

王永徐,邱天越,李 臣,等. 甘薯叶黄酮的基因型差异及磷酸氢二钾乙醇双水相提取工艺的响应面优化[J]. 江苏农业科学,2019,47(23):227-231.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.23.054

甘薯叶黄酮的基因型差异及磷酸氢二钾乙醇双水相提取工艺的响应面优化

王永徐,邱天越,李 臣,叶夏芳,崔 鹏,曹如霞,陆国权

(浙江农林大学农业与食品科学学院/浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室/浙江农林大学薯类作物研究所,浙江临安 311300)

摘要:选用20个各地主栽品种,测其甘薯叶黄酮含量,其中观赏品种台湾红的黄酮含量最高,为25.37 mg/g,徐薯27的黄酮含量最低,为10.63 mg/g,不同品种间甘薯叶黄酮含量差异达到极显著水平($P < 0.01$)。不同品种间的甘薯叶黄酮含量为紫叶甘薯品种 > 绿叶紫薯品种 > 绿叶常规品种。超声辅助双水相法提取甘薯叶黄酮,在单因素试验的基础上,选取磷酸氢二钾用量、乙醇用量和样品量为自变量,甘薯叶黄酮得率为响应值,运用Minitab 17软件通过Box - Behnken 试验设计及响应面分析法,分析各自变量之间交互作用对黄酮得率的影响,建立了黄酮得率的二次多项式回归方程的预测模型。各单因素及其交互作用对黄酮得率的影响,优化甘薯叶黄酮的提取工艺条件。结果表明,优化后的提取条件为磷酸氢二钾用量3 g(30%),乙醇用量3.06 g(30.65%),样品量是0.45 g,此时最大萃取得率为8.11%。

关键词:甘薯茎叶;双水相;黄酮;超声辅助

中图分类号: R284.2; TS201.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)23-0227-05

甘薯 [*Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill], 是旋花科 (Convolvulaceae) 薯蓣属一年生或多年生蔓生草本植物, 别称红薯、地瓜、番薯、甜薯等。甘薯是粮食作物^[1] 和经济作物, 具有高产、稳产、适应性广等优点。我国是甘薯重要的产区之一, 是甘薯种植的第一大国, 我国甘薯种植面积占世界甘薯种植面积的65%左右, 年产1.2亿t, 占世界甘薯产量的86%。近几年, 我国甘薯种植面积呈现缓慢下降趋势^[2], 而种植专用型甘薯品种的面积在不断增加。随着消费多元化的发展, 甘薯育种方向和加工方式都趋向于多元化发展。所以对甘薯

茎叶的资源再利用具有十分重要的价值。甘薯茎叶含有丰富的蛋白质、氨基酸、胡萝卜素、维生素B、维生素C以及铁、钙、镁、钠等矿质元素, 而且富含活性多糖、多酚和黄酮类化合物, 具有清除自由基、调剂免疫力、抗疲劳、抗菌、抗肿瘤、抗糖尿病等一系列功能。随着天然产物的开发检测技术日趋成熟, 关于甘薯抗氧化功能物质的研究越来越多。由于甘薯是我国重要的粮食经济作物, 对于废弃甘薯茎叶的开发利用变得尤为重要。本研究应用新型提取方法优化提取的工艺条件, 探究甘薯叶黄酮的最佳提取工艺条件, 为甘薯叶黄酮的开发利用提供理论依据。

收稿日期:2018-09-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:31671750);国家现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-11-B-18);浙江省重大科技专项(编号:2012C12902-3)。

作者简介:王永徐(1992—),男,山东临沂人,硕士,研究方向为甘薯茎叶功能成分。E-mail:w824981332@163.com。

通信作者:陆国权,博士,教授,研究方向为薯类品质评价及其产后商品化技术。E-mail:lugq10@zju.edu.cn。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 2017年5月9日在浙江省杭州市临安区浙江农林平山试验基地种植徐薯22。每个小区面积3.6 m², 并扦插60株,3次重复。8月5日开始采收测定小区内的甘薯叶,间隔10 d再进行1次采收,至8月25日共采收3次;采收的甘薯叶片叶柄在45℃烘干至恒质量,粉碎、过90目筛低

[J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(2):90-98.

[12] White J C. Differential bioavailability of field - weathered p, p' - DDE to plants of the *Cucurbita* and *Cucumis* genera [J]. Chemosphere, 2002, 49(20):143-152.

[13] Gao Y, Ren L, Ling W, et al. Desorption of phenanthrene and pyrene in soils by root exudates [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(4):1159-1165.

[14] Nardi S, Reniero F, Concheri G. Soil organic matter mobilization by root exudates of three maize hybrids [J]. Chemosphere, 1997, 35(10):2237-2244.

[15] Luo L, Zhang S Z, Shan X Q, et al. Oxalate and root exudates

enhance the desorption of p, p' - DDT from soils [J]. Chemosphere, 2006, 63(8):1273-1279.

[16] Li Y, Yang L, Yan H, et al. Uptake, translocation and accumulation of imidacloprid in six leafy vegetables at three growth stages [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 164:690-695.

[17] Tsugawa H, Cajka T, Kind T, et al. MS - DIAL: data - independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis [J]. Nature Methods, 2015, 12(6):523-526.

[18] Li Y, Long L, Ge J, et al. Effect of imidacloprid uptake from contaminated soils on vegetable growth [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(26):7232-7242.

温保存待测。

1.1.2 试验试剂 芸香苷标准品(上海源叶生物科技有限公司);磷酸氢二钾、氯化钠、硫酸铵、碳酸钠、乙醇试剂(分析纯,浙江卡尔生物技术有限公司)。

1.1.3 主要仪器 DHG-9123A 鼓风干燥箱烘箱(上海精宏实验设备有限公司)、TP-214 分析天平(美国丹佛仪器有限公司)、分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、锤式旋风磨(杭州大吉光电仪器有限公司)、超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 乙醇与不同种类无机盐相图的绘制和分相能力的对比 双水相体系分相能力的研究参照池汝安等的方法^[3]进行。试验结果表明,氯化钠不能与无水乙醇形成双水相,因为温度对碳酸钠的溶解度有很大影响,所以容易产生晶体而不能与乙醇形成稳定的双水相体系,磷酸氢二钾、硫酸铵都能与乙醇形成稳定的双水相体系。室温下,通过改变盐的用量,采用浊点法绘制各双水相体系见图1。

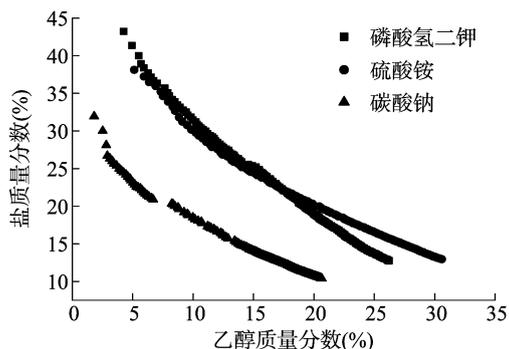


图1 3种不同盐的双水相体系

由图1可知,乙醇/磷酸氢二钾、乙醇/碳酸钠、乙醇/硫酸铵3种双水相体系中,磷酸氢二钾分相能力较强,在较少的乙醇和盐的用量时,就能形成稳定的双水相体系,碳酸钠在水中溶解度较另外2种盐低,在含盐量较低时该双水相体系的分配系数较小,无法考察含盐量较高时该双水相体系对目标萃取物的萃取效果,故不适合作萃取体系;硫酸铵能够稳定分相且持续时间长但在水中的溶解度没有磷酸氢二钾好,故不适合作萃取体系;磷酸氢二钾既能够稳定分相,而且持续时间长,分相的浓度范围广,萃取能力强,故选用磷酸氢二钾与乙醇为萃取甘薯叶多酚的双水相体系,并对其进一步研究。

1.2.2 黄酮的测定 参考陆国权等的方法^[4]。

2 结果与分析

2.1 不同基因型品种甘薯叶黄酮含量

从表1、表2可知,甘薯叶的黄酮含量分布在10~30 mg/g之间,观赏品种台湾红的黄酮含量最高,为25.37 mg/g,其次是秦紫薯3号,为21.14 mg/g,徐薯27的黄酮含量最低,为10.63 mg/g,不同品种间甘薯叶黄酮含量差异达到极显著水平($P < 0.01$)。不同品种间的甘薯叶黄酮含量为紫叶甘薯品种 > 绿叶紫薯品种 > 绿叶常规品种。

2.2 单因素影响试验

2.2.1 样品量对提取率的影响 由图2可以看出,样品用量

表1 不同基因型甘薯叶黄酮含量及抗氧化能力

品种	黄酮含量 (mg/g)	自由基清除能力 (%)
台湾红	25.371 ± 0.61A	94.7 ± 1.3AB
秦紫薯3	21.136 ± 0.48B	92.0 ± 0.6AB
商薯19	18.250 ± 0.27CDE	93.6 ± 0.3AB
福薯7-6	16.130 ± 0.65DEF	92.9 ± 0.1AB
烟紫薯4	18.912 ± 0.88DC	98.1 ± 0.1A
浙薯6025	15.996 ± 0.60DEF	89.0 ± 0.8B
黔紫薯3	14.267 ± 0.80FGH	94.1 ± 0.6AB
徐薯27	10.632 ± 0.72I	93.5 ± 2.8AB
苏薯8	13.541 ± 0.12FGH	91.0 ± 1.3AB
黔薯2	12.661 ± 0.34HI	94.5 ± 3.4AB
徐薯32	16.096 ± 0.30DEF	89.7 ± 0.3B
秦薯5	14.281 ± 0.08FGH	90.0 ± 1.1B
徐薯22	16.110 ± 0.62DEF	91.6 ± 0.1AB
商薯8	13.716 ± 0.51FGH	89.6 ± 0.0B
川紫薯6	12.253 ± 0.13HI	93.2 ± 0.4AB
商薯12	15.519 ± 0.68EFG	90.3 ± 0.9AB
冀薯982	12.912 ± 0.39GHI	91.0 ± 2.5AB
秦紫薯4	18.638 ± 0.90BCD	94.1 ± 2.9AB
徐薯25	12.887 ± 0.37GHI	89.9 ± 0.4B
冀紫薯2	11.785 ± 0.29HI	93.0 ± 3.5AB

注:同列数据后不同大写字母表示在0.01水平差异极显著。

表2 甘薯叶黄酮含量方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
组间	478.400	29	25.179	77.171	<0.001
组内	6.525	30	0.326		
总数	484.926	59			

直接影响甘薯叶总黄酮的提取率,样品用量过大或者过小都不利于总黄酮的提取。样品量过小,磷酸氢二钾用量增大,会因溶剂用量过多,影响双水相的稳定性,从而导致总黄酮提取率下降;磷酸氢二钾用量过大,溶剂体积过少,黄酮类从样品扩散到溶剂中的速率低,而且极易达到饱和状态。因此选用0.4 g的样品用量。

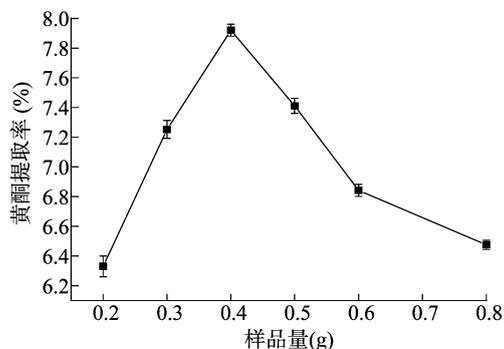


图2 样品量对提取率的影响

2.2.2 磷酸氢二钾用量对提取率的影响 在磷酸氢二钾-乙醇双水相中,上相由乙醇和水组成,由于黄酮类化合物易溶于乙醇所以进入上相。双水相的形成是磷酸氢二钾与乙醇争夺水分子的过程。随着磷酸氢二钾用量的增加,盐对水的束缚能力逐渐增强,导致上相中乙醇的相对体积分数增加^[5]。

因此,盐用量的多少可影响到上相的极性,最终影响到黄酮的提取率^[6]。从图3可以看出,随着磷酸氢二钾用量的增加,总黄酮得率先上升后下降,在磷酸氢二钾2.5 g时黄酮的提取率达到最大值。探究其中的原因,可能是因为磷酸氢二钾在2.5 g时形成的双水相最为稳定,有利于黄酮的溶出和扩散。

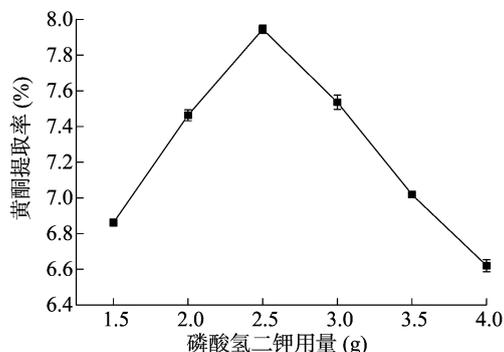


图3 磷酸氢二钾用量对提取率的影响

2.2.3 乙醇用量对提取率的影响 由图4可知,在乙醇质量小于3.0 g时,随着乙醇质量的增加,黄酮提取率呈现上升趋势;在3.0 g时黄酮的提取率达到最大值;在乙醇质量大于3.0 g时,黄酮的提取率呈现下降趋势。这是因为乙醇的用量多少会直接影响双水相提取效果。过低的乙醇用量不利于黄酮类化合物从植物细胞中溶解出来,而过高的乙醇用量不易透过亲水性植物细胞壁,也会导致盐的析出^[7]。当水的用量过少时盐不能完全溶解,过多时则无法形成双水相体系。因此,初步确定乙醇最佳用量为3.0 g,此时黄酮提取率最高。

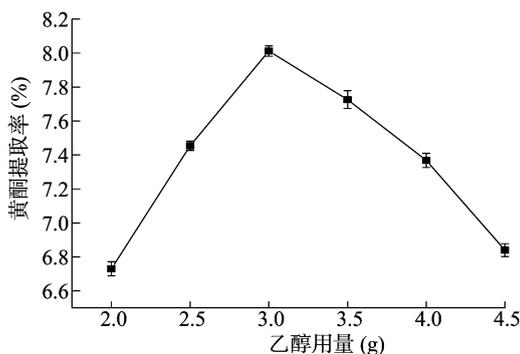


图4 乙醇用量对提取率的影响

2.2.4 超声时间对提取率的影响 由图5可知,在超声时间为10~40 min时甘薯叶黄酮得率随超声时间的延长而提高,在40 min时达到最大值,之后继续超声提取得率会有所降低,可能是因为超声时间过长,甘薯茎叶里面的黄酮已经全部溶出,过长的超声时间导致黄酮类化合物部分氧化降解^[8],从而导致提取得率下降。所以,选定40 min为最佳超声时间。

2.3 响应面试验设计

在单因素试验基础上,根据Box-Behnken试验设计原理,选择磷酸氢二钾用量(A)、乙醇用量(B)、样品量(C)进行三因素三水平的响应面分析,确定甘薯叶黄酮提取的较优条件,试验因素水平组合见表3,Box-Behnken设计和结果见表4。

采用Minitab 17软件对数据进行统计分析,得到甘薯叶黄

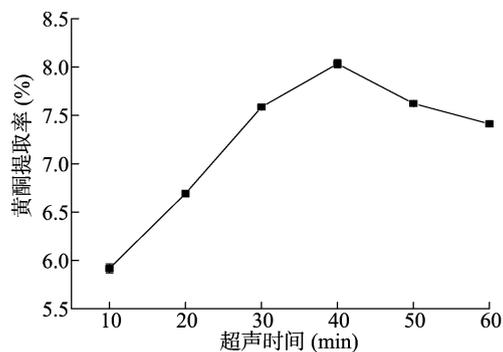


图5 超声时间对提取率的影响

表3 响应面优化试验因素水平

水平	磷酸氢二钾用量 (g)	乙醇用量 (g)	样品量 (g)
-1	2.0	2.5	0.3
0	2.5	3.0	0.4
1	3.0	3.5	0.5

表4 Box-Behnken设计和结果

试验号	磷酸氢二钾用量 (g)	乙醇用量 (g)	样品量 (g)	提取率 (%)
1	1	0	1	7.64
2	0	1	1	7.91
3	0	0	0	8.11
4	-1	1	0	7.86
5	-1	0	1	7.82
6	1	1	0	7.68
7	1	0	-1	7.90
8	-1	-1	0	7.59
9	0	1	-1	7.87
10	1	-1	0	7.76
11	0	0	0	8.13
12	0	-1	-1	7.89
13	0	0	0	8.08
14	-1	0	-1	7.73
15	1	-1	1	7.60

酮提取率对A(磷酸氢二钾用量)、B(乙醇用量)、C(样品量)的二次多项回归方程为黄酮提取率 = $-9.652 + 6.545A + 4.910B + 1.823C - 0.8583A^2 - 0.6783B^2 - 1.913C^2 - 0.3500A \times B - 0.7000A \times C + 0.6600B \times C$ 。

回归模型分析: R^2 为99.35%; R^2 (调整)为98.17%; R^2 (预测)为95.11%。

由表5可知,整体模型显著性水平 $P < 0.01$,表明该模型达到了极显著水平。校正决定系数 R^2 (调整)为值为98.17%,说明多酚得率的变化有98.17%来自此3个因素。由表中的F值和P值可以看出模型中B、C、 A^2 、 B^2 、 C^2 和 $A \times B$ 、 $A \times C$ 、 $B \times C$ 对甘薯叶黄酮提取率有极显著影响。由F值大小可知因素的主效应关系为乙醇>样品量>磷酸氢二钾用量。

2.4 响应面分析

使磷酸氢二钾用量、乙醇用量、样品量三因素交互作用,做响应曲面,由图6可知,磷酸氢二钾用量与样品量相互作用

表5 回归模型的方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	0.428 123	0.047 569	71.71	0.000
线性	3	0.050 900	0.016 967	25.58	0.002
A(磷酸氢二钾用量)	1	0.000 050	0.000 050	0.08	0.795
B(乙醇用量)	1	0.028 800	0.028 800	43.42	0.001
C(样品量)	1	0.022 050	0.022 050	33.24	0.002
平方和	3	0.288 748	0.096 249	145.10	0.000
A ²	1	0.170 016	0.170 016	256.31	0.000
B ²	1	0.106 185	0.106 185	160.08	0.000
C ²	1	0.052 801	0.052 801	79.60	0.000
2 因素交互	3	0.088 475	0.029 492	44.46	0.000
A × B	1	0.030 625	0.030 625	46.17	0.001
A × C	1	0.030 625	0.030 625	46.17	0.001
B × C	1	0.027 225	0.027 225	41.04	0.001
残差	5	0.003 317	0.000 663		
失拟值	3	0.002 050	0.000 683	1.08	0.514
纯误差	2	0.001 267	0.000 633		
总差	14	0.431 440			

对甘薯叶黄酮提取率的影响十分明显,提取率的响应面开口向下,提取率和双水相萃取体系中的3个制约因素呈现明显的二次抛物线关系。随着每个因素水平的增加,响应值提取率也在增大^[9]。三因素的增加,响应值提取率出现最大值,随着三因素水平继续增加,提取率呈现不同斜率的下降,该回归模型具有稳定点,稳定点是最大值^[10]。借助Minitab17中多元二次回归模型对甘薯叶黄酮提取率进行估算,对二次抛物线函数模型进行极值分析,解方程可得甘薯叶中黄酮的较优提取条件为磷酸氢二钾用量3 g(30%),乙醇用量是3.06 g(30.65%),样品量是0.45 g,此时理论最大萃取得率为8.11%。考虑实际操作,取磷酸氢二钾30%,乙醇浓度30%,样品量是0.45 g,3次重复试验结果平均值为8.07%,基本与预测值相近。由此可见,该模型能够较为准确地反映出三种因素对甘薯叶中的黄酮提取率的影响。

3 讨论与结论

不同品种间甘薯叶黄酮含量差异极显著,紫色甘薯叶品种的黄酮含量高于一般品种。紫色甘薯叶品种花青素含量高于一般品种,花青素和黄酮有相同的合成代谢通路^[11],所以甘薯叶黄酮的含量与叶色有很大的相关性。优化提取试验结果表明,加入相对多的磷酸氢二钾形成了水相体系,所得提取率略小但差异不显著,主要是目标提取物黄酮进入双水相体系,表面性质、电荷作用和离子键、氢键、憎水键以及环境等都会对黄酮在上下相中的分配造成影响^[12],造成其在上、下两相中的浓度不同,甘薯叶粉样刚好悬浮于两相之间,易溶于乙醇相的黄酮提取后进入上相,易溶于水相的多糖等物质溶于下相。这样,提取和分离过程同时进行,对甘薯叶提取液中的黄酮成分起到了一定的纯化、富集作用。本试验优化的甘薯叶黄酮提取率为8.11%,与李文芳等的研究结果^[13-14]存在差异;应该是本研究材料包括叶柄部分,叶柄中含有木质化纤维等机械组织影响了提取得率;另外也可能是由试验材料选用的甘薯品种、种植地点、取样时间、测定方法等差异不同造成的^[15-16]。

不同品种间甘薯叶黄酮含量差异达到极显著水平。不同品种间的甘薯叶黄酮含量为紫叶甘薯品种 > 绿叶紫薯品种 > 绿叶常规品种。磷酸氢二钾-乙醇双水相超声波辅助提取甘薯叶中黄酮的较优提取条件为磷酸氢二钾用量3 g(质量分数为30%),乙醇用量3.06 g(质量分数30.65%),样品量是0.45 g,此时理论最大萃取得率为8.11%。利用乙磷酸氢二钾-乙醇双水相超声波辅助提取甘薯叶中黄酮的得率约为8.11%,得率较高,用时较短,操作不复杂,具有较强的可操作性。由此可得,磷酸氢二钾-乙醇双水相超声波辅助提取适合于甘薯叶中黄酮类化合物的提取,为甘薯叶的进一步资源化开发利用提供了一定的技术支撑。

参考文献:

- [1] 马剑凤,程金花,汪洁,等. 国内外甘薯产业发展概况[J]. 江苏农业科学,2012,40(12):1-5.
- [2] 马代夫,李强,曹清河,等. 中国甘薯产业及产业技术的发展与展望[J]. 江苏农业学报,2012,28(5):969-973.
- [3] 池汝安,詹斯维,张越非,等. 葛根总黄酮在乙醇-无机盐双水相体系中的萃取[J]. 武汉工程大学学报,2014,36(3):1-7.
- [4] 陆国权,赵文静. 甘薯多酚最佳提取工艺及多酚含量的基因型差异研究[J]. 中国粮油学报,2009,24(3):49-52.
- [5] 周燕芳. 超声波协同提取杨桃叶中黄酮的工艺研究[J]. 现代食品科技,2006,22(3):160-162.
- [6] 高云涛,李干鹏,李正全,等. 超声集成丙醇-硫酸铵双水相体系从苦荞麦苗中提取总黄酮及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2009,30(2):110-113.
- [7] 杨宇华,郑宝东,黄艳,等. 响应面法优化超声波辅助提取艾草总黄酮工艺[J]. 食品研究与开发,2018,39(3):59-64.
- [8] 王苗苗,赵有为,赵开丽,等. 响应面法优化辣木叶总黄酮超声波辅助提取工艺[J]. 热带农业科技,2015,38(4):22-28.
- [9] 忻晓庭,潘悠悠,陆国权,等. 响应面法优化甘薯皮多酚超声提取工艺[J]. 江苏师范大学学报(自然科学版),2018,36(1):26-29,32.

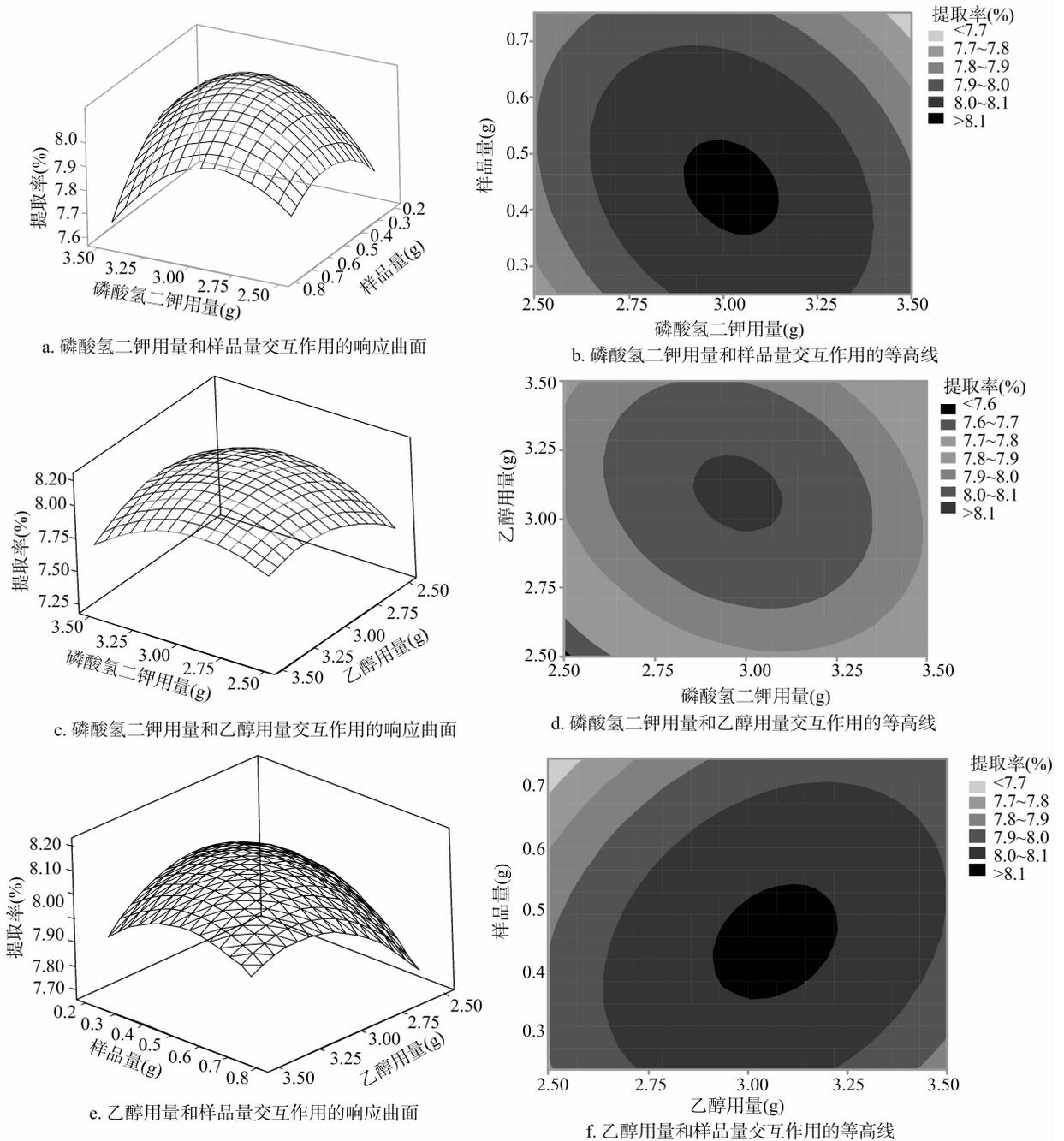


图6 各因素交互作用对总黄酮得率影响的响应曲面和等高线

[10] 阎森琳, 蒋玉蓉, 曹美丽, 等. 响应面法优化紫薯种子多酚提取工艺及其品种差异[J]. 食品科学, 2016, 37(4): 7-12.

[11] 张毅, 钮福祥, 孙健, 等. 不同地区紫薯的花青素含量与体外抗氧化活性比较[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(21): 205-207.

[12] 高丽威. 紫心甘薯黄酮类化合物的提取纯化及抗氧化活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.

[13] Altemimi A, Watson D G, Kinsel M, et al. Simultaneous extraction, optimization, and analysis of flavonoids and polyphenols from peach

and pumpkin extracts using a TLC - densitometric method [J]. Chemistry Central Journal, 2015, 9(1): 1-15.

[14] 李文芳, 田春莲, 黄美娥, 等. 甘薯叶和茎中黄酮类化合物含量的初步测定[J]. 中国农学通报, 2005, 21(4): 119-121.

[15] 王玫, 张泰铭, 熊运海. 超声波法提取紫甘薯叶总黄酮的工艺研究[J]. 广州化学, 2010, 35(2): 13-18.

[16] 徐艳. 超声波乙醇浸提法提取甘薯茎叶中总黄酮的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(5): 76-79.