

响应面法优化箬叶总黄酮的超声提取工艺

贺伟强¹, 陈召桂², 高璇¹, 洪丽芝¹

(1. 嘉兴职业技术学院, 浙江 嘉兴 314001; 2. 浙江五芳斋实业股份有限公司, 浙江 嘉兴 314000)

摘要:为了优化箬叶黄酮的提取工艺,在乙醇体积分数、液料比、提取时间和超声功率4个单因素试验的基础上,采用响应面法优化箬叶总黄酮的提取工艺,考察各因素的影响效应及其交互作用。结果表明:确定最佳提取工艺条件为液料比50:1,乙醇体积分数76%,提取时间80 min,超声功率234 W,提取2次。采用此工艺条件,箬叶总黄酮得率预测值为2.052%,验证值为2.017%。回归方程的预测值与验证值的相对误差为1.71%,该回归方程与实际情况拟合良好。

关键词:箬叶;总黄酮;提取工艺;响应面法

中图分类号:S795.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)11-0131-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.11.0131

箬叶为箬竹的叶子,箬竹为禾本科、箬竹属植物,主要分布于我国长江以南各省区。箬叶当前主要作为食品包装物用于包裹粽子,被国家卫生部确认为药食两用资源,是一种可以开发利用的新型食用、药用资源^[1]。现代药物分析研究表明,箬叶中含有箬叶黄酮、箬叶多糖、有机硒、锌、碘、钙、多种维生素和氨基酸等对人体有益的活性成分。其中的黄酮类化合物与银杏黄酮类化合物具有相似的化学组成,具有明显的清除自由基、抗脂质过氧化和调节血脂的功效^[2-4]。

响应面分析法(response surface methodology, RSM)作为一种工艺条件优化的有效方法,可以建立连续变量曲面模型,通过回归方程来拟合多个响应变量和一系列试验变量之间的关系,考察不同试验因素及其交互作用对目标响应值的影响^[5-7]。该方法能经济、有效、快速地确定多试验因素的最佳组合条件^[8-10]。本研究以乙醇溶液为溶剂,研究了不同乙醇体积分数、液料比、超声功率和提取时间对箬叶总黄酮的影响规律,利用响应面分析法,获得了箬叶总黄酮超声提取的优化工艺。

1 材料与方法

1.1 材料

供试箬叶产自湖南省张家界市。50℃烘干后用粉碎机粉碎过筛80目备用。芦丁标准品购

于上海金穗生物科技有限公司;乙醇、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠等试剂均为分析纯。紫外可见分光光度计(型号UV1102 II),高速多功能粉碎机(型号JP-500B-2),电子天平(型号AL104-IC),超声波细胞粉碎机(型号JY99-IIIBN)。

1.2 方法

1.2.1 样品溶液制取与箬叶总黄酮含量测定方法 准确称量箬叶粉1 g,放入三角瓶中,加入乙醇溶液后超声辅助提取,提取液过滤到50 mL容量瓶中并定容,混匀后测定吸光值。提取2次,2次结果相加即为箬叶总黄酮得率。

采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠法,吸取提取液1 mL于10 mL离心管中,加入5%硝酸钠溶液0.3 mL,震荡后静置5 min,再加入10%硝酸铝溶液0.3 mL,震荡后静置5 min,再加入1 mol·L⁻¹的氢氧化钠溶液4 mL,静置10 min后在510 nm下测定吸光度。代入回归方程,计算出样品提取液中的总黄酮浓度C,箬叶黄酮的含量:Y = C·50/M×100%。式中:Y为总黄酮得率,%;M为称量的箬叶粉的准确质量,g。

1.2.2 绘制标准曲线 以芦丁的标准溶液(400 μg·mL⁻¹)为母液,依次稀释成400、300、200、100、50 μg·mL⁻¹的标准溶液。分别取1 mL置于10 mL的具塞比色管中,按照1.2.1中的方法测定吸光度,以OD₅₁₀为纵坐标,质量浓度(μg·mL⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线。得回归方程:Y = 3.011X + 0.013 7, R² = 0.999 2。

1.2.3 单因素试验设计 选择液料比50:1,提取时间60 min,超声功率200 W,考察不同乙醇体积分数(20%、40%、60%、80%、100%)超声提取2次对总黄酮得率的影响;选择上述试验确定

收稿日期:2016-07-16

基金项目:2015年浙江省高校访问工程师资助项目(2015(66))

第一作者简介:贺伟强(1979-),男,河南省新郑市人,硕士,副教授,从事植物活性成分的提取与开发技术研究。E-mail: hwwq2005003@163.com。

的最佳乙醇体积分数,提取时间 60 min,提取功率 200 W,考察不同液料比(20:1,30:1,40:1,50:1,60:1)超声提取 2 次对总黄酮得率的影响;选择上述试验确定的最佳乙醇体积分数和最佳液料比,超声功率 200 W,考察不同提取时间(20、40、60、80、100 min)对总黄酮得率的影响;选择上述试验确定的最佳单因素条件,考察不同超声功率(100、150、200、250、300 W)提取 2 次对总黄酮得率的影响。

1.2.4 Box-Behnken 中心组合设计 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,选提取时间、提取功率和乙醇体积分数作为对箬叶总黄酮得率影响较显著的 3 个因素进行三因素三水平的中心组合实验见表 1。

表 1 Box-Behnken 中心组合因素水平设计

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken central component experiments design

水平	提取时间 (X_1)/min	提取功率 (X_2)/W	乙醇体积分 数(X_3)/%
Levels	Extracting time	Extracting power	Volume fraction of ethyl alcohol
-1	40	150	60
0	60	200	80
1	80	250	100

2 结果与分析

2.1 超声辅助提取过程中的单因素试验

2.1.1 乙醇体积分对总黄酮得率的影响 从图 1 可以看出,乙醇体积分在 20%~80%时,总黄酮得率逐步增大,乙醇体积分大于 80%后总黄酮得率逐渐减小。因此在其它因素确定条件下乙醇较佳体积分选择 80%。

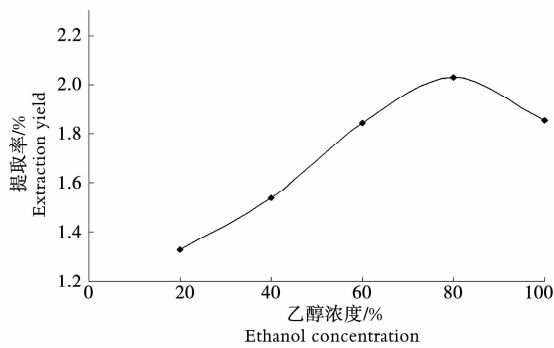


图 1 乙醇体积分对总黄酮得率的影响
Fig. 1 Effect of ethanol concentration on the yield of total flavonoids

2.1.2 液料比对总黄酮得率的影响 从图 2 可以看出,选择乙醇体积分数为 80%总黄酮得率随着液料比的增大而增加,当液料比为 50:1 时,总黄酮得率达到较高水平,继续提高液料比总黄酮得率曲线坡度增长不明显。因此从节约提取溶剂和提取效率的角度来看,其它条件为确定条件下液料比选择 50:1。

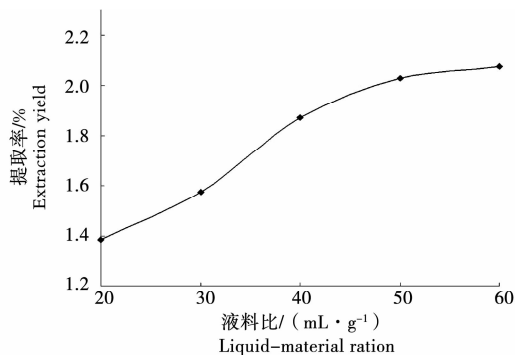


图 2 液料比对总黄酮得率的影响
Fig. 2 Effect of liquid-material ration on the yield of total flavonoids

2.1.3 提取时间对总黄酮得率的影响 选择乙醇体积分 80%、液料比 50:1,提取功率 200 W,考察不同提取时间(20、40、60、80、100 min)对总黄酮得率的影响。从图 3 可以看出,总黄酮得率随着提取时间的增加而升高,超声提取 60 min 时达到最大值,之后总黄酮得率呈现下降趋势。因此从节能和提高效率的角度来看,其它条件确定条件下超声时间选择 60 min。

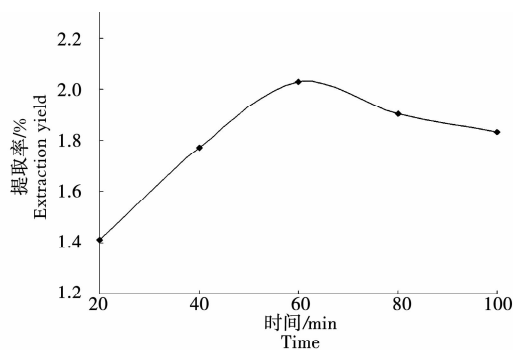


图 3 提取时间对总黄酮得率的影响
Fig. 3 Effect of extraction time on the yield of total flavonoids

2.1.4 超声功率对总黄酮得率的影响 选择乙醇体积分 80%、液料比 50:1、超声提取 60 min,考察不同超声功率(100、150、200、250、300 W)提取两次对总黄酮得率的影响。由图 4 可知随着功率升高总黄酮得率逐渐升高,200 W 时总黄酮得率

达到最高,之后随着功率的升高得率降低,因此当其它条件确定时,总黄酮较佳超声功率为 200 W。

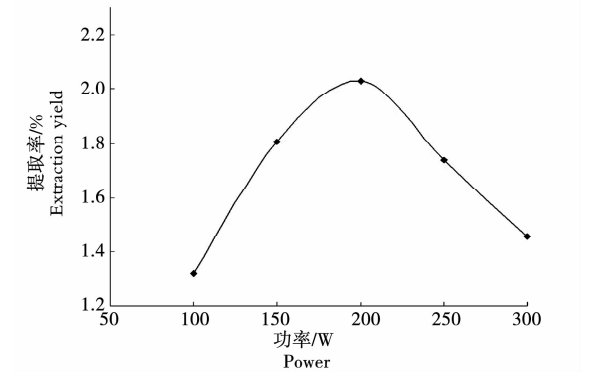


图 4 提取功率对总黄酮得率的影响

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

2.2 响应面结果与分析

2.2.1 回归模型的建立与分析 设定提取功率为 200 W,利用响应面分析法对提取时间、液料比和乙醇体积分数 3 个因素分析得到的试验设计方案及结果见表 2。

以箬叶总黄酮得率为响应值,表 2 数据经回归拟合后,得到回归方程: $Y=1.99+0.088 X_1+0.22X_2-0.046X_3+0.040X_1 X_2-0.021X_1 X_3-0.054X_2 X_3-0.12X_1^2-0.19X_2^2-0.25X_3^2$ 。通过

Design-Expert8.0.7 对表 2 的数据分析,由表 3 看出,箬叶总黄酮得率二次多项式模型 $P<0.01$,

表 2 Box-Behnken 中心组合设计及试验结果

Table 2 Design and the results of the Box-Behnken central component experiments

序号	提取时间/min (X_1)	液料比/ ($g\cdot mL^{-1}$) (X_2)	乙醇体积 分数/% (X_3)	得率(Y)/% Extraction rate
1	—1	—1	0	1.390
2	1	—1	0	1.510
3	—1	1	0	1.767
4	1	1	0	2.047
5	—1	0	—1	1.492
6	1	0	—1	1.684
7	—1	0	1	1.582
8	1	0	1	1.692
9	0	—1	—1	1.402
10	0	1	—1	1.918
11	0	—1	1	1.278
12	0	1	1	1.577
13	0	0	0	1.988
14	0	0	0	2.028
15	0	0	0	1.944

表 3 回归模型方差分析

Table 3 ANOVA for the regression model

方差来源 Variance source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
模型 Model	0.85	9	0.094	10.31	0.0097	* * ($P<0.01$)
X_1	0.062	1	0.062	6.76	0.0483	
X_2	0.37	1	0.37	40.99	0.0014	* * ($P<0.01$)
X_3	0.017	1	0.017	1.85	0.2322	
$X_1 X_2$	6.400×10^{-3}	1	6.400×10^{-3}	0.70	0.4403	
$X_1 X_3$	1.681×10^{-3}	1	1.681×10^{-3}	0.18	0.6855	
$X_2 X_3$	0.012	1	0.012	1.29	0.3073	
X_1^2	0.053	1	0.053	5.80	0.0609	
X_2^2	0.13	1	0.13	14.39	0.0127	
X_3^2	0.24	1	0.24	26.23	0.0037	* * ($P<0.01$)
残差 Residual	0.046	5	9.115×10^{-3}			
失拟项 Lack of fit	0.042	3	0.014	7.94	0.1139	
纯误差 Pure error	3.531×10^{-3}	2	1.765×10^{-3}			
总和 Total egression	0.89	14				

复相关系数 Multiple correlation coefficient $R^2=0.9489$

调整确定系数 Adjusted determination coefficient $R^2=0.8569$

达到极显著水平;模型的失拟项不显著($P=0.1139$);该模型的复相关系数 $R^2=0.9489$,表明该模型的回归方程的拟合度良好,该方程为箬叶总黄酮得率与提取工艺参数的数学模型^[11-13]。

2.2.2 响应面分析 根据建立的拟合函数,定性分析提取时间、液料比和乙醇体积分数对箬叶总黄酮得率的关系,每2个因素对总黄酮得率的等高线和响应面见图5,从等高线可以看出总黄酮得率最大值的条件应该在圆心处。比较3组图可

知,对箬叶总黄酮得率影响显著的因素,表现曲线和响应曲面较为陡峭,对总黄酮得率影响不显著的因素,表现曲线和响应曲面较为平缓^[14],其中超声功率对总黄酮得率影响显著($P<0.01$)。单因素对总黄酮得率的影响顺序为:超声功率(X_2)>提取时间(X_1)>乙醇体积分数(X_3)。 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 的交互作用均不显著($P>0.05$),说明超声功率、提取时间和乙醇体积分数之间的交互作用对总黄酮得率的影响较小。

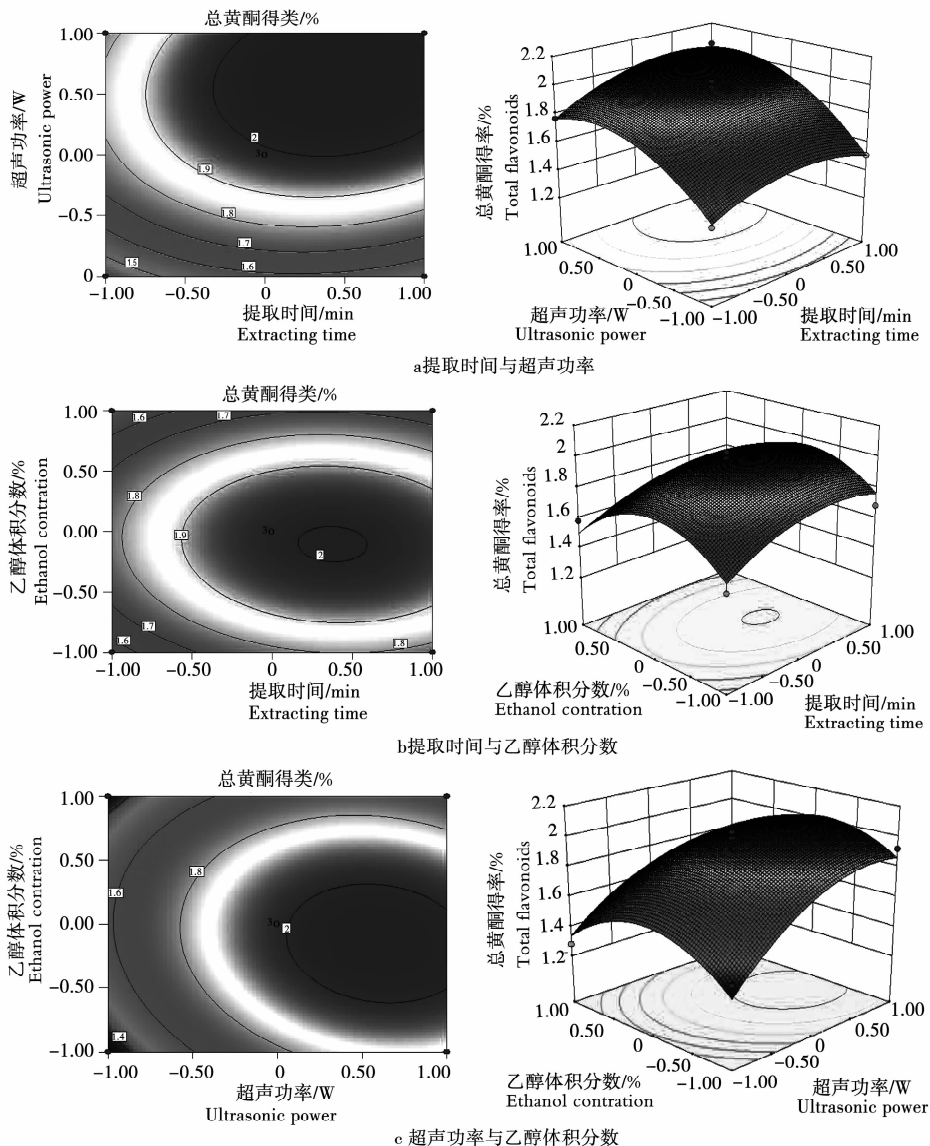


图5 各两因素对总黄酮得率的交互作用

Fig. 5 Interaction of each two factors on the yield of total flavonoids

2.2.3 提取工艺的优化与验证 由 Design expert 8.0.7 优化后的提取工艺为:液料比 50:1,提

取时间 80 min,超声功率 234 W,乙醇体积分数 76%,提取 2 次。在此工艺条件下进行 3 次重复

验证试验,得到箬叶总黄酮得率的平均值为 2.017%,达到模型预测值(2.052%)的 98.29%,证明应用响应面法建立的箬叶总黄酮得率预测模型可靠。

3 结论

本试验以张家界的箬叶为材料,采用超声波辅助法提取箬叶总黄酮得到的优化模拟方程为: $Y=1.99+0.088X_1+0.22X_2-0.046X_3+0.040X_1X_2-0.021X_1X_3-0.054X_2X_3-0.12X_1^2-0.19X_2^2-0.25X_3^2$ 。根据响应面分析得到的优化提取工艺条件为液料比 50,提取时间 80 min,超声功率 234 W,乙醇体积分数 76%,提取 2 次,在此工艺条件下,箬叶总黄酮得率达到 2.017%,与模型预测值 2.052%非常接近。与传统的浸提法相比较,不仅大大缩短了提取时间,而且提高了总黄酮得率,是一种经济、快捷而且高效的提取工艺。

参考文献:

- [1] 苏春花,王福升,丁雨龙.长节箬竹叶总黄酮提取工艺[J].林业科技开发,2010,24(5):87-90.
- [2] 高梦祥,张佳烂,王江明.微波浸提竹叶黄酮的工艺研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(7):147-150.

- [3] 黄京华.丛生竹黄酮类化合物的分析研究及其在分类上的应用[J].竹子研究汇刊,1993,12(1):18-27.
- [4] 魏凤玉,方菊,陈玮,等.竹叶黄酮在豆浆保鲜中的应用[J].食品科学,2012,33(18):312-315.
- [5] 崔大明,张益波,付璐,等.响应面法优化超声法提取枸杞中总黄酮工艺[J].食品研究与开发,2011,32(3):55-59.
- [6] Myers W R. Encyclopedia of biopharmaceutical statistics[M]. New York:Marcel Dekker,2003:858-869.
- [7] 陈魁.试验设计与分析[M].北京:清华大学出版社,1996:94-180.
- [8] 吴华勇,黄赣辉,顾振宇,等.响应曲面法优化竹叶总黄酮的提取工艺研究[J].食品科学,2008,29(11):196-200.
- [9] 余清,许慧星,肖小蓉,等.基于响应面分析法优化的乌饭树叶总黄酮提取条件[J].食品科学,2008,24(1):93-98.
- [10] 肖卫华,韩鲁佳,杨增玲,等.响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究[J].中国农业大学学报,2007,12(5):52-56.
- [11] 邹建国,刘飞,刘燕燕,等.响应面法优化微波辅助提取枳壳中总黄酮工艺[J].食品科学,2012,33(2):24-28.
- [12] 候学敏,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.
- [13] 贺伟强,周奇迹,沈永根.微波辅助水浸提桑叶总黄酮的工艺条件优化试验[J].蚕业科学,2014,40(2):295-300.
- [14] 王丰俊,王运强,顾欣,等.响应面法优化超声波提取构树叶中叶绿素的工艺研究[J].北京林业大学学报,2010,32(6):135-140.

Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of Total Flavonoids from Indocalmus Leaves

HE Wei-qiang¹, CHEN Zhao-gui², GAO Xuan¹, HONG Li-zhi¹

(1. Jiaxing Vocational and Technical College, Jiaxing, Zhejiang 314001; 2. Zhejiang Wufang-zhai Industry Limited Company, Jiaxing, Zhejiang 314000)

Abstract: In order to optimize flavonoids extraction process from indocalmus leaves, based on single factor test, response surface methodology was used to explore the factors of ethanol concentration, liquid-material ratio, extraction time and ultrasonic power as well as their cross-interactions on extraction rate of flavonoids. Based on the results of response surface methodology, the optimum extraction conditions was ascertained as follows: liquid-material ration was 50:1, ethanol concentration was 76%, extraction time was 80 min and ultrasonic power was 234 W, extraction twice. Under the optimum extraction condition, the predicted extraction rate of flavonoids was 2.052% and the actual extraction rate was 2.017%. The experimental values predicted from the regression equation within a relative error of 1.71%, indicating a good fitness.

Keywords: indocalmus leaves; total flavonoids; extraction technology; response surface methodology