

doi:10.11937/bfyy.20170781

响应面优化超声波辅助太行菊 总黄酮提取工艺

郝英¹, 陈建中²

(1. 邯郸学院 数理学院, 河北 邯郸 056005; 2. 冀南太行山区野生资源植物研发中心, 河北 邯郸 056005)

摘要:以太行菊为试材,以超声波辅助提取试验,采用单因素分析和响应面分析相结合的方法,筛选出最优的太行菊黄酮提取组合配置,针对太行菊黄酮类化合物提取工艺进行优化。结果表明:单因素试验中最佳的料液比 $1:25\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,乙醇浓度60%,提取温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,提取时间45 min。响应面试验的方差分析表明,料液比、乙醇浓度和提取温度对黄酮提取率影响差异极显著,提取时间对提取率的影响差异不显著。4个因素对提取率的影响依次为料液比>乙醇浓度>提取温度>提取时间。回归方程模型预测的最优提取工艺条件为料液比 $1:25.88\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、乙醇浓度61.78%、提取温度 $63.44\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、提取时间55 min,太行菊黄酮提取率可达极值4.74%。料液比、乙醇浓度和提取温度的增加极显著的提高了太行菊黄酮的提取率。

关键词:太行菊;黄酮;超声辅助提取;单因素试验;响应面法

中图分类号:R 284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)18-0131-07

近年来有关植物活性物质的提取及其相关功效的研究逐渐增多,并取得了很多成果,为食品和医药行业研发新产品提供了很多重要数据。关于黄酮类物质的研究表明,其具有抗癌、抗心脑血管疾病、治疗骨质疏松、免疫调节等很多重要作用,其作用机理多是因为黄酮类物质具有很强的抗氧化作用^[1-2],能清除有害的超氧自由基^[3]。

太行菊(*Opisthopappus taihangensis*)为中国特有植物,是我国太行山区的一种珍稀物种。多年生宿根,须根系,茎深紫色至褐色,老茎节间

短约0.5 cm嫩茎节间一般较长可长至4 cm,茎柔软多不能支撑直立。单叶深缺刻,舌状花,花瓣粉色或白色,花瓣完全展开直径可达3 cm,花期6—9月。太行菊花国内主要分布于河南、山西、河北三省太行山区,多生长在海拔1 000 m左右的悬崖峭壁、岩石缝中。太行菊由于其生境的特殊性,多耐旱和耐寒,是农业园艺栽培菊花的近缘野生种,是一种非常宝贵的野生种质资源。但由于采伐严重,目前已经成为濒危植物。

太行菊植株内因含有大量的黄酮和多酚而具有较高的抗氧化活性^[4],近年来,超声波技术由于热能耗低、效率高和不破坏有效成分的特点,被应用于提取植物中的黄酮类^[5]、生物碱以及其它生物活性物质^[6-7],具有非常广阔的应用前景。该研究采用超声波辅助技术,提取太行菊中黄酮类化合物,通过响应面法分析优化提取因素组合,为开发利用太行菊食药资源提供参考依据。

第一作者简介:郝英(1980-),女,硕士,讲师,研究方向为数学统计及数学教育。E-mail:elgoogle@126.com.

责任作者:陈建中(1978-),男,硕士,副教授,研究方向为天然产物活性物质提取分离。E-mail:cjzhong@126.com.

基金项目:河北省科技计划资助项目(13222907);邯郸市科技局资助项目(1627201054);邯郸学院校级资助项目(15202,16211)。

收稿日期:2017-04-05

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试太行菊为河北邯郸涉县的合漳乡、偏城镇的长裂太行菊。于开花前采集地上部分,采时株高4~10 cm,为河北邯郸地区野生种类。去掉杂质、洗净尘土、沥干水分,于60℃鼓风干燥箱中烘至恒重,粉碎过筛后备用。

供试试剂:95%乙醇及无水乙醇、硫酸亚铁、过氧化氢、水杨酸、Tris-HCl缓冲液、邻苯三酚、盐酸。所用化学试剂均为分析纯及以上。

供试仪器设备:小型自动粉碎机(郑州市烽火机械设备有限公司),L5紫外可见分光光度计(日本岛津仪器公司),N-1100V-WP旋转蒸发器(西安安泰仪器公司),TGL-16G高速冷冻离心机(常州中捷实验仪器制造有限公司),DK-S28数显水浴锅(常州中捷实验仪器制造有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 芦丁标准曲线的制备

精确称取芦丁标准品0.02 g,用95%乙醇超声溶解,并定容于100 mL容量瓶中。准确吸取标准品溶液0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,分别置于25 mL比色管中;用30%乙醇加到6 mL;加入1 mL 5% NaNO₂,摇匀后静置6 min,加入1 mL 10% Al(NO₃)₃,摇匀后静置6 min,加入10 mL 4% NaOH,加水至25 mL,摇匀后静置15 min。以第一支试管溶液为空白,用1 cm比色皿,在200~600 nm扫描,发现最大吸收波长是510 nm。在510 nm下分别测定不同浓度芦丁的吸光度。吸光度Y和浓度X的关系回归方程 $Y = 10.749X - 0.007\ 05$, $R^2 = 0.999\ 22$ 。芦丁在0.012~0.041 mg·mL⁻¹范围内线性关系良好^[8-10]。

1.2.2 样品吸光度的测定

吸取样品液1 mL,用70%乙醇补至5 mL,加入5% NaNO₂ 0.3 mL,摇匀放置6 min;再加入10% Al(NO₃)₃ 0.3 mL,摇匀放置6 min;加4% NaOH 4 mL,用蒸馏水定容至10 mL,摇匀放置15 min后测定吸光度^[11-13]。

1.3 数据分析

采用Excel软件进行数据处理及分析。

2 结果与分析

2.1 料液比对太行菊黄酮提取率的影响

如图1所示,太行菊黄酮提取率随料液比增加,前期快速提高,后期逐渐变得平稳。在料液比为1:25 g·mL⁻¹时,太行菊黄酮的提取率最大,从1:15 g·mL⁻¹再到1:25 g·mL⁻¹,此时太行菊黄酮的提取率明显上升;当料液比超过1:25 g·mL⁻¹后,太行菊黄酮提取率呈现缓慢下降的趋势。考虑到减少成本,节约资源的原因,料液比1:25 g·mL⁻¹是提取太行菊黄酮的最适范围。

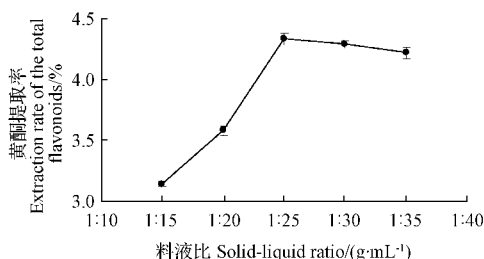


图1 液料比对太行菊黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effect of liquid-solid ratio on the flavones extraction rate from *Opisthoppappus taihangensis*

2.2 乙醇浓度对太行菊黄酮提取率的影响

如图2所示,乙醇浓度小于60%时,太行菊提取液中黄酮含量随乙醇浓度增大而增大,乙醇浓度大于60%以后,太行菊提取液中黄酮含量随乙醇浓度的增大而快速下降。考虑到生产成本,可以得出60%乙醇是太行菊黄酮提取的最适浓度。

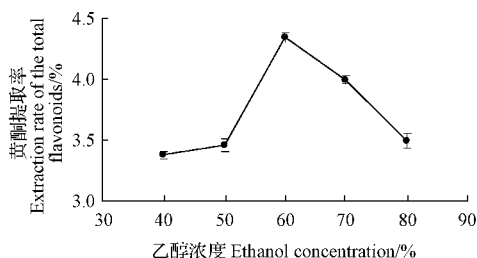


图2 乙醇浓度对太行菊黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on the flavones extraction rate from *Opisthoppappus taihangensis*

2.3 提取温度对太行菊黄酮提取率的影响

如图 3 所示,当温度小于 60 ℃时,太行菊黄酮提取率随提取温度的增加而增加,而当温度大于 60 ℃时,黄酮的提取率又随着提取温度的增加而快速降低,所以,当温度为 60 ℃时,太行菊中黄酮的提取率最高,将 60 ℃确定为最适提取条件。

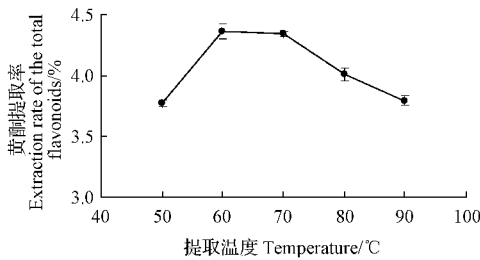


图 3 提取温度对太行菊黄酮提取率的影响
Fig. 3 Effect of extraction temperature on the flavones extraction rate from *Opisthopappus taihangensis*

2.4 提取时间对太行菊黄酮提取率的影响

如图 4 所示,太行菊黄酮提取率随超声时间的增加,前期呈现出快速的提高,后期逐渐变得平稳。超声时间为 45 min 左右,太行菊黄酮提取率能达到最高水平。时间过短,太行菊中黄酮残余太多,容易造成资源的浪费;时间过长,太行菊黄酮的提取率没有太大变化,而且时间越长生产效率越低,增加了不必要的能耗。因此,为了控制

成本,节约药品,提高太行菊黄酮的生产效率,选择超声时间 45 min 为最适提取时间。

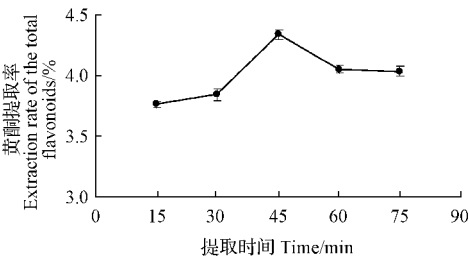


图 4 提取时间对太行菊黄酮提取率的影响
Fig. 4 Effect of extraction time on the flavones extraction rate from *Opisthopappus taihangensis*

2.5 太行菊黄酮提取响应面试验设计

根据提取温度、提取时间、料液比和乙醇浓度 4 个单因素试验所确定的水平范围,以在食品生物学及工程学中广泛应用的 Design-Expert Software 8.0 为辅助手段设计响应面试验。中心组合(Box-Behnken) 试验设计原理,做 4 因素 3 水平共 29 个试验点(5 个中心点)的响应面分析试验。表 1 中 29 个试验点可分为 2 类:自变量 A、B、C、D 取值在各水平所构成的三维析因点共计 24 个;0 为区域的中心点,零点试验重复 5 次,用以估计试验误差。A(提取温度)、B(提取时间)、C(液料比)、D(乙醇浓度)为自变量,太行菊总黄酮得率为响应值 Y(指标值)。

表 1 Box-Behnken 中心组合因素水平编码

Table 1 Independent variables and coded levels in Box-Behnken experimental design

试验序号 Experiment number	A 提取时间 Extraction time /min	B 提取温度 Extraction temperature /℃	C 料液比 Solid-liquid ratio /(g·mL ⁻¹)	D 乙醇浓度 Ethanol concentration /%	Y 黄酮提取率 Extraction rate of the total flavonoids/%
1	0	0	0	0	4.914
2	0	1	0	-1	3.765
3	-1	0	1	0	3.803
4	0	0	1	1	4.090
5	0	1	-1	0	3.842
6	0	1	1	0	4.388
7	1	-1	0	0	3.597
8	0	1	0	1	4.109
9	1	0	0	1	3.904
10	1	1	0	0	4.191
11	-1	1	0	0	3.920
12	0	0	-1	1	3.559
13	0	-1	0	-1	3.346

表 1(续)
Table 1(Continued)

试验序号 Experiment number	A 提取时间 Extraction time /min	B 提取温度 Extraction temperature /℃	C 料液比 Solid-liquid ratio /(g·mL ⁻¹)	D 乙醇浓度 Ethanol concentration /%	Y 黄酮提取率 Extraction rate of the total flavonoids/%
14	0	0	0	0	4.813
15	0	-1	0	1	3.609
16	0	-1	1	0	3.861
17	-1	0	0	-1	3.625
18	0	0	0	0	5.238
19	-1	0	-1	0	2.943
20	0	-1	-1	0	3.051
21	0	0	1	-1	3.207
22	-1	-1	0	0	3.807
23	0	0	0	0	5.117
24	1	0	0	-1	3.513
25	1	0	-1	0	3.803
26	1	0	1	0	4.481
27	-1	0	0	1	3.939
28	0	0	-1	-1	2.388
29	0	0	0	0	5.013

2.5.1 黄酮类物质的提取影响因子方差分析

如表 2 所示,回归方程模型达到极显著水平($P<0.01$),失拟项不显著($P>0.05$)。决定系数 R^2 为 0.915 6,校正决定系数 R^2_{Adj} 为 0.831 2,信噪比 R_{SN} 为 11.766,说明回归方程拟合度和可信度都非常高,能够预测太行菊黄酮的提取率。对表 2 回归模型系数的显著性分析表明,一次项中

提取温度、料液比、乙醇浓度 3 个因素的 P 值达到极显著水平($P<0.01$),而提取时间的差异不显著($P>0.05$)。由此能够得出 $A、B、C、D$ 因素对太行菊黄酮提取率影响大小为料液比>乙醇浓度>提取温度>超声时间。平方项的回归系数均处于显著水平,说明各因素与太行菊黄酮提取率之间存在明显的交互效应关系。

表 2
Table 2
Variance analysis for the established regression model

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型	11.330	14	0.810	10.84	<0.000 1
A-提取时间	0.180	1	0.180	2.35	0.147 2
B-提取温度	0.720	1	0.720	9.68	0.007 7**
C-料液比	1.500	1	1.500	20.11	0.000 5**
D-乙醇浓度	0.940	1	0.940	12.65	0.003 2**
AB	0.058	1	0.058	0.78	0.393 5
AC	0.008	1	0.008	0.11	0.744 0
AD	0.001	1	0.001	0.02	0.889 9
BC	0.017	1	0.017	0.23	0.636 4
BD	0.002	1	0.002	0.02	0.884 3
CD	0.021	1	0.021	0.28	0.606 3
A ²	1.730	1	1.730	23.17	0.000 3**
B ²	1.760	1	1.760	23.62	0.000 3**
C ²	3.950	1	3.950	52.89	<0.000 1**
D ²	4.420	1	4.420	59.22	<0.000 1**
残差	1.040	14	0.075		
失拟项	0.930	10	0.930	3.36	0.126 9
绝对误差	0.110	4	0.028		
总离差	12.370	28			

注: * 表示在 $P<0.05$ 差异显著; ** 表示在 $P<0.01$ 差异极显著。
Note: * indicates significant difference at $P<0.05$; ** indicates significant difference at $P<0.01$.

对表 2 的试验结果采用多元回归拟合后,可以得出太行菊黄酮提取率 Y 与 A 超声时间、 B 超声温度、 C 料液比和 D 乙醇浓度的回归方程: $T = 5.02 + 0.12A + 0.25B + 0.35C + 0.28D + 0.12AB - 0.045AC + 0.019AD - 0.066BC + 0.020BD - 0.072CD - 0.52A^2 - 0.52B^2 - 0.78C^2 - 0.83D^2$ 。

2.5.2 影响黄酮提取率的 RSA 响应面曲面分析

由图 5 可知,料液比与乙醇浓度之间交互作用对太行菊黄酮影响最大,在提取温度和提取时间处于 0 水平时,制作出料液比与乙醇浓度响应面与等高线。随料液比增加与乙醇浓度增加,太

行菊黄酮提取率变化呈先急剧增加后缓慢下降趋势。因此料液比在 $1:25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,乙醇浓度在 55%~65% 时,太行菊黄酮提取率相对较高。

从图 6 可以看出,提取温度和料液比具有交互影响,并且对太行菊黄酮提取率的提高具有明显的促进。在超声时间和乙醇浓度处于 0 水平时,提取温度和料液比的升高使太行菊黄酮的提取率增高;如果继续升高,太行菊黄酮的提取率会有一定程度的下降。响应面中料液比曲面坡度较陡,这说明料液比相对于提取温度对太行菊黄酮提取率的影响更加显著。

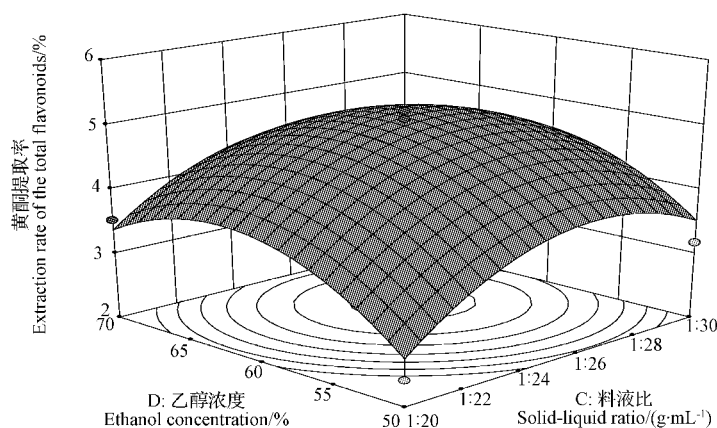


图 5 料液比与乙醇浓度对黄酮提取率响应面

Fig. 5 Response surface of solid-liquid ratio and ethanol concentration affects flavonoids extraction rate

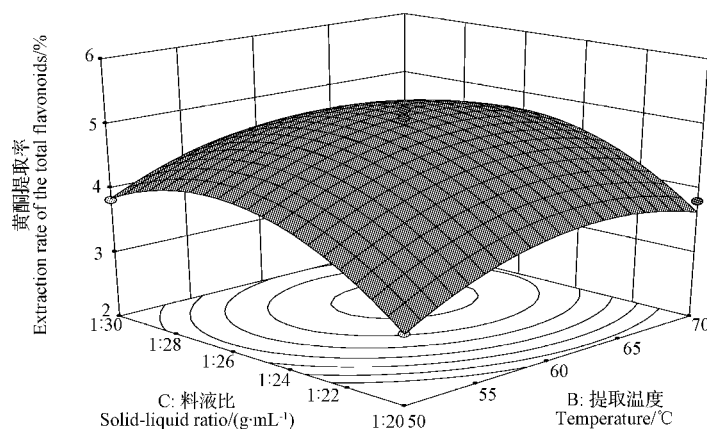


图 6 提取温度与料液比对黄酮提取率响应面

Fig. 6 Response surface of extraction temperature and solid-liquid ratio affects flavonoids extraction rate

从图 7 可以看出,提取温度与乙醇浓度具有交互影响,并且对太行菊黄酮提取率的提高具有

明显的促进。在乙醇浓度和提取时间处于 0 水平时,提取温度和乙醇浓度的升高使太行菊黄酮的

提取率增高;如果继续升高,太行菊黄酮的提取率会有一定的下降。通过等高线可以看出乙醇浓度轴比较密集,响应曲面中乙醇浓度曲面坡度较陡,

这说明乙醇浓度比提取温度对太行菊黄酮提取率的影响大。

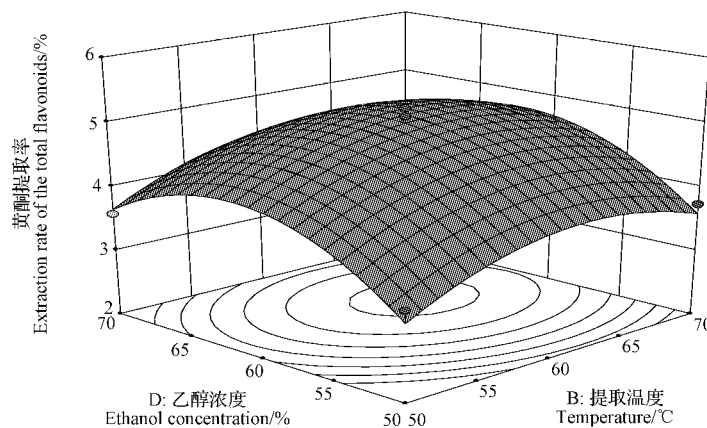


图7 提取温度与乙醇浓度对黄酮提取率响应面

Fig. 7 Response surface of extraction temperature and ethanol concentration affects flavonoids extraction rate

2.6 工艺条件的优化及回归模型的检验

为确保在上述响应面试验 29 组处理基础上建立的回归方程的准确性,并优化出超声波提取太行菊黄酮的最佳条件。依照回归方程模型,最佳的提取工艺条件为提取时间 55 min、提取温度 63.44 °C、料液比 1 : 25.88 g · mL⁻¹、乙醇浓度 61.78%,在这种条件下太行菊黄酮提取率的预测值可以达到 4.74%。预测值与 3 次平行试验值 4.75%的误差在试验允许范围内,因此响应面试验优化太行菊黄酮提取条件切实可行。

3 结论与讨论

料液比、乙醇浓度、提取温度和提取时间是影响太行菊总黄酮类化合物提取率的重要因素,提取试验主要对这 4 个因素进行了系统的研究。单因素试验表明,太行菊总黄酮提取率随料液比增加,前期呈现出快速的提高,后期逐渐变得平稳;乙醇浓度小于 60%时,太行菊总黄酮含量随乙醇浓度增大而提升,乙醇浓度大于 60%以后,太行菊黄酮含量随乙醇浓度数的增大而呈快速下降趋势;提取温度小于 60 °C时,太行菊总黄酮的提取率随提取温度的升高而提升,而当温度大于 60 °C时,黄酮提取率又随着提取温度的降低而快速降

低;太行菊总黄酮提取率随超声时间的增加,前期呈现出快速的提升,后期逐渐变得平稳。最佳的料液比是 1 : 25 g · mL⁻¹,乙醇浓度是 60%,提取温度是 60 °C,提取时间是 45 min。响应面试验的方差分析表明,料液比、乙醇浓度和提取温度对黄酮提取率影响差异极显著,提取时间对提取率的影响差异不显著。4 个因素对提取率的影响依次为:料液比>乙醇浓度>提取温度>提取时间。回归方程模型预测的最优提取工艺条件为料液比 1 : 25.88 g · mL⁻¹、乙醇浓度 61.78%、提取温度 63.44 °C、提取时间 55 min,太行菊黄酮提取率可达极值 4.74%。刘海芳等^[14]研究的太行菊黄酮提取率为 2.96%,响应面试验的方差分析表明,料液比、乙醇浓度和提取温度的增加极显著的提高了太行菊黄酮的提取率。

综合单因素试验的 4 个因素,其中料液比、乙醇浓度和提取温度与前期的研究结果基本吻合,太行菊与其它菊花相比,活性成分的特性和含量是不同的。目前,关于太行菊黄酮的提取优化试验多采用正交优化分析法,而该试验采用响应面分析法优化太行菊黄酮的提取条件,在前人的基础上对太行菊进行更加深入的研究,为有效的开发利用太行菊提供了理论指导。

参考文献

- [1] 车建美,刘波,郑雪芳,等.水果保鲜技术及其保鲜机理的研究进展[J].保鲜与加工,2012,12(1):44-50.
- [2] 郭艳峰.丁香黄芩提取液对圣女果保鲜效果的影响[J].热带农业科学,2015,35(2):82-85.
- [3] 刘开华,张宇航,邢淑婕.含茶多酚的壳聚糖涂膜对圣女果保鲜效果的影响[J].食品研究与开发,2014,35(2):109-112.
- [4] 芮光伟,邢亚阁,许青莲,等.壳聚糖丁香精油生物涂膜保鲜剂对圣女果品质的影响[J].西华大学学报(自然科学版),2014,33(5):41-44.
- [5] 张文婷,赵武奇,鲁晓翔,等.四种物流贮藏温度对圣女果品质的影响[J].食品工业科技.2015,36(5):329-333.
- [6] 张慙,刘倩.国内外果蔬保鲜技术及其发展趋势[J].食品与生物技术学报,2014,33(8):785-792.
- [7] 史孟凡.采后 ClO_2 水溶液清洗对樱桃番茄的保鲜效果[D].杨凌:西北农林科技大学,2013.
- [8] AQUINO-BOLAÑOS E N, MERCADO-SILVA E. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama[J]. Postharvest Biology & Technology, 2004, 33(3): 275-283.
- [9] 魏东伟,徐铭蔓,孙武勇,等.太行菊和野菊不同器官水提液抗氧化活性研究[J].中国食品学报,2015,15(2):56-63.
- [10] 梁芳,蒋素华,王洁琼,等.濒危植物太行菊组织培养及快繁技术研究[J].中国农学通报,2015,31(16):115-120.
- [11] 田华,韩慢慢,陈乐玲.圣女果保鲜技术研究进展[J].食品工业科技,2016,37(7):396-398.
- [12] 张文婷,赵武奇,鲁晓翔,等.四种物流贮藏温度对圣女果品质的影响[J].食品工业科技,2015,36(5):329-333.
- [13] 李宁,关文强,赵丽静.丁香精油对贮藏期圣女果防腐效果初步研究[J].天津农学院学报,2011,18(2):16-19.
- [14] 刘海芳,魏东伟,刘全军,等.太行菊不同器官中绿原酸和 4 种黄酮类物质含量研究[J].天然产物研究与开发,2013,25(5):646-651.

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Total Flavonoids From *Opisthopappus taihangensis* (Ling) Shih by Response Surface Methodology

HAO Ying¹, CHEN Jianzhong²

(1. Department of Mathematics and Physics, Handan College, Handan, Hebei 056005; 2. Wild Resources Plant Research Center of South Hebei Taihang Mountains, Handan, Hebei 056005)

Abstract: Taking *Opisthopappus taihangensis* as test material, the single-factor test was carried out by ultrasonic-assisted extraction. The optimum extraction process of flavonoids from *Opisthopappus taihangensis* was analyzed by Box-Behnken response surface. The results showed that the extraction conditions were as follows the ratio of material to liquid 1 : 25 g · mL⁻¹, ethanol concentration 60%, extraction temperature 60 °C, extraction time 45 minutes. The variance analysis of the response surface test showed that solid-liquid ratio, ethanol concentration and extraction temperature on the extraction rate of flavonoids was very significant, and the extraction time had no significant effect on the extraction rate of flavonoids. The effects of four factors on the extraction rate were as follows; solid-liquid ratio > ethanol concentration > extraction temperature > extraction time. The optimal extraction conditions were as follows, solid-liquid ratio was 1 : 25.88 g · mL⁻¹, the concentration of ethanol was 61.78%, the extraction temperature was 63.44 °C, the extraction time was 55 minutes, and the extraction rate of flavonoids was 4.74%. The solid-liquid ratio, ethanol concentration and extraction temperature could increase the extraction rate of flavonoids from *Opisthopappus taihangensis* very significantly.

Keywords: *Opisthopappus taihangensis*; flavonoids; ultrasonic-assisted extraction; single-factor experiment; response surface method