

王 波, 张晓艳, 黄 攀, 等. 响应面法优化马齿苋黄酮超声波提取工艺[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(1): 166-171.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.01.024

响应面法优化马齿苋黄酮超声波提取工艺

王 波, 张晓艳, 黄 攀, 吕德雅, 严 帆, 刘 辉

(安徽师范大学环境科学与工程学院, 安徽 芜湖 241002)

摘要: 以野生马齿苋为试验材料, 在单因素试验基础上, 采用 Box-Behnken 试验设计和响应面分析法, 探讨乙醇体积分数、液料比、提取时间以及提取温度对马齿苋黄酮提取率的影响。结果表明: 优化的马齿苋黄酮超声波提取工艺条件为乙醇体积分数 80%、液料比 30:1 (ml/g)、提取时间 55.40 min、提取温度 64.19 °C, 此条件下马齿苋黄酮理论提取率为 1.42%, 实际提取率为 1.38%。回归模型的预测值与实测值接近, 表明响应面法对马齿苋黄酮提取工艺的优化合理可行。

关键词: 马齿苋; 黄酮; 超声波提取; 响应面优化

中图分类号: TS218 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)01-0166-06

Optimization of ultrasonic wave extraction of flavonoid from *Portulaca oleracea* L. by response surface methodology

WANG Bo, ZHANG Xiao-yan, HUANG Pan, LYU De-ya, YAN Fan, LIU Hui

(College of Environmental Science and Engineering, Anhui Normal University, Wuhu 241002, China)

Abstract: Using *Portulaca oleracea* L. as material, the effects of ethanol volume fraction, ratio of liquid-to-solid, extraction time and extraction temperature on the extraction yield of flavonoid were determined through response surface methodology based on Box-Behnken experimental design. The results showed that optimum extraction conditions were 80.00%, 30:1 (ml/g), 55.40 min and 64.19 °C for ethanol volume fraction, ratio of liquid-to-solid, extraction time and extraction temperature, respectively. Under these conditions, the predicted and actual extraction rates of flavonoid from *Portulaca oleracea* L. were 1.42% and 1.38%, respectively. The predictive value of the regression model agreed with the experimental value, and the optimized conditions for flavonoid extraction from *Portulaca oleracea* L. were reliable.

Key words: *Portulaca oleracea* L.; flavonoid; ultrasonic wave extraction; response surface methodology

马齿苋(*Portulaca oleracea* L.)是马齿苋科马齿苋属一年生肉质草本植物, 又名蚂蚁菜、长命菜、瓜子菜、五行草等, 在中国南北方均有分布, 资源十分丰富^[1-3]。马齿苋含有黄酮、多糖、多酚、生物碱等多种生物活性物质, 具有广泛的药理活性及营养保健

功能^[4-7], 是中国卫生部划定的 101 种药食同源野生植物之一, 曾经被列入 2008 年北京奥运会的菜谱^[8-9], 对马齿苋功能性成分的研究越来越受到人们的关注。黄酮类化合物具有较低的毒性和广谱的药学功能, 具有抗肿瘤、抗过敏、抗菌、抗病毒、抗衰老、降低心肌耗氧量、降血糖及增强机体免疫力等功能^[10-11]。近年来, 对于马齿苋黄酮的研究, 主要涉及提取工艺^[12-14]、抑菌和抗氧化性等方面^[15-17], 但目前未见利用响应面分析法优化马齿苋黄酮提取工艺方面的报道。响应面分析法通过建立数学模型解决受多种因素影响的最优组合问题, 用于确定各因

收稿日期: 2017-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31400589); 安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2010A150)

作者简介: 王 波(1974-), 女, 吉林柳河人, 博士, 副教授, 研究方向为环境生物学、环境与食品安全。(E-mail) wangbohky@163.com

素及其交互作用在工艺过程中对响应值的影响,常用于原料功效成分提取工艺条件的优化^[18-21]。超声波提取技术具有快速、廉价和高效的特点,广泛应用于多种天然产物的提取^[22]。本研究采用超声波法提取马齿苋黄酮,并应用响应面法优化其提取工艺,为马齿苋植物资源的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 马齿苋样品

马齿苋样品 2015 年 10 月 15 日采于安徽省安庆市潜山县。新鲜马齿苋先用自来水冲洗掉泥沙,然后用蒸馏水冲洗干净,最后用滤纸迅速吸干表面附着水分,于 90 ℃ 条件下杀青 30 min,60 ℃ 下烘干至恒质量。烘干后的马齿苋样品用粉碎机粉碎,过 60 目尼龙筛,分别存于自封袋中编号备用。

1.2 仪器与试剂

主要仪器:752 型紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司产品),KH3200E 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司产品),SHZ-D(III)型循环水式真空泵(上海凌科实业发展有限公司产品)。

主要试剂:芦丁标准品,亚硝酸钠,硝酸铝,氢氧化钠,无水乙醇,以上试剂均为分析纯。

1.3 马齿苋黄酮超声波提取工艺

准确称取已过 60 目筛的马齿苋干燥样品 1.000 0 g,进行超声波提取,然后过滤,最后将滤液定容至 50 ml,即得马齿苋黄酮提取液。

1.4 马齿苋黄酮提取率的测定

精确称取芦丁标准品 0.008 0 g,加 60% 乙醇溶解,转移至 50 ml 容量瓶中并稀释至刻度,摇匀,即得芦丁标准溶液^[21]。分别移取上述芦丁标准溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 ml 至 10 只 10 ml 容量瓶中,加入 60% 乙醇溶液补充至 5.0 ml。先分别加入 5% NaNO₂ 溶液 0.3 ml 摇匀,放置 6 min 后,分别加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 ml 摇匀,放置 6 min 后,再分别加入 1.0 mol/L NaOH 溶液 4.0 ml,用蒸馏水定容至 10.0 ml 摇匀,放置 15 min 后,在 510 nm 处测定吸光度值^[23]。以吸光度值为纵坐标,黄酮质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得到芦丁标准曲线的回归方程是 $Y = 18.419 0x + 0.012 6$,相关系数 $R^2 = 0.999 3$ 。精密移取马齿苋黄酮提取液 1.5 ml 至 10 ml 容量瓶中,同上操作加入

5% NaNO₂、10% Al(NO₃)₃ 和 1.0 mol/L NaOH,定容,在 510 nm 处测定吸光度。根据测得的吸光度和标准曲线回归方程计算马齿苋中黄酮的含量,然后计算马齿苋黄酮提取率,马齿苋黄酮提取率=(马齿苋黄酮质量/马齿苋质量)×100%。

1.5 马齿苋黄酮提取的单因素试验

前人研究结果表明,在黄酮的超声波辅助提取过程中,黄酮提取率受乙醇体积分数、液料比、提取时间和提取温度等提取工艺参数的影响^[20,24]。因此,分别以这 4 个工艺参数为单因素进行试验,研究其对马齿苋黄酮提取率的影响,各因素水平见表 1。

1.6 马齿苋黄酮提取的响应面试验

在单因素试验结果基础上,采用 4 因素 3 水平对乙醇体积分数、液料比、提取时间和提取温度进行优化试验,同时采用 Design-Expert V8.0.6.1 进行响应面分析,确定超声波法提取马齿苋黄酮的最优工艺。试验因素和水平设计见表 1。

表 1 马齿苋黄酮提取的响应面试验因素与水平表

Table 1 Factors and coded levels of response surface analysis for extracting flavonoid from *Portulaca oleracea* L.

水平	乙醇体积 分数 (%)	液料比 (ml/g)	提取时间 (min)	提取温度 (℃)
-1	60	10 : 1	40	50
0	70	20 : 1	60	60
1	80	30 : 1	80	70

1.7 统计分析

试验设 3 次重复,采用 SPSS 17.0 for Windows 软件进行数据分析,采用 origin86 软件作图。

2 结果与分析

2.1 马齿苋黄酮提取的单因素试验结果

2.1.1 乙醇体积分数对马齿苋黄酮提取率的影响

控制反应条件为液料比 30 : 1 (ml/g),反应温度 50 ℃,提取时间 60 min,考察乙醇体积分数分别为 50%、60%、70%、80%、90%、100% 时的黄酮提取率。由图 1 可知,黄酮提取率随乙醇体积分数的增大呈先上升后下降的趋势。当乙醇体积分数为 70% 时,黄酮提取率达到最大值(1.16%)。再增大乙醇体积分数,黄酮提取率反而下降。这可能是由于随着乙醇体积分数的增大黄酮类化合物的溶解度也随之增大,当乙醇体积分数过大时样品中的其他醇溶性物

质被浸出,与黄酮形成竞争^[20],从而导致黄酮提取率降低。因此确定最佳乙醇体积分数为 70%。

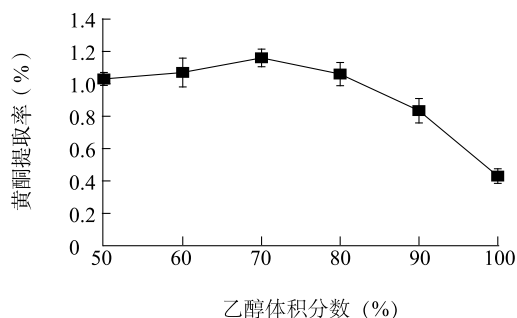


图1 乙醇体积分数对黄酮提取率的影响

Fig.1 Effect of ethanol volume fraction on flavonoid extraction yield

2.1.2 液料比对马齿苋黄酮提取率的影响 控制反应条件为乙醇体积分数 70%,反应温度 50 ℃,提取时间 60 min,考察液料比分别为 5 : 1、10 : 1、20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1 (ml/g) 时的黄酮提取率。由图 2 可知,黄酮提取率随液料比的增大呈先上升后下降的趋势。当液料比为 20 : 1 时,黄酮提取率达到最大值(1.36%)。如果溶剂用量少,则黄酮溶出量少;如果溶剂用量过大,杂质溶出量也增加,且成本增加^[22]。因此确定最佳液料比为 20 : 1。

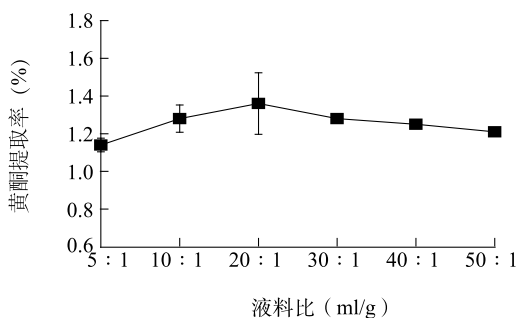


图2 液料比对黄酮提取率的影响

Fig.2 Effect of ratio of liquid-to-solid on flavonoid extraction yield

2.1.3 提取时间对马齿苋黄酮提取率的影响 控制反应条件为液料比 30 : 1 (ml/g),乙醇体积分数 70%,反应温度 50 ℃,考察超声波提取时间分别为 20 min、40 min、60 min、80 min、100 min 及 120 min 时的黄酮提取率。由图 3 可知,黄酮提取率随提取时间的增大呈先上升后下降的趋势。当提取时间为

60 min 时,黄酮提取率达到最大值(1.44%)。提取时间较短时黄酮没有完全溶出,当时间延长时溶出的黄酮可能被氧化分解掉,使得提取率下降。因此,确定最佳提取时间为 60 min。

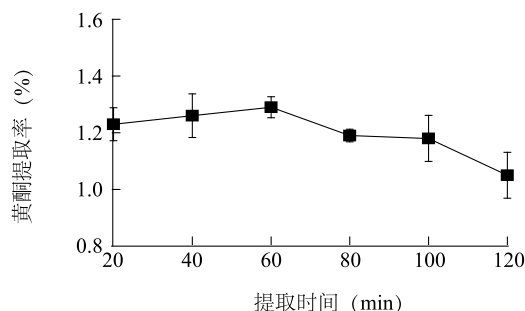


图3 提取时间对黄酮提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on flavonoid extraction yield

2.1.4 提取温度对马齿苋黄酮提取率的影响 控制反应条件为液料比 30 : 1 (ml/g),乙醇体积分数 70%,提取时间 60 min,考察反应温度分别为 30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃、80 ℃ 时的黄酮提取率。由图 4 可知,黄酮提取率随提取温度的增大呈先上升后下降的趋势。当提取温度为 60 ℃时,黄酮提取率达到最大值(1.44%)。这种变化主要是由于温度在一定范围内升高时,物质的溶解度会增加,分子间的黏滞度下降,使得更多的黄酮得以溶出。但过高的温度会破坏黄酮的分子结构,从而降低黄酮的提取率^[25]。因此,确定最佳提取温度为 60 ℃。

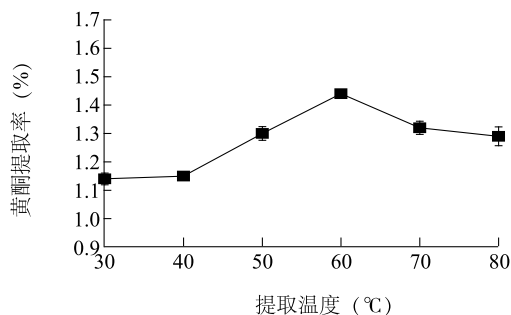


图4 提取温度对黄酮提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on flavonoid extraction yield

2.2 马齿苋黄酮提取的响应面试验结果

2.2.1 回归模型的建立和方差分析 采用 Design-Expert V8.0.6.1 软件,根据 Box-Behnken 试验设计,以乙醇体积分数(A)、液料比(B)、提取时间(C)、提

取温度(D)4因素作为自变量,以马齿苋黄酮提取率作为响应值,共设计29个试验点,其中24个分析点,5个零点^[26-28]。试验设计方案及数据处理结果见表2,方差分析结果见表3。对表2结果进行统计分析,建立四元二次响应面回归方程(编码方程):黄酮提取率=1.300 0-0.009 2A+0.130 0B+0.013 0C+0.013 0D+0.042 0AB-0.020 0AC-0.020 0AD+0.050 0BC-0.043 0BD+0.040 0CD-0.000 3A²-0.057 0B²-0.059 0C²-0.046 0D²。

表2 Box-Behnken 设计方案及响应值

Table 2 Box-Behnken experimental design and corresponding results

试验号	因素水平				黄酮提取率 (%)
	乙醇体积分数(A)	液料比(B)	提取时间(C)	提取温度(D)	
1	1	-1	0	0	1.05
2	-1	-1	0	0	1.20
3	0	0	0	0	1.37
4	0	1	0	1	1.30
5	-1	1	0	0	1.32
6	1	0	0	-1	1.30
7	0	-1	1	0	0.97
8	0	0	0	0	1.31
9	-1	0	0	-1	1.20
10	0	-1	0	-1	0.99
11	0	1	1	0	1.41
12	0	-1	-1	0	1.11
13	-1	0	-1	0	1.18
14	0	1	0	-1	1.30
15	1	1	0	0	1.34
16	-1	0	1	0	1.33
17	1	0	-1	0	1.17
18	0	0	-1	-1	1.25
19	0	0	1	1	1.19
20	0	0	-1	1	1.10
21	0	0	0	0	1.25
22	-1	0	0	1	1.30
23	0	0	0	0	1.31
24	0	1	-1	0	1.35
25	0	0	0	0	1.26
26	1	0	1	0	1.24
27	0	0	1	-1	1.18
28	1	0	0	1	1.32
29	0	-1	0	1	1.16

表3 响应面二次回归方程各项与黄酮提取率的方差分析

Table 3 Analysis of variance for each term of the response surface quadratic regression equation and the extraction rate of flavonoid

项目	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值
模型	0.280	14	0.020	4.50	0.004 0 **
A	0.001	1	0.001	0.22	0.642 9
B	0.200	1	0.200	44.18	<0.000 1 **
C	0.002	1	0.002	0.48	0.499 3
D	0.002	1	0.002	0.44	0.517 8
AB	0.007	1	0.007	1.61	0.225 3
AC	0.002	1	0.002	0.36	0.560 1
AD	0.002	1	0.002	0.36	0.560 1
BC	0.010	1	0.010	2.20	0.159 7
BD	0.008	1	0.008	1.69	0.215 2
CD	0.006	1	0.006	1.43	0.252 4
A ²	0.000	1	0.000	0	0.991 3
B ²	0.021	1	0.021	4.68	0.048 3 *
C ²	0.023	1	0.023	5.01	0.041 9 *
D ²	0.014	1	0.014	3.03	0.103 7
残差	0.063	14	0.004		
失拟项	0.054	10	0.005	2.33	0.215 0
纯误差	0.009	4	0.002		
总离差	0.350	28			

A:乙醇体积分数;B:液料比;C:提取时间;D:提取温度。*、** 分别表示该项目对黄酮提取率的影响显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$), $R^2=0.818 2$ 。

响应面二次模型方差分析结果(表3)显示:失拟项不显著($P=0.215 0>0.05$),说明模型的拟合程度良好,残差均由随机误差引起,未知因素对试验结果干扰很小^[29];模型的 P 值为0.004 0,表明该二次方程模型为极显著^[30];四元二次响应面回归方程的决定系数 $R^2=0.818 2$,说明回归方程拟合性好。综上所述,该二次响应面回归方程的失拟项很小,模型极显著,试验误差小,说明模型拟合非常可靠,因此可用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析^[31]。

根据模型拟合结果,马齿苋黄酮最佳提取工艺参数为乙醇体积分数 80%、液料比 30:1 (ml/g)、提取时间 55.40 min、提取温度 64.19 ℃,此条件下马齿苋黄酮提取率为 1.42%。为方便操作,将马齿苋黄酮最佳提取工艺参数修正为乙醇体积分数 80%、液料比30:1(ml/g)、提取时间 55 min、提取温度 64 ℃。在此最佳提取工艺条件下进行验证试验,3次重复,结果表明马齿苋黄酮的提取率为 1.38%,

接近模型预测的马齿苋黄酮提取率,说明预测值与试验值之间具有较好的拟合性,从而也证明了响应面分析法优化马齿苋黄酮提取工艺的可行性。

2.2.2 马齿苋黄酮提取的响应面分析 由乙醇体积分数、液料比、提取时间和提取温度对马齿苋黄酮提取率所构成的响应图,可反映两因素交互作用对黄酮提取率的影响。固定 2 个因素在 0 水平上,分析乙醇体积分数、液料比、提取时间和提取温度交互

作用对马齿苋黄酮提取率的影响。根据回归分析结果,采用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件作出响应曲面图(图 5)。响应曲面图中,曲线走势越陡,影响越显著;曲线走势越平滑,影响越小^[32]。由图 5 可知:液料比对马齿苋黄酮提取率的影响最为显著,表现为曲线较陡,其次为提取时间和提取温度,影响最不显著的是乙醇体积分数,表现为曲线较为平滑,随乙醇体积分数的变化,马齿苋黄酮提取率的变化较小。

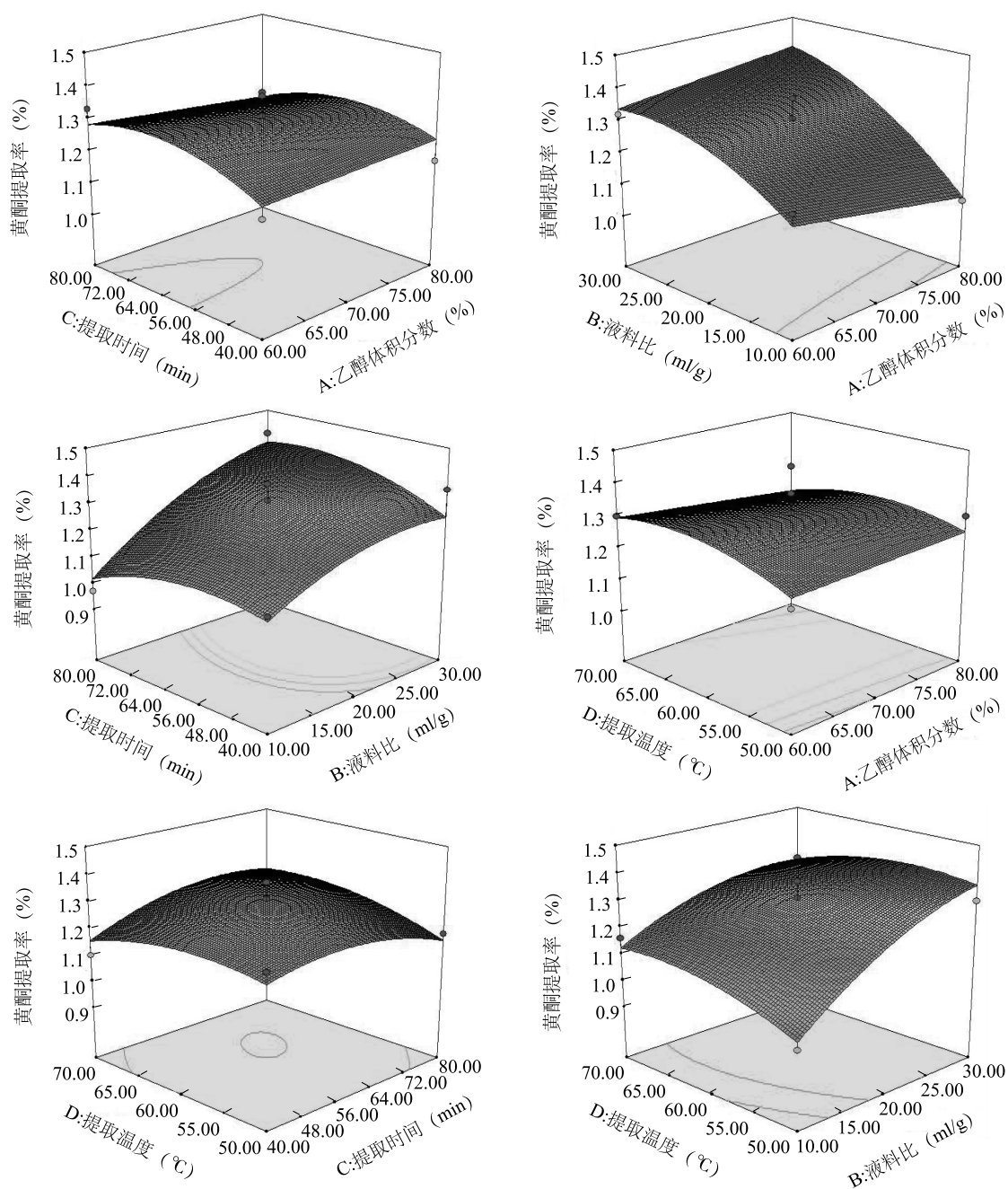


图 5 各因素间交互作用对黄酮提取率的响应面图

Fig.5 Response surface plots for the effects of cross-interactions among different factors on the extraction rate of flavonoid

3 结 论

在单因素试验的基础上,利用试验设计软件 Design-Expert,对自变量乙醇体积分数、液料比、提取时间和提取温度 4 因素与因变量黄酮提取率的数学模型进行了回归分析,得到的数学模型拟合性好,表明该模型准确可靠,能够用该模型代替试验真实点对试验结果进行预测,预测马齿苋黄酮的最佳提取条件及其理论最大提取率。根据数学模型预测出的试验条件和实际操作的可行性,确定马齿苋黄酮最佳提取工艺参数为:乙醇体积分数 80%、液料比 30:1 (ml/g)、提取时间 55 min、提取温度 64 ℃,此条件下马齿苋黄酮提取率为 1.38%,与预测值 1.42%相差较小。

参考文献:

- [1] 夏道宗,陈 佳,邹庄丹.马齿苋、车前草复合保健饮料的研制及其抗氧化作用研究[J].食品科学,2009,30(4):118-122.
- [2] 董 静,邢锦城,王茂文,等.3 种外源物质浸种对 NaCl 胁迫下马齿苋种子萌发的影响[J].江苏农业科学,2017,45(14):103-106.
- [3] YAN J, SUN L R, ZHOU Z Y, et al. Homoisoflavonoids from the medicinal plant *Portulaca oleracea* [J]. Phytochemistry, 2012, 80: 37-41.
- [4] SADEGHI G, KARIMI A, SHAFEIE F, et al. The Effects of purslane (*Portulaca oleracea* L.) powder on growth performance, carcass characteristics, antioxidant status, and blood metabolites in broiler chickens[J]. Livestock Science, 2016, 184: 35-40.
- [5] 梁 彦,张传军,吕艳荣.马齿苋多糖对高脂饮食联合链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠的作用及机制[J].食品科学,2014,35(3):217-220.
- [6] CHEN Y G, SHEN Z J, CHEN X P. Evaluation of free radicals scavenging and immunity-modulatory activities of Purslane polysaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 45(5): 448-452.
- [7] EGEE-GILABERT C, RUIZ-HERNÁNDEZ M V, PARRA M A, et al. Characterization of purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions: Suitability as ready-to-eat product[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 172: 73-81.
- [8] SHEN H, TANG G, ZENG G, et al. Purification and characterization of an antitumor polysaccharide from *Portulaca oleracea* L. [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 93(2): 395-400.
- [9] 丁怀伟,姚佳琪,宋少江.马齿苋的化学成分和药理活性研究进展[J].沈阳药科大学学报,2008,25(10):831-837.
- [10] 宋成英,黄俊懿,封加福,等.对生物黄酮生物活性的综述[J].化学工程与装备,2013(4):128-130,133.
- [11] 程欢欢,刘晓平,陈 红,等.生物类黄酮抗癌作用研究综述[J].医学理论与实践,2015,28(15):1997-1999.
- [12] 孙希云,牛广财,孟宪军,等.马齿苋中黄酮类化合物的最佳提取工艺[J].食品与发酵工业,2004,30(11):135-137.
- [13] 姜 宁,刘晓鹏,王东辉,等.马齿苋总黄酮酶解提取工艺的优化[J].食品科学,2008,29(10):323-326.
- [14] 孙希云,张 琦,孟宪军.大孔吸附树脂分离纯化马齿苋中黄酮类化合物的研究[J].食品与发酵工业,2006,32(2):124-127.
- [15] 谷春梅,潘 姝.马齿苋黄酮提取工艺及其分离纯化和抑菌作用的研究[J].食品科技,2015,40(12):185-189.
- [16] 詹 雁,王立珍,徐超群,等.马齿苋不同提取部位抗氧化活性的比较[J].中药药理与临床,2012,28(5):126-128.
- [17] 孙希云,刘 宁,陈 波,等.马齿苋总黄酮抗氧化性质的研究[J].沈阳农业大学学报,2006,37(1):108-110.
- [18] 曹春艳.响应面法优化银杏叶黄酮提取工艺[J].中国食品学报,2014,14(4):78-86.
- [19] 吴存兵,陈晓兰,吴君艳.响应面法优化乙醇提取牡丹花总黄酮工艺[J].南方农业学报,2016,47(8):1370-1375.
- [20] 熊春华,周苏果,沈 忱,等.响应面法优化提取菊米黄酮及抗氧化活性研究[J].中国食品学报,2014,14(7):118-123.
- [21] 韦迎春,闫 明,杨 晶,等.响应面法优化泽泻中 23-乙酰泽泻醇 B 闪式提取工艺[J].中国中药杂志,2016,41(3):438-442.
- [22] 张卫红,吴晓霞,马空军.超声波技术强化提取天然产物的研究进展[J].现代化工,2013,33(7):26-29.
- [23] 章爱华,邓 斌,蒋刚彪,等.马齿苋黄酮提取液抗氧化活性的初步研究[J].食品科技,2008(8):140-143.
- [24] 刘玉芬,夏海涛.响应面法优化碱蒿黄酮提取工艺及其体外抗氧化作用[J].食品科学,2012,33(12):63-68.
- [25] 裴 斐,陶虹伶,蔡丽娟,等.辣木叶多酚超声辅助提取工艺响应面法优化及抗氧化活性研究[J].食品科学,2016,37(20):24-29.
- [26] 汪 璇,张建新,孙长江,等.响应面法优化黄粉虫黄酮提取工艺[J].食品科学,2013,34(4):11-16.
- [27] 刘军海,黄宝旭,蒋德超.响应面分析法优化艾叶多糖提取工艺研究[J].食品科学,2009,30(2):114-118.
- [28] 于 森,柏云娇,代岐昌,等.响应曲面法优化文殊兰中生物碱的提取工艺[J].中草药,2013,44(10):1286-1289.
- [29] 郑林龙,蒋剑平,许海顺,等.响应面法优化土茯苓多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J].中华中医药杂志,2014,29(3):918-922.
- [30] 陈 华.响应面法优化天麻中天麻素提取工艺研究[D].遵义:遵义医学院,2011.
- [31] LIYANA-PATHIRANA C, SHAHIDI F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2005, 93(1): 47-56.
- [32] 陈 健,孙爱东,高雪娟.响应面分析法优化超声波提取槟榔原花青素工艺[J].食品科学,2011,32(4):82-86.

(责任编辑:张震林)