

铁棍山药皮中黄酮化合物 提取工艺条件优化

赵立庭,赵 华,刘 阳,田 梁

(天津科技大学 化工与材料学院,天津 300457)

摘 要:为了确定热回流法提取铁棍山药皮中黄酮化合物的最佳工艺,采用响应面曲线分析方法,以提取时间、料液比、过筛目数、乙醇体积浓度为考察因素,研究各因素及其交互作用对铁棍山药黄酮化合物提取效果的影响。利用 Minitab 16 软件确定了铁棍山药中黄酮化合物的最佳提取工艺参数,为方便操作,将工艺参数调整为乙醇体积分数 79%,料液比为 0.023 g/mL,提取时间为 75 min,过筛目数为 120 目,进行验证实验,实际测得平均得率为 0.338 2 mg/g,接近预测值,实验数据稳定,说明回归模型能较好预测铁棍山药皮中总黄酮的提取得率。

关键词:铁棍山药;黄酮;热回流提取;响应曲面法

中图分类号:TS 201.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2016)04-0059-05

Optimization of extract process conditions for flavonoids in the peel of Henan tiegun yam

ZHAO Li-ting, ZHAO Hua, LIU Yang, TIAN Liang

(College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin University of
Science and Technology, Tianjin 300457)

Abstract: In order to confirm the best extract process conditions, the effect of the factors and the interactions among them on the extraction of flavonoids in the peel of Henan tiegun yam was researched by response surface method. The factors were extraction time, solid-liquid ratio, sieving mesh number and ethanol volume concentration. The optimal factors confirmed by software Minitab 16 were adjusted to ethanol volume fraction 79%, solid-liquid ratio 0.023 g/mL, extraction time 75 min and sieving mesh number 120 mesh. The average yield was 0.338 2 mg/g determined by verification test, close to the predicted value. The test data was stable, which indicated that the regression model could predict the yield rate of flavonoids in the peel of Henan tiegun yam.

Key words: Henan tiegun yam; flavone; heat reflux extraction; response surface method

铁棍山药是河南焦作的著名特产之一,已有三千年种植历史,曾为历代皇室贡品,属于四大怀药(怀山药、怀地黄、怀牛膝、怀菊花)^[1]的怀山药中的极品,在国内外享有很高的知名度,现已被焦作市申请为国家原产地保护产品,只有焦作种植的才能叫做“铁棍山药”^[2]。铁棍山药富含蛋白质、维生素和多种氨基酸与矿物质,以其显著的滋阴助阳功能以及细长的块茎、深灰色厚实的表皮、形似棍棒且耐储存而获得“铁棍怀山药”的美称^[3],不仅行销全国,还远销国外,被视为山药中的珍品。

山药皮中富含黄酮化合物,黄酮类化合物是广泛存在于自然界的具有保健作用的一类化合物^[4],

在植物体内大部分与糖结合成为苷,大多数具有黄色或淡黄色故称为黄酮,不仅具有降血压、降血脂、扩张冠状动脉等作用,还具有抗氧化、镇咳、平喘、抗菌抗炎、增强免疫和抗肿瘤等药理活性,在天然药物开发中深受关注^[5]。

本实验以铁棍山药皮为原料,采用热回流提取方法,研究提取过程中提取液体积分数、料液比、提取时间、过筛目数对黄酮提取得率的影响,通过 IBM SPSS Statistics 软件及响应曲面分析方法优化山药皮黄酮化合物的提取工艺。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

铁棍山药源自河南焦作,于 85 ℃干燥箱干燥至恒重,粉碎后过 40 目、60 目、80 目、100 目、120 目筛后保存备用。芦丁、亚硝酸钠、硝酸铝、无水乙醇、氢

收稿日期:2015-11-12

作者简介:赵立庭,1989 年出生,女,研究生。

氧化钠均为分析纯,购自天津市北方天医化学试剂厂。紫外分光光度计、循环水式多用真空泵、粉碎机,购自上海一恒科技有限公司。

1.2 提取工艺流程

山药皮→清洗→烘干→粉碎→过筛→热回流提取→离心、浓缩提取液→石油醚萃取脱脂→饱和正丁醇萃取→浓缩干燥→山药皮黄酮粗品。

1.3 山药皮黄酮化合物含量的测定方法

1.3.1 标准溶液的配制^[6]

称取 5 g 亚硝酸钠,用水溶解并定容至 500 mL 得 1% 亚硝酸钠溶液。

称取 5 g 硝酸铝,用水溶解并定容至 500 mL 得 1% 硝酸铝溶液。

称取干燥至恒重的黄酮对照品 5 mg,用乙醇溶解并定容至 50 mL,摇匀,即得 0.1 mg/mL 的黄酮标准溶液。

称取 10 g 氢氧化钠,用水溶解并定容至 100 mL 得 10% 氢氧化钠溶液。

标准品溶液的制备:精确称取芦丁标准品 5 mg,用 70% 乙醇溶解,于 50 mL 容量瓶中定容,即得芦丁标准品溶液。

1.3.2 标准曲线的制作

分别取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 的 0.1 mg/mL 芦丁标准溶液于 6 支比色管中,分别加入 0.3 mL 1% 亚硝酸钠,放置 6 min,加 0.3 mL 1% 硝酸铝后放置 6 min,再加 10% NaOH 溶液 4.0 mL,定容至 10 mL,摇匀,以空白溶液作参比,在波长 510 nm 处测吸光度,得出回归方程 $Y = 0.10928X - 0.0011$, $R = 0.9992$ 。

1.3.3 样品处理

待测样品中分别加入 1% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,静置 6 min;再加 1% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,静置 6 min,再加 10% 氢氧化钠溶液 4.0 mL,定容至 10 mL,摇匀,以试剂做空白,于 510 nm 处测吸光值。

山药皮黄酮得率/(mg/g) = 试样中黄酮含量/试样质量。

1.4 实验设计

1.4.1 单因素实验设计

通过预实验,确定乙醇水溶液浓度(%)、固液比(g/mL)、提取时间(min)和过筛目数(目)为因素,进行单因素实验。

1.4.2 优化实验

在单因素实验基础上,综合考虑 4 个因素对提取物中黄酮得率的影响,并以 Box - Behnken 中心综合实验设计优化工艺。

1.4.3 数据分析

单因素实验数据分析采用 Excel 和 IBM SPSS Statistics 软件;优化实验采用 Box - Behnken 中心组合设计,使用 Minitab 16 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 乙醇浓度对黄酮得率的影响

称取 5 份烘干过 120 目筛的山药皮粉末(2 g),分别加入 20%、40%、60%、80%、100% 的乙醇水溶液,置于蒸馏烧瓶中,以 1:50 的固液比,于 100 °C 提取 60 min,按照 1.3.3 中的步骤处理,计算得黄酮得率,考察乙醇水溶液的体积分数对黄酮得率的影响,结果见图 1。

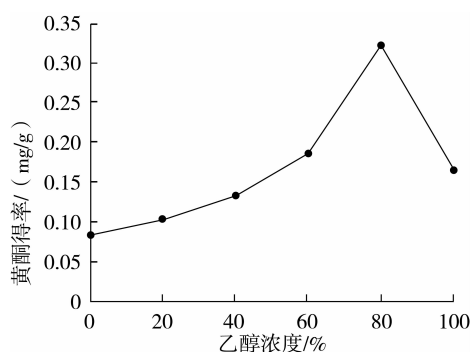


图1 不同乙醇浓度对黄酮得率的影响

结果表明,在一定条件下,随着乙醇浓度的增加,山药皮细胞壁破裂速度加快^[7],花色苷不断溶出,当乙醇浓度达到 80% 时,山药皮提取黄酮化合物得率最高,达到 0.322 mg/g,极显著高于其他组。之后随着乙醇浓度的增大,黄酮得率下降,这可能是由于乙醇浓度过大破坏了黄酮的稳定性,因此,选择最佳乙醇浓度为 80%。

2.1.2 固液比对黄酮得率的影响

分别称取烘干过 120 目筛的山药皮粉末 1、2、4、5、10 g,并分别加入 80% 的乙醇水溶液 100 mL,置于蒸馏烧瓶中,于 100 °C 提取 60 min,按照 1.3.3 中的步骤处理,计算得黄酮得率,考察固液比对黄酮得率的影响,结果如图 2 所示。

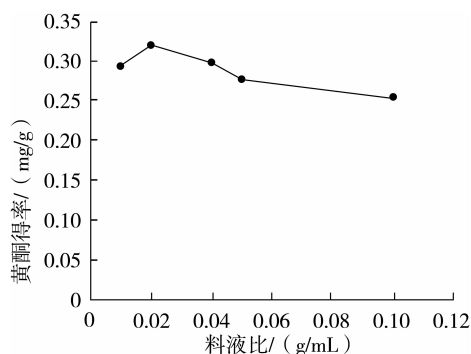


图2 不同固液比对黄酮得率的影响

结果表明,当条件一定时,固液比越大,表示溶剂量越小,料液比低于0.02 g/mL时,黄酮得率随固液比的增加而增加^[8],料液比为0.02 g/mL时得率达到最高,超过0.02 g/mL后略有降低,可能是因为溶剂含量过少,山药皮黄酮提取不够充分,从而使含量下降,因此选择最佳料液比为0.02 g/mL。

2.1.3 提取时间对黄酮得率的影响

分别称取5份过120目筛的山药皮粉末(2 g),置于蒸馏烧瓶中,采用80%的乙醇,以1:50的固液比,设定提取时间分别为30、60、90、120、150 min,回流提取温度为100℃,按照1.3.3的步骤处理,测定黄酮含量,考察提取时间对黄酮得率的影响,结果见图3。

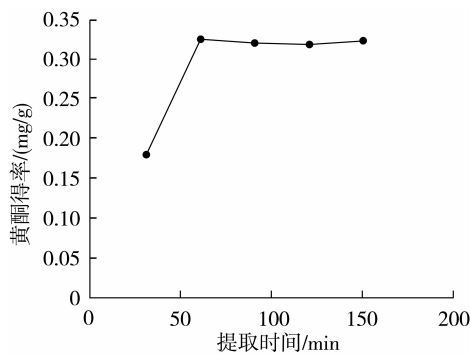


图3 不同提取时间对黄酮得率的影响

结果表明,在一定条件下,随着提取时间的增加,山药皮黄酮得率不断上升,当提取时间为60 min时黄酮得率达到最大,继续增加提取时间可能会使黄酮分解,因此选择最佳提取时间为60 min。

2.1.4 山药皮过筛目数对黄酮得率的影响

分别称取过40、60、80、100、120目筛的山药皮粉末2 g,置于蒸馏烧瓶中,采用80%的乙醇,以50:1的液固比,提取时间为60 min,回流提取温度为100℃,按照1.3.3的步骤处理,测定黄酮含量,考察过筛目数对黄酮得率的影响,结果见图4。

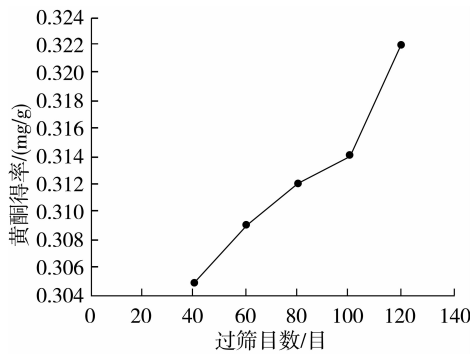


图4 不同过筛目数对黄酮得率的影响

结果表明,在一定条件下,随着过筛目数的增大,山药皮黄酮得率不断提高,当过筛目数达到120

目时黄酮得率最高。因此,选择最佳过筛目数为120目。

2.2 响应面实验结果

2.2.1 铁棍山药皮中黄酮化合物的提取工艺回归模型的建立及方差分析

依据Box-Behnken中心组合实验设计方案进行实验,因素水平见表1,结果如表2所示。利用Minitab 16对表2实验数据进行回归分析^[9],得到4个因素与影响值的四次二元方程。

表1 实验因素水平

水平	A 乙醇浓度/%	B 固液比/(g/mL)	C 提取时间/min	D 过筛目数/目
-1	60	0.01	60	80
0	80	0.02	90	100
1	100	0.04	120	120

表2 响应面设计方案及结果

实验号	A	B	C	D	黄酮含量/(mg/g)
1	0	-1	1	0	0.286
2	1	0	0	1	0.164
3	-1	0	0	-1	0.169
4	0	1	1	0	0.290
5	0	1	-1	0	0.150
6	-1	0	0	1	0.187
7	0	-1	-1	0	0.146
8	1	0	0	-1	0.148
9	0	0	0	0	0.314
10	0	0	0	0	0.314
11	-1	0	1	0	0.176
12	0	0	0	0	0.315
13	0	1	0	-1	0.283
14	1	0	1	0	0.154
15	0	0	0	0	0.314
16	0	-1	0	1	0.296
17	0	1	0	1	0.300
18	1	0	-1	0	0.013
19	-1	0	-1	0	0.035
20	0	-1	0	-1	0.279
21	0	0	-1	-1	0.162
22	1	1	0	0	0.134
23	0	0	0	0	0.314
24	0	0	-1	1	0.179
25	0	0	1	-1	0.303
26	-1	1	0	0	0.178
27	0	0	1	1	0.320
28	1	-1	0	0	0.101
29	-1	-1	0	0	0.152

根据软件结果,山药皮热回流提取黄酮的回归方程如下:

$$Y=0.314\ 337+0.006\ 263\ 44B+0.070\ 333\ 3C+$$

$$0.008\ 513\ 44D - 0.015\ 250\ 0A - 0.147\ 662\ A^2 - 0.024\ 682\ 0B^2 - 0.072\ 286\ 8C^2 - 0.000\ 307D^2 + 0.001\ 75AB - 0.005AD - 0.000\ 04BD。$$

其中 *Y* 为山药皮热回流提取黄酮含量的预测值, *A*、*B*、*C*、*D* 分别为四个自变量的值, 对方程进行方差分析, 结果如表 3 所示。

表 3 回归方程的方差分析				
来源	自由度	平方和	F	P
区间	2	0.000 937	0.03	0.974
回归	14	0.225 637	221.70	0.000
线性	4	0.063 305	218.18	0.000
<i>A</i>	1	0.002 791	38.39	0.000
<i>B</i>	1	0.000 383	6.35	0.027
<i>C</i>	1	0.059 361	816.57	0.000
<i>D</i>	1	0.000 771	11.73	0.005
平方	4	0.162 319	558.19	0.000
<i>A</i> ²	1	0.126 311	1 925.87	0.000
<i>B</i> ²	1	0.001 054	51.41	0.000
<i>C</i> ²	1	0.034 952	461.54	0.000
<i>D</i> ²	1	0.000 001	0.01	0.930
交互作用	6	0.000 013	0.03	1.000
<i>A</i> × <i>B</i>	1	0.000 012	0.17	0.689
<i>A</i> × <i>C</i>	1	0.000 000	0.00	1.000
<i>A</i> × <i>D</i>	1	0.000 001	0.01	0.909
<i>B</i> × <i>C</i>	1	0.000 000	0.00	1.000
<i>B</i> × <i>D</i>	1	0.000 000	0.00	0.993
<i>C</i> × <i>D</i>	1	0.000 000	0.00	1.000
残差误差	12	0.000 872		
失拟	10	0.000 872	261.51	0.004
纯误差	2	0.000 001		
合计	28	0.227 447		

2.2.2 响应面分析

根据回归方程作出两因子交互作用的响应曲面和等高线, 以乙醇浓度和固液比、提取时间和过筛目数的交互作用(图 5 ~ 图 7) 为例进行分析, 并作主效应图 8。

根据回归方程, 各因素间交互作用的三维曲面见图 5 ~ 图 7。三维曲面反应每两个影响因素之间的交互作用, 等高线形状越趋向于椭圆交互作用越显著^[10]。由图可以看出, 四个因素的交互作用均不显著。如果一个响应曲面坡度相对平缓, 表明处理条件的变化对黄酮得率的影响较小^[11]; 相反如果一个响应曲面坡度非常地陡峭, 表明响应值对于处理条件的改变非常敏感。分析可知: 图 5 表明在一定的乙醇浓度和料液比条件下, 乙醇浓度对黄酮得率的影响明显大于料液比; 图 6 表明在一定的乙醇浓

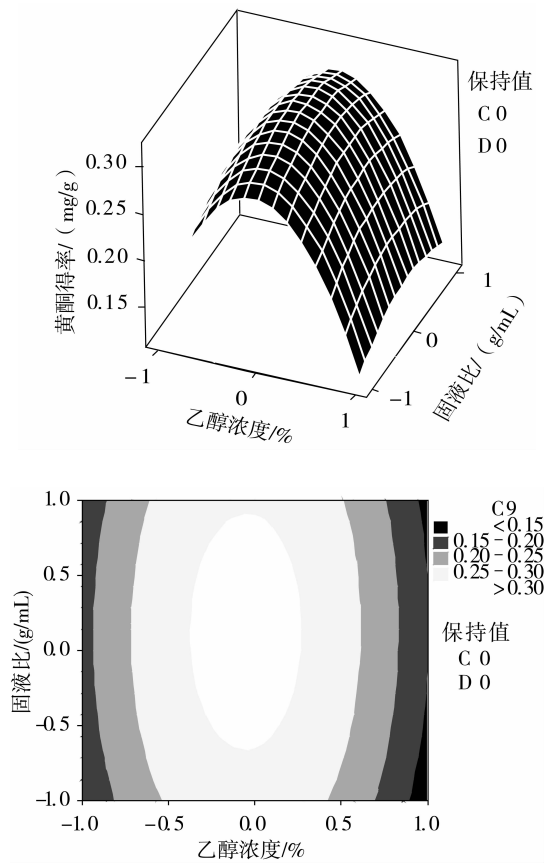


图 5 乙醇浓度和料液比之间的交互作用

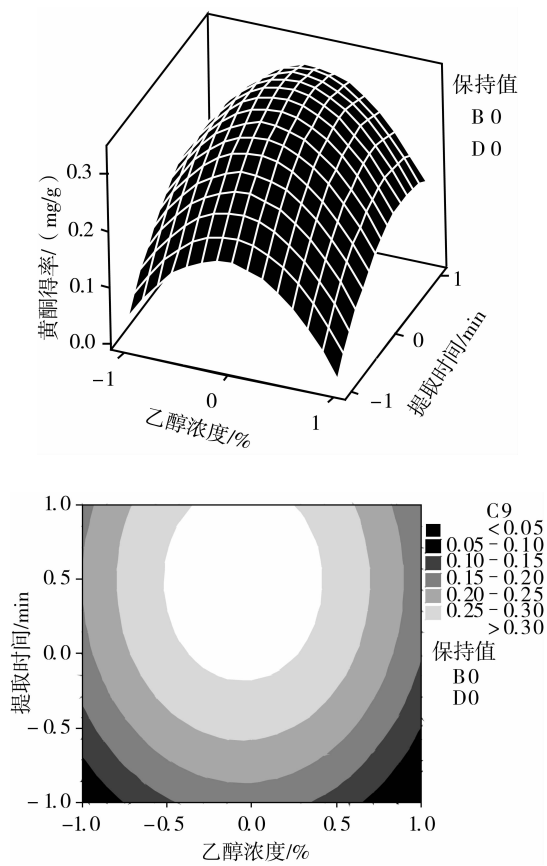


图 6 乙醇浓度与提取时间之间的交互作用

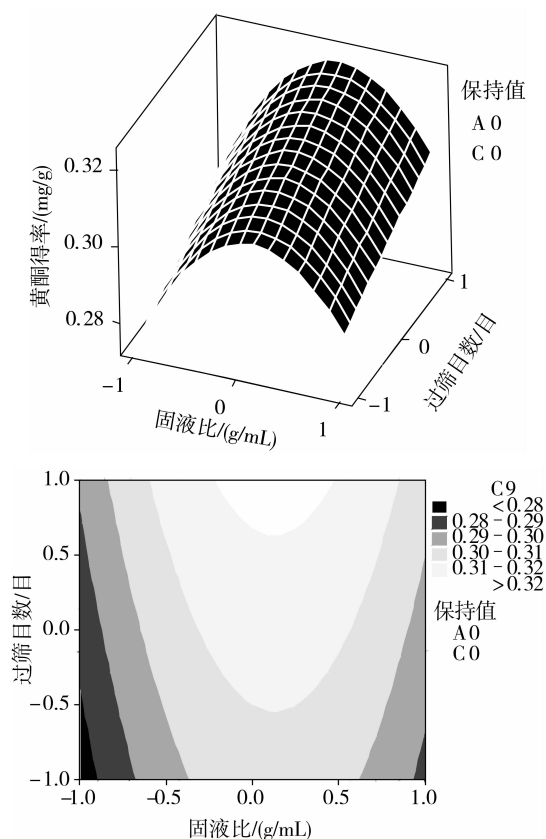


图7 料液比和过筛目数之间的交互作用

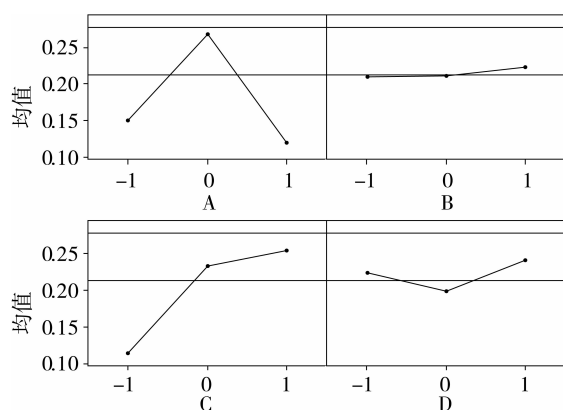


图8 黄酮得率的主效应图

度与提取时间条件下,乙醇浓度对黄酮得率的影响略大于提取时间;图7表明在一定的过筛目数和料液比条件下,料液比对黄酮得率的影响略大于过筛目数,结合图8黄酮得率的主效应图,可得这四个因素对黄酮得率影响的大小排列是乙醇浓度>提取时间>过筛目数>料液比。

2.2.3 最佳热回流提取工艺条件的确定

为进一步确定最佳提取条件,利用 Minitab 16 软件对提取的工艺条件进行优化,较优提取工艺参数为:乙醇体积分数 78.99%,料液比为 0.022 6 g/mL,提取时间为 75 min,过筛目数为 120 目,此条件下,铁棍山药皮提取黄酮得率为 0.340 4 mg/g。为

方便实际操作,将提取工艺参数调整为:乙醇体积分数 79%,料液比为 0.023 g/mL,提取时间为 75 min,过筛目数为 120 目,在此条件下进行三次平行实验,实际测得山药皮黄酮的平均提取得率为 0.338 2 mg/g,接近软件分析得到的预测值,说明实验模型可行度高,与实际情况拟合度好。

3 结论

通过单因素实验和 Box - Behnken 实验设计建立了热回流提取山药皮黄酮化合物的优化回归数学模型,该模型在本实验条件范围内能较为准确地预测山药黄酮的提取得率。通过方差分析及主效应图分析可知,各因素对山药皮黄酮化合物提取率的影响为:乙醇浓度>提取时间>过筛目数>固液比,乙醇浓度变化对山药皮黄酮得率影响最大。

Minitab 16 软件确定的最优工艺条件为:乙醇体积分数 78.99%,料液比为 0.022 6 g/mL,提取时间为 75 min,过筛目数为 120 目,铁棍山药皮提取总黄酮得率最大值为 0.340 4 mg/g。调整工艺参数为乙醇体积分数 79%,料液比为 0.023 g/mL,提取时间为 75 min,过筛目数为 120 目,进行验证实验,测得的平均得率为 0.338 2 mg/g,实验数据稳定,表明采用响应面法优化得到的回流浸提工艺参数较为准确、可靠,具有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 卜婷婷. 菏泽陈集铁棍山药系列产品的开发及应用[D]. 济南: 山东师范大学, 2014.
- [2] 陈佳希. 铁棍山药有效成分提取分离及其活性研究[D]. 西安: 西北大学, 2011.
- [3] 张卫明, 单承莺, 何海玲, 姜洪芳, 张玖. 栽培昆明山药与铁棍山药品质比较[J]. 中药材, 2007, 05: 513 - 515.
- [4] 郭刚军, 何美莹, 邹建云, 等. 苦荞黄酮的提取分离及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2008, 12: 373 - 376.
- [5] 张成, 朱科谕, 张庞文, 等. 苍耳子、田基黄中黄酮类物质提取含量测定及对比研究[J]. 中国农学通报, 2014, 6: 306 - 313.
- [6] 时宏博. 黄粟叶黄酮类化合物的分离纯化及活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [7] 赵强, 余四九, 王廷璞, 等. 响应面法优化秃疮花中生物碱提取工艺及抑菌活性研究[J]. 草业学报, 2012, 4: 206 - 214.
- [8] 李典庆, 周创兵, 陈益峰, 等. 边坡可靠度分析的随机响应面法及程序实现[J]. 岩石力学与工程学报, 2010, 8: 1513 - 1523.
- [9] 胡冉, 李典庆, 周创兵, 等. 基于随机响应面法的结构可靠度分析[J]. 工程力学, 2010, 9: 192 - 200.
- [10] 林建原, 季丽红. 响应面法优化银杏叶中黄酮的提取工艺[J]. 中国食品学报, 2013, 2: 83 - 90.
- [11] 侯学敏, 李林霞, 张直峰, 等. 响应面法优化薄荷叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 6: 124 - 128. ㉞