

响应面优化野生櫻桃李叶总黄酮的超声辅助提取工艺

刘伟,何晓燕,陈文强,朱燕,代思月,欧阳艳*

新疆维吾尔自治区普通高校天然产物化学与应用重点实验室 伊犁师范学院,伊宁 835000

摘要:以具有地域特色的野生櫻桃李叶为实验材料,在单因素试验基础上,以乙醇体积分数、提取温度、料液比为自变量,总黄酮提取量为响应值,利用响应面法优化野生櫻桃李叶总黄酮的超声辅助提取最佳条件为乙醇体积分数 51%、提取温度 72 ℃、料液比 1:45 g/mL,在 300 W 功率下超声提取 30 min,提取次数 2 次,总黄酮提取量为 38.27 mg/g,达到预测值的 98.3%。超声辅助提取较传统索氏提取操作简单,耗时少,提取效率高,是野生櫻桃李叶总黄酮提取的一种有效方法。

关键词:野生櫻桃李;总黄酮;超声波;响应面法

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.10.015

Optimization of Ultrasonic-assisted extraction of Total Flavonoids from *Prunus divaricata* Ldb Leave Using Response Surface Methodology

LIU Wei, HE Xiao-yan, CHEN Wen-qiang, ZHU Yan, DAI Si-yue, OUYANG Yan*

University and College Key Lab of Natural Product Chemistry and Application in Xinjiang, Yili Normal University, Yining 835000, China

Abstract: The optimal conditions for the ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Prunus divaricata* Ldb leave were determined using response surface methodology. Based on single factor experiments, the influence of ethanol concentration, extraction temperature and solid-liquid ratio on the extraction yield of total flavonoids were investigated. The optimal conditions were determined as follows: ethanol concentration was 51%, extraction temperature was 72 ℃, solid-liquid ratio was 1:45 (g/mL), ultrasonic power was 300 W, for 2 times, each time 30 min, the yield of total flavonoids was 38.27 mg/g, which accounts for 98.3% of the theoretically predicted value. Compared with the traditional Soxhlet extraction, the ultrasonic-assisted extraction was more convenient, less time-consuming, higher extraction efficiency. Hence, the ultrasonic-assisted extraction can be used as an effective method for the extraction of total flavonoids from *P. divaricata* leave.

Key words: *Prunus divaricata* Ldb; total flavonoids; ultrasonic; response surface methodology

野生櫻桃李(*Prunus divaricata* Ldb.),俗称野酸梅,蔷薇科李属,落枝灌木或小乔木。植株高 1.5~8.0 m,多分枝,枝条细长,开展形,叶繁茂,深绿色^[1],主要分布于中亚天山、高加索、小亚细亚及巴尔干半岛,在我国仅分布于新疆伊犁霍城县的大西沟和小西沟^[2]。本地哈萨克牧民长期食用櫻桃李果酱或将果实晒干泡茶饮用,高血脂及高血压患者较少,因此野生櫻桃李被誉为“雪域珍果”^[3],具有天然的保健功能和开发前景。国内学者对野生櫻桃李的研究多集中在生态、栽培及果实营养成分等方面,对其有效成分的提取与活性研究近年来才逐步

开展,其中野生櫻桃李果皮色素和果肉总酚提取物均表现出了较好的抗氧化活性^[4,5]。黄酮类化合物是植物花、叶等器官中的重要次级代谢产物,在心血管病治疗、抗病毒、抗肿瘤、保肝、抑菌、抗衰老等方面有着广泛的用途^[6]。超声波辅助提取是利用超声波的空化效应、热效应和机械作用来加快物质的溶出,缩短提取时间,提高提取效率^[7]。近年来,超声辅助提取技术广泛应用于提取天然产物有效成分黄酮、生物碱、三萜等研究领域^[8,9]。本文采用超声辅助提取的方法,在单因素试验基础上,结合响应面法优化野生櫻桃李叶总黄酮的超声辅助提取工艺,以期野生櫻桃李资源的利用与开发提供理论依据。

1 材料与方法

收稿日期:2015-06-19

接受日期:2015-08-26

基金项目:新疆维吾尔自治区高校科研计划(XJEDU 2014S061);
自治区教育厅普通高校重点实验室资助项目(2013YS
HXZD03)

*通讯作者 Tel:86-013909995611; E-mail: ilioyy@126.com

1.1 材料、试剂与仪器

材料与试剂:野生樱桃李树叶于新疆伊犁霍城县大西沟 10 月份采摘,经伊犁师范学院资源与生态研究所赵玉副教授鉴定为蔷薇科野生樱桃李叶,洗净自然晾干后 50 °C 烘干至恒重,粉碎过 60 目筛备用,树叶标本存放于伊犁师范学院资源与生态研究所。芦丁标准品,国药集团化学试剂有限公司(批号:65011360);亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、氯化铝、无水乙醇均为分析纯。

仪器:UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津分析仪器厂);XH-2008D 智能温控低温超声波催化合成仪(北京祥鹤科技发展有限公司);DD-5M 型低速离心机(湘仪离心机有限公司);FA2104 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);BAO-150AG 型电热恒温干燥箱(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的绘制

为避免含邻二酚类化合物对总黄酮含量测定的干扰,参照文献^[10],选用对黄酮类化合物专属性较强的 $AlCl_3$ 法测定样品总黄酮含量。精确称取芦丁标准品 25.0 mg,用少量的 60% 乙醇溶液溶解后定容于 100 mL 容量瓶中,摇匀得 0.25 mg/mL 的芦丁标准溶液,备用。精密移取上述芦丁标准溶液 0.0、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL,分别加入盛有 5.0 mL 60% 乙醇溶液的 25 mL 相同规格的容量瓶中,再加 0.1 mol/L $AlCl_3$ 溶液 2.0 mL,用 60% 乙醇溶液定容至刻度,摇匀,放置 15 min,以加入 0.0 mL 芦丁的溶液为空白对照,于 417 nm 处测定吸光值。以芦丁标准溶液质量浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,

绘制标准曲线得 $y = 27.93619x + 0.0023$, $R^2 = 0.9999$,结果表明在浓度 8.0 $\mu\text{g/mL}$ 至 18.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内两变量呈现良好的线性关系。

1.2.2 野生樱桃李叶总黄酮提取单因素试验

精密称取 1.0000 g 的备用野生樱桃李叶,固定料液比 1:30 g/mL、提取温度 70 °C、提取时间 30 min,考察不同乙醇体积分数(30%、40%、50%、60%、70%)对总黄酮提取的影响;其它条件不变,设定试验所得最适乙醇体积分数,考察不同提取温度(40、50、60、70、80 °C)对总黄酮提取的影响;按照上述方法依次考察超声提取时间(10、20、30、40、50 min)、料液比(1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 g/mL)对总黄酮提取的影响;上述试验均在 300 W 功率下超声提取 2 次,合并提取液,将提取液 4000 rpm 离心 10 min,取上清液定容待测。精密移取 1.0 mL 定容后的溶液按照 1.2.1 方法测定总黄酮含量,重复 3 次取平均值。

$$Y = k \times \frac{c \times V}{m}$$

式中: Y 为总黄酮含量(mg/g), k 待测液与测试液体积之比, c 为标准曲线法计算所得浓度(mg/mL), V 为测试液定容的体积(mL), m 为野生樱桃李叶质量(g)。

1.2.3 响应面设计

在单因素试验的基础上,以总黄酮提取量为响应值,选取乙醇体积分数(A)、提取温度(B)、料液比(C)为自变量,采用 Box-Behnken 设计三因素三水平试验,因素水平设计见表 1,利用 Design-Expert 8.05 软件对实验数据进行分析。

表 1 响应面试验因素及水平表

Table 1 Factors and levels of RSM test

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
A 乙醇体积分数 Ethanol concentration (%)	45	50	55
B 提取温度 Extraction temperature (°C)	65	70	75
C 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	1:35	1:40	1:45

1.2.4 超声辅助提取法与传统索氏提取法效果比较

准确称取 1.0000 g 的备用野生樱桃李叶,分别采用超声辅助提取法(在响应面优化的最佳工艺参数进行),传统索氏提取法(与超声提取相同的提取

溶剂和料液比,微沸状态提取 4 h),考察不同提取方法对野生樱桃李叶总黄酮提取的影响。

2 结果与分析

2.1 不同提取条件下单因素试验结果

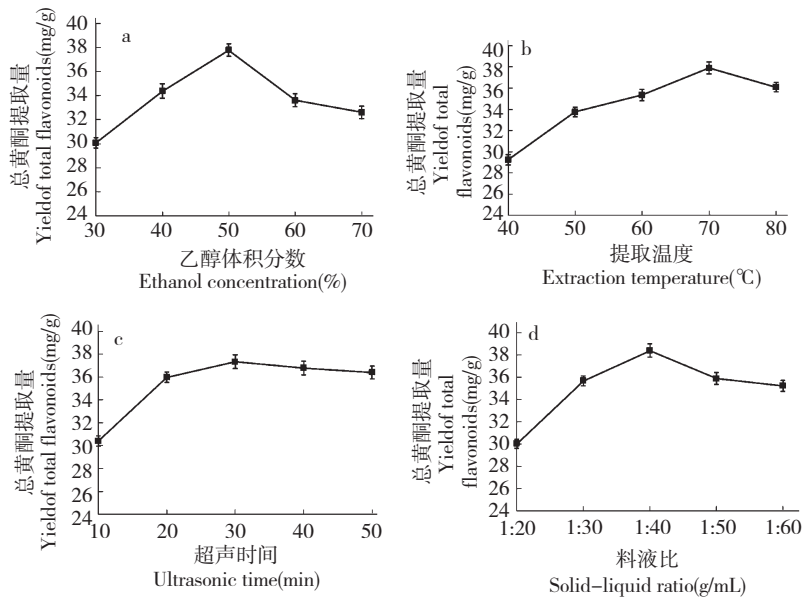


图1 乙醇体积分数(a)、提取温度(b)、超声时间(c)及料液比(d)对总黄酮提取量的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration (a), extraction temperature (b), ultrasonic time (c) and solid-liquid ratio (d) on extraction yield of total flavonoids

由图1a可知,当乙醇体积分数小于50%时,野生櫻桃李叶总黄酮提取量随着乙醇体积分数的增大而增高。黄酮类化合物在植物体中通常与糖结合成苷类,小部分以游离态(苷元)的形式存在。推测原因野生櫻桃李叶中黄酮苷类物质较多,黄酮苷水溶性较好,当以极性较大的溶剂提取时效果较好。试验过程中发现当乙醇体积分数大于60%时,所得提取溶液颜色明显加深,在417 nm的紫外吸收值会突然增大。有文献报道乙醇浓度是影响色素提取的显著因素^[11]。当提取溶剂浓度大于60%时野生櫻桃李叶中的色素、糖类等物质会溶于溶剂中,影响了黄酮类化合物的浸出,干扰因素也随之增大。因此,选择50%乙醇为最适宜提取溶剂。由图1b可知,当提取温度在40~70℃之间,提取温度与总黄酮提取量呈正相关性,可能是温度升高加剧了黄酮分子之间碰撞频率,植物细胞更容易破裂,加快了黄酮类化合物的溶出。当提取温度超过70℃后,总黄酮提取量有所降低,可能是温度过高对野生櫻桃李叶中总黄酮的组织结构有所破坏,与李楠等^[12]报道一致;此外,在80℃时溶剂易挥发也会影响总黄酮的提取效果。因此选择提取温度为70℃为宜。由图1c可知,当超声时间在30 min之前,总黄酮提取量随时间的延长增加显著,之后略有下降。可能是由于超声波的强振动、强空化效应等对植物细胞壁的

破坏作用,加快了细胞内容物的溶出^[13]。随着超声时间的延长,植物细胞膜会进一步被破坏,其中的粘液等杂质溶出使提取液粘度增大,影响提取效果。因此选择30 min为适宜提取时间。由图1d可知,总黄酮的提取量随着料液比的增加呈现先快速增长而后下降的趋势。增加提取溶剂用量,可以使物料与溶剂充分接触,同时可以增加传质动力,从而有助于总黄酮的溶出。当料液比达到1:40 g/mL后,总黄酮提取量有所下降,可能是溶剂过多,在超声作用下野生櫻桃李叶中其它成分溶出,影响了总黄酮的提取。考虑到溶剂成本,选择1:40 g/mL为适宜料液比。

2.2 响应面分析优化总黄酮提取工艺

在单因素实验基础上,固定提取时间,以乙醇体积分数(A)、提取温度(B)、料液比(C)为自变量,以总黄酮提取量为响应值,设计17次试验,其中析因部分试验12次,中心点重复试验5次,结果见表2。

实验以随机次序进行,利用Design-Expert 8.05软件对数据进行多元回归拟合,得到以总黄酮含量Y为目标函数: $Y = 38.18 + 0.38A + 0.65B + 1.15C + 0.47AB + 0.095AC + 0.15BC - 2.17A^2 - 0.91B^2 - 0.63C^2$ 。

对上述模型进行方差分析,结果见表3。由表3可知,总模型F值为31.31,表明模型显著;模型P

表2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and result

试验号 No.	因素 Factors			总黄酮提取量 Y Yield of total flavonoids (mg/g)
	A (%)	B (°C)	C (g/mL)	
1	0	0	0	38.13
2	0	1	1	38.22
3	0	1	-1	36.24
4	1	0	-1	34.18
5	1	1	0	36.68
6	0	0	0	38.55
7	0	0	0	38.32
8	0	-1	1	36.75
9	0	-1	-1	35.36
10	-1	1	0	34.94
11	0	0	0	37.87
12	1	-1	0	34.32
13	1	0	1	37.29
14	0	0	0	38.04
15	-1	0	-1	33.66
16	-1	-1	0	34.46
17	-1	0	1	36.39

<0.0001 , 响应面回归模型达到极显著水平。线性项、二次项及交互项 AB 的 P 值 <0.05 , 表明其对总黄酮提取量影响显著; 其它交互项 AC 与 BC 显著性较差, 表明总黄酮提取量与自变量非简单的线性关系; 模型失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率^[14], 模型中失拟项 P 值为 $0.1122 > 0.05$, 表明

数据拟合效果较好, 模型选择合适。模型变异系数 CV 值为 1.07, 说明模型稳定性好; 模拟方程的相关系数 $R^2_{Adj}(0.9446) > 0.90$, 说明实验误差较小, 可以利用该模型预测上述提取条件对总黄酮提取量的影响。三个试验因素对响应值的影响顺序为 $C > B > A$ 。

表3 回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 DF	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	43.13	9	4.79	31.31	<0.0001	* *
A	1.14	1	1.14	7.45	0.0294	*
B	3.37	1	3.37	22.00	0.0022	* *
C	10.60	1	10.60	69.28	<0.0001	* *
AB	0.88	1	0.88	5.77	0.047	*
AC	0.036	1	0.036	0.24	0.6420	
BC	0.087	1	0.087	0.57	0.4754	
A ²	19.87	1	19.87	129.81	<0.0001	* *
B ²	3.48	1	3.48	22.77	0.0020	* *
C ²	1.67	1	1.67	10.91	0.0131	*

残差 Residual	1.07	7	0.15		
失拟项 Lack of fit	0.80	3	0.27	3.87	0.1122
净误差 Pure Error	0.27	4	0.069		
总变异 Cor Total	44.20	16			

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

Note: very significance different, ** $P < 0.01$, significance different, * $P < 0.05$.

响应面图形能较直观地反映出各因素对响应值的影响, 等高线的形状可以反映出交互效应的强弱, 椭圆形表示两因素交互作用显著, 而圆形则与之相反^[14]。图 2 分别显示了 3 组试验参数以总黄酮提取量为响应值的趋势图。其中料液比(C)对总黄酮提取量的影响最为显著, 乙醇体积分数(A)与提取温度(B)的交互作用最为显著, 表现的等高线最扁平; 乙醇体积分数(A)和料液比(C)的交互作用最小, 与模型方差分析结果一致。在实验考察范围内,

总黄酮提取量随乙醇体积分数、提取温度、料液比自变量的增大均呈现出先增大后减小的趋势, 表明三个自变量过高或过低都不利于总黄酮的提取。

由 Design-Expert 8.05 软件分析得到总黄酮最佳提取条件为乙醇体积分数 50.80%、提取温度 72.38 °C、料液比 1:44.91 g/mL, 理论总黄酮提取量为 38.93 mg/g。为方便操作, 总黄酮最佳提取优化工艺参数调整为乙醇体积分数 51%、提取温度 72 °C、料液比 1:45 g/mL。

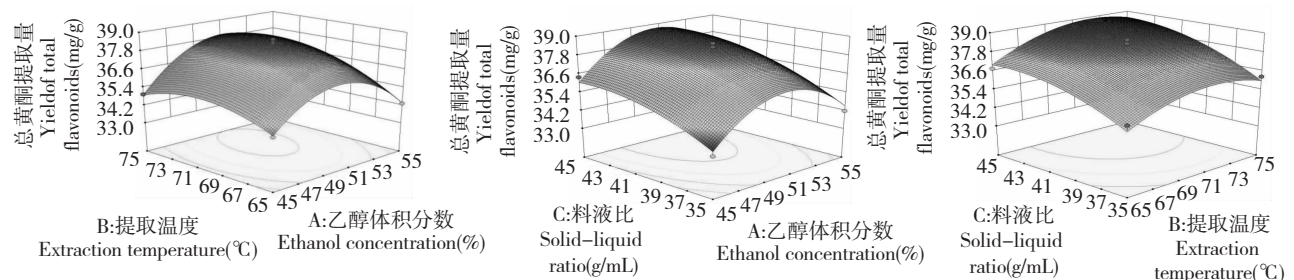


图 2 不同自变量交互作用对总黄酮提取量影响的响应面

Fig. 2 Response surface plots showing the interaction of different independent variables on yield of total flavonoids

2.3 超声辅助提取法与传统提取法效果比较

以 51% 的乙醇为提取溶剂, 固定料液比为 1:45 g/mL, 采用超声辅助法在 72 °C 下提取 30 min, 提取 2 次, 合并提取液, 离心, 定容, 测定总黄酮含量。重复 3 次, 所得总黄酮含量平均值为 38.27 mg/g, 与理论值基本一致。这表明响应面法优化超声辅助提取野生櫻桃李叶中总黄酮的提取工艺准确可靠, 具有一定的实用价值。相比传统索氏提取法(总黄酮提取量平均值为 35.59 mg/g)大大缩短了提取时间, 提高了效率。索氏提取在高温下随着提取时间延长, 树叶中非黄酮类物质也会逐渐溶出, 对后续总黄酮含量检测带来不便。

3 讨论

超声辅助提取结合响应面法在优化植物有效成分的提取工艺中已得到广泛应用^[15]。传统的索氏提取法耗时长, 有效成分长时间在高温提取环境中易被破坏。试验表明, 超声辅助提取野生櫻桃李叶

中总黄酮较传统的索氏提取法效率高, 后续操作简单, 提取效果好。野生櫻桃李叶总黄酮的提取工艺研究还未见报道, 本文在单因素试验基础上进行三因素三水平 Box-Behnken 试验设计, 利用响应面分析法优化野生櫻桃李叶总黄酮提取条件。结合实际可操作性得出较优工艺条件为乙醇体积分数 51%、提取温度 72 °C、料液比 1:45 g/mL, 在 300 W 功率下超声提取 30 min, 提取次数 2 次, 优化后的试验结果与理论预测值基本一致。该方法耗时短, 操作方便, 提取效率高, 为野生櫻桃李叶黄酮类化合物的开发利用提供了理论依据。

参考文献

- 1 Qiman Y (齐曼·尤努斯), Patiguli (帕提古丽), Muhetar (木合塔尔), et al. Nutritional components of *Prunus Divaricata* L in Xinjiang. *J Xinjiang Agric Sci* (新疆农业科学), 2005, 42:240-243.
- 2 Zhang XS (张新时). On the eco-geographical characters and the problems of classification of the wild fruit-tree forest in

- the Ili valley of sinkiang. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1973, 15:239-253.
- 3 Zhang WM (张卫明), Qian XS (钱学射), Gu GP (顾龚平). Ethnobotany of Prunus resource. *Chin J Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2004, 23:1-4.
 - 4 Li ZW (李紫薇), Ouyang Y (欧阳艳), Jia FQ (贾风勤), et al. Antioxidant activity of skin pigment from wild plum. *Food Sci Technol* (食品科技), 2011, 36:269-271.
 - 5 Wang Y, Chen X, Zhang Y, et al. Antioxidant activities and major anthocyanins of *Myrobalan plum* (*Prunus cerasifera* Ehrh.). *J Food Sci*, 2012, 77: C388-C393.
 - 6 Chang J (常军), Wang CX (王晨曦), Li YP (李玉萍). Research progress on structure-activity relationship of natural flavonoids compounds. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25:1006-1010.
 - 7 Wei LY, Wang JH, Zheng XD, et al. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem Artichoke Tubers. *J Food Eng*, 2007, 79:1087-1093.
 - 8 Hu T, Guo YY, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total saponins from *Eclipta prostrata* L. using response surface methodology. *Food Sci*, 2012, 9: C975-C982.
 - 9 Wu FN (鄢方宁). Application of ultrasonic extraction technique to traditional chinese medicine. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38:315-316.
 - 10 Li XX (李秀信), Zhang YM (张院民). Studies on the determination method of total flavone content in *Toona Sinensis*. *J Chin Inst Food Sci Technol* (中国食品学报), 2010, 10:243-248.
 - 11 Xu L (徐璐), Wang T (汪涛), Guo QS (郭巧生), et al. Response surface optimization of ultrasonic-assisted pigment extraction from *Coreopsis tinctoria*. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39:4792-4797.
 - 12 Li N (李楠). Study on the stability of flavonoids from Gold Lotus. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2011, 32:76-77.
 - 13 Yang Y (杨昱), Bai JW (白靖文), Yu ZG (俞志刚). Progress in ultrasound-assisted extraction in natural product. *Food Mach* (食品与机械), 2011, 27:170-174.
 - 14 Zhang R (张儒), Zhang BL (张变玲), Xie T (谢涛), et al. Optimization of extraction process of total ginsenoside from adventitious roots of *Panax ginseng* C. A. Meyer by response surface methodology. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:726-731.
 - 15 Lin SH (林水花), Wu JG (吴建国), Zheng YZ (郑燕枝), et al. Optimization of ultrasonic extraction of triterpenoid from the root of *Actinidia eriantha* by response surface analysis. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:431-437.
-
- (上接第 1810 页)
- 13 Liu CL (刘长利), Yin Y (尹艳), Zhang SH (张淑华), et al. Study on correlation between trace elements and active ingredient in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39:3335-3338.
 - 14 Zhao MX (赵曼茜), Lv JR (吕金嵘), Guo LP (郭兰萍), et al. Effects of inorganic elements soil on contents of inorganic elements and baicalin in *Scutellaria*. *Chin J Expe Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2010, 16:103-106.
 - 15 Guo LP (郭兰萍), Huang LQ (黄璐琦), Yan YN (阎玉凝). The influences of inorganic elements in soil on the geolism of *Atractylodes lancea*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27:245-250.
 - 16 Qin JF (秦俊法). The research of trace elements of Chinese medicine in China V. essential parameters of quality control in traditional Chinese medicine. *Guangdong Trace Element Sci* (广东微量元素科学), 2011, 18(3):1-10.
 - 17 Li CY (李成义), Wang Y (王燕), Qiang ZZ (强正泽), et al. Comparative study of formononetin and calycosion content in *Hedysari Radix* and *Astragali Radix*. *Modern Chin Med* (中国现代中药), 2014, 16:534-537.
 - 18 Li CY (李成义), Wang Y (王燕), Qiang ZZ (强正泽), et al. Comparative study about contents of mark components in *Hedysari Radix* from different habitats in Gansu province. *Modern Chin Med* (中国现代中药), 2014, 16:796-799.
 - 19 Yang HM (杨宏梅), Li SG (李世刚). Extraction and content determination of polysaccharides in *Hedysayum polybotrys*. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2013, 41:10278.