

综合利用

响应面优化牡丹籽壳总黄酮超声波提取工艺 及抗氧化活性研究

李婉仪¹, 吉文丽¹, 李蕊¹, 李秀信², 张延龙¹

(1. 西北农林科技大学 风景园林艺术学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:采用超声波法提取牡丹籽壳中总黄酮。通过单因素试验分别考察乙醇体积分数、料液比、超声功率、超声时间、提取温度对总黄酮得率的影响,在此基础上采用响应面法优化超声波提取工艺条件。以抗氧化剂 V_C 为对照,采用 DPPH 法测定牡丹籽壳总黄酮的体外抗氧化活性。结果表明:超声波提取牡丹籽壳总黄酮最佳工艺条件为乙醇体积分数 60%、料液比 1:50、超声功率 250 W、超声时间 50 min、提取温度 40℃,在此条件下牡丹籽壳总黄酮得率为 13.66%;牡丹籽壳总黄酮对 DPPH 自由基的清除能力优于 V_C ,且其抗氧化活性与质量浓度呈一定的量效关系。

关键词:牡丹籽壳;总黄酮;超声波提取;响应面;抗氧化活性

中图分类号:TS229;R284.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)04-0114-05

Optimization of ultrasound extraction of total flavonoids from peony seed shell by response surface methodology and its antioxidant activity

LI Wanyi¹, JI Wenli¹, LI Rui¹, LI Xiuxin², ZHANG Yanlong¹

(1. College of Landscape Architecture and Arts, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 2. College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: Flavonoids were extracted from peony seed shell by ultrasound extraction method, and the effects of volume fraction of ethanol, solid-liquid ratio, ultrasonic power, extraction time and extraction temperature on the yield of total flavonoids were studied by single factor experiment. Based on this, the extraction conditions were optimized by response surface methodology. Using V_C as control, the antioxidant activity of total flavonoids from peony seed shell was assessed by DPPH method. The results demonstrated that the optimal extraction conditions were obtained as follows: volume fraction of ethanol 60%, solid-liquid ratio 1:50, ultrasonic power 250 W, extraction time 50 min and extraction temperature 40℃. Under these conditions, the yield of flavonoids was 13.66%. The scavenging ability of flavonoids extracted from peony seed shell on DPPH free radical was stronger than that of V_C , and the antioxidant ability and mass concentration were in a concentration-dependent manner.

Key words: peony seed shell; total flavonoids; ultrasound extraction; response surface methodology; antioxidant activity

收稿日期:2017-11-28;修回日期:2017-12-07

基金项目:国家林业局公益性行业重大科研专项(201404701);杨凌示范区科技计划项目(2017NY-16)

作者简介:李婉仪(1993),女,硕士研究生,研究方向为油用牡丹综合开发与利用(E-mail)liwanyi@nwsuaf.edu.cn。

通信作者:吉文丽,副教授,博士生导师(E-mail)jiwenli@nwsuaf.edu.cn。

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)为毛茛科芍药属落叶灌木,是原产中国的名贵木本花卉^[1]。油用牡丹是牡丹组中结籽量大、出油率高、适应性强而且产量稳定的品种的统称,是我国特有的木本油料植物,分布范围广、出油率高、油质优、综合利用产业链长、附加值高,具有重要的经济效益、生态效益及社会效益^[2]。“凤丹”牡丹(*Paeonia ostia*, Fengdan)是

牡丹野生种杨山牡丹(*Paeonia ostia*)的栽培种,主要用于丹皮和牡丹籽油的生产,是一种药食兼备的观赏性植物,广泛种植于山东、河南、陕西、安徽、重庆等地^[3]。2011年国家卫生部批准牡丹籽油为新资源食品。牡丹籽壳作为牡丹籽油生产中的副产物,约占牡丹籽质量的1/3^[4],尽管其总量丰富,由于加工利用技术和相关研究的缺乏,大量牡丹籽壳被作为废弃物丢弃,造成了资源浪费和环境污染。因此,研究牡丹籽壳中的功能性成分对提高牡丹籽油副产物的综合利用率及其经济效益有重要意义。

目前,国内外对牡丹籽的研究主要集中于油脂成分提取和活性成分分析,但基于响应面法的优化方法,研究牡丹籽壳总黄酮的提取工艺及其抗氧化活性报道较少。研究表明,牡丹籽壳中含有脂肪酸、多糖、多酚、黄酮类化合物等多种生物活性成分^[5-8]。黄酮类化合物具有较好的抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒、降血脂等作用,其保健和药用价值成为研究热点^[9-11]。为充分开发和利用牡丹籽中的生物活性成分,本研究以“凤丹”牡丹籽壳为原料,采用响应面法优化牡丹籽壳中黄酮类化合物的超声波提取工艺,并对其抗氧化活性进行了初步研究,为更好地开发利用牡丹资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

牡丹籽壳,采收自西北农林科技大学校园的四年生实生苗的“凤丹”牡丹种子。

芦丁标准品,北京化学试剂有限公司;DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼),Solarbio公司;乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠、石油醚等均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

FW-400A型倾斜式高速万能粉碎机:北京中兴伟业仪器有限公司;AUY220型电子分析天平:日本岛津;DHG-9140A型电热恒温鼓风干燥箱:上海精宏实验设备有限公司;UV1900型双光束紫外可见分光光度计:上海佑科仪器仪表有限公司;KQ-500DE型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;SHB-Ⅲ型循环水式真空泵:郑州长城科工贸有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 牡丹籽壳总黄酮的提取

牡丹籽壳预处理:将牡丹籽壳晒干后,于60℃下烘干5h,粉碎过60目筛,经石油醚脱脂后备用。

总黄酮的提取:准确称取0.5g经预处理的牡

丹籽壳粉末,按照设计的试验条件,将提取溶剂与牡丹籽壳粉末混匀,在超声波清洗器中进行提取,然后在3900 r/min离心10 min,弃渣,上清液定容到一定体积,测定总黄酮含量。

1.2.2 牡丹籽壳总黄酮含量的测定

以芦丁为标样,采用亚硝酸钠-硝酸铝显色法^[12]测定牡丹籽壳中的总黄酮含量,得到标准曲线回归方程为: $A = 5.822C + 0.0484$ (C 为芦丁质量浓度,mg/mL; A 为吸光度),相关系数 $R^2 = 0.9998$ 。准确吸取牡丹籽壳总黄酮提取液1.0 mL,用70%乙醇稀释至5.00 mL,分别加入5%亚硝酸钠溶液0.3 mL,摇匀,静置6 min。再加5%硝酸铝溶液0.3 mL,摇匀,静置6 min,再加4%氢氧化钠溶液4 mL,并用70%乙醇水溶液定容至100 mL,摇匀,静置12 min。在510 nm波长处测定吸光度,按回归方程计算提取液中总黄酮质量浓度。总黄酮得率计算公式为:

$$\text{总黄酮得率} = \frac{c \times v_2 \times v_1}{v_3 \times m} \times 100\%$$

式中: c 为提取液总黄酮质量浓度,mg/mL; v_2 为测定时反应体系的体积,mL; v_1 为提取液的体积,mL; v_3 为测定时吸取的体积,mL; m 为称取的样品的质量,mg。

1.2.3 DPPH法测定牡丹籽壳总黄酮抗氧化活性

参照文献[13-14]方法稍作修改DPPH法测定牡丹籽壳总黄酮的抗氧化活性。取3.0 mL不同质量浓度梯度的牡丹籽壳总黄酮样品溶液或3.0 mL V_c 阳性对照溶液,加入1 mL的0.2 mmol/L的DPPH乙醇溶液混匀,室温下避光放置30 min,用无水乙醇调零,于517 nm测定吸光度 A_i 。以3.0 mL无水乙醇代替样品为空白组,其余处理同上,于517 nm测定吸光度为 A_0 ,对照组为3.0 mL不同质量浓度梯度的样品溶液与1 mL的无水乙醇混匀后测定吸光度 A_c ,按下式计算DPPH自由基清除率。

$$\text{DPPH自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_i - A_c}{A_0}\right) \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对牡丹籽壳总黄酮得率的影响

在料液比1:30、超声功率200 W、超声时间30 min、提取温度40℃的条件下,考察乙醇体积分数对牡丹籽壳总黄酮得率的影响,结果见图1。

从图1可以看出,随着乙醇体积分数的增大,总黄酮得率先呈上升趋势,当乙醇体积分数达到60%

时达到最高值,但随后呈逐渐下降趋势,在一定乙醇体积分数范围内,牡丹籽壳总黄酮得率变化不显著。当乙醇体积分数较高时,牡丹籽壳中的醇溶性和脂溶性物质的溶出量增大,影响牡丹籽壳中黄酮类物质的溶出,从而导致总黄酮得率的降低^[15]。故选择乙醇体积分数为60%。

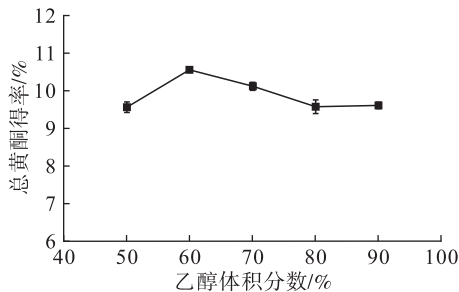


图1 乙醇体积分数对牡丹籽壳总黄酮得率的影响

2.1.2 料液比对牡丹籽壳总黄酮得率的影响

在乙醇体积分数60%、超声功率200 W、超声时间30 min、提取温度40℃的条件下,考察料液比对牡丹籽壳总黄酮得率的影响,结果见图2。

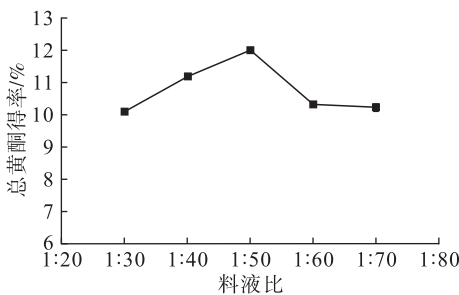


图2 料液比对牡丹籽壳总黄酮得率的影响

从图2可以看出,随着料液比的增大,总黄酮得率不断增加,当料液比为1:50时总黄酮得率达到最大值,这可能由于提取剂用量的加大,使黄酮更容易从原料中向溶剂中扩散,从而增大总黄酮得率^[16]。当料液比超过1:50时,总黄酮得率降低。综合得率和能耗等因素,选取料液比为1:50。

2.1.3 超声功率对牡丹籽壳总黄酮得率的影响

在乙醇体积分数60%、料液比1:50、超声时间30 min、提取温度40℃的条件下,考察超声功率对牡丹籽壳总黄酮得率的影响,结果见图3。

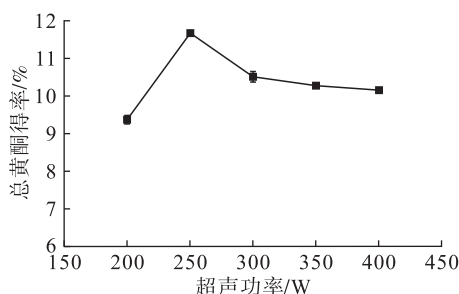


图3 超声功率对牡丹籽壳总黄酮得率的影响

从图3可以看出,总黄酮得率随着超声功率的增大而提高,当超声功率达到250 W时,总黄酮得率达到最大值,当超声功率继续增大时,总黄酮得率逐渐下降。原因可能是由于超声波功率越大,其产生的空化效应和机械作用越强烈,使得分子间运动的速率更快,加速粒子间的碰撞及扩散程度,使细胞壁破碎,导致黄酮渗透速率加快,但超声功率达到一定值时,分子运动过于强烈,加强了黄酮分子与其他成分之间的反应而使黄酮遭到破坏^[17],导致总黄酮得率下降。故选择超声功率为250 W。

2.1.4 超声时间对牡丹籽壳总黄酮得率的影响

在乙醇体积分数60%、料液比1:50、超声功率250 W、提取温度40℃的条件下,考察超声时间对牡丹籽壳总黄酮得率的影响,结果见图4。

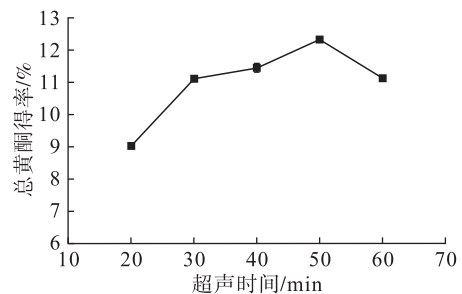


图4 超声时间对牡丹籽壳总黄酮得率的影响

从图4可以看出,在提取过程中,随着超声时间延长,总黄酮得率增大,在超声时间为50 min时达到最大值;超过50 min后总黄酮得率开始降低。这可能是由于在一定范围内,延长超声时间可以增加黄酮类化合物的溶出量,但继续延长超声时间,黄酮类物质已基本溶出,且过长时间的加热提取会造成黄酮类化合物的破坏,最终使得总黄酮得率降低^[18]。综合得率和能耗等因素,选择超声时间为50 min。

2.1.5 提取温度对牡丹籽壳总黄酮得率的影响

在乙醇体积分数60%、料液比1:50、超声功率250 W、超声时间50 min的条件下,考察提取温度对牡丹籽壳总黄酮得率的影响,结果见图5。

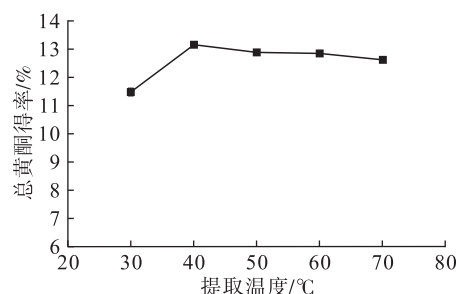


图5 提取温度对牡丹籽壳总黄酮得率的影响

从图5可以看出,在提取温度达到40℃之前,

随着提取温度的升高总黄酮得率逐渐升高;当提取温度超过 40℃ 以后,总黄酮得率随提取温度的升高略有下降,但变化不大。综合得率和能耗等因素,选择提取温度为 40℃。

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面设计及结果

在单因素试验的基础上,固定乙醇体积分数 60%、提取温度 40℃,选取料液比(A)、超声功率(B)、超声时间(C)3个因素,以总黄酮得率为响应值,采用 Design Expert 8.0.6 设计三因素三水平的 Box-Behnken 模型,通过试验确定最优提取工艺。响应面试验因素及水平见表 1,响应面试验设计及结果见表 2。

表 1 响应面试验因素及水平

水平	A 料液比	B 超声功率/W	C 超声时间/min
-1	40:1	200	40
0	50:1	250	50
1	60:1	300	60

表 2 响应面试验设计及结果

试验号	A	B	C	总黄酮得率/%
1	0	0	0	13.41
2	0	-1	1	11.12
3	1	1	0	10.83
4	-1	0	1	11.41
5	1	0	1	10.69
6	1	0	-1	12.25
7	-1	-1	0	11.38
8	0	1	1	10.57
9	0	0	0	13.56
10	1	-1	0	11.59
11	0	-1	-1	11.72
12	0	0	0	13.63
13	0	1	-1	10.05
14	0	0	0	13.66
15	0	0	0	13.54
16	-1	0	-1	10.21
17	-1	1	0	9.92

根据表 2 响应面试验设计及结果,采用软件 Design Expert 8.0.6 对所得数据进行回归分析。得到牡丹籽壳总黄酮得率(Y)对料液比(A)、超声功率(B)和超声时间(C)的二次多项回归方程: $Y = 13.56 + 0.31A - 0.55B - 0.055C + 0.17AB - 0.69AC + 0.28BC - 1.18A^2 - 1.45B^2 - 1.24C^2$ 。对上述回归模型进行方差分析,结果见表 3。

从表 3 可以看出,此模型的 $P < 0.01$,响应面回归模型达到极显著水平。同时方程失拟项不显著

($P = 0.6899 > 0.05$), $R^2 = 0.9982$,说明响应面试验结果和数学模型拟合度较好。变异系数(CV)为 0.74%,说明试验有良好的稳定性,此回归模型能够对牡丹籽壳总黄酮提取效果进行较好地分析及预测。由 3 个影响因素的 F 值大小可以得出,各因素对牡丹籽壳总黄酮得率的影响顺序为超声功率 > 料液比 > 超声时间,超声功率对牡丹籽壳总黄酮得率有较大影响。模型一次项 C 差异不显著($P > 0.05$),一次项 A 和 B,交互项 AB、AC、BC 以及二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对牡丹籽壳总黄酮得率均有极显著的影响($P < 0.01$)。

表 3 回归模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	29.26	9	3.25	432.69	<0.0001
A	0.74	1	0.74	99.04	0.0001
B	2.46	1	2.46	327.94	0.0001
C	0.024	1	0.024	3.22	0.1158
AB	0.12	1	0.12	16.30	0.0049
AC	1.90	1	1.90	253.44	0.0001
BC	0.31	1	0.31	41.73	0.0003
A^2	5.84	1	5.84	776.91	0.0053
B^2	8.58	1	8.58	1182.17	0.0001
C^2	6.50	1	6.50	865.05	0.0015
残差	0.053	7	7.57×10^{-3}		
失拟项	0.015	3	5.00×10^{-3}	0.52	0.6899
纯误差	0.038	4	9.50×10^{-3}		
总变异	29.31	16			

注: $P < 0.01$,差异极显著; $P < 0.05$,差异显著。

2.2.2 最佳工艺条件的确定及验证试验

通过 Design Expert 8.0.6 软件分析得到牡丹籽壳总黄酮的最佳提取条件为乙醇体积分数 60%、提取温度 40℃、料液比 1:51.40、超声功率 240.47 W、超声时间 49.17 min,在此条件下总黄酮得率最大理论预测值为 13.64%。考虑到试验的可操作性,将工艺条件优化为乙醇体积分数 60%、提取温度 40℃、料液比 1:50、超声功率 250 W、超声时间 50 min,在此条件下进行 3 次平行试验,牡丹籽壳总黄酮平均得率为 13.66%。该结果与预测值 13.64% 的相对误差为 0.15%,说明采用响应面优化的提取工艺条件准确可靠,对实际操作有一定的参考价值。

2.3 DPPH 自由基清除能力(见图 6)

从图 6 可以看出,当牡丹籽壳总黄酮质量浓度小于 0.8 mg/mL 时,随着总黄酮质量浓度的增加 DPPH 自由基清除率逐步升高,当牡丹籽壳总黄酮质量浓度为 0.8 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率达到 75.88%,当牡丹籽壳总黄酮质量浓度大于

0.8 mg/mL 时,随总黄酮质量浓度的增加,DPPH 自由基清除率趋于平缓。与相同质量浓度下的 V_c 对照品相比,牡丹籽壳总黄酮对 DPPH 自由基的清除效果更好。

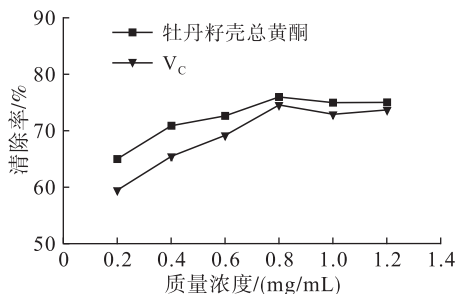


图6 牡丹籽壳总黄酮对 DPPH 自由基的清除作用

3 结论

在单因素试验的基础上,采用响应面法优化牡丹籽壳总黄酮的超声波提取工艺,得出最佳工艺条件为:乙醇体积分数 60%,料液比 1:50,超声功率 250 W,超声时间 50 min,提取温度 40℃。在最佳工艺条件下,牡丹籽壳总黄酮得率为 13.66%,与理论值(13.64%)的相对误差为 0.15%。

体外抗氧化活性表明,在一定质量浓度范围内,牡丹籽壳总黄酮对 DPPH 自由基具有较强的清除能力,在相同质量浓度下,牡丹籽壳总黄酮对 DPPH 自由基的清除率高于 V_c ,说明牡丹籽壳总黄酮具有较好的抗氧化能力。研究结果为牡丹籽壳的综合开发利用提供了理论依据,也为探索牡丹籽壳中的天然抗氧化剂奠定一定的基础。

参考文献:

[1] 王高潮,刘仲健. 中国牡丹培育与鉴赏及文化渊源 [M]. 北京:中国林业出版社,2000:1-4.
 [2] 陈慧玲,杨彦伶,张新叶,等. 油用牡丹研究进展[J]. 湖北林业科技,2013,42(5):41-44.
 [3] 李嘉钰. 中国牡丹品种图志:西北、西南、江南卷[M]. 北京:中国林业出版社,2006:157-163.
 [4] 陈刚,马晓,张帅. “凤丹”牡丹种皮多糖提取工艺的研究[J]. 食品工业科技,2017,38(1):261-264.
 [5] 周海梅,马锦琦,苗春雨,等. 牡丹籽油的理化指标和

脂肪酸成分分析[J]. 中国油脂,2009,34(7):72-74.
 [6] SU J, WANG H, MA C, et al. Correction: anti-diabetic activity of peony seed oil, a new resource food in STZ-induced diabetic mice [J]. Food Funct, 2015, 6(9): 2930-2938.
 [7] 张红玉,王成章,原姣姣,等. 牡丹籽壳提取物及不同极性部位的抗氧化活性研究[J]. 中国油脂,2016,41(7):64-67.
 [8] SU J, MA C, LIU C, et al. Hypolipidemic activity of peony seed oil rich in α -linolenic, is mediated through inhibition of lipogenesis and upregulation of fatty acid β -oxidation[J]. J Food Sci, 2016, 81(4):H1001-H1009.
 [9] 高丽,王燕龙,熊云景,等. HPD-100 大孔树脂分离纯化荷叶黄酮的研究[J]. 中国酿造,2012,31(8):127-130.
 [10] 蔡为荣,顾小红,汤坚. 仙人掌皮黄酮提取工艺优化[J]. 农业工程学报,2008,24(6):299-303.
 [11] 白喜婷,朱文学,罗磊,等. 牡丹籽提取物的抑菌特性研究[J]. 中国酿造,2009,28(3):59-62.
 [12] 李秀信,张院民. 香椿叶总黄酮含量测定方法研究[J]. 中国食品学报,2010,10(5):243-248.
 [13] 李小勇,霍喜东,杨自勇,等. 不同方法提取国槐叶黄酮及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2014,35(17):102-106.
 [14] 丰永红,于淑娟,李国基,等. DPPH 法测甘蔗提取物抗氧化活性研究[J]. 甘蔗糖业,2003(1):31-33,50.
 [15] 鲍涛,王冶,孙崇德,等. 黑苦荞米黄酮提取工艺优化及其降血糖活性研究[J]. 农业工程学报,2016,32(增刊2):383-389.
 [16] 朱文学,焦昆鹏,罗磊,等. 绿豆皮黄酮的超声波辅助水提工艺优化及抗氧化活性[J]. 食品科学,2015,36(6):12-17.
 [17] 乔孟,屈晓清,丁之恩. 响应面法优化超声波辅助提取湖北海棠叶中总黄酮工艺[J]. 食品科学,2013,34(2):143-147.
 [18] 邓梦琴,林晓瑛,张明,等. 超声辅助提取菠萝蜜果皮黄酮工艺优化及体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2016,37(24):288-293.