

张丽霞,魏照辉,赵婉晴. 响应面优化超声波辅助酶法提取桑叶总黄酮的工艺[J]. 江苏农业科学,2019,47(13):217-221.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.13.053

响应面优化超声波辅助酶法提取桑叶总黄酮的工艺

张丽霞,魏照辉,赵婉晴

(江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014)

摘要:利用响应面法对超声波辅助酶法提取桑叶总黄酮的条件进行优化,在单因素试验的基础上,选取料液比、提取温度和提取时间 3 个因素为自变量,以桑叶总黄酮提取率为响应值,进行 Box - Behnken 中心组合试验设计,进行响应面分析。结果表明,当加酶量为 0.8%,超声功率为 200 W,超声时间为 10 min 时,提取桑叶总黄酮的最佳工艺条件为料液比 1:18(g/mL),提取温度 51℃,提取时间 3.6 h,在此条件下总黄酮提取率为 5.55%,总黄酮产量理论与试验平均值相对标准误差为 0.89%,表明 Box - Behnken 模型优化可用于桑叶总黄酮提取条件优化,所得参数准确可靠,具有实用价值。

关键词:桑叶;总黄酮;超声波辅助酶法提取;响应面法;提取率

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)13-0217-05

桑叶为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的干燥叶。近年来随着健康饮食的价值回归,桑叶已经被广泛应用于食品工业、医药、美容护肤等方面,呈现出古树新花的局面。桑叶含有矿物质、维生素、食物纤维、氨基酸、植物甾醇、黄酮类等多种功能性成分,具有降血糖、降血压、降低胆固醇、抗衰老、维持消化系统和排泄系统健康、防癌抗癌、提高免疫力等功效^[1-4]。

桑叶具有上述功效,是因为其含有黄酮类、生物碱类、糖类,以及甾类、挥发油、氨基酸类、维生素和微量元素等有效成分,而黄酮类化合物和生物碱为主要功效成分,其中黄酮类化合物占桑叶干质量的 1%~3%,具有降血脂、清除自由基、抗炎和抗癌等作用^[5-8]。桑叶黄酮类化合物具有显著的抗癌、

抗氧化作用,受到人们的广泛关注,其抗肿瘤作用主要表现在抗癌细胞增殖、诱导癌细胞凋亡和增强抑癌基因活性及抑制癌基因表达等方面^[9-10]。因此,考虑到桑叶黄酮具有上述特殊功效,有必要对其提取工艺研究。

国内外对黄酮提取的研究较多,目前提取桑叶黄酮主要采用水、乙醇等溶剂进行提取,但该方法有提取率低、生产周期长的缺点。也有研究采用超声法、微波法和超临界 CO₂ 提取法提取桑叶黄酮。但从桑叶中超声波辅助酶法提取总黄酮的报道却并不多见。其中超声波辅助提取法是一种从植物中提取活性成分的重要方法^[11-12],近年来被广泛应用于植物活性成分的提取研究。超声提取相对于微波法提取和超临界 CO₂ 提取具有提取率高、速率快、能耗低的优点^[13-14]。本研究采用超声波辅助酶法,在单因素试验的基础上,采用了 Box - behnken 中心组合设计,使用响应面分析法对桑叶总黄酮超声波辅助提取条件进行了优化。为更好地开发利用桑叶的药用食用价值提供合理的依据和参考。

收稿日期:2018-04-10

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:31401489)。

作者简介:张丽霞(1979—),女,河南驻马店人,博士,副研究员,研究方向为食品生物技术与果蔬加工。E-mail:zlx5885@163.com。

果实贮藏品质的影响[J]. 北方园艺,2012(13):159-162.

[15]康明丽,张平,马岩松,等. 气体成分对冬枣细胞膜和贮藏品质的影响[J]. 果树学报,2003,20(2):112-115.

[16]李家政,毕大鹏. 微孔膜包装对鸭梨贮藏品质的影响[J]. 果树学报,2010,27(1):57-62.

[17]佟伟,王文辉,王志华,等. 不同气体贮藏条件对寒富苹果采后果实品质的影响[J]. 保鲜与加工,2014(1):15-18.

[18]马惠玲,宋淑亚,马艳萍,等. 自发气调包装对核桃青果的保鲜效应[J]. 农业工程学报,2012,28(2):262-267.

[19]罗银泳,陈东康,姚詹武,等. 自发气调包装对豇豆耐藏性及品质的影响[J]. 广东农业科学,2006,33(8):67-69.

[20]佟伟,贾晓辉,王文辉,等. 自发气调包装对 3 个西洋梨品种保鲜效果的研究[J]. 浙江农业科学,2009,1(1):117-119.

[21]敖静,张昭其,黄雪梅. 不同薄膜自发气调包装对西兰花的保鲜效果[J]. 广东农业科学,2015,42(2):77-81,88,193.

[22]Sivakumar D, Korsten L. Fruit quality and physiological responses of

litchi cultivar McLean's Red to 1-methylcyclopropene pre-treatment and controlled atmosphere storage conditions[J]. LWT - Food Science and Technology, 2010, 43(6): 942-948.

[23]彭自挥. 黄州萝卜保鲜方法的研究及霉心原因分析[D]. 武汉:华中农业大学,2009:9-10.

[24]Rao M V, Paliyath G, Ormrod D P. Ultraviolet - B - and ozone - induced biochemical changes in antioxidant enzymes of Arabidopsis thaliana[J]. Plant Physiology, 1996, 110(1): 125-136.

[25]曹建康,姜微波,赵玉梅. 果蔬采后生理生化试验指导[M]. 北京:中国轻工业出版社,2007:31-32.

[26]胡璇,夏延斌,邓后勤. 利用质构仪测定剁椒椒度方法的研究[J]. 辣椒杂志,2010,8(3):39-43.

[27]Moyer R A, Hummer K E, Finn C E, et al. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(3): 519-525.

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

材料与试剂:供试桑叶采摘于江苏省句容市桑树基地,经自然干燥后用粉碎机粉碎,过 200 目筛保存于 4 ℃ 冰箱;芸香苷标准品购自国药集团化学试剂有限公司;无水乙醇、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠等试剂均为国产分析纯,购自天津市科密欧试剂有限公司。

仪器:UV-1600 紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司生产;JJ500 型电子天平,常熟市双杰测试仪器厂生产;DHG-9053A 电热恒温鼓风干燥箱,上海合恒仪器设备有限公司生产;电热恒温水浴锅,常州智博瑞仪器制造有限公司生产;TDL-5 离心机,上海安亭科学仪器厂生产;JP-500B-2 型高速多功能粉碎机,上海市久品实业有限公司生产;THZ-C-1 台式冷冻振荡器,太仓市仪器设备厂生产;Synergy UV 纯水仪,南京双隆试验器材有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 桑叶总黄酮的提取 超声波辅助果胶酶法提取:准确称取 0.5 g 桑叶于 100 mL 蒸馏水中,加入果胶酶 0.6% (质量分数),放入 50 ℃ 的水浴锅中排气 3 min,然后在 50 ℃ 下超声辅助提取一段时间,准确吸 2 mL 提取液到离心管中,离心(10 000 r/min)5 min 后得到澄清提取液。

1.2.2 桑叶总黄酮含量的测定 桑叶中总黄酮含量采用铝盐螯合显色法测定^[15]。准确称量 80 mg 芸香苷标准品,置于 100 mL 容量瓶中,用 75% 乙醇定容,配制成 0.8 mg/mL 的芸香苷标准液。然后芸香苷标准液和 75% 乙醇分别按照 1:1、1:3、1:7、1:15 体积比配制成 0.40、0.20、0.10、0.05 mg/mL 芸香苷对照品溶液。510 nm 处测定吸光度,以 75% 乙醇作空白对照。以吸光度为纵坐标,对照品的浓度(mg/mL)为横坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程: $Y = 1.0980X + 0.0032 (R^2 = 0.9978)$,利用标准曲线计算样品总黄酮含量(C)。提取物总黄酮提取率公式:

$$W = (CV/m) \times 100\%$$

式中:W 为黄酮提取率(%);V 为提取液的总体积(mL);m 为称量的桑叶粉的准确质量(g)。

1.2.3 单因素试验 (1)加酶量对提取效果的影响 在固定料液比 1:10(g/mL),提取温度 60 ℃,提取时间 2 h,超声功率 200 W,超声 10 min 条件下,考察不同加酶量(0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%)对桑叶中总黄酮提取率的影响,筛选出最佳的加酶量。(2)料液比对提取效果的影响 在固定加酶量 0.8%,提取温度 60 ℃,提取时间 2 h,超声功率 200 W,超声 10 min 的条件下,考察不同料液比(1:10、1:15、1:20、1:25)对桑叶中总黄酮提取率的影响,筛选出最佳的料液比。(3)提取温度对提取效果的影响 在固定加酶量 0.8%,料液比 1:10(g/mL),提取时间 2 h,超声功率 200 W,超声 10 min 的条件下,考察不同提取温度(40、45、50、55、60 ℃)对桑叶中总黄酮提取率的影响,筛选出最佳的提取温度。(4)提取时间对提取效果的影响 在固定加酶量 0.8%,料液比 1:10(g/mL),提取温度 60 ℃,超声功率 200 W,超声 10 min 的条件下,考察不同提取时间(1、2、3、4 h)对桑叶中总黄酮提取率的影响,筛选出最佳的提取时间。

(5)超声波功率对提取效果的影响 在固定加酶量 0.8%,料液比 1:10(g/mL),提取温度 60 ℃,超声 10 min 的条件下,考察不同超声功率(150、200、250、300、400 W)对桑叶中总黄酮提取率的影响,筛选出最佳的超声波功率。

1.2.4 响应面试验设计 在单因素试验结果基础上,固定加酶量 0.8%,超声功率 200 W,超声 10 min 等条件,采用 Box-Behnken 试验设计,以选取料液比、提取温度和提取时间 3 个因素为自变量,以桑叶黄酮提取率为响应值,进行 Box-Behnken 试验,以-1、0、1 分别代表自变量的低、中、高 3 个水平,试验因素水平及编码见表 1。

表 1 试验因素水平及编码

编码	因素		
	$-X_1$:料液比 (g : mL)	X_2 :提取温度 (℃)	X_3 :提取时间 (h)
-1	1 : 15	40	2
0	1 : 20	50	3
1	1 : 25	60	4

1.2.5 数据处理 采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面分析。

2 结果与分析

2.1 加酶量对桑叶总黄酮提取率的影响

由图 1 可知,随着加酶量的增大,总黄酮的提取率逐渐增大,当加酶量大于 0.6% 后总黄酮提取率差异不显著,说明此时酶已经达到饱和,为了避免酶的浪费而造成成本加大,因此选择最佳加酶量为 0.6%。

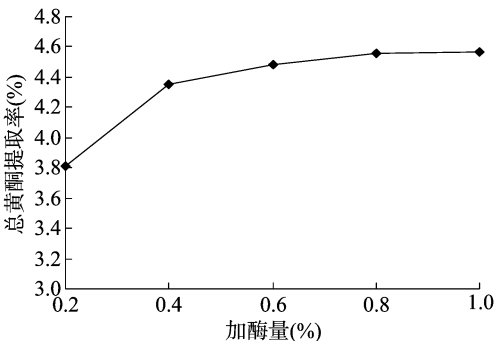


图 1 加酶量对总黄酮提取率的影响

2.2 料液比对桑叶总黄酮提取率的影响

由图 2 可知,随着液料比的增大,桑叶总黄酮的提取率逐渐提高,这主要是由溶剂能够溶解的黄酮的量不断增加所致^[16]。当液料比达 1:20 时,再增加溶剂用量,提取率提高不明显,因此选择最佳液料比为 1:20。

2.3 提取温度对桑叶总黄酮提取率的影响

由图 3 可知,随着提取温度的升高,总黄酮提取的提取率呈现逐渐增大的变化趋势,这主要是由于温度升高,加剧了黄酮分子运动及相互间的碰撞频率,促进植物细胞破裂^[17],有助于黄酮渗出扩散到溶剂中。但是温度增加至 50 ℃ 时,再升高温度对总黄酮的提取率影响不明显。因此从节能和提高提取效率的角度考虑,选择最佳提取温度为 50 ℃。

2.4 提取时间对桑叶总黄酮提取率的影响

由图 4 可知,随着提取时间的延长,总黄酮提取率逐渐增

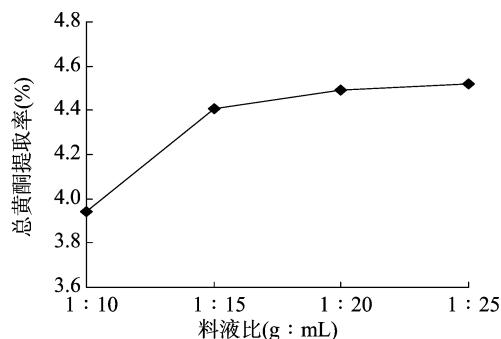


图2 料液比对总黄酮提取率的影响

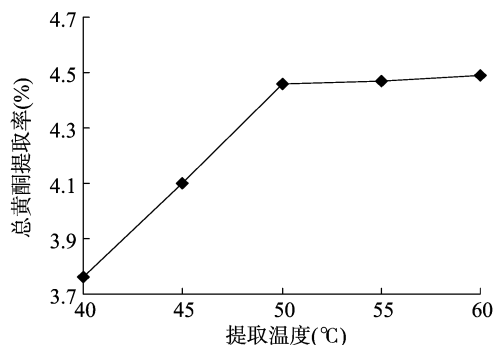


图3 提取温度对总黄酮提取率的影响

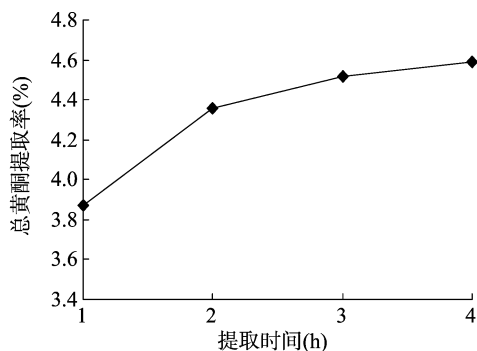


图4 提取时间对总黄酮提取率的影响

大,当提取时间为 3 h 时,总黄酮的提取率为 4.52%,继续延长提取时间,总黄酮的提取率变化不大。理论上提取时间越长,原料与提取剂的接触越充分,提取也越充分。但是时间延长会增加试验周期。因此本试验将提取时间确定为 3 h。

2.5 超声功率对桑叶总黄酮提取率的影响

由图 5 可知,当超声功率小于 250 W 时,总黄酮的提取率随超声功率的升高而升高,250 W 时总黄酮的提取率达到最大,当超声功率大于 250 W 时总黄酮提取率明显下降。因此,选用超声功率为 250~300 W。

2.6 回归方程的建立与方差分析

Box-Behnken 试验设计及结果见表 2。以总黄酮提取率 (Y) 为指标,利用 Design-expert 8.0.1 Trial 数据处理软件中 ANOVA 程序对表 2 的试验结果进行二次回归分析,计算出方程各项系数并进行方差分析,可得 3 个因子与 Y 之间的回归方程(模型)为

$$Y = 5.520 + 0.069X_1 + 0.030X_2 + 0.099X_3 - 0.020X_1X_2 - 0.067X_1X_3 - 0.015X_2X_3 - 0.130X_1^2 - 0.095X_2^2 - 0.067X_3^2。$$

由方差分析(表 3)可以看出,所得 Y_1 的回归方程极显著

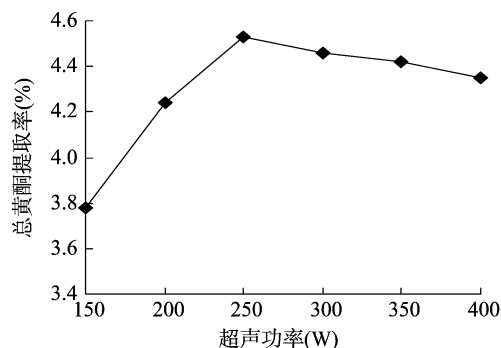


图5 超声功率对总黄酮提取率的影响

表 2 响应面设计方案和试验结果

编号	编码			试验值
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	1	0	5.33
2	1	1	0	5.42
3	0	-1	1	5.47
4	0	0	0	5.53
5	1	0	1	5.45
6	1	-1	0	5.31
7	0	-1	-1	5.28
8	0	0	0	5.53
9	0	0	0	5.55
10	-1	0	1	5.44
11	1	0	-1	5.35
12	0	1	-1	5.28
13	0	1	1	5.41
14	-1	-1	0	5.14
15	0	0	0	5.49
16	0	0	0	5.51
17	-1	0	-1	5.07

($P < 0.01$), 且 $R^2 > 0.9$, 失拟项 F 检验不显著($P > 0.05$), 说明回归方程拟合度好, 模型显著($P < 0.01$), 该回归模型可用于试验结果分析。料液比和提取时间对桑叶总黄酮提取率的影响极显著($P < 0.01$), 提取温度对桑叶总黄酮提取率的影响不显著($P > 0.05$)。二次项 X_1^2 、 X_2^2 以及交互项中的 X_1X_3 也对桑叶总黄酮提取率的影响显著($P < 0.05$)。这表明各试验因素对总黄酮提取率的影响呈二次关系, 且 3 个因素之间存在交互作用。

2.7 响应面分析

2.7.1 响应面各因素间交互作用的优化分析 响应面的图形是可以反映各试验因子对响应值的影响, 而等高线图能反映最优条件下各试验因子的取值以及各因子之间的交互作用。圆形等高线表示 2 个因素交互作用不显著, 而椭圆形等高线表示 2 个因素交互作用显著。

料液比和提取温度 2 个因素对总黄酮提取率的交互作用见图 6。由响应面图可知, X_1 、 X_2 2 个因素的交叉项显著, 料液比约在 (1:18、1:20), 提取温度约在 (45、50 °C), 二者存在显著增效作用, 呈现正相关关系; 而料液比约在 (1:20、1:23), 提取温度约在 (50、55 °C), 桑叶总黄酮提取率随二者的增加而降低。由等高线图可知, 总黄酮提取率最大为 5.58%。

表 3 回归模型方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.28	9	0.031	10.35	0.002 8
X_1	0.038	1	0.038	12.48	0.009 6
X_2	7.200×10^{-3}	1	7.200×10^{-3}	2.38	0.167 1
X_3	0.078	1	0.078	25.75	0.001 4
X_1X_2	1.600×10^{-3}	1	1.600×10^{-3}	0.53	0.491 0
X_1X_3	0.018	1	0.018	6.02	0.043 9
X_2X_3	9.000×10^{-4}	1	9.000×10^{-4}	0.30	0.602 6
X_1^2	0.068	1	0.068	22.51	0.002 1
X_2^2	0.038	1	0.038	12.48	0.009 6
X_3^2	0.019	1	0.019	6.29	0.040 6
残差	0.021	7	3.029×10^{-3}		
失拟项	0.019	3	6.375×10^{-3}	12.26	0.057 4
纯误差	2.080×10^{-3}	4	5.200×10^{-4}	$R^2 = 0.930\ 1$	
总和	0.30	16			

注: $P < 0.05$ 表示差异显著; $P > 0.05$ 表示差异不显著; $P < 0.01$ 表示差异极显著。

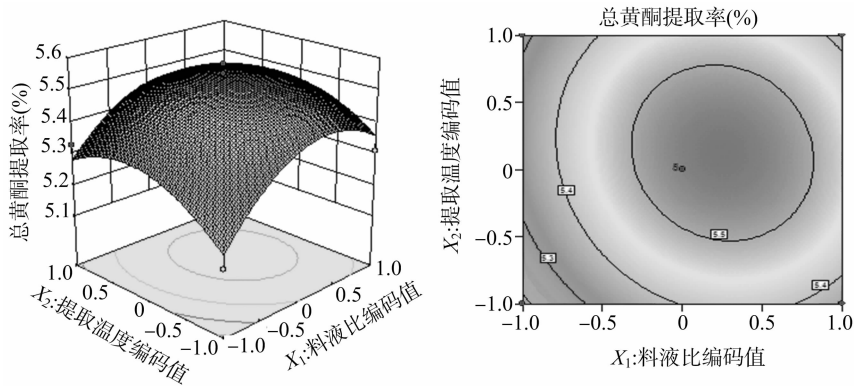


图6 料液比与提取温度对总黄酮提取率影响的响应面和等高线

料液比和提取时间 2 个因素对总黄酮提取率的交互作用见图 7。由图 7 可知, X_1 、 X_3 2 个因素的交叉项显著, 在料液比约在(1 : 18、1 : 20), 提取时间约在(2、4 h), 二者存在显著

增效作用, 呈现正相关关系。由等高线图可知, 总黄酮提取率最大为 5.53%。

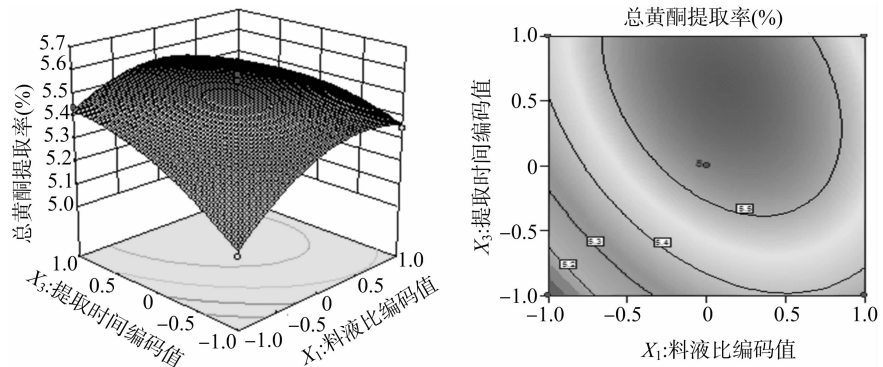


图7 料液比与提取时间对总黄酮提取率影响的响应面和等高线

提取温度和提取时间 2 个因素对总黄酮提取率的交互作用见图 8。由图 8 可知, X_2 、 X_3 2 个因素的交叉项显著, 在提取温度约在(40、45 ℃), 提取时间约在(2、4 h), 二者存在显著增效作用, 呈现正相关关系。由等高线图可知, 总黄酮提取率最大为 5.49%。

2.7.2 模型的验证 为了检验响应面法优化桑叶提取总黄酮工艺结果的可靠性, 根据得到的优化条件进行 3 次验证试验, 结果显示, 试验平均值为 5.55%, 与预测的最大响应值相对标准偏差为 0.89%, 表明 Box - Behnken 模型优化可用于桑叶总黄酮的提取条件优化, 所得参数准确可靠, 具有实用价值。

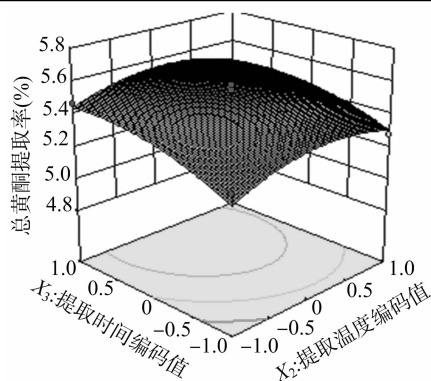
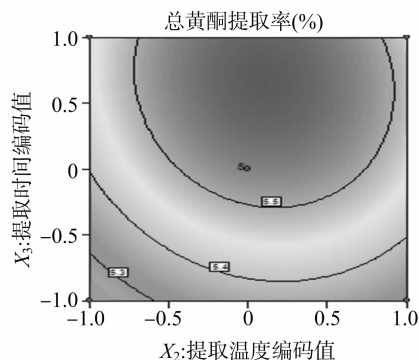


图8 提取温度与提取时间对总黄酮提取率影响的响应面和等高线



3 结论与讨论

桑叶黄酮的提取方法有多种^[18],牟会荣等采用响应面法就提取时间、提取度、乙醇浓度和液料比 4 个因素进行桑叶黄酮提取工艺的优化,所得最佳提取工艺为提取温度 68 ℃、提取时间 40 min、乙醇浓度 52% 和液料比 86 mL/g,此条件下桑叶黄酮得率为 4.71%,而理论预测值为 4.64%^[19]。田刚等利用均匀设计法对超临界 CO₂ 流体提取桑叶黄酮的工艺进行优化,结果表明,超临界 CO₂ 流体提取桑叶黄酮的最佳提取条件为提取温度 51 ℃,提取压强 36 MPa,提取时间 4.0 h,夹带剂乙醇用量 3.7 mL/g,在此条件下测得的桑叶黄酮的提取率为 1.42%^[20]。本研究在单因素试验的基础上,采用超声波辅助酶法提取桑叶总黄酮,并采用响应面法对提取工艺进行优化,获得的桑叶总黄酮最佳提取工艺条件为料液比 1:18,提取温度 51 ℃,提取时间 3.6 h,在此条件下总黄酮提取率为 5.55%,总黄酮产量理论值与试验平均值相对标准误差为 0.89%,表明 Box-Behnken 模型优化可用于桑叶总黄酮的提取条件优化,所得参数准确可靠,具有实用价值。与传统的有机溶剂回流提取法、超临界 CO₂ 提取法相比,本方法具有安全无毒、成本低、提取率较高、操作简单的特点。

参考文献:

- [1] 王向阳,俞兴伟,全义超. 桑叶多糖的提取与降血糖功能研究[J]. 中国食品学报,2014,14(9):63-67.
- [2] 郑晓静,伍金娥,何计国,等. 响应面法优化超声波提取桑叶中 1-脱氧野尻霉素的工艺研究[J]. 中国食品学报,2012,12(9):34-40.
- [3] 丁双华,叶立斌,陈卫,等. 响应面优化提取桑叶多酚的研究[J]. 中国食品学报,2012,12(1):52-58.
- [4] 应芝,励建荣,韩晓祥. 响应面分析法优化桑叶多糖提取工艺的研究[J]. 中国食品学报,2008,8(4):39-45.
- [5] 贺伟强,向天勇,陶昆,等. 响应面法优化超声辅助提取桑叶总黄酮的工艺研究[J]. 中国农学通报,2012,28(33):296-301.
- [6] Chun H C, Yu T C, Tsui H T, et al. Mulberry leaf extract inhibit hepatocellular carcinoma cell proliferation via depressing IL-6 and TNF- α derived from adipocyte[J]. Journal of Food and Drug

- Analysis,2018,26(3):1024-1032.
- [7] Zhang Y, Ren C J, Lu G B, et al. Purification, characterization and anti-diabetic activity of a polysaccharide from mulberry leaf[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology,2014,70(3):687-695.
- [8] 玄光善,潘士佳,南姬. 桑叶有效成分降糖作用研究[J]. 食品科学,2011,32(7):323-326.
- [9] 杨雨,欧阳臻,常钰,等. 桑叶不同组分降血糖作用研究[J]. 食品科学,2007,28(8):454-456.
- [10] 王志雄,高剑文,缪伟伟. 桑叶对肿瘤血管生成的影响[J]. 中国医药导报,2014,11(25):22-25.
- [11] 李先佳,郁建平,都国栋. 桑叶总黄酮和多糖提取工艺优化[J]. 食品科学,2005,26(6):159-162.
- [12] 林英男,时伟. 超临界 CO₂ 提取桑叶中总黄酮的工艺研究[J]. 齐鲁工业大学学报(自然科学版),2014(3):32-36.
- [13] Wen L R, Yang B, Cui C, et al. Ultrasound-assisted extraction of phenolics from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit seed with artificial neural network and their antioxidant activity[J]. Food Analytical Methods,2012,5(6):1244-1251.
- [14] 钟雨坤,王历琼,韩小丹,等. 正交试验优化超声波辅助同时提取桑叶总黄酮、单宁工艺[J]. 食品科学,2015,36(12):44-48.
- [15] 李文利,宁喜斌,熊梓伊,等. 响应面法优化微波提取桑叶黄酮和多糖工艺研究[J]. 食品工业,2015(2):21-25.
- [16] Katsube T, Imawaka N, Kawano Y, et al. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity[J]. Food Chemistry,2006,97(1):25-31.
- [17] 孙敏耀,唐文照,卢霞,等. 分光光度法测定不同采收时间桑叶中总黄酮[J]. 中草药,2004,35(10):116-117.
- [18] 缪伟伟,王志雄,石全雨,等. 响应曲面法与正交法在二氧化碳超临界萃取桑叶总黄酮中的比较[J]. 江苏农业科学,2017,45(18):189-193.
- [19] 牟会荣,陈昆,王晓岚,等. 正交试验法与响应面法在桑叶黄酮提取工艺优化中的应用和比较[J]. 江苏科技大学学报(自然科学版),2016,30(1):88-93.
- [20] 田刚,杨丛,赵晓军,等. 均匀设计优化超临界 CO₂ 流体提取桑叶黄酮的研究[J]. 农业科学研究,2016,37(4):23-26,35.