取时间 1h)提取枳椇子中黄酮类物质。随后将提取液抽滤, 旋转蒸发浓缩, 分别以 75% 乙醇定容至 200mL 容量瓶中, 各取 2.0mL 样液置于 25mL 比色管中, 按 1.2.1 节中总黄酮测定方法测定吸光度, 参照芦丁标准曲线方程及公式(1), 计算两种方法提取枳椇子总黄酮的得率, 并进行比较分析。

1.2.5 超声波法提取总黄酮单因素试验设计

准确称量原料 2g 于 250mL 具塞三角瓶中, 在一定条件下进行超声波提取。提取液经 3800r/min 离心 15min, 抽滤, 旋转蒸发浓缩, 分别以 75% 乙醇定容于 50mL 容量瓶, 各取 2.0mL 样液置于 25mL 比色管中, 按 1.2.1 节中总黄酮测定方法测定吸光度, 参照芦丁标准曲线方程及公式(1), 计算总黄酮得率。选择影响较大的因素, 各因素水平设置如下: 提取温度 25、35、45、55、65、70、80℃; 乙醇体积分数 20%、40%、60%、80%、100%; 超声波功率 240、360、480、540、600W; 提取时间 20、40、60、80、100min; 液料比(mL/g) 20:1、30:1、40:1、50:1、60:1。

1.2.6 试验设计及分析

在单因素试验研究的基础上, 选取乙醇体积分数、超声波功率、液料比为试验因素。利用 Design Expert 软件进行 Box-Behnken 设计和数据处理, 以确定最优工艺条件^[18-19]。

对超声波功率 X_1 、液料比 X_2 和乙醇体积分数 X_3 为自变量, 以总黄酮得率 Y 为响应值, 因素水平及编码见表 1, 试验设计方案及结果见表 2。

表 1 超声波法提取枳椇子总黄酮 Box-Behnken 试验因素水平及编码
Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization factors used in the response surface analysis

因素	编码水平		
	-1	0	1
X_1 超声波功率/W	360	480	600
X_2 液料比(mL/g)	30:1	50:1	70:1
X_3 乙醇体积分数/%	60	80	100

2 结果与分析

2.1 超声波法与回流法的提取效果比较

回流法、超声波法提取枳椇子中黄酮类物质, 总黄酮得率分别为(0.47 ± 0.03)%、(0.65 ± 0.04)%。利用超声波法得到的总黄酮得率明显高于回流法。因此, 采用超声波法作为提取枳椇子总黄酮的方法具有一定的优势。

2.2 超声波法提取枳椇子总黄酮影响因素分析

2.2.1 提取温度对总黄酮得率的影响

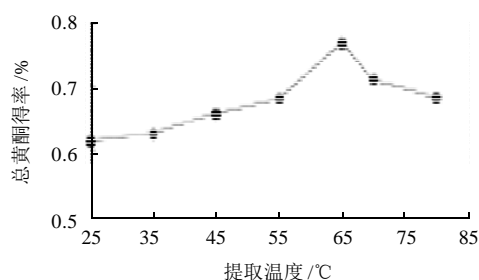


图1 提取温度对总黄酮得率的影响

Fig.1 Effect of extraction temperature on the yield of total flavonoids

由图1可知,随着温度升高,总黄酮得率缓慢上升,在55~65℃之间有较大的增幅,这是因为随温度升高,分子运动加快,导致渗透、扩散、溶解速度加快,化合物更易从细胞转移到溶剂中;当温度高于65℃随温度上升得率出现下降,可能原因是温度过高使枳椇子中黄酮类物质被破坏所导致。提取温度65℃比较合适。

2.2.2 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响

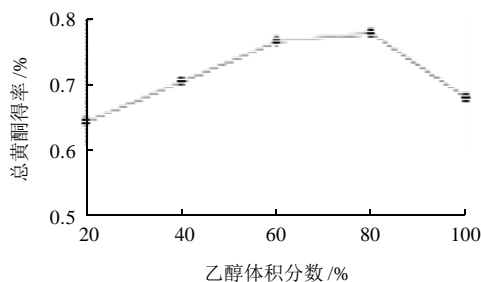


图2 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on the yield of total flavonoids

由图2可以看出,随着乙醇体积分数的增加,得率逐渐增大,在体积分数60%~80%有最大值。体积分数继续增大,得率反而降低。这可能是由于蛋白质在高体积分数的乙醇中更易于变性,变性后的蛋白质包裹住总黄酮导致得率下降,选取乙醇体积分数为80%。

2.2.3 超声波功率对总黄酮得率的影响

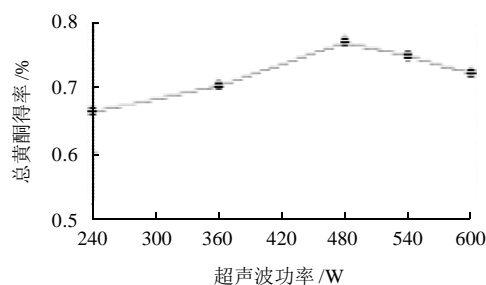


图3 超声波功率对总黄酮得率的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic power on the yield of total flavonoids

由图3可看出,超声波功率由240W增加到480W的过程中,得率逐渐增大,超声波功率增强,介质质点运动加速,使有效物质迅速逸出基体游离于溶剂中,并且空化作用、匀化作用加强,使提取更为彻底。当超声波功率由480W继续增加,得率反而有所下降。故选取超声波功率为480W。

2.2.4 提取时间对总黄酮得率的影响

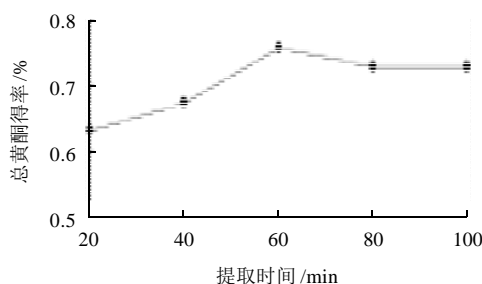


图4 提取时间对总黄酮得率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on the yield of total flavonoids

由图4可知,随着提取时间的延长,得率逐渐增大,在提取时间60min达到最大值。60min后,随着时间的继续延长,得率开始下降。从生产效率和生产成本角度考虑,选取提取时间为60min。

2.2.5 液料比对总黄酮得率的影响

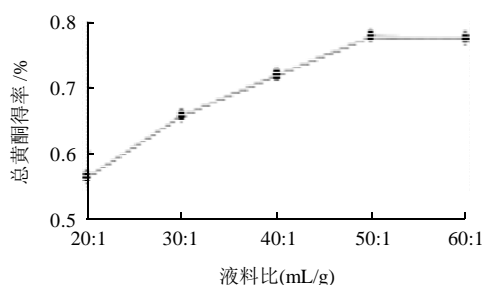


图5 液料比对总黄酮得率的影响

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

由图5可知,随着液料比的增大,得率不断上升,直至液料比(mL/g)大于50:1时总黄酮得率基本保持不变。这是因为原料中的总黄酮已达到溶出量的最大限,继续增大液料比对得率的影响不大。故选择液料比50:1。

2.3 超声波法提取枳椇子总黄酮条件优化

在单因素试验过程中,提取时间和温度只在一个较窄范围对提取率有较好的促进作用,且温度过高,时间过长均会破坏枳椇子总黄酮中活性成分。根据单因素试验结果,选择提取时间60min、提取温度65℃,以乙醇体积分数、超声波功率、液料比作为因素,采用Box-Behnken设计试验,试验方案及结果见表2。

表2 响应面分析试验设计方案及结果

Table 2 Experimental design and corresponding results for response surface analysis

试验号	X_1	X_2	X_3	Y 总黄酮得率/%
1	-1	-1	0	0.71
2	1	-1	0	0.76
3	-1	1	0	0.81
4	1	1	0	0.79
5	-1	0	-1	0.76
6	1	0	-1	0.77
7	-1	0	1	0.61
8	1	0	1	0.66
9	0	-1	-1	0.69
10	0	1	-1	0.78
11	0	-1	1	0.65
12	0	1	1	0.63
13	0	0	0	0.77
14	0	0	0	0.76
15	0	0	0	0.76
16	0	0	0	0.76
17	0	0	0	0.77

2.3.1 因素与总黄酮得率模型建立

应用 Design Expert 7.0 软件对表 2 中的数据进行拟合, 获得回归模型为: $Y=0.76+0.011X_1+0.025X_2-0.056X_3-0.018X_1X_2+0.010X_1X_3-0.028X_2X_3+0.008X_1^2-0.0045X_2^2-0.072X_3^2$ 。

经显著性检验可以看出, 回归模型高度显著, R^2 为 0.9782, 调整后 R^2 为 0.9502, 说明模型的拟合度好, 响应值的 95.02% 是由于所选变量引起, 表明总黄酮得率实际值与预测值之间具有较好的拟合相关性。可以利用该回归方程确定最佳提取工艺条件。

对模型中的回归系数进行显著性检验可以看出(表 3), 一次项中液料比、乙醇体积分数以及交互项中液料比和乙醇体积分数的交互作用对总黄酮得率均有极显著的影响($P < 0.01$), 超声波功率和液料比的交互作用对总黄酮得率有较显著影响($P < 0.1$)。二次项中乙醇体积分数对总黄酮得率有极显著的影响($P < 0.01$); 根据多元二次回归方程的各个系数绝对值的大小可判断三个因素对提取率的影响顺序为乙醇体积分数>液料比>超声波功率。

剔除不显著项($P > 0.1$), 得优化回归模型为 $Y=0.76+0.011X_1+0.025X_2-0.056X_3-0.018X_1X_2-0.028X_2X_3-0.072X_3^2$ 。

分别对方程各自变量(X_1 、 X_2 、 X_3)求极值, 得到极值点为 $X_1=-0.88$, $X_2=0.971$, $X_3=-0.777$, 相当于超声波功率 374.4W, 液料比 69.4:1, 乙醇体积分数 64.5%。在此最优条件下, 预测总黄酮最大得率为 0.823%。由于仪器功率选择原因未能在超声波功率 374.4W 进行验证, 根据表 3 可知, 超声波功率对总黄酮得率影响并不显著, 因此该验证实验可以反映出优化模型能较好地预测超声波法提取枳椇子总黄酮的得率。

表3 回归方程模型方差分析及其系数的显著性检验

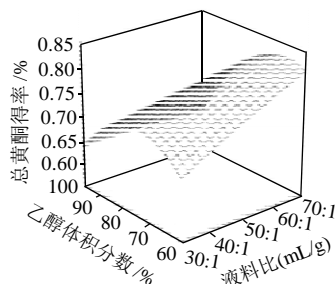
Table 3 Analysis of variance for the fitted quadratic model and significance test of the regression coefficients in it

变异来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值	显著性
X_1	0.001013	1	0.001013	5.472973	0.0519	*
X_2	0.005	1	0.005	27.02703	0.0013	**
X_3	0.025313	1	0.025313	136.8243	< 0.0001	**
X_1X_2	0.001225	1	0.001225	6.621622	0.0368	*
X_1X_3	0.0004	1	0.0004	2.162162	0.1849	
X_2X_3	0.003025	1	0.003025	16.35135	0.0049	**
X_1^2	0.000269	1	0.000269	1.456615	0.2667	
X_2^2	8.53×10^{-5}	1	8.53×10^{-5}	0.460882	0.5190	
X_3^2	0.021827	1	0.021827	117.9858	< 0.0001	**
回归模型	0.058152	9	0.006461	34.92616	< 0.0001	**
残差	0.001295	7	0.000185			
合计	0.059447	16				

注: *.差异显著, $P < 0.1$; **.差异极显著, $P < 0.01$ 。

2.3.2 交互作用分析

响应面图能比较直观的反映各因素和各因素间的交互作用, 通过多元回归方程做响应面图, 见图 6~8。

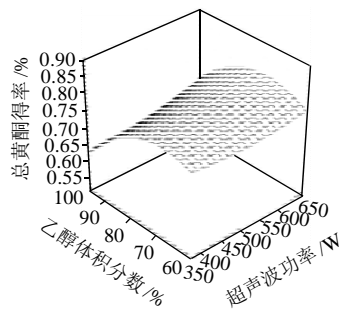


固定水平: 超声波功率 480W。

图6 乙醇体积分数和液料比对总黄酮得率的影响

Fig.6 Response surface of the effect of ethanol concentration and material-to-liquid ratio on the yield of total flavonoids

由图 6 可知, 液料比与乙醇体积分数的交互作用显著。液料比在低水平时, 乙醇体积分数的响应抛物曲线的最高点也处在较低水平, 而随着液料比的增大, 乙醇体积分数的响应抛物曲线的最高点向高水平方向移动。响应面的响应值在乙醇体积分数 60%~70%, 料液比 60:1~70:1 范围内较高。

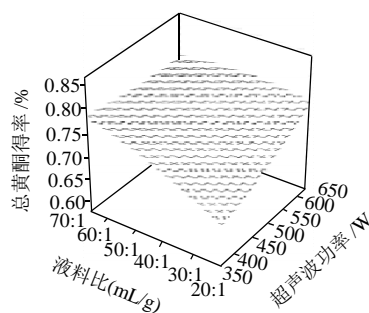


固定水平: 液料比 50:1。

图7 乙醇体积分数和超声波功率对总黄酮得率的影响

Fig.7 Response surface of the effect of ethanol concentration and ultrasonic power on the yield of total flavonoids

由图7可知,乙醇体积分数与超声波功率的交互作用不显著。不同水平的超声波功率对响应值的影响较小,而不同水平的乙醇体积分数对响应值影响显著。乙醇体积分数在60%~70%的范围内,响应值较大。由于超声波功率对总黄酮得率的影响不大,且超声波功率过大会造成能源浪费,因此可选择较低超声波功率进行提取。



固定水平:乙醇体积分数80%。

图8 超声波功率和液料比对总黄酮得率的影响

Fig.8 Response surface of the effect of ultrasonic power and material-to-liquid ratio on the yield of total flavonoids

由图8可知,液料比与超声波功率的交互作用显著性较小。随着超声波功率的增大,液料比的响应抛物曲线的最高点向低水平方向移动。最大响应值接近液料比70:1(mL/g)、超声波功率350W处所对应的响应值。

3 结 论

超声波法与回流法的比较结果表明,超声波法提取枳椇子总黄酮的效果要优于回流法,超声波法作为提取枳椇子总黄酮的方法具有一定的优势。

在提取时间60min、提取温度65℃条件下,各因素对得率的影响从大到小依次为乙醇体积分数>液料比>超声波功率;液料比和乙醇体积分数的交互作用对总黄酮得率有极显著影响,超声波功率和液料比的交互作用对总黄酮得率有显著影响,超声波功率与乙醇体积分数的交互作用影响不显著。工艺条件优化的多元二次回归模型为: $Y=0.76+0.011X_1+0.025X_2-0.056X_3-$

$0.018X_1X_2-0.028X_2X_3-0.072X_3^2$, $R^2=0.9782$ 。响应面最佳工艺条件为超声波功率374.4W,液料比69.4:1(mL/g)、乙醇体积分数64.5%、预测总黄酮得率为0.823%,优化模型能较好地预测超声波法枳椇子总黄酮得率。

参考文献:

- [1] 谢宗万,余友岑.全国中草药名鉴:上册[M].北京:人民卫生出版社,1999:464-472.
- [2] 王艳林,韩玉,钱金萍.枳椇子抗脂质过氧化作用的实验研究[J].中草药,1994,25(6):306-307.
- [3] 江庆中,符树根,况小宝,等.枳椇综合利用研究[J].江西林业科技,2004(6):3-6.
- [4] 嵇扬,陈善,张葵荣.枳椇子水提取液对四氧嘧啶糖尿病小鼠的保护作用[J].中药材,2002,25(3):190-193.
- [5] 丁林生,梁侨丽,滕艳芬.枳椇子黄酮类成分的研究[J].药学学报,1997,32(8):600-602.
- [6] 沙美,丁林生.枳椇子的化学成分研究[J].中国药科大学学报,2001,32(6):418-420.
- [7] 申向荣,张德志.枳椇属植物的研究进展[J].时珍国医国药,2007,18(6):1351-1354.
- [8] HASE K, OHSUGI M, XIONG Q, et al. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* Thunb. on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide[J]. Biol Pharm Bull, 1997, 20(4): 381-385.
- [9] 张洪,叶丽萍,张如洪,等.枳椇子有效部位的初步研究[J].广东药学院学报,2003,19(2):111-115.
- [10] 霍丹群,张文,李奇琳,等.超声波法与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.
- [11] 周燕芳,丁利君.超声波辅助提取艾叶黄酮的工艺研究[J].食品与机械,2006(4):39-41.
- [12] 耿岩玲,李福伟,王晓,等.罗布麻中黄酮的超声波强化提取及高速逆流色谱分离纯化[J].食品科学,2007,28(12):47-49.
- [13] 唐巧玉,周毅峰,朱玉昌,等.金橘皮中黄酮类物质的提取及其体外抗氧化活性研究[J].农业工程学报,2008,24(6):258-261.
- [14] 任发政,罗云波,杜海全,等.枳椇子浸提液影响乙醇吸收的研究[J].食品科学,2003,24(1):31-33.
- [15] 任发政,罗云波,蒋菁莉.枳椇子影响乙醇代谢机理研究[J].食品科学,2002,23(12):58-60.
- [16] 郭雪峰,岳永德.黄酮类化合物的提取、分离纯化和含量测定方法的研究进展[J].安徽农业科学,2007,35(26):8083-8086.
- [17] 侯冬岩,田瑞华,杨梅,等.苦丁茶中总黄酮的三波长-光谱法定量分析[J].分析化学,2004,32(6):783-786.
- [18] 杜双奎,于修焯,李志西,等.红枣酶法提汁工艺条件响应面分析[J].农业机械学报,2007,38(3):191-193.
- [19] 李志西,杜双奎.试验优化设计与统计分析[M].北京:科学出版社,2010:212-243.