

刺梨叶总黄酮超声辅助提取工艺优化

李欣燃, 朱淼, 韩世明, 向红, 王绪英*

(六盘水师范学院 生物科学与技术学院, 贵州 六盘水 553004)

摘要:旨在利用响应曲面法优化刺梨叶总黄酮超声辅助提取工艺。通过单因素试验研究提取时间、料液比、溶剂浓度对刺梨叶中总黄酮提取率影响。以此为基础,采用响应曲面法确定以上各因素与总黄酮得率关系。结果表明,提取总黄酮的最佳工艺参数为料液比为1:36(g/mL)、提取时间为34 min,乙醇浓度为57%。此条件下刺梨叶总黄酮实际提取量达到(40.87±0.09) mg/g,与预测提取量41.36 mg/g之间相差1.18%,说明该模型预测值与实际值拟合度较好。

关键词:刺梨叶;总黄酮;响应曲面法;提取工艺;优化

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Flavonoids from *Rosa roxburghii* Leaves

LI Xin-ran, ZHU Miao, HAN Shi-ming, XIANG Hong, WANG Xu-ying*

(School of Biological Sciences and Technology, Liupanshui Normal University, Liupanshui 553004, Guizhou, China)

Abstract: The present investigation aims to optimize the ultrasonic-assisted extraction process of total flavonoids from *Rosa roxburghii* leaves by surface response method. The effects of extraction time, solid-liquid ratio and solvent concentration on the extraction rate of total flavonoids from *Rosa roxburghii* leaves were studied by single factor experiments. On this basis, the relationship between the above factors and total flavonoids yield was determined by surface response method. The results showed that the optimum technological parameters for extracting total flavonoids were as follows: solid-liquid ratio 1:36(g/mL), extraction time 34 min, and ethanol concentration 57%. The relative error between the predicted optimal yield of 41.36 mg/g and the actual yield of (40.87±0.09) mg/g was 1.18%, which indicated a higher fitting degree between the predicted value and the actual value.

Key words: *Rosa roxburghii* leaves; flavonoid; response surface method; extraction technology; optimization

引文格式:

李欣燃,朱淼,韩世明,等.刺梨叶总黄酮超声辅助提取工艺优化[J].食品研究与开发,2019,40(12):189-193

LI Xinran, ZHU Miao, HAN Shiming, et al. Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Flavonoids from *Rosa roxburghii* Leaves[J]. Food Research and Development, 2019, 40(12): 189-193

基金项目:贵州省科学技术基金(黔科合J字LH[2014]7469号);贵州省教育厅基金(黔教合KY字[2017]012);六盘水市科技局项目(52020-2017-02-03);六盘水师范学院高层次人才科研启动基金项目(LPSSYKYJJ201803)

作者简介:李欣燃(1981—),男(汉),副教授,博士,主要从事天然产物生物活性研究。

*通信作者:王绪英(1971—),女(汉),教授,硕士,主要从事植物药用成分研究。

刺梨叶为蔷薇科(*Rosaceae*)蔷薇属(*Rosa*)植物刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt)叶片,在《本草纲目》、《草木便方》、《中华本草》、《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003年版)等古今典籍中均有记录,具有健胃消食、清热解暑、止血、解毒疗疮等功效,可用于治疗积食饱胀、疥痛金疮、外伤出血等症^[1-2]。

黄酮类化合物是植物中源自苯丙氨酸和乙酸代谢的重要次级代谢产物^[3-4],具有抗菌、抗氧化、抗炎、

抗病毒、抗心脑血管疾病、抗癌、抗Ⅱ型糖尿病、降血糖、降血脂等多种生物学活性^[5-11],此类化合物广泛存在于蔬菜与水果中,对人体健康起到重要作用。因此,从植物体内提取黄酮类化合物已成为国内外学者研究的热点。

刺梨叶中含有丰富的黄酮类化合物、维生素 C 和多糖等成分^[12-14],然而对于刺梨叶中生物有效成分提取工艺的优化未见报道。本研究在单因素试验基础上,结合响应曲面法对刺梨叶中总黄酮提取工艺进行参数优化,以期建立一条实用有效的刺梨叶黄酮提取方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

刺梨叶(4月份)采摘于六盘水师范学院校内,经六盘水师范学院王绪英教授鉴定;亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠(均为分析纯):北京化学试剂厂;芦丁标准品(纯度 $\geq 98\%$):北京中科质检生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计(UV-1800型):上海菁华科技仪器有限公司;超声波清洗机(SB-800DT):宁波新芝生物科技股份有限公司;电热恒温鼓风干燥箱(BGZ-30):上海博迅实业有限公司医疗设备厂;电子分析天平(ATY124):沈阳龙腾电子计量仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品及标准品制备

刺梨叶采收后洗净,再用蒸馏水清洗,放置空旷处自然晾干,在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱内烘干至恒重,用粉碎机粉碎,备用。

采用硝酸铝显色法测定叶片中黄酮含量^[15],取 0.1 g 芦丁标准品至 100 mL 容量瓶中,加 60% 乙醇定容。分别取配置好的标准品 0 、 0.5 、 1.0 、 1.5 、 2.0 、 2.5 、 3.0 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入 0.7 mL 的 5% NaNO_2 混匀放置室温 6 min ,加入 0.7 mL 的 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 混匀放置室温 6 min 后,再加入 10 mL 1 mol/L NaOH ,用 60% 乙醇补齐至 25 mL ,混匀后放置室温 15 min ,在 510 nm 处测量其吸光度,以吸光度为纵坐标,芦丁浓度为横坐标,建立标准曲线方程: $y=10.314x+0.0069$, $R^2=0.9936$ 。

黄酮得率/ $\%$ =提取液中黄酮质量/叶片干粉质量 $\times 100$

1.3.2 提取物单因素试验

按料液比 $1:10$ 、 $1:20$ 、 $1:30$ 、 $1:40$ 、 $1:50$ 、 $1:60$ (g/mL),加入体积分数为 60% 的乙醇溶液,超声时间为 30 min 共 6 个水平;按超声浸提时间 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 min ,加入体积分数为 60% 的乙醇溶液,料液比 $1:30$ (g/mL)

共 6 个水平;按乙醇溶液浓度 40% 、 50% 、 60% 、 70% 、 80% 、 90% ,超声浸提时间 30 min ,料液比 $1:30$ (g/mL)共 6 个水平,分别以刺梨叶干粉为原料,在超声功率为 800 W ,提取温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下,进行单因素试验。

1.3.3 正交试验设计

采用 Design-Expert8.0.6 软件中的 Box-Behnken 进行响应曲面法设计试验,试验条件选取上述 3 个单因素试验中的最适范围附近 3 个数值,以黄酮化合物得率为响应值设计正交试验,所有试验保持超声功率为 800 W ,提取温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 不变,优化刺梨叶黄酮类化合物提取工艺。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 料液比对黄酮得率影响

料液比对黄酮得率影响见图 1

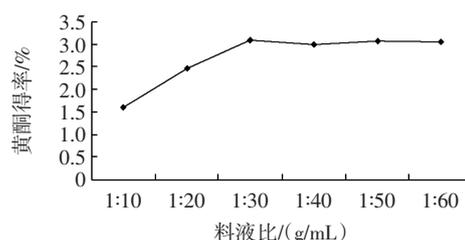


图 1 料液比对黄酮得率的影响

Fig.1 Effect of solid-to-liquid ratio on the yield of flavonoids

由图 1 可知,随着溶剂体积的增加,刺梨叶黄酮得率逐渐升高,当料液比达到 $1:30$ (g/mL)时,刺梨叶黄酮得率趋于平衡,再增加溶剂体积,黄酮得率变化不大。还会增加黄酮提取液浓缩工艺难点和生产成本,故认为料液比选取 $1:30$ (g/mL)左右为宜。

2.1.2 乙醇体积分数对黄酮得率影响

乙醇体积分数对黄酮得率影响见图 2。

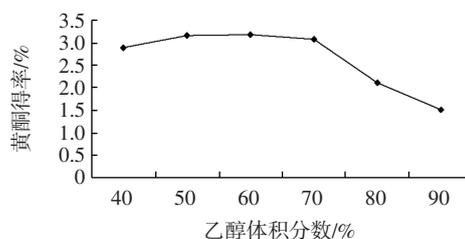


图 2 乙醇体积分数对黄酮得率的影响

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

由图 2 可知,刺梨叶总黄酮得率随着乙醇体积分数的增加呈先增加后下降趋势,当乙醇体积分数在 60% 左右时达到最大值,当乙醇体积分数大于 70% 时,黄酮得率显著降低,这可能是由于不同体积分数的乙醇

极性不同,根据相似相容原理,当乙醇体积分数达到60%时,刺梨叶黄酮类化合物得率达到最大,随着乙醇体积分数的不断增大,有机溶剂与刺梨叶黄酮类化合物间的极性差异逐渐增加,导致其溶出量减少,黄酮类化合物得率下降。综合考虑溶剂用量以及提取率方面,认为刺梨叶黄酮类化合物在乙醇体积分数为50%~70%之间的溶解性较好。

2.1.3 提取时间对黄酮得率影响

提取时间对总黄酮提取率影响如图3所示。

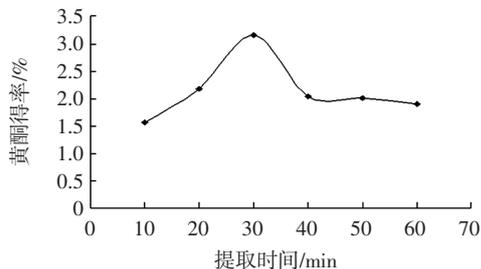


图3 提取时间对黄酮得率的影响
Fig.3 Effect of extraction time on the yield of flavonoids

由图3可知,随着超声时间不断增加,黄酮类化合物得率呈现先升高后降低的趋势,当提取时间达到30 min时,黄酮类化合物得率达到最大,当超声时间超过30 min后,乙醇溶剂不断挥发损失,黄酮类化合物稳定性逐渐变差,其中一些热敏性组分被破坏,导致得率降低。考虑黄酮类化合物得率和提取效率,认为选择超声提取时间30 min最佳。

2.2 响应面法优化提取工艺条件

2.2.1 回归模型建立与分析

依据单因素试验结果,采用Box-Behnken原理设计提取工艺优化试验,试验方案及结果见表1。

表1 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 1 Box-Behnken experimental design and corresponding results

试验号	A 料液比/(g/mL)	B 提取时间/min	C 乙醇体积分数/%	Y 黄酮类化合物得率/%
1	1:30	20	70	2.18
2	1:30	20	50	2.83
3	1:30	40	70	2.47
4	1:30	40	50	3.46
5	1:40	20	60	3.08
6	1:20	20	60	2.10
7	1:40	40	60	3.85
8	1:20	40	60	2.70
9	1:40	30	50	3.81
10	1:40	30	70	2.99
11	1:20	30	50	2.59
12	1:20	30	70	2.05

续表1 Box-Behnken 试验设计与结果

Continue table 1 Box-Behnken experimental design and corresponding results

试验号	A 料液比/(g/mL)	B 提取时间/min	C 乙醇体积分数/%	Y 黄酮类化合物得率/%
13	1:30	30	60	3.98
14	1:30	30	60	3.75
15	1:30	30	60	3.58
16	1:30	30	60	3.87
17	1:30	30	60	3.97

通过Design-Expert8.0.6对黄酮得率的数据进行分析,对表1中响应面与各因素进行回归拟合,得到刺梨叶黄酮类化合物得率(Y)与料液比(A)、提取时间(B)、乙醇体积分数(C)的二次多项回归方程为: $Y = -27.83125 + 0.31237A + 0.37425B + 0.70863C + 4 \times 10^{-4}AB - 6.75 \times 10^{-4}AC - 8.5 \times 10^{-4}BC - 3.8375 \times 10^{-3}A^2 - 5.1125 \times 10^{-3}B^2 - 5.8375 \times 10^{-3}C^2$ 。

对拟合方程进行方差分析,结果如表2所示。

表2 响应面试验结果方差分析表

Table 2 Analysis of variance of each term in the response surface regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	7.65	9	0.85	40.77	<0.000 1**
A	2.3	1	2.30	110.36	<0.000 1**
B	0.65	1	0.65	31.17	0.000 8**
C	1.13	1	1.13	54.33	0.000 2**
AB	6.4×10^{-3}	1	6.4×10^{-3}	0.31	0.596 8
AC	0.018	1	0.018	0.87	0.380 9
BC	0.029	1	0.029	1.39	0.277 5
A ²	0.62	1	0.62	29.74	0.001 0*
B ²	1.10	1	1.10	52.79	0.000 2**
C ²	1.43	1	1.43	68.83	<0.000 1**
残差	0.15	7	0.021		
失拟误差	0.033	3	0.011	0.39	0.764 5
纯误差	0.11	4	0.028		
总和	7.79	16			

注:*为差异显著($P < 0.05$);**为差异极显著($P < 0.01$)。

由表2的方差分析可知,回归方程模型差异极显著($P < 0.01$),方程失拟项差异不显著,说明该方程回归模型与试验数据拟合程度较高。各项方差分析表明A、B、C、B²、C²对黄酮得率有极显著影响,A²对黄酮得率有显著影响。各单因素对黄酮得率的影响力大小顺序为A>C>B,即料液比>乙醇体积分数>提取时间。

2.2.2 响应面图与等高线图分析

为了进一步考察分析提取条件优化过程中各变量之间的交互作用,利用Design-expert8.0.6软件对响应曲面图和等高线图进行绘制,如图4、图5及图6所示。

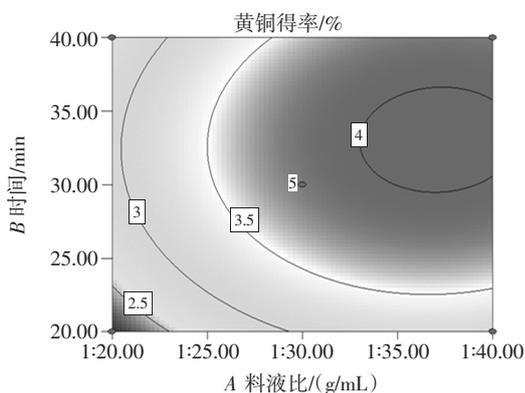
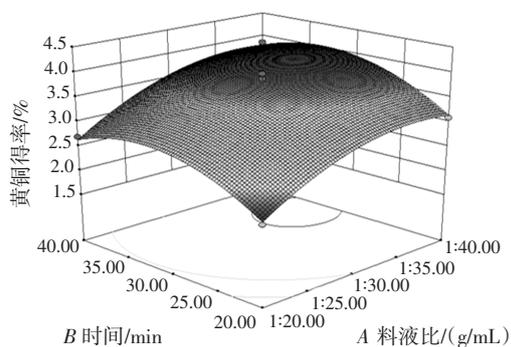


图4 料液比与提取时间对黄酮化合物得率的影响

Fig.4 Interaction effects of liquid-to-solid ratio and extraction time on the yield of flavonoids

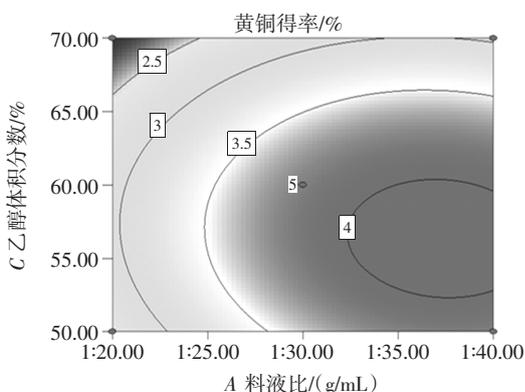
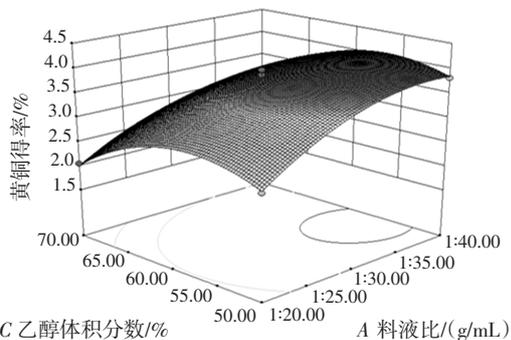


图5 料液比与乙醇体积分数对黄酮化合物得率的影响

Fig.5 Interaction effects of liquid-to-solid ratio and ethanol concentration on the yield of flavonoids

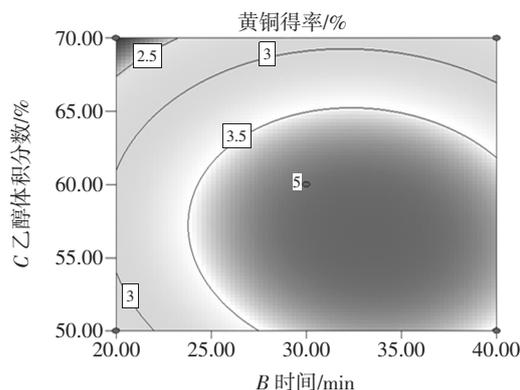
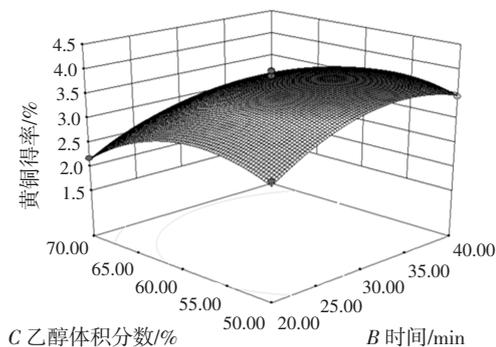


图6 提取时间与乙醇体积分数对黄酮化合物得率的影响

Fig.6 Interaction effects of extraction time and ethanol concentration on the yield of flavonoids

响应面坡度越陡峭,颜色变化越剧烈,等高线呈椭圆形,则说明响应面对此操作条件的变化较敏感,即对黄酮得率影响较大。由图4~图6可以看出,其各因素交互作用对响应面坡度变化较平缓,等高线基本呈圆形,说明AB、AC、BC之间的交互作用不强,对刺梨叶黄酮得率影响较弱,且响应值随着各因素的增加逐渐增大,当达到一定极限后又开始降低。另外,由各单因素的坡度变化可知,料液比对黄酮得率影响大于乙醇体积分数和提取时间的作用。

2.3 提取工艺优化及验证试验

根据回归方程模型得到的最佳工艺条件为料液比1:35.75(g/mL),提取时间33.80 min,乙醇体积分数57.05%,在此条件下,黄酮得率预测值可达41.36 mg/g。为便于试验操作,将最佳提取工艺条件修正为料液比1:36(g/mL),提取时间34 min,乙醇体积分数57%,并在此条件下进行3次平行试验进行验证,得到刺梨叶黄酮的实际得率平均值为 (40.87 ± 0.09) mg/g。该值与理论预测值比较相近,因此认为利用响应曲面法优化刺梨叶黄酮提取工艺具有可行性。

3 结论

试验以刺梨叶为原材料,采用超声辅助提取,提

取温度60℃,在考察料液比、乙醇体积分数、提取时间3个单因素的基础上,通过正交试验发现各因素对刺梨叶黄酮提取的影响力大小为料液比>乙醇体积分数>提取时间。采用响应曲面法优化刺梨叶黄酮提取的最佳条件,即料液比为1:36(g/mL)、提取时间34min、乙醇体积分数57%、提取3次,黄酮化合物的提取率可达(40.87±0.09)mg/g,相对标准偏差为2.21%。

响应曲面法应用于刺梨叶黄酮提取方法具有直观性和高效性,是目前用于工艺优化的有效方法之一^[16],通过验证试验发现,实际得率40.87mg/g与预测得率41.36mg/g相近,该模型拟合度较好,说明试验结果具有一定的实用价值,这也为刺梨叶黄酮类化合物工业生产提供一定的参考依据。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999: 238
- [2] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[M].贵阳:贵州科技出版社,2003: 231
- [3] Scarano A, Chieppa M, Santino A. Looking at Flavonoid Biodiversity in Horticultural Crops: A Colored Mine with Nutritional Benefits[J]. Plants, 2018, 7(4): 98
- [4] Cheng A X, Han X J, Wu Y F, et al. The function and catalysis of 2-oxoglutarate-dependent oxygenases involved in plant flavonoid biosynthesis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(1): 1080-1095
- [5] Al-Huqail A A, Behiry S I, Salem M Z M, et al. Antifungal, Antibacterial, and Antioxidant Activities of *Acacia Saligna* (Labill.) H. L.Wendl. Flower Extract:HPLC Analysis of Phenolic and Flavonoid Compounds[J]. Molecules, 2019, 24(4): 700
- [6] Kawai Y.β-Glucuronidase activity and mitochondrial dysfunction: the sites where flavonoid glucuronides act as anti-inflammatory agents[J]. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2014,54(3): 145-150
- [7] Min N, Leong P T, Lee R C H. A flavonoid compound library screen revealed potent antiviral activity of plant-derived flavonoids on human *Enterovirus A71* replication[J]. Antiviral Research, 2018, 150: 60-68
- [8] 李楠,刘元,侯滨滨. 黄酮类化合物的功能特性[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(6): 139-141
- [9] Fang J Y, Lin C H, Huang T H, et al. In vivo Rodent Models of Type 2 Diabetes and Their Usefulness for Evaluating Flavonoid Bioactivity[J]. Nutrients, 2019,11(3): 530
- [10] 王丽玲,焦必林,曾凡坤. 保健功能因子—生物类黄酮[J].粮食与油脂,2004, 17(9): 18-20
- [11] Wang C Y, Chen C T, Wang S Y. Changes of flavonoid content and antioxidant capacity in blueberries after illumination with UV-C[J]. Food Chemistry, 2009, 117(3): 426-431
- [12] Liu Qing-lin, Fan Wei-guo, An Hua-ming. Studies on the extraction of water-soluble polysaccharides and total flavone from *Rosa roxburghii leaves* [J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2005, 24(6): 522-526
- [13] Tian Yuan, Cao Pei-xue, Liang Guang-yi, et al. An investigation in Chemical Constituents of chestnut rose (*Rosa roxburghii*) leaves[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2009, 28(4): 366-368
- [14] 向显衡,何照凡,牛爱珍. 刺梨叶果中维生素C含量的变化[J].中国果树,1984(1): 50
- [15] 李石容. 金花茶茶花黄酮类化合物的分离纯化及抗氧化活性的初步研究[D].湛江:广东海洋大学,2012: 11
- [16] 沈小钟,杨帆,于荣敏. 响应面法优选黄芪提取工艺[J]. 中国试验方剂学杂志, 2012, 18(18): 34-37

收稿日期:2019-04-23