

文章编号:1001-7380(2020)03-0001-06

响应面法优化乌饭树叶总黄酮超声提取工艺的研究

周 鹏¹,赵 青²,黄 婧¹,张 敏^{1*}

(1. 江苏省林业科学研究院,江苏 南京 211153; 2. 南京林业大学,江苏 南京 210037)

摘要:为确定乌饭树叶总黄酮超声辅助提取最佳工艺条件,以总黄酮提取量为指标,在单因素试验基础上,利用响应面法建立数学模型考察乙醇体积分数、液料比、超声时间及超声温度对乌饭树叶总黄酮提取量的影响,优化乌饭树叶总黄酮提取工艺。结果表明,最佳提取工艺条件为:以体积分数75%乙醇为提取溶剂,液料比65:1 mL/g,超声时间80 min,超声温度65 ℃,在此工艺条件下的总黄酮提取量为23.41 mg/g。该结果与模型预测值相近,表明利用响应面法优化乌饭树叶总黄酮提取工艺合理可行。

关键词:乌饭树;总黄酮;提取;工艺;响应面法

中图分类号:R284.2; S793.9

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2020.03.001

Optimization of ultrasonic-assisted extraction process of total flavonoids from leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb.

Zhou Peng¹, Zhao Qing², Huang Jing¹, Zhang Min^{1*}

(1. Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China; 2. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: In order to determine the optimum conditions in the ultrasonic extraction of total flavonoids in *Vaccinium bracteatum* Thunb. leaves, response surface method was used to optimize the main technological parameters and get the regression model using total flavonoids extraction content as index, based on the results of single factor trial. The screened optimum technological conditions were as follows, 75% of the ethanol concentration as the extraction solvent, liquid-solid ratio of 65 mL:1 g, ultrasonic duration time of 80 min, ultrasonic temperature of 65 ℃. The confirmatory experiment value of the total flavonoids extraction content was 23.41 mg/g, so close to the predicted value of the regression model and the regression equation fitted well with the actual situation. The technological conditions could be referred as flavonoids extraction in *V. bracteatum* Thunb. leaves.

Key words: *Vaccinium bracteatum* Thunb.; Total flavonoids; Extraction; Process; Response surface analysis

乌饭树(*Vaccinium bracteatum* Thunb.)为杜鹃花科(Ericaceae)越桔属常绿灌木,主要分布于长江以南地区。作为我国传统的药食同源植物,具有极高的食用和药用价值。江、浙、闽一带素有用乌饭树嫩叶制作乌米饭食用的习俗^[1]。据《中药大辞典》记载,乌饭树具有益肾固精、强筋明目、散瘀消肿等药效^[2]。研究表明,除了银杏等树种含有黄酮类物质外^[3],乌饭树中也含有黄酮类次生代谢产物,且其种类多样,含量较高(约19.48%)^[4],在抗

氧化^[5]、抗肿瘤^[6]和抑菌消炎^[7]等方面均具有显著效果,是其预防和治疗疾病的关键成分,因而成为目前研究的热点^[8]。

乌饭树叶黄酮类提取物在食品和药品的开发以及食品防腐中已经开始使用,且具有较大的市场前景^[5,9],因此研究乌饭树叶黄酮提取工艺具有重要意义。目前比较常见的黄酮提取方法有浸提法^[10-11]、酶提取法^[12]、超声提取法^[13]等。不同的提取方法各有利弊,需根据提取对象考虑试验的安全

收稿日期:2020-04-09;修回日期:2020-04-22

基金项目:江苏省林业科学研究院青年基金项目“LED光质对乌饭树组培苗生长及叶片黄酮积累的调控研究”(JAF-2016-04);中央财政林业科技推广示范资金项目“乌饭树良种繁育及栽培技术推广”(苏[2019]TG02)

作者简介:周 鹏(1989-),男,江苏如东人,助理研究员,硕士。主要从事植物组织培养技术研究。

***通信作者:**张 敏(1980-),女,内蒙古乌海人,研究员,博士。主要从事生物技术与林木花卉良种繁育工作。

性、经济性和目的性^[14]。已有部分学者对乌饭树叶黄酮提取工艺进行研究,章海燕等^[15]对水提取黄酮的工艺进行了优化;王晓仙等^[16]采用正交设计优化乙醇超声提取乌饭树叶总黄酮的工艺。响应面法是解决多变量问题的一种统计学方法,通过多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系以寻找响应因素的最佳条件,作为有效的分析方法在许多研究领域得到了应用^[10,12,14]。本研究以乌饭树叶为原料,采用超声波辅助法,在单因素试验基础上利用响应面法对影响乌饭树叶黄酮提取量的主要因素进行分析和优化,以期筛选乌饭树叶黄酮的最佳提取工艺条件,为进一步开发利用乌饭树叶黄酮资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乌饭树叶采自江苏省林业科学研究院资源圃,用硅胶保存并带回实验室,擦拭干净,60℃烘干至恒重,粉碎后过60目筛备用。

槲皮素标准品(纯度≥98%)购于北京盛世康普化工技术研究院;醋酸钠、无水乙醇、六水合三氯化铝均为分析纯。

1.2 仪器与设备

DHG-9423A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);FW100型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);KH-500DB型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);SHZ-DIII型循环水式真空泵(巩义市矛华仪器有限责任公司);WFZ UV-2100型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线绘制 黄酮测定采用三氯化铝比色法^[17]。精密称取10 mg 槲皮素标准品,加50%乙醇定容至50 mL,摇匀即得质量浓度为0.2 mg/mL的槲皮素标准溶液。精确量取0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mL 槲皮素标准液置于25 mL容量瓶中,依次加入5 mL的1% AlCl₃溶液和1 mL的10%醋酸钠溶液,然后用50%乙醇定容至25 mL,摇匀,静置10 min,于390 nm处测定吸光度。以吸光度(Y)对槲皮素标准品浓度(X)进行线性回归,得回归方程 $Y=2.719\ 3X-0.001\ 3$, $R^2=0.999\ 7$,表明在0—0.32 mg/mL范围内槲皮素标准品的质量浓度和吸光度呈良好的线性关系。

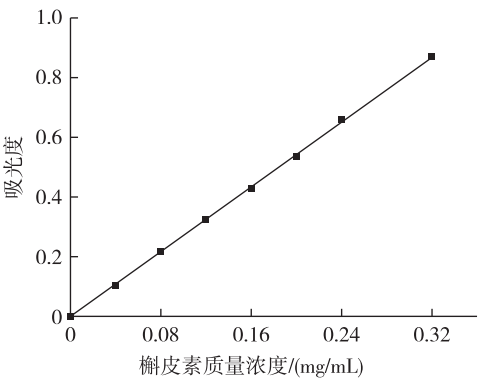


图1 槲皮素标准曲线

1.3.2 乌饭树叶总黄酮的提取和含量测定 准确称取乌饭树叶干燥粉末0.500 g,加入一定体积分数乙醇溶剂,在设定的条件下超声回流提取,抽滤,洗涤滤渣3次,合并滤液并用乙醇定容至50 mL。取0.5 mL黄酮提取液于25 mL容量瓶中,测定吸光度,计算样品中总黄酮含量(mg/g)。

1.3.3 单因素试验设计 固定液料比(40:1 mL/g)、超声时间(30 min)、超声温度(55℃),考察乙醇体积分数(0,30%,50%,70%,90%,100%)对总黄酮提取量的影响;采用筛选出的提取溶剂,固定超声时间(30 min)和超声温度(55℃),考察液料比(20:1,40:1,60:1,80:1 mL/g)对总黄酮提取量的影响;采用筛选出的提取溶剂和液料比,固定超声温度(55℃),考察超声时间(30,50,70,90,110 min)对总黄酮提取量的影响;采用筛选出的提取溶剂、液料比和超声时间,考察超声温度(45,55,65,75℃)对总黄酮提取量的影响。

1.3.4 响应面分析 以单因素试验为基础,利用Design-Expert 8.0.5软件,依据Box-behnken试验设计原理,以乙醇体积分数(A)、液料比(B)、超声时间(C)及超声温度(D)设置为自变量,以总黄酮提取量(Y)为响应值,设计4因素3水平二次回归正交组合试验,各试验因素水平设计见表1。

表1 响应面分析因素与水平

因素	水平		
	-1	0	+1
A/%	65	70	75
B/(mL/g)	50:1	60:1	70:1
C/min	80	90	100
D/℃	62	65	68

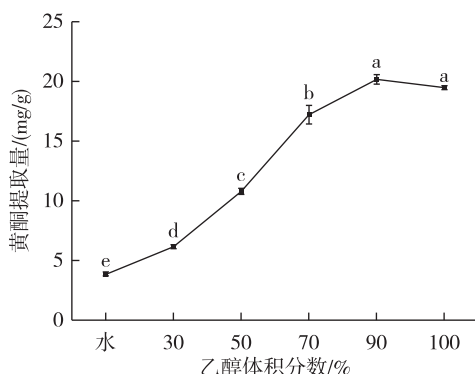
1.4 数据统计与分析

采用 Excel 2003 和 SPSS 20.0 进行数据统计分析;利用 Origin 9.0 对单因素试验数据制图;使用 Design-Expert8.0.5 软件进行响应面试验数据分析和图形输出。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对乌饭树叶总黄酮提取量的影响 由图 2 可知,水作为提取溶剂时总黄酮提取量最小。在乙醇体积分数 30%—90% 范围内,随着乙醇体积分数的增加,总黄酮提取量逐渐增加,当 100% 乙醇作为提取溶剂时,提取量较 90% 乙醇稍有降低,但两者差异不显著 ($P>0.05$)。研究发现,90% 和 100% 乙醇作为提取溶剂时,提取液呈现绿色(其他均为黄色)且出现明显的沉淀,判断是由于原料中叶绿素、脂溶性物质、糖类杂质大量析出,从而增加对总黄酮纯化处理的难度和成本^[10,18]。因此考虑到生产成本,选择 70% 乙醇作为提取溶剂。

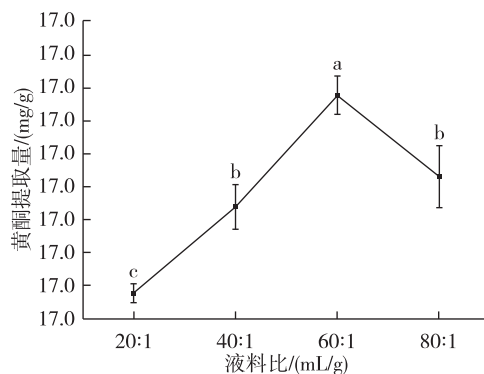


注:不同小写字母表示存在显著性差异 ($P<0.05$)。

图2 乙醇体积分数对总黄酮提取量的影响

2.1.2 液料比对乌饭树叶总黄酮提取量的影响 由图 3 可以看出,当液料比在 20:1—60:1 之间时,随着液料比的增加黄酮提取量增加,当液料比超过 60:1 mL/g 时,黄酮提取量显著下降。原因可能是随着溶剂体积的增加,溶剂与物料接触更加充分,促进乌饭树叶中总黄酮的有效浸提,但当溶剂量超过某一值时,其他物质随之渗出并阻碍黄酮的析出^[19-20]。因此,液料比选择为 60:1 mL/g。

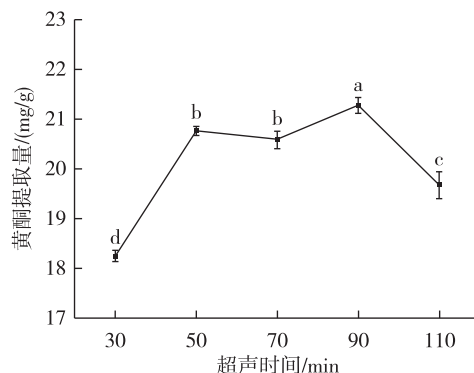
2.1.3 超声时间对乌饭树叶总黄酮提取量的影响 由图 4 可知,随着超声时间的增加,总黄酮提取量呈现出“M”型变化趋势,在 90 min 时达到最大



注:不同小写字母表示存在显著性差异 ($P<0.05$)。

图3 液料比对总黄酮提取量的影响

值。超声时间超过 90 min 后,总黄酮提取量显著下降,推测超声时间过长导致部分黄酮物质被超声波所分解^[12]。因此,从总黄酮稳定性考虑,选择超声时间为 90 min。



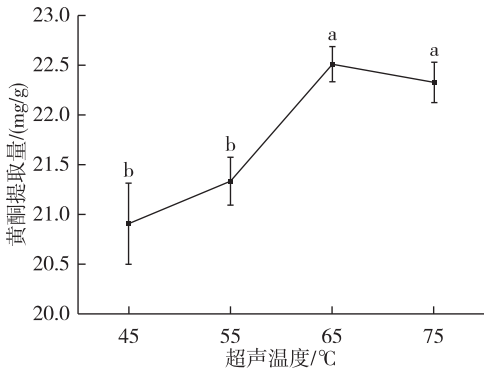
注:不同小写字母表示存在显著性差异 ($P<0.05$)。

图4 超声时间对总黄酮提取量的影响

2.1.4 超声温度对乌饭树叶总黄酮提取量的影响 由图 5 可知,当浸提温度在 45—65 ℃ 之间时,随着超声温度升高,分子运动速率不断加快,类黄酮物质的渗透和扩散速率加快,导致黄酮提取量随之增加,在 65 ℃ 时达到最大值。随着浸提温度继续升高,总黄酮提取量有所降低,判断是由于当温度过高,导致黄酮类组分被氧化^[12],以及乙醇挥发较快,叶中黄酮物质不能充分被溶解^[14],导致总黄酮提取量有所降低。因此,选择超声温度为 65 ℃。

2.2 响应面分析

2.2.1 回归模型的建立与分析 表 2 是响应面优化方案及试验结果。利用 Design Expert 8.0.5 软件对数据进行多元回归拟合分析,得到乌饭树叶总黄酮提取量的预测值 (Y) 对自变量乙醇体积分数 (A)、液料比 (B)、超声时间 (C) 和超声温度 (D) 的



注:不同小写字母表示存在显著性差异($P<0.05$)。
图 5 超声温度对总黄酮提取量的影响

响应回归方程:
$$Y = 22.85 + 0.88A + 0.26B + 0.30C + 0.35D - 0.20AB - 0.54AC + 0.33AD + 4.67BC + 0.33BD - 0.31CD - 0.52A^2 - 0.25B^2 - 0.13C^2 - 1.58D^2$$

表 2 Box-Beknhen 试验设计及结果

序号	乙醇体积分 数/%	液料比 / (mL/g)	超声时 间/min	超声温 度/℃	总黄酮提取 量 /(mg/g DW)
1	-1	-1	0	0	20.86±0.14
2	1	-1	0	0	22.65±0.06
3	-1	1	0	0	21.76±0.09
4	1	1	0	0	22.76±0.14
5	0	0	-1	-1	20.25±0.19
6	0	0	1	-1	21.19±0.11
7	0	0	-1	1	21.58±0.14
8	0	0	1	1	21.26±0.27
9	-1	0	0	-1	19.84±0.12
10	1	0	0	-1	20.91±0.04
11	-1	0	0	1	20.36±0.14
12	1	0	0	1	22.75±0.03
13	0	-1	-1	0	22.22±0.09
14	0	1	-1	0	22.39±0.31
15	0	-1	1	0	22.99±0.07
16	0	1	1	0	23.18±0.24
17	-1	0	-1	0	20.07±0.23
18	1	0	-1	0	23.29±0.17
19	-1	0	1	0	21.89±0.21
20	1	0	1	0	22.94±0.14
21	0	-1	0	-1	20.65±0.02
22	0	1	0	-1	20.84±0.16
23	0	-1	0	1	20.23±0.16
24	0	1	0	1	21.74±0.07
25	0	0	0	0	22.36±0.08
26	0	0	0	0	23.10±0.10
27	0	0	0	0	22.84±0.07
28	0	0	0	0	22.80±0.15
29	0	0	0	0	23.13±0.11

由表 3 可知,该模型方差分析差异极显著($P<0.01$),决定系数 R^2 为 0.938 8,表明其拟合度良好;失拟项检验不显著($P=0.302\ 8>0.05$),表明未知因素对试验结果干扰较小;从 F 值可知,各因素对总黄酮提取量的影响程度依次为 A (乙醇体积分数) $>D$ (超声温度) $>C$ (超声时间) $>B$ (液料比)。其中,一次项 B 和 C 以及交互项 AC 对试验结果有显著影响($P<0.05$);一次项 A 和 D 以及二次项 A^2 和 D^2 对试验结果的影响极显著($P<0.01$)。

表 3 多元回归模型方差分析

方差来源	平方和 SS	自由度 Df	均方 MS	F 值	P	显著程度
总模型	32.07	14	2.29	15.34	<0.000 1	**
A	9.24	1	9.24	61.86	<0.000 1	**
B	0.79	1	0.79	5.27	0.037 7	*
C	1.11	1	1.11	7.44	0.016 3	*
D	1.49	1	1.49	10.01	0.006 9	**
AB	0.15	1	0.15	1.02	0.329 3	
AC	1.18	1	1.18	7.89	0.014 0	*
AD	0.43	1	0.43	2.90	0.110 4	
BC	3.18×10^{-5}	1	3.18×10^{-5}	2.13×10^{-4}	0.988 6	
BD	0.43	1	0.43	2.88	0.112 0	
CD	0.39	1	0.39	2.62	0.127 5	
A^2	1.76	1	1.76	11.78	0.004 0	**
B^2	0.4	1	0.4	2.68	0.124 0	
C^2	0.1	1	0.1	0.68	0.422 0	
D^2	16.2	1	16.2	108.52	<0.000 1	**
残差	2.09	14	0.15			
失拟误差	1.71	10	0.17	1.79	0.302 8	
纯误差	0.38	4	0.096			
总和	34.16	28				

注:*表示 $P<0.05$,差异显著;**表示 $P<0.01$,差异极显著。

2.2.2 响应面图分析 图 6 是基于多元回归模型所绘制的双因素间交互作用对乌饭叶总黄酮提取量影响的响应面分析图。响应曲面陡峭程度越大,说明响应值受所考察因素的交互影响越大,反之,则影响越小。等高线越趋于椭圆形,说明响应值受所考察因素的交互影响越大,越趋于圆形,则影响越小^[21-23]。由图 6 可以看出,从 a 到 f,响应曲面陡峭程度依次增大,等高线也由圆形向椭圆形逐渐过渡(f 除外),表明所考察因素间的交互影响作用由小到大顺序依次为 $BC<AB<CD<BD<AD<AC$,与显著性检验结果相吻合(见表 3)。 f 响应曲面扭曲,可能是由于没有选择提取溶剂单因素试验结果中的最

大值(90%乙醇)作为响应面设计的中心点,而是基

于实际情况选择了70%乙醇的结果。

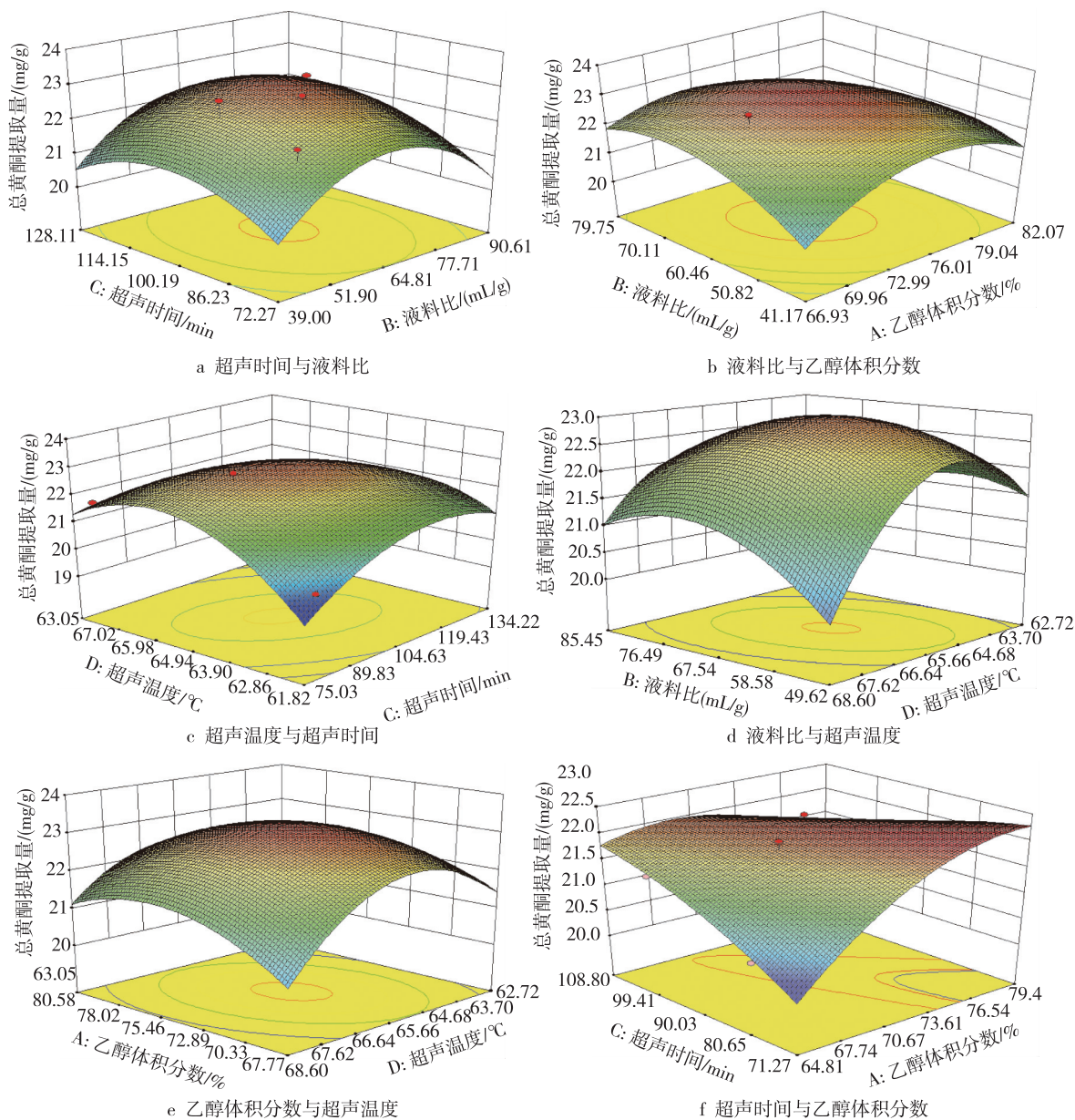


图6 2因素间交互作用对乌饭叶总黄酮提取量影响的响应面图

2.2.3 最佳提取工艺及验证 通过 Design Expert 8.0.5 软件对回归方程进行分析处理,得到最佳工艺条件为乙醇体积分数 75%,液料比 63.47:1 mL/g,超声时间 80 min,超声温度 66.05 ℃,总黄酮提取量的理论值为 23.50 mg/g。从实际操作过程的方便性角度考虑,选择乙醇体积分数 75%,液料比 65:1 mL/g,超声时间 80 min,超声温度 65 ℃,在该工艺下进行 5 次重复试验,总黄酮提取量为 23.41 mg/g,与理论值相近,证明试验模型选择可靠。

3 结论与讨论

乌饭树叶中富含类黄酮化合物,在食品与医药领域均具有广阔的开发利用前景^[1,8]。本研究以乌饭树叶干燥粉末为原料,采用乙醇浸提和超声波辅助法结合响应面法优化提取工艺,所得的 1 次总黄酮提取量为 23.41 mg/g。该结果高于章海燕等^[15]利用水提取黄酮时的结果(提取量达 16.817 mg/g),说明黄酮类物质的醇溶性一般好于水溶性。王晓仙等^[16]采用正交试验优化乌饭树叶总黄酮的提取

工艺条件,得到最佳的超声提取工艺为 70% 乙醇,液料比 40:1 mL/g,超声提取 30 min,提取 2 次,提取量为 29.78 mg/g。本研究中 1 次提取量与前者 2 次提取量结果相近,说明响应面优化超声波辅助提取黄酮的方法可靠。

本研究通过响应面法分析,结合实际操作和生产效益,得到乙醇超声提取乌饭树叶总黄酮的最佳工艺条件为以 75% 乙醇为提取溶剂,液料比 65:1 mL/g,超声时间 80 min,超声温度 65 ℃,在此条件下 1 次总黄酮提取量为 23.41 mg/g,与模型预测值相近,证明采用响应面法优化提取工艺方法可靠,可为乌饭树叶黄酮资源提取和开发利用提供一定科学依据。

参考文献:

- [1] FAN M C, FAN Y H, RAO Z M, et al. Comparative investigation on metabolite changes in 'wu mi' production by *Vaccinium bracteatum* Thunb. leaves based on multivariate data analysis using UPLC-QToF-MS[J]. Food Chemistry, 2019, 286: 146-153.
- [2] 赵 青,陈庆生,方炎明,等.乌饭树化学成分和药理活性研究进展[J].中药材, 2016, 39(6): 1437-1440.
- [3] 吴雅琼,国 靖,周 琦,等.不同产地银杏黄酮及相关活性物质含量变异分析[J].南京林业大学学报(自然科学版), 2019, 43(3): 183-188.
- [4] 王 立,练伟佳,李 言,等.乌饭树资源开发利用研究进展[J].中草药, 2018, 49(17): 4197-4204.
- [5] HU J, WANG J, LI S X, et al. Phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities analysis of extracts from *Vaccinium bracteatum* Thunb leaves[J]. Journal of Applied Botany and Food Quality, 2016, 89: 150-155.
- [6] WANG L, XU H N, YAO H, et al. Phenolic composition and radical scavenging capacity of *Vaccinium bracteatum* Thunb leaves[J]. International Journal of Food Properties, 2011, 14(4): 721-725.
- [7] ZHENG Y, CHEN L, LIU Y H, et al. Evaluation of antimicrobial activity of water-soluble flavonoids extract from *Vaccinium bracteatum* Thunb leaves[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(6): 1853-1859.
- [8] MARIK P, LANDA P, LADOVA P, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidative activity of *Vaccinium bracteatum* [J]. Planta Medica, 2019, 75(9): 1059-1060.
- [9] 张德谨,陈义勇,胡雅琳,等.大孔树脂纯化乌饭树叶黄酮工艺研究[J].食品与机械, 2018, 34(2): 166-170, 194.
- [10] 田 刚,张乐乐,贺国旭,等.响应面法优化月季叶总黄酮提取工艺的研究[J].河南工业大学学报(自然科学版), 2019, 40(2): 75-79.
- [11] CHI R, TAN J, GAO H, et al. Kinetics of leaching flavonoids from *Pueraria lobata* with ethanol[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2006, 14(3): 402-406.
- [12] 谢勇武,谭属琼,陈玉莹.响应面法优化辣木叶总黄酮提取工艺及其分离纯化[J].分子植物育种, 2019, 17(15): 5120-5130.
- [13] CHEN Y, GU X, HUANG S Q, et al. Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(4): 429-435.
- [14] 马金菊,孙江飞,武文浩,等.响应面法优化无花果叶总黄酮超声辅助提取工艺[J].中国酿造, 2018, 37(3): 140-144.
- [15] 章海燕,王 立,张 晖.基于响应面分析法优化的乌饭树树叶水溶性黄酮提取条件[J].食品工业科技, 2010, 31(3): 260-263.
- [16] 王晓仙,谭 飞,姚 舜,等.乌饭树树叶总黄酮的超声提取工艺研究[J].中国药师, 2015, 18(1): 66-68.
- [17] 王 立,姚惠源.乌饭树树叶中黑色素定量检测方法的研究[J].食品工业科技, 2005(10): 176-179.
- [18] 杜银香,张建伟,胡泽华,等.华中枸骨叶总黄酮超声提取工艺的优化及其抑菌作用[J].中成药, 2019, 41(9): 2200-2203.
- [19] 李玉娟,陈燕文,席晓志,等.响应面法优化玛咖总黄酮提取工艺[J].食品与药品, 2017, 19(4): 251-256.
- [20] 张玲玲,孙芬芳,张蓉希,等.响应面法优化提取丁香中的总黄酮及抗氧化性研究[J].中国调味品, 2019, 44(11): 40-43, 50.
- [21] 侯学敏,李林霞,张直峰,等.响应面法优化薄荷叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J].食品科学, 2013, 34(6): 124-128.
- [22] 陈 兰,李喜宏,王腾月,等.响应面法优化枣核总黄酮超声提取工艺研究[J].食品工业科技, 2013, 34(24): 292-295.
- [23] PRAKASH M J, MANIKANDAN S, THIRUGNANASAMBANDHAM K, et al. Box-Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(1): 604-611.