

紫叶李叶黄酮提取工艺的响应面优化及最佳采收月份的确定

甄可妙¹, 苏琪¹, 闫子涵¹, 国洪宾¹, 高剑¹, 李梦冉², 周程艳^{1*}

¹河北大学药学院,河北省药物质量分析控制重点实验室,保定 071002;²沧州师范学院生命科学学院,沧州 061000

摘要:使用高效液相色谱仪测定不同条件下超声辅助提取紫叶李叶中矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷花青素、芦丁、槲皮素、山奈酚 4 种黄酮类物质的得率,并根据 4 种物质的活性,建立紫叶李叶中黄酮类物质得率权重计算公式。在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 设计-响应面法优化紫叶李叶黄酮类物质提取工艺。应用最佳提取工艺处理不同月份紫叶李叶,并根据 4 种成分权重计算黄酮类物质得率,确定最佳采收月份。结果表明,紫叶李叶黄酮类物质最佳提取工艺为乙醇体积分数 63.93%、液料比 25:1 (mL/g)、提取温度 44.08 °C、提取时间 41.62 min;最佳采收月份为 8 月份。此结果重复性好,可信度高,其中矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷花青素得率随时间变化最明显,且与日照条件显著相关,该试验对后期相关具体成分的提取具有借鉴意义。

关键词:紫叶李叶;黄酮类物质;响应面法;高效液相色谱;超声辅助提取

中图分类号:TQ464

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)8-1379-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.8.014

Optimization of extraction of flavonoids from *Prunus cerasifera* leaves using response surface methodology and determination of optimum harvest month

ZHEN Ke-miao¹, SU Qi¹, YAN Zi-han¹, GUO Hong-bin¹, GAO Jian¹, LI Meng-ran², ZHOU Cheng-yan^{1*}

¹College of Pharmaceutical Science, Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control of Hebei Province, Hebei University, Baoding 071002, China;

²College of life sciences, Cangzhou Normal University, Cangzhou 061000, China

Abstract: The yield of ultrasonic assisted extraction of cyanidin-3-*O*-glucoside, rutin, quercetin and kaempferol in the leaves of *Prunus cerasifera* were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). And according to the activity of the four substances, the weight calculation formula for the yield of flavonoids in the leaves of *P. cerasifera* was established. On the basis of single-factor test, Box-Behnken response surface methodology was used to optimize extraction process of flavonoids from *P. cerasifera* leaves. The leaves of *P. cerasifera* in different months were treated by the best extraction process, and the flavonoids yield was calculated according to the weight of four substances to determine the best picking month. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: ethanol volume fraction was 63.93%, ratio of liquid to raw material was 25:1 (mL/g), extraction temperature was 44.08 °C, and extracted for 41.62 min. And the best picking month was August. The results showed good repeatability and high reliability. The yield of cyanidin-3-*O*-glucoside changed most obviously over time, and was also significantly related to sunshine conditions. All in all, the study in this paper can provide the beneficial reference for the extraction of related components in the future.

Key words: *Prunus cerasifera* leaves; flavonoids; response surface methodology; HPLC; ultrasonic assisted extraction

紫叶李(*Prunus cerasifera* Ehrh. cv. *atropurpurea* Jacq.),又名红叶李,蔷薇科(Rosaceae)李属落叶乔木,具有保肝护肝、补中益气、养阴生津、润肠通便等

功效^[1,2]。前期试验结果表明其叶中含有大量的黄酮类化合物,为其主要活性成分,主要包含花青素、芦丁、槲皮素、山奈酚等,其中以花青素含量最多。

黄酮类化合物,又称生物类黄酮,是一类存在于自然界的、以 2-苯基色原酮为母核的化合物,它在植物的生长、发育、开花、结果以及抗菌防病等方面起着重要的作用。同时其具有多种显著的生物活

收稿日期:2020-03-08 接受日期:2020-07-09

基金项目:河北省科技计划(B2015201016);保定市科学技术研究与发展指导计划(18ZF121)

*通信作者 Tel:86-312-5971107; E-mail: xuefanone@163.com

性,可用于治疗多种疾病,且具有抗癌防癌作用,在临床上广泛应用,具有良好的研究价值。芦丁(rutin)具有多种生理功能,对人体各个器官均有保护作用,如清除自由基、促进成骨细胞的生长、降低血糖、抑制结肠癌和前列腺癌等^[3]。槲皮素(querce-tin)是一种多羟基黄酮类化合物,广泛存在于植物的花、叶、果实中,具有抗氧化、抗病毒、抗炎等作用,在细胞和动物实验中可以用来治疗肝、心、脾、肺、肾、骨科疾病、神经系统疾病等^[4];花青素(anthocya-nin),又称花色素,由1个2-苯基苯并吡喃环和环上不同的取代基组成,是自然界一类广泛存在于植物中的水溶性天然色素,通常以糖苷的形式形成花色苷^[5],如花青素矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷、花青素3-半乳糖苷、花青素3-芸香糖苷、花青素丙二酰-鼠李糖苷、花青素戊糖苷、天竺葵色素鼠李糖苷等^[6],紫叶李叶中主要为花青素矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷^[1]。花青素具有抗氧化、保护肝功能、改善血液循环、抗癌、抑制炎症、抗过敏及视力保护等作用,在医药、食品和化妆品等行业有广阔的应用前景^[7]。山奈酚(kaempferol)又称山奈黄素、山奈素、茨非醇、4',5,7-三羟基黄酮醇、四羟基黄酮,广泛存在于植物根、叶和果实中,具有防癌、抗癌、抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒等多种功效^[8,9]。目前对紫叶李叶中黄酮类成分研究较少,尚未有通过测定紫叶李叶中花青素、芦丁、槲皮素、山奈酚此4种物质得率并采用建立权重公式来计算紫叶李叶黄酮类物质得率的报道,采收期亦不明确。

此外,近年来响应面法在优化黄酮、多糖、多酚等天然有效成分的提取工艺中得到了广泛应用。与传统的正交设计试验相比,响应面法对数据分析更为详细,不仅可以直观看出各因素对得率影响的显著情况,还可以进一步分析两因素间存在的交互作用,借助软件可以三维模拟出更直观更精准的最佳提取工艺,预测值准确性较高^[10]。基于此,在单因素试验的基础上,采用Box-Behnken设计,运用响应面法对紫叶李叶中黄酮类物质的提取工艺进行优化,并使用最佳工艺处理不同月份紫叶李叶,对紫叶李叶中4种黄酮类物质进行了分离与测定,计算黄酮类物质的权重得率,最终确定紫叶李叶的最佳采收月份,以期为紫叶李叶的开发应用提供基础。

1 材料

1.1 材料和试剂

试验中紫叶李叶于2017年全年按月份在河北

大学本部校园采集,经河北大学周程艳副教授鉴定为蔷薇科李属植物紫叶李(*Prunus cerasifera* Ehrh. cv. *atropurpurea* Jacg.)树叶,于日光下晒干备用。标本(A2201712001)存放于河北大学药学院生药学与天然药物化学研究平台。甲醇(色谱纯 天津市科密欧化学试剂有限公司);乙酸(分析纯 天津市泰兴试剂厂);无水乙醇(分析纯 天津市科密欧化学试剂有限公司);矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷花青素标准品(成都曼思特生物科技有限公司);芦丁标准品(上海源叶生物科技有限公司);槲皮素标准品(上海源叶生物科技有限公司);山奈酚标准品(成都曼思特生物科技有限公司)。

1.2 仪器和设备

YL-060S 超声波清洗器(深圳语路有限公司);LC-UV100 LC-100 液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司);LBR-1 型液相色谱柱温箱(石家庄莱博瑞分析仪器有限公司);Venusil C₁₈ Plus 色谱柱(大连依利特分析仪器有限公司);TP502 型电子天平(上海菁海仪器有限公司);FA2104N 电子分析天平(上海菁海仪器有限公司);101-2AB 型电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Venusil C₁₈ Plus(4.6×250 mm,5 μm);流动相A:1%乙酸,流动相B:100%甲醇,梯度洗脱(0~15 min,75% A;15~16 min,75% A→50% A;16~35 min,50% A;35~36 min,50% A→40% A;36~49 min,40% A;49~50 min,40% A→75% A;50~60 min,75% A),流速:0.6 mL/min,检测波长:360 nm,进样量:20 μL,柱温:30 ℃^[11-13]。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

准确称取芦丁标准品0.005 0 g置于烧杯中,加入少量甲醇,超声溶解,转移至50 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,制成100 μg/mL的对照品溶液。槲皮素、山奈酚、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷花青素的对照品溶液均按照此方法配制。将配制好的溶液放入4 ℃冰箱冷藏贮存,待用时用甲醇稀释至所需浓度梯度,见表1。

2.2.2 供试品溶液的制备

精密称取同一时间采集的干燥至恒重的紫叶李叶1.00 g,研磨成细粉,置于锥形瓶中,加入体积分数为70%的乙醇溶液使料液比达到1:15,保鲜膜

表 1 对照品溶液的制备
Table 1 Preparation of reference solution

浓度梯度 Concentration gradient	芦丁 Rutin ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	槲皮素 Quercetin ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	山奈酚 Kaempferol ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	矢车菊素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷花青素 Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
对照品溶液质量浓度 The mass concentration of the reference solution	100	100	100	100
梯度一 Gradient one	75	75	75	75
梯度二 Gradient two	50	50	50	50
梯度三 Gradient three	25	25	25	25
梯度四 Gradient four	10	10	10	10

封口,毛细管扎细孔,超声波清洗器预热为 50 ℃ 的条件下将锥形瓶放入并保持此温度,提取 60 min,提取完成后,溶液用滤膜过滤后用甲醇稀释 5 倍。

2.3 标准曲线的绘制与方法学考察

2.3.1 标准曲线的绘制

按“2.1”项下色谱条件使用高效液相色谱仪测定“2.2.1”中不同浓度梯度的矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷花青素、芦丁、槲皮素、山奈酚 4 种物质对照品溶液的峰面积,以峰面积为纵坐标(y),对照品溶液的质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标(x),绘制 4 种标准品的标准曲线,得到回归方程。

2.3.2 方法学考察

系统适应性试验,取“2.2”项下供试品溶液和对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。精密度试验,取中浓度的混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,计算芦丁、槲皮素、山奈酚、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷花青素峰面积 RSD。重复性试验,按“2.2.2”项中方法平行制备供试品溶液 6 份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算芦丁、槲皮素、山奈酚、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷花青素峰面积 RSD。稳定性试验,按“2.2.2”项中方法制备供试品溶液,室温放置,分别于 0、3、6、9、12、16、19、21、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算芦丁、槲皮素、山奈酚、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷花青素峰面积 RSD。加样回收率试验,按“2.2.2”项中方法制备供试品溶液,分别加入折算质量为本底量的 80%、100%、120% 的三种水平的混合对照品溶液,每个浓度平行做三份,进行加样回收试验,计算 4 种黄酮类物质在不同添加浓度下的平均回收率与 RSD。

2.4 提取液中黄酮类物质得率的计算

2.4.1 四种黄酮类物质含量测定及得率计算

按“2.2.2”项中方法配制紫叶李叶提取液,根

据标准曲线的制备方法测定提取液中芦丁、槲皮素、山奈酚、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷花青素 4 种物质的峰面积,通过“2.3.1”项中的回归方程分别求出提取液中 4 种物质的质量浓度,按下式计算各物质得率。

$$W = C \times N \times V / (M \times 10^6) \times 100\%$$

C : 各物质质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; N : 提取液稀释倍数; V : 稀释前提取液体积, mL ; M : 紫叶李叶质量, g

2.4.2 黄酮类物质得率计算

根据芦丁、槲皮素、山奈酚、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷花青素 4 种黄酮类物质的生物活性、研究现状及应用前景分别赋予不同权重,分别为 0.1、0.2、0.3、0.4。根据上述权重情况计算黄酮类物质的得率,公式为:黄酮类物质得率 = 矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷花青素得率 $\times 0.4$ + 芦丁得率 $\times 0.1$ + 槲皮素得率 $\times 0.2$ + 山奈酚得率 $\times 0.3$ 。

2.5 单因素试验

设计单因素试验,分别考察液料比(5:1、10:1、15:1、20:1、25:1)、乙醇体积分数(50%、60%、70%、80%、90%)、提取温度(30、40、50、60、70 ℃)、提取时间(30、40、50、60、70 min)对黄酮类物质得率的影响。液料比、乙醇体积分数、提取温度、提取时间四个因素的固定水平分别为 15:1、70%、50 ℃、60 min,在对各因素进行单因素试验探究时,其他因素均取固定水平。

2.6 响应面试验设计

采用统计分析软件 Design-Expert 8.0.6,运用 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,基于单因素试验的基础,以液料比、乙醇体积分数、提取温度、提取时间为考察因素,以黄酮类物质得率为响应值,进行响应面试验设计,因素及水平见表 2。

2.7 紫叶李叶最佳采收月份的确定

使用最佳工艺制备不同月份(4~12 月份)紫叶

表2 Box-Behnken 试验因素水平表
Table 2 Factors and levels of Box-Behnken test

水平 Level	因素 Factor			
	A 液料比 Liquid-material ratio(mL/g)	B 乙醇体积分数 Ethanol volume fraction(%)	C 提取温度 Extraction temperature(°C)	D 提取时间 Extraction time(min)
-1	15:1	50	40	40
0	20:1	60	50	50
1	25:1	70	60	60

李叶提取液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,通过“2.4”项中计算方法计算出不同月份矢车菊素-3-O-葡萄糖苷花青素、芦丁、槲皮素、山奈酚4种物质的得率及黄酮类物质得率。

2.8 统计分析

每项试验均重复3次,取平均值,结果以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表述。采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面优化试验的设计、结果分析及作图。采用 SAS 8.1 统计软件 one-way ANOVA 模型进行单因素方差分析,用 Duncan's 检验进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著; $P < 0.01$ 为差异极显著。

表3 线性回归方程及相关系数

Table 3 Linear regression equation and correlation coefficient

成分 Ingredient	保留时间 Retention time (min)	回归方程 Regression equation	相关系数 Coefficient of correlation (R^2)	线性范围 Linearity range($\mu\text{g/mL}$)
矢车菊素-3-O-葡萄糖苷花青素 Cyanidin-3-O-glucoside	23.61	$y = 1\ 241.9x - 6\ 072.2$	0.998 4	0.010 ~ 10
芦丁 Rutin	31.70	$y = 4\ 051.5x + 10\ 185.4$	0.999 3	0.025 ~ 10
槲皮素 Quercetin	47.89	$y = 9\ 073.2x - 64\ 097$	1.000 0	0.010 ~ 10
山奈酚 Kaempferol	53.62	$y = 22\ 604x - 108\ 066$	0.999 3	0.025 ~ 5

3.1.2 方法学考察结果

系统适应性试验,色谱图见图1,理论塔板数按矢车菊素-3-O-葡萄糖苷花青素峰计不低于5 000,分离度大于1.5,分离良好。精密度试验,芦丁、槲皮素、山奈酚、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷花青素峰面积RSD分别为1.37%、2.26%、2.66%、2.99%,表明仪器的精密度良好;重复性试验,芦丁、槲皮素、山奈酚、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷花青素峰面积RSD分别为1.56%、2.79%、2.97%、3.13%,表明该方法的重复性良好;稳定性试验,芦丁、槲皮素、山奈酚、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷花青素峰面积RSD分别为1.26%、2.34%、2.76%、3.01%,表明供试品溶液室温下放置24 h内稳定;加样回收率试验,4种黄酮类

3 结果与分析

3.1 标准曲线的绘制和方法学考察结果

3.1.1 标准曲线的绘制

通过对4种对照品溶液进行测定,得到的各标准品的峰面积与质量浓度的线性回归方程见表3。从计算结果来看,矢车菊素-3-O-葡萄糖苷花青素、芦丁、槲皮素、山奈酚4种物质的相关系数分别为0.998 4、0.999 3、1.000 0、0.999 3,说明此4种物质分别在0.010 ~ 10、0.025 ~ 10、0.010 ~ 10、0.025 ~ 5 $\mu\text{g/mL}$ 范围内峰面积与质量浓度呈现良好的线性关系。

物质在三种不同添加浓度下的平均回收率在85.66% ~ 108.07%之间,RSD < 2%。

3.2 单因素试验结果

乙醇体积分数对黄酮类物质得率的影响如图2(A)所示,当乙醇体积分数在50% ~ 60%之间时,黄酮类物质得率随乙醇体积分数增加而增加,乙醇体积分数为60%时,黄酮类物质得率达到最大为0.098% \pm 0.000 3%。当乙醇体积分数继续增加时,黄酮类物质得率逐渐降低。液料比对黄酮类物质得率的影响如图2(B)所示,随着液料比的增加,黄酮类物质得率逐渐增加,当液料比为20:1时,黄酮类物质得率达到最大为0.127% \pm 0.000 5%。之后随着液料比的增加,黄酮类物质得率降低。提取

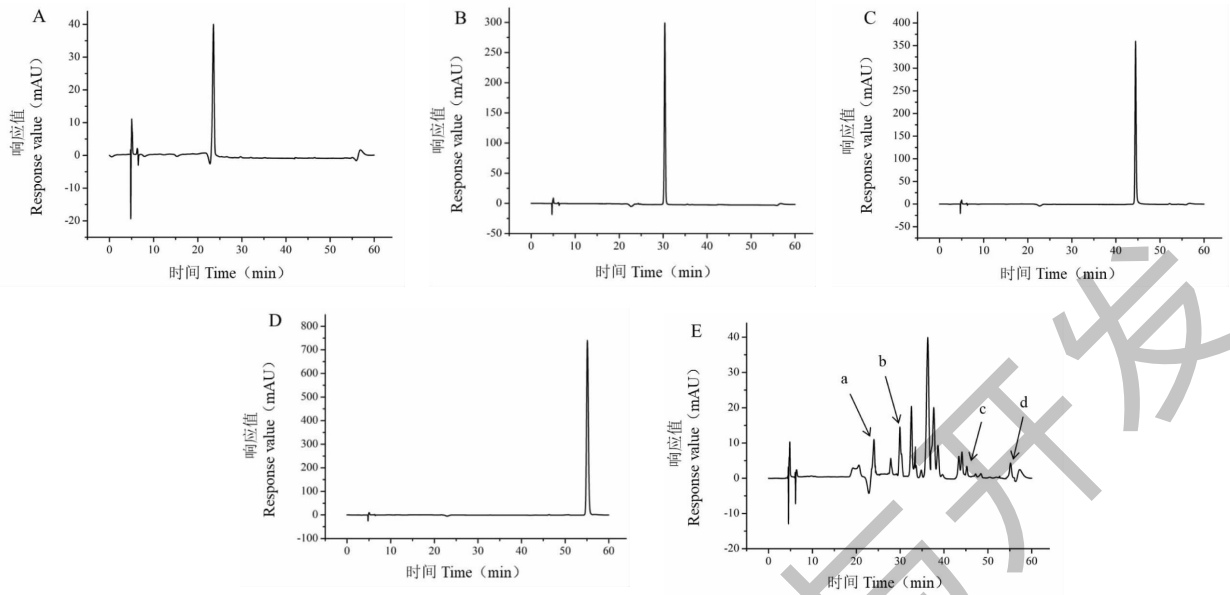


图1 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

注:对照品:(A)矢车菊素-3-O-葡萄糖苷花青素;(B)芦丁;(C)槲皮素;(D)山奈酚。样品:(E)紫叶李叶提取液:(a)矢车菊素-3-O-葡萄糖苷花青素;(b)芦丁;(c)槲皮素;(d)山奈酚。Note: Reference substance:(A) Cyanidin-3-O-glucoside;(B) Rutin;(C) Quercetin;(D) Kaempferol. Sample:(E) Extraction solution of *Prunus cerasifera* leaves:(a) Cyanidin-3-O-glucoside;(b) Rutin;(c) Quercetin;(d) Kaempferol.

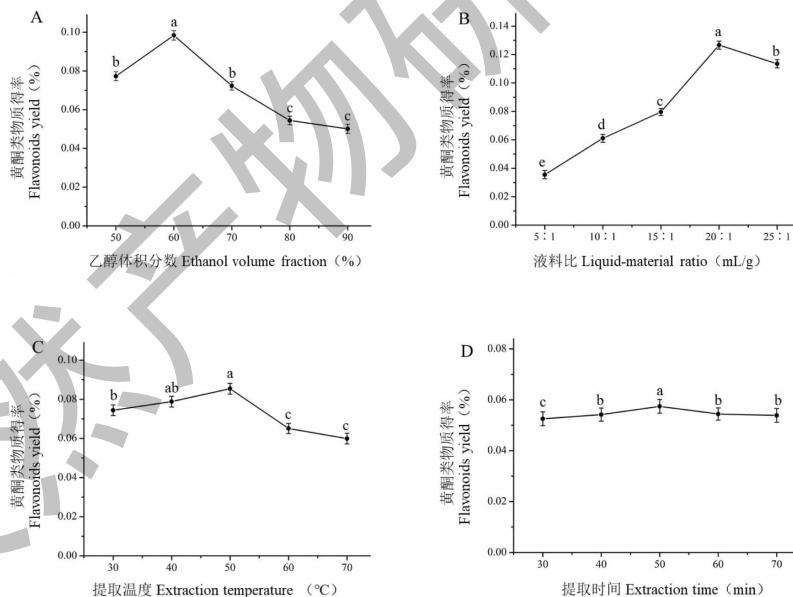


图2 乙醇体积分数、液料比、提取温度、提取时间对黄酮类物质得率的影响

Fig. 2 Effects of ethanol volume fraction, liquid-material ratio, extraction temperature, extraction time on yield of flavonoids

注:图中小写字母表示单因素试验中具有显著差异的不同处理组($P < 0.05$)。Note: Lowercase letters mean a significant difference among the different treatments at $P < 0.05$ level in single factor test.

温度对黄酮类物质得率的影响如图2(C)所示,提取温度在 $30\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,黄酮类物质得率随温度的升高而增加,50 $^{\circ}\text{C}$ 时黄酮类物质得率最大为

$0.085\% \pm 0.0003\%$,之后黄酮类物质得率随温度升高而降低。提取时间对黄酮类物质得率的影响如图2(D)所示,随提取时间的延长,黄酮类物质得率

先增加后降低。提取时间为 50 min 时黄酮类物质得率达到最大为 $0.057\% \pm 0.0002\%$, 提取时间超过 50 min 后黄酮类物质得率下降。从上述单因素试验结果得出, 当其他因素固定时, 乙醇体积分数, 液料比, 提取温度和提取时间分别为 60%, 20:1, 50 °C 和 50 min 时, 黄酮类物质得率最大。

3.3 Box-Behnken 响应面优化

3.3.1 响应面试验结果与分析

在单因素试验的基础上, 选取液料比、乙醇体积分数、提取温度、提取时间 4 个因素为变量, 以紫叶李叶提取液中黄酮类物质得率为响应值, 采用 Design-Expert 8.0.6 统计软件进行 4 因素 3 水平试验, 结果见表 4。

表 4 Box-Behnken 试验的设计及结果
Table 4 Design and results of Box-Behnken tests

序号 No.	A 液料比 A Liquid-material ratio (mL/g)	B 乙醇体积分数 B Ethanol volume fraction (%)	C 提取温度 C Extraction temperature (°C)	D 提取时间 D Extraction time (min)	黄酮类物质得率 Flavonoids yield (%)
1	15:1	50	50	50	0.081748
2	25:1	50	50	50	0.075511
3	15:1	70	50	50	0.077664
4	25:1	70	50	50	0.099515
5	20:1	60	40	40	0.086857
6	20:1	60	60	40	0.095909
7	20:1	60	40	60	0.096107
8	20:1	60	60	60	0.093969
9	15:1	60	50	40	0.073657
10	25:1	60	50	40	0.103901
11	15:1	60	50	60	0.095450
12	25:1	60	50	60	0.094262
13	20:1	50	40	50	0.099390
14	20:1	70	40	50	0.095783
15	20:1	50	60	50	0.078146
16	20:1	70	60	50	0.073610
17	15:1	60	40	50	0.086237
18	25:1	60	40	50	0.103818
19	15:1	60	60	50	0.079700
20	25:1	60	60	50	0.086533
21	20:1	50	50	40	0.089747
22	20:1	70	50	40	0.080918
23	20:1	50	50	60	0.099138
24	20:1	70	50	60	0.077637
25	20:1	60	50	50	0.099436
26	20:1	60	50	50	0.097450
27	20:1	60	50	50	0.101957
28	20:1	60	50	50	0.107246
29	20:1	60	50	50	0.099565

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验结果进行

二次多元回归分析, 对自变量 A、B、C、D 和黄酮类

物质得率进行多元二项式方程拟合。以紫叶李叶中黄酮类物质得率为响应值,经回归拟合后得到的回归方程如下。

$$Y = 0.10 + 5.757 \times 10^{-3} A - 1.546 \times 10^{-3} B - 5.027 \times 10^{-3} C + 2.131 \times 10^{-3} D + 7.022 \times 10^{-3} AB - 2.687 \times 10^{-3} AC - 7.858 \times 10^{-3} AD - 2.322 \times 10^{-4} BC - 3.168 \times 10^{-3} BD - 2.797 \times 10^{-3} CD - 6.866 \times 10^{-3} A^2 - 0.011B^2 - 4.608 \times 10^{-3} C^2 - 3.172 \times 10^{-3} D^2$$

对回归方程进行方差分析,结果见表5。回归

方程显著性检验 $P < 0.05$,表明模型具有显著性;失拟项 $P = 0.07 > 0.05$,表明方程拟合程度高,无明显失拟存在,此模型成立。根据表5中 F 值的大小可以判断4个因素对黄酮类物质得率的影响程度为:液料比 > 温度 > 时间 > 乙醇体积分数。一次项 A 、 C 、交互项 AB 、 AD 、二次项 A^2 对黄酮类物质得率的影响显著 ($P < 0.05$);二次项 B^2 对黄酮类物质得率具有极显著的影响 ($P < 0.01$)。

表5 方差分析结果

Table 5 Results of variance analysis

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
模型 Model	0.002 23	14	0.000 159	3.048 711	0.022 8	*
A	0.000 398	1	0.000 398	7.613 261	0.015 4	*
B	2.87×10^{-5}	1	2.87×10^{-5}	0.549 091	0.470 9	
C	0.000 303	1	0.000 303	5.805 11	0.030 3	*
D	5.45×10^{-5}	1	5.45×10^{-5}	1.043 309	0.324 4	
AB	0.000 197	1	0.000 197	3.775 537	0.072 4	
AC	2.89×10^{-5}	1	2.89×10^{-5}	0.552 831	0.469 5	
AD	0.000 247	1	0.000 247	4.728 039	0.047 3	*
BC	2.16×10^{-7}	1	2.16×10^{-7}	0.004 13	0.949 7	
BD	4.01×10^{-5}	1	4.01×10^{-5}	0.768 471	0.395 5	
CD	3.13×10^{-5}	1	3.13×10^{-5}	0.599 235	0.451 7	
A^2	0.000 306	1	0.000 306	5.853 807	0.029 7	*
B^2	0.000 717	1	0.000 717	13.728 09	0.002 4	**
C^2	0.000 138	1	0.000 138	2.636 885	0.126 7	
D^2	6.53×10^{-5}	1	6.53×10^{-5}	1.249 075	0.282 5	
残差 Residual	0.000 731	14	5.22×10^{-5}			
失拟项 Lack of fit	0.000 674	10	6.74×10^{-5}	4.736 796	0.073 7	不显著
纯误差 Pure error	5.7×10^{-5}	4	1.42×10^{-5}			
总和 Cor total	0.002 961	28				

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

Notes: * Significant difference ($P < 0.05$); ** Very significant difference ($P < 0.01$).

黄酮类物质得率的响应面图见图3,响应面图可以直观地反映各因素间的交互作用对响应值的影响程度。响应面坡度越陡表示两因素交互作用越大,反之则表示两因素交互作用不显著^[14]。可在图3(C)中看出,液料比和提取时间交互项的响应面坡度最陡,说明两因素交互作用显著,而其他因素的交互作用不显著。与表5方差分析结果一致。

经软件分析,提取紫叶李叶中黄酮类物质的最佳工艺条件为乙醇体积分数63.93%、液料比25:1、

提取温度44.08℃、提取时间41.62min,预测黄酮类物质得率为0.1058%。

3.3.2 验证试验

在接下来的工作中为了便于控制试验条件,将最佳工艺条件调整为乙醇体积分数64%、液料比25:1、提取温度44℃、提取时间42min。应用此条件做3次平行试验,平均黄酮类物质得率为0.1062% ± 0.0002%。

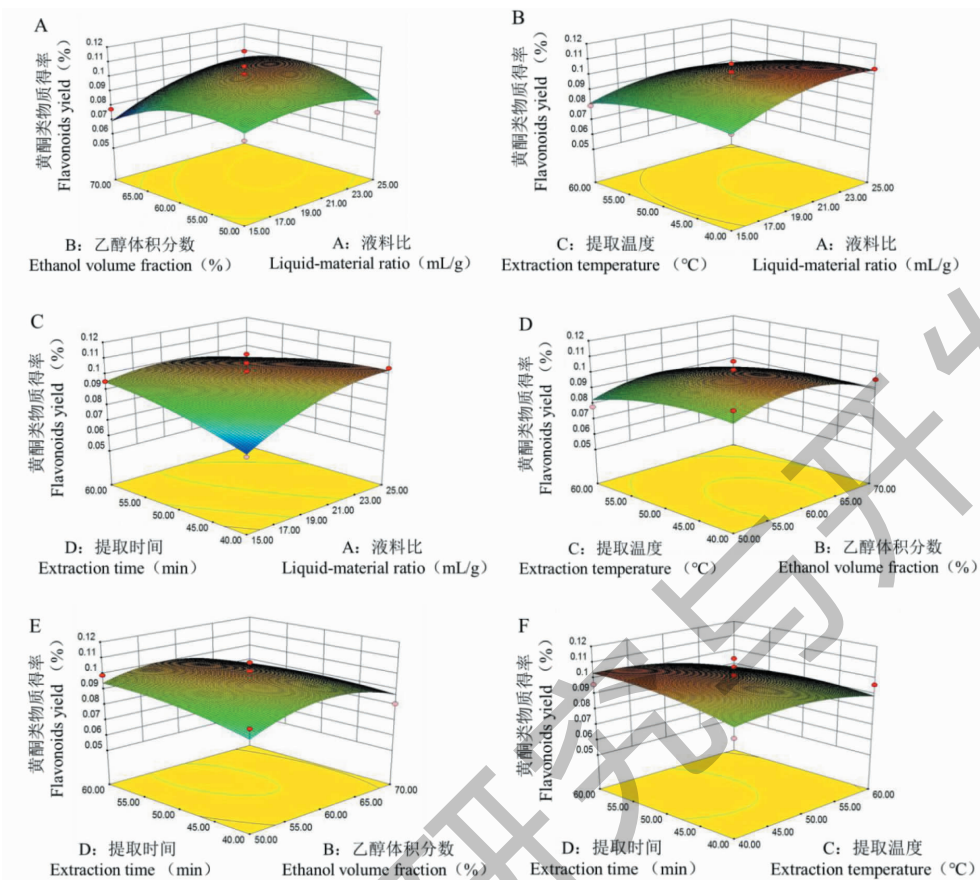


图3 各因素交互作用对紫叶李叶黄酮类物质得率影响的响应面图

Fig. 3 Responses surface plot showing the interactive effects of different factors on the yield of flavonoids from *P. cerasifera* leaves

3.4 最佳采收月份的确定

使用软件分析所得的最佳工艺条件处理不同月份的紫叶李叶,并测定提取液中黄酮类物质得率。不同月份紫叶李叶4种黄酮类物质得率变化见图4(A)。在4~12月份,矢车菊素-3-O-葡萄糖苷花青素得率呈波浪形变化,在6、8、12月份较高,8~9月

份迅速下降;而芦丁得率总体呈上升趋势,7~8月份迅速升高,在11月份达到峰值,12月份骤降;槲皮素和山奈酚得率受采摘月份影响均不显著。加权后的黄酮类物质得率变化见图4(B),在4~12月份黄酮类物质得率总体呈波浪形变化,12月份最高,8月份得率仅次于12月份。

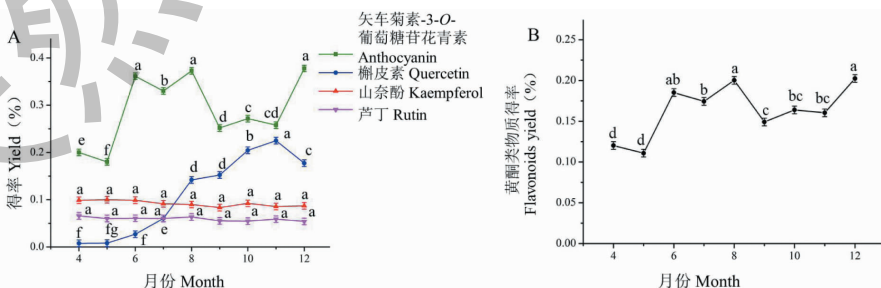


图4 不同月份紫叶李叶中黄酮类物质得率

Fig. 4 The yield of flavonoids in *Prunus cerasifera* leaves in different months

注:(A)不同月份紫叶李叶中四种黄酮类物质得率;(B)不同月份紫叶李叶中四种黄酮类物质经加权后的得率。Note:(A) The yield of four kinds of flavonoids in *Prunus cerasifera* leaves in different months;(B) The weighted yield of four kinds of flavonoids in *Prunus cerasifera* leaves in different months.

4 讨论与结论

本试验对 HPLC 法中流动相的组成进行了前期考察,结果发现,使用甲醇-1% 乙酸为流动相进行测定能够同时对 4 种黄酮类物质进行很好的分离,且均能达到对称峰型,无拖尾现象发生,理论塔板数较高,亦无其他色谱峰干扰。同时,相关文献^[11-13] 的实验研究亦表明以甲醇-1% 乙酸等为流动相的分离度较好,结果稳定,可信度高。因此,本试验最终确定以甲醇-1% 乙酸为流动相,检测波长为 360 nm。

本试验采用 Box-Behnken 分析方法,探讨以紫叶李叶为试验材料,采用超声波法提取黄酮类物质的最佳工艺及其优化。在单因素试验中,采用乙醇溶剂提取,符合黄酮化合物易溶于醇溶剂的特性,同时乙醇体积分数的增加在一定程度上能够提高黄酮类物质得率,但乙醇体积分数过高会溶解更多杂质,这些杂质会与黄酮类物质竞争溶剂导致黄酮类物质的溶解度降低^[15,16];对液料比而言,液料比的增加在一定程度上能提高黄酮类物质得率,当液料比增加到一定程度,底物中的其他杂质的溶解度也增大,反而会导致黄酮类物质得率降低^[15,17],因此适合的液料比可以有效地溶解黄酮类物质,而且不会造成溶剂的浪费;提取温度方面,适当的提高温度在一定程度上能提高黄酮类物质得率,但温度过高会导致黄酮类物质氧化以及其他杂质溶解度增加,从而导致黄酮类物质得率降低^[18,19];合适的提取时间可以提高黄酮类物质得率,过长的提取时间可以使紫叶李叶中杂质也相应的溶出,从而会导致黄酮类物质得率降低。在上述单因素试验的基础上,按照 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,以黄酮类物质得率为响应值,以液料比、乙醇体积分数、提取温度、提取时间为影响因子设计 4 因素 3 水平响应曲面试验,对紫叶李叶黄酮类物质提取工艺进行优化,得到的二次回归模型相关性显著($P < 0.05$),准确度、精密密度较高,并得出其最佳提取条件为乙醇体积分数 63.93%、液料比 25:1、提取温度 44.08 °C、提取时间 41.62 min。同时,还进行了相关的验证试验,结果与预测值接近且重复性好,说明了响应面的 Box-Behnken 模型优化紫叶李叶中黄酮类物质提取工艺的效果良好,该条件具有实际意义,将为其进一步的研究开发提供科学依据。

紫叶李叶中黄酮类物质的含量会受成熟度、品种、部位、环境条件、生长季节等的影响,其中以随时间变化有规律可循。紫叶李叶中黄酮类成分主要是

花色素,根据史宝胜^[20] 的研究了解到紫叶李叶花色素含量的变化主要受光照和温度的影响,当温度在 15 °C 时,相关酶的活性显著增强,所以花色素的含量会呈现上升趋势,但温度大于 35 °C 时,酶活性会受到抑制,花色素的含量会受到影响,甚至会导致花色素的分解。光照对花色素含量的影响较大,涉及的原因较多,一般是在春秋两季节花色素含量较多,夏季含量较少,因此 7 月份花色素含量下降是合理的。根据保定市气象局记录^[21],保定市的光照强度也呈现波浪式变化,在 2~5 月呈上升趋势,5~7 月呈下降趋势,而温度在 6 月的下半个月基本上升到 30 °C 以上,7 月后温度继续升高,甚至会达到 40 °C 的高温,酶活性严重受到影响。而保定的雨季也基本集中在 7、8 两个月,雨季天空云较多,对光照也有影响。8~10 月光照时间又是一个先上升后下降的趋势,温度在 9 月以后也基本转凉,因此紫叶李叶中黄酮类物质的得率总体呈现波浪形是合理的。

根据最佳采收月份的试验结果和上述的分析表明,12 月份黄酮类物质得率应高于 8 月份得率,但 12 月份紫叶李叶生长状况差,难以大量收集,而 8 月份紫叶李叶生长旺盛。综合考虑不同月份紫叶李叶中 4 种黄酮类物质得率以及加权后的黄酮类物质得率动态累积变化情况、紫叶李叶的生长状况,最终确定 8 月份为最佳采收月份。这样既能保证矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷花青素、芦丁、槲皮素、山奈酚 4 种物质得率达到较高水平,又能保证加权后的黄酮类物质得率达到高峰。这与其生长发育及所处的月份有关,而这种变化的机理有待于进一步的深入研究。

本试验所采用的方法学对 4 种黄酮类物质的分离良好,且方法重复性高,稳定性好,具有较好的准确性。通过单因素试验确定了液料比、乙醇体积分数、提取温度和提取时间 4 个因素的最佳取值范围,建立了紫叶李叶中黄酮类物质得率的响应值与多因素之间的回归方程模型,确定其最佳提取工艺为乙醇体积分数 63.93%、液料比 25:1、提取温度 44.08 °C、提取时间 41.62 min。使用最佳提取工艺处理不同月份紫叶李叶,通过权重公式计算黄酮类物质得率,最终确定紫叶李叶最佳采收月份为 8 月份。该试验对后期相关具体成分的提取具有一定的借鉴意义,并对紫叶李的进一步开发利用具有一定的科学价值。

参考文献

- 1 Xue XL. Determination of the contents of anthocyanidin in

- Prunus cerasifera* leaves [J]. Hubei Agr Sci (湖北农业科学), 2010, 49: 956-958.
- 2 Chu C, Liu XX, Wu CX, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Prunus cerasifera* and its antibacterial effect [J]. Mod Prevent Med (现代预防医学), 2018, 45: 1850-1854.
 - 3 Li YS. Progress on resources, pharmacological effect and major forms of rutin [J]. Amino Acids Bio Res (氨基酸和生物资源), 2013, 35: 13-16.
 - 4 Ma N, Li YJ, Fan JP. Research progress on pharmacological action of quercetin [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med (辽宁中医药大学学报), 2018, 20: 221-224.
 - 5 Qiao TT, Guo L. The research progress of anthocyanin source, structure and physiological function [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2019, 41: 388-392.
 - 6 Lu YZ, Qi WY, Wang XY. Quantitative analysis of anthocyanidin and anthocyanin from fresh leaves of *Prunus cerasifera* var. *atropurpurea* by HPLC [J]. Shandong Agr Sci (山东农业科学), 2011 (11): 100-102.
 - 7 Zhong LL, Tu D, Yang Y, et al. Research progress on physiological functions of anthocyanins and their application prospects [J]. Curr Biotechnol (生物技术进展), 2013, 3: 346-352.
 - 8 Chen YH, Zhou KY, Yuan HY. Research progress in the efficacy of kaempferol [J]. Guangdong Med J (广东医学), 2010, 31: 1064-1066.
 - 9 Lei XQ, Chen A, Liu Y, et al. Research progress on pharmacological action of kaempferol [J]. Stud Trace Elem Health (微量元素与健康研究), 2017, 34(2): 61-62.
 - 10 Hou XM, Li LX, Zhang ZF, et al. Total flavonoids from *Mentha haplocalyx* Briq. leaves: optimization of extraction process by response surface methodology and antioxidant activity [J]. Food Sci (食品科学), 2013, 34(6): 124-128.
 - 11 Ding W. Determination of five flavonoids in different *Typhonium flagelliforme* extracts by using HPLC [J]. Food Ind (食品工业), 2019, 40: 302-305.
 - 12 Li G, Li Y, Wang CJ, et al. Effect of vinegar soak method on the content and bioactivities of anthocyanins in black soybean hulls [J]. J Shanxi Univ: Nat Sci (山西大学学报: 自科版), 2018, 42: 905-913.
 - 13 Liu GM, Jia XB, Chen Y, et al. HPLC method was used to compare the difference of composition of *Prunella vulgaris* L. from different regions [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2010, 41: 1384-1386.
 - 14 Yin XL, Zhao YH, Guan M, et al. Optimization of the extraction process and immunological activity of *Corbicula fluminea* polysaccharide [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 1325-1333.
 - 15 Qin JJ, Qian HQ, Wei J, et al. Extraction process of total flavonoids from *Cuscuta chinensis* and its antioxidant activity [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2019, 40(23): 151-156.
 - 16 Liang PJ, Jiang JH, Chen M. Optimization of extraction technique of total flavonoids from *Amygdalus communis* L. seed kernel via response surface methodology [J]. Food Res Dev (食物研究与开发), 2017, 38(9): 50-54.
 - 17 Chen XJ, Chen CY, Tan LB, et al. Optimization of extraction conditions of Hong Guo Ginseng Oil by response surface methodology [J]. Shandong Chem Ind (山东化工), 2019, 48(16): 14-17.
 - 18 Yang F, Liu MY, Chen JY, et al. Optimization of ultrasonic extraction of total flavonoids from sweet buckwheat seed in Yunnan [J]. Chin Food Addit (中国食品添加剂), 2013(6): 129-132.
 - 19 Jiao KP, Ma LP, Zhu WX, et al. Optimization of extraction process of flavonoids from stem and leave of *Arachis hypogaea* by response surface methodology and antioxidant activity [J]. J Chin Cereals Oils Assoc (中国粮油学报), 2018, 33(2): 89-95.
 - 20 Shi BS. The research on the physiological characters and the influence factors on the leave color of purple leaf cherry plum [D]. Harbin: Northeast Forestry University (东北林业大学), 2006.
 - 21 Li YE, Gao WQ. Proceedings of the 27th annual meeting of Chinese meteorological society on urban meteorology and better life (第27届中国气象学会年会城市气象, 让生活更美好分会场论文集) [C]. Beijing: Chinese Meteorological Society, 2010: 373-380.