

# 响应面法优化野金柴总黄酮超声辅助提取工艺及其不同组分抗氧化能力研究

李洪安,李夏嘉龙,邓泽元,江和栋,李红艳\*

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室,江西南昌 330047)

**摘要:**采用超声辅助提取野金柴中的黄酮类化合物,研究液料比、乙醇浓度、超声功率、超声时间对提取得率的影响,并采用响应曲面法优化提取工艺条件。采用 ADS-7 大孔树脂对野金柴中的根皮苷进行分离,分析总黄酮、根皮苷、黄酮 R(除去根皮苷后的剩余黄酮组分)的抗氧化活性。结果表明,各工艺条件对野金柴总黄酮得率的影响为:超声时间 > 乙醇浓度 > 超声功率 > 液料比,优化所得最佳的提取工艺条件为:液料比 40:1,乙醇浓度 80%,超声功率 540 W,超声时间 60 min,在此条件下野金柴总黄酮得率为 8.82% ± 0.09%。总黄酮、根皮苷、黄酮 R 清除 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.0205、0.0222、0.0261 mg/mL;清除 ABTS 自由基的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.0220、0.0233、0.0266 mg/mL,总黄酮抗氧化能力最强,根皮苷其次,再次为黄酮 R,三者都有较好的 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力。

**关键词:**响应面法,超声提取,野金柴,黄酮,抗氧化

## Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Total Flavonoids in *Lithocarpus polystachyus* Rehd by Response Surface Methodology and Their Antioxidant Activities

LI Hong-an, LI Xia-jia-long, DENG Ze-yuan, JIANG He-dong, LI Hong-yan\*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** The flavonoids of *Lithocarpus polystachyus* Rehd were extracted by ultrasound assisted method. The effects of liquid-material ratio, ethanol concentration, ultrasonic power, and ultrasonic time on the extraction yield were studied, and the response surface methodology was used to optimize the extraction process conditions. ADS-7 macroporous resin was utilized to separate the phlorizin, and the antioxidant activities of total flavonoids, phlorizin, and flavonoid R (the remaining flavones after phlorizin removal) were analyzed. The results indicated that the order of factors affecting the total flavonoid extraction yield was the ultrasonic time > ethanol concentration > ultrasonic power > liquid-material ratio. The optimized parameters were as follows: Liquid-material ratio 40:1, ethanol concentration 80%, ultrasound power of 540 W, and ultrasound time of 60 min. Under these conditions, the total flavonoid yield was 8.82% ± 0.09%. The IC<sub>50</sub> values of DPPH free radical scavenging by total flavonoids, phlorizin, and flavonoids R were 0.0205, 0.0222, and 0.0261 mg/mL, respectively. The IC<sub>50</sub> values of total flavonoids, phlorizin, and flavonoids R scavenging ABTS free radicals were 0.0220, 0.0233, and 0.0266 mg/mL. The antioxidant capacity of total flavonoids was the strongest, followed by phlorizin and then by flavonoid R, all of which showed great DPPH and ABTS free radical scavenging ability.

**Key words:** response surface methodology; ultrasound-assisted extraction; *Lithocarpus polystachyus* Rehd; flavonoids; antioxidant activity

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2020)23-0136-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020020192

**引文格式:** 李洪安,李夏嘉龙,邓泽元,等. 响应面法优化野金柴总黄酮超声辅助提取工艺及其不同组分抗氧化能力研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(23): 136-141, 154.

LI Hong-an, LI Xia-jia-long, DENG Ze-yuan, et al. Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Total Flavonoids in *Lithocarpus polystachyus* Rehd by Response Surface Methodology and Their Antioxidant Activities [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(23): 136-141, 154. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

野金柴, 是壳斗科栎属植物多穗石柯 (*Lithocarpus polystachyus* Rehd) 的干燥叶<sup>[1]</sup>, 又名多

收稿日期: 2020-02-19

作者简介: 李洪安(2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: ncuspylihongan@163.com.

\* 通信作者: 李红艳(1986-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 抗氧化、食品营养、食品化学, E-mail: lihongyan@ncu.edu.cn.

基金项目: 江西省自然科学基金面上项目(20192BAB204023)。

穗柯。广泛分布于长江南部,尤以江西、福建、湖南、广西等省最为广泛<sup>[2]</sup>。野金柴中富含黄酮类化合物<sup>[3]</sup>,其中,根皮苷具有强烈的甜味,甜度可达蔗糖的300倍<sup>[4]</sup>,一般应用于生产茶饮料,根皮苷有较高的抗氧化能力<sup>[5]</sup>,在食品生产中有较高的利用价值。金弘昕等<sup>[6]</sup>对野金柴的化学组分进行了分离鉴定,研究表明,野金柴黄酮类物质除根皮苷外,还有槲皮素3-O-β-D-葡萄糖苷、槲皮苷、3-羟基根皮苷、山柰酚3-O-α-L-鼠李糖苷几种黄酮化合物,未对其活性进行进一步研究;单思聪等<sup>[7]</sup>的研究表明,多穗柯总黄酮具有较好的抗氧化能力,陈阳<sup>[8]</sup>的研究证实多穗柯根皮苷具有一定的抗氧化作用。但目前除根皮苷外,尚未见关于野金柴中其他黄酮类化合物研究利用的报道。

目前,对于野金柴中黄酮类化合物的提取,大多采用加热回流、长时间浸提等方法,但此类方法存在提取时间长、效果不佳、消耗溶剂量大等缺点,提取时的高温还可能破坏野金柴中的功能性成分。相比之下,超声辅助提取具有高效、消耗溶剂量小、绿色环保等优点<sup>[9]</sup>。超声波在液体介质中能产生空化效应,能有效地破坏包埋结构的外层,加速功能成分的溶出,从而提高提取效率。在超声提取过程中,液料比、乙醇浓度、功率、超声时间等因素对得率有较大的影响。

本文以野金柴为原料,采用响应面法优化野金柴总黄酮的超声辅助提取工艺,并用 ADS-7 大孔树脂分离总黄酮中的根皮苷,进而对比总黄酮、根皮苷、黄酮 R (除去根皮苷后的剩余黄酮组分)的抗氧化能力,为野金柴中黄酮类化合物的综合利用提供基础数据,提高野金柴的生产利用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

野金柴 壳斗科栎属植物多穗石柯 (*Lithocarpus polystachyus* Rehd) 的干燥叶,江西叶昔清生物科技有限公司提供;芦丁(生化试剂≥98%)、1,1-二苯-2-苦基肼(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、V<sub>c</sub>和 Trolox 阿拉丁化学试剂有限公司生产;亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、过硫酸钾 分析纯,天津大贸公司;盐酸、无水乙醇 分析纯,西陇科学公司。

DGG-9140A 电热鼓风干燥箱 上海森信实验仪器有限公司;AR323CN 电子天平 奥豪斯仪器有限公司;TDL-5-A 飞鸽牌台式离心机、FW80 高速万能粉碎机 上海安亭科学仪器厂;GA92-IIID 超声波粉碎机 无锡市上佳生物技术有限公司;722G 可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;ELx800 光吸收酶标仪 美国伯腾仪器有限公司;EZ-L100-P200 中压制备系统 利穗科技(苏州)有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 野金柴预处理 将野金柴样品放入恒温干燥箱内 60 ℃ 烘干至恒重,粉碎,过 60 目筛,收集粉末,密封,低温保存。

1.2.2 野金柴总黄酮提取 精确称取适量野金柴粉末,加一定浓度乙醇溶液混合均匀,静置 10 min,按照设定好的条件,进行超声波辅助提取,提取液 4200 r/min 离心 6 min,离心后取上清液待测。

### 1.2.3 野金柴中总黄酮的测定

1.2.3.1 绘制芦丁标准曲线 精密称取 12.5 mg 芦丁标准品于 25 mL 容量瓶中,用 75% 乙醇定容,即得 0.5 mg/mL 的芦丁标准溶液,精确移取标准溶液 0、0.25、0.50、1.00、1.25、1.50、1.75 mL 于 10 mL 容量瓶中,分别加入 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.4 mL,摇匀静置 6 min,加入 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 0.4 mL,摇匀静置 6 min,加 4% NaOH 溶液 4 mL,加无水乙醇定容,摇匀静置 10 min,按照分光光度法,在 510 nm 处测吸光度 A<sup>[10]</sup>,以吸光度 A 为纵坐标,芦丁质量浓度 C 为横坐标绘制标准曲线。得到标准曲线方程为  $A = 13.04435C - 0.00287$ ,  $R^2 = 0.9996$ 。

1.2.3.2 黄酮得率计算 精密吸取野金柴黄酮提取液 0.5 mL 于 10 mL 容量瓶中,按上述方法测定样品中总黄酮含量。按照以下公式计算得率(F):

$$\text{总黄酮得率}(\%) = \frac{C \times N \times V}{M \times 1000} \times 100$$

式中: C 为由回归方程计算出黄酮的浓度, mg/mL; N-稀释倍数; V-提取液体积, mL; M-称取的野金柴粉末质量, g。

1.2.4 野金柴总黄酮提取单因素实验 高温易改变黄酮类物质活性,且不利于调控,因此固定提取温度 30 ℃,同时其余因素不变,考察乙醇浓度、液料比、功率、超声时间等单因素对野金柴总黄酮得率的影响,每组实验重复三次。

1.2.4.1 乙醇浓度对黄酮得率的影响 在液料比 30:1、功率 500 W、超声时间 30 min 的条件下,分别考察乙醇浓度 50%、60%、70%、80%、90% 对野金柴黄酮得率的影响。

1.2.4.2 液料比对黄酮得率的影响 在乙醇浓度 70%、功率 500 W、超声时间 30 min 的条件下,分别考察液料比 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 对野金柴黄酮得率的影响。

1.2.4.3 超声功率对黄酮得率的影响 在乙醇浓度 70%、液料比 30:1、超声时间 30 min 的条件下,分别考察功率 300、400、500、600、700 W 对野金柴黄酮得率的影响。

1.2.4.4 超声时间对黄酮得率的影响 在乙醇浓度 70%、液料比 30:1、功率 500 W 的条件下,分别考察提取时间 20、30、40、50、60 min 对野金柴黄酮得率的影响。

1.2.5 响应面优化试验 根据 Box-Benhnken 的中心组合实验设计原理,基于单因素实验结果,以液料比(A)、乙醇浓度(B)、超声功率(C)、超声时间(D)为响应因素,编码水平为-1、0、1,野金柴黄酮得率(F)为响应值,采用四因素三水平的响应面分析法进行实验设计<sup>[11]</sup>,因素水平设计见表 1。

表 1 响应曲面试验因素水平设计

Table 1 Factors and levels of response surface design

水平	因素			
	A 液料比 (mL/g)	B 乙醇浓度 (%)	C 超声功率 (W)	D 提取时间 (min)
-1	30:1	70	400	40
0	40:1	80	500	50
1	50:1	90	600	60

### 1.2.6 大孔树脂法分离总黄酮中的根皮苷

1.2.6.1 大孔树脂的预处理 按李斌等<sup>[12]</sup>的方法对大孔树脂进行预处理。

1.2.6.2 吸附与洗脱 用野金柴总黄酮提取液对预处理好的大孔树脂进行浸泡,并采用常规湿法装柱,使其自然沉降不留气泡,并静态吸附 10 h。采用 EZ Purifier 中压制备系统进行自动吸附洗脱,同时配备紫外分光光度检测器进行自动检测分离。以 3 BV 的流速进行上样动态吸附 0.5 h,共计上样 500 mL。之后使用 70% 乙醇溶液以 2 BV 的流速进行洗脱 1 h,并设定在紫外吸收 285 nm 处收集根皮苷溶液<sup>[13]</sup>;之后再使用 75%、85%、95% 乙醇溶液以 2 BV 的流速各洗脱 0.5 h,将树脂内剩余吸附物质全部洗出。70% 乙醇洗脱 2 BV 可将大多数根皮苷洗下,之后的递增梯度洗脱可将剩余黄酮物质洗脱<sup>[14]</sup>。洗脱液进入紫外分光光度检测器中,设定根皮苷收集波长为 285 nm<sup>[15]</sup>,收集阈值 300 mAU,自动收集器采用多管收集的方式将洗脱液收集,在 285 nm 下无吸收的其他组分则流入回收装置,完成对根皮苷与黄酮 R 的分离。参考金弘昕等<sup>[6]</sup>的结论,野金柴黄酮类物质除根皮苷外,还含有槲皮素 3-O-β-D-葡萄糖苷、槲皮苷、3-羟基根皮苷、山柰酚 3-O-α-L-鼠李糖苷,故黄酮 R 即为上述黄酮物质的多组分溶液。

1.2.6.3 浓缩与收集 将纯化的根皮苷溶液、总黄酮溶液、黄酮 R 溶液分别经旋蒸浓缩,氮吹后收集。

1.2.7 抗氧化活性研究

1.2.7.1 DPPH 自由基清除率的测定 以维生素 C (10、15、20、25、30、35、40 mg/mL) 作为阳性对照,分别检测 10、15、20、25、30、35、40 mg/mL 浓度的野金柴黄酮提取液、黄酮 R 溶液、纯化根皮苷溶液对 0.2 mmol/L DPPH 溶液的自由基清除率。分别测定  $V_c$  和三种溶液对 DPPH 自由基的清除率,清除率越高表明清除自由基的能力越强,即抗氧化能力越强。精密吸取 100 μL 的野金柴黄酮提取液、黄酮 R 溶液、根皮苷溶液,分别加入 100 μL 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液,37 °C 避光静置 30 min,在 517 nm 下用酶标仪测定其吸光值  $A_{\text{样品}}$ ,以乙醇为空白,在 517 nm 下用酶标仪测定吸光值  $A_{\text{空白}}$ <sup>[16]</sup>。按下式计算自由基清除率,且以清除率为纵坐标,溶液浓度为横坐标绘图,维生素 C 作为阳性对照,实验重复三次,取平均值和 SD 值:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100$$

1.2.7.2 清除 ABTS 自由基活性的测定 分别检测 10、15、20、25、30、35、40 mg/mL 浓度的野金柴黄酮提取液、黄酮 R 溶液、纯化根皮苷溶液对 ABTS 溶液的自由基清除率。用去离子水配制 7 mmol/L 的 ABTS 溶液及 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液。取过硫酸钾溶液 5.00 mL,加入到 15.00 mL ABTS 溶液中,在室温下置于黑暗处反应 16 h,形成 ABTS 自由基储备液。用体积分数 80% 乙醇对 ABTS 自由基储备液进行稀释,使其在 734 nm 下的吸光度为  $0.70 \pm 0.05$ ,即为 ABTS 稀释液,备用。取 200 μL ABTS 稀释液与 20 μL 样品振荡混匀 6 min,在 734 nm 下测定其吸光度  $A_{\text{样品}}$ 。取 200 μL ABTS 稀释液与 20 μL 溶剂振荡混匀 6 min,在 734 nm 下测定其吸光度  $A_{\text{空白}}$  作为空白

对照<sup>[17]</sup>。按公式计算自由基清除率,以清除率为纵坐标,溶液浓度为横坐标绘图,为能多角度地反映总黄酮、黄酮 R、根皮苷的抗氧化能力,采用 Trolox 作为阳性对照,实验重复三次,取平均值和 SD 值:

$$\text{ABTS 清除率}(\%) = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100$$

## 1.3 数据处理

所有数据均为 3 次重复实验的平均值,通过运用 Excel、OriginPro 9.0 数据处理软件和 Design-Expert.8.05、SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

2.1.1 乙醇浓度对总黄酮得率的影响 野金柴总黄酮提取得率随乙醇浓度的变化如图 1 所示。由图 1 可知,随着乙醇浓度的增加,野金柴总黄酮提取得率呈现出增加的趋势。当乙醇溶液浓度达到 80% 后,提取得率的提升幅度明显放缓,基本与乙醇浓度在 80% 处持平。这可能是由于当乙醇浓度较低时,水分子数量较大,细胞发生溶胀导致离子通道受阻<sup>[18]</sup>,黄酮无法顺利从细胞被分离,而当乙醇浓度达到 80% 时,黄酮极性与提取液的极性相似,得率最大。因此,选择 70%~90% 的乙醇浓度作为野金柴总黄酮的最佳提取浓度范围。

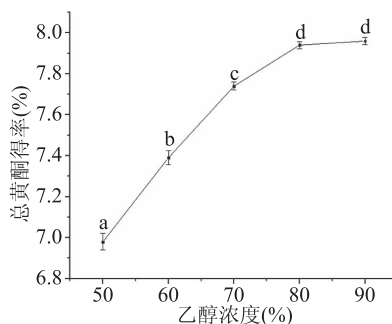


图1 乙醇浓度对总黄酮得率的影响  
Fig.1 Effects of ethanol concentrations on total flavonoids yield

2.1.2 液料比对总黄酮得率的影响 野金柴总黄酮提取得率随液料比的变化如图 2 所示。由图 2 可知,当液料比从 10:1 增加到 30:1 时,野金柴总黄酮的提取得率呈现出较为明显的增长速度,其原因可能是随着液料比的增长,野金柴细胞溶胀性提高,野金柴细胞与溶剂的接触面积增大<sup>[19]</sup>。当液料比由 30:1 增长到 40:1 时,增加趋势基本消失,液料比从 40:1 增加到 50:1 时,总黄酮提取得率出现下降,这可能是由于溶剂量过多时,一些其他化合物也被提取出来,使得率呈下降趋势<sup>[20]</sup>。虽然总黄酮提取得率在液料比 40:1 时最大,但由于液料比从 30:1 增加到 40:1,需要消耗更多的溶剂,且提取得率的增幅并不明显。综合考虑,选择 30:1~50:1 的液料比范围作为野金柴总黄酮提取的最佳液料比范围。

2.1.3 超声功率对总黄酮得率的影响 野金柴总黄酮提取得率随超声功率的变化如图 3 所示。由图 3 可知,当功率由 300 W 递增至 500 W 时,总黄酮得率



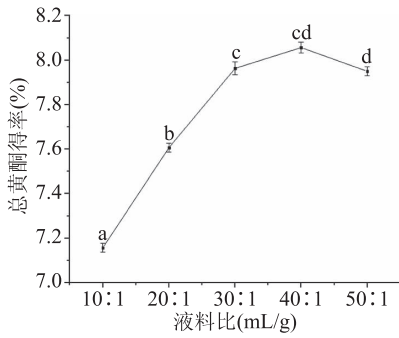


图2 液料比对总黄酮得率的影响

Fig.2 Effects of liquid-material ratios on total flavonoids yield

呈现出逐步上升的趋势,但当功率由 500 W 增加到 700 W 时,总黄酮得率下降。这可能是由于当超声功率在 300~500 W 范围内时,空化泡的形成随功率的升高而变得更容易,并且空化泡的崩解也随功率的升高而变得更加剧烈;当功率超过 500 W 后,空化泡增长得过大,以至于不能崩解或者很脆弱的崩解,大大降低了空化作用的效果,并且过多的空化泡也会阻碍超声波的传播<sup>[21]</sup>。且随着功率的增加,溶液温度可能升高,从而导致黄酮活性发生改变。因此,当其他条件相同时,选择 400~600 W 的功率范围作为最佳提取功率范围。

**2.1.4 超声时间对总黄酮得率的影响** 野金柴总黄酮提取得率随超声时间的变化如图 4 所示。由图 4 可知,随着超声时间的增加,野金柴总黄酮提取得率呈现出增长的趋势,当超声时间到达 50 min 后,提取得率提升不明显,与超声时间为 50 min 时差别不大。可能是在超声时间增大的过程中,超声波空化泡作用与空化泡崩解产生的机械作用有利于乙醇溶液进入组织内,加快了黄酮的溶出<sup>[22]</sup>,当时间达到 50 min 后,组织内大部分黄酮被提取完全,剩余部分极少,增大超声时间也难以提升黄酮得率。且若再增大超声时间,探头的温度会随之增加,导致提取剂的蒸发

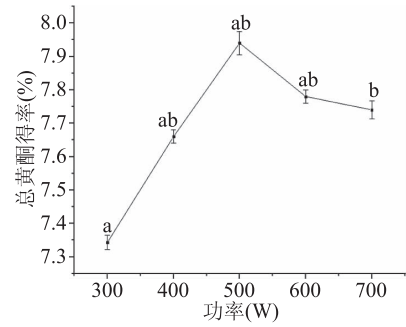


图3 超声功率对总黄酮得率的影响

Fig.3 Effects of ultrasonic power on yield of total flavonoids

流失<sup>[23-24]</sup>,可能导致黄酮得率反而下降。因此,在确定其他条件一致时,可选择超声时间 40~60 min 作为野金柴总黄酮的最佳超声时间范围。

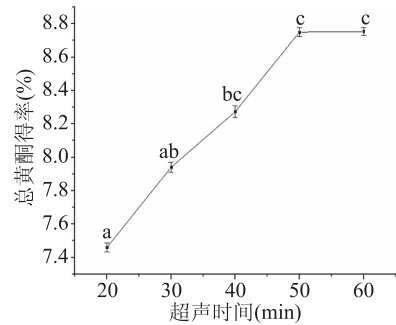


图4 超声时间对总黄酮得率的影响

Fig.4 Effects of ultrasonic time on yield of total flavonoids

**2.2 响应面分析**

**2.2.1 响应面方案设计** 选取(A)液料比、(B)乙醇浓度、(C)超声功率、(D)超声时间四个因素,设计三个水平实验,野金柴黄酮得率为响应值。实验设计与结果如表 2 所示。

**2.2.2 方差分析及显著性检测** 用软件 Design-Expert.8.05 对以上数据进行回归分析,结果如表 3 所示。对各因素回归拟合,可得如下野金柴黄酮得率

表2 Box-Behnken 实验设计和结果

Table 2 The experimental design and results for Box-Behnken

实验号	A	B	C	D	黄酮得率 (%)	实验号	A	B	C	D	黄酮得率 (%)
1	40	80	500	50	8.830 ± 0.009	16	30	70	500	50	8.530 ± 0.005
2	30	90	500	50	8.770 ± 0.008	17	30	80	500	40	8.270 ± 0.008
3	50	80	600	50	8.650 ± 0.010	18	50	90	500	50	8.780 ± 0.003
4	40	80	500	50	8.790 ± 0.004	19	30	80	500	60	8.700 ± 0.007
5	50	80	500	40	8.270 ± 0.008	20	40	80	400	60	8.490 ± 0.002
6	30	80	400	50	8.460 ± 0.006	21	50	80	500	60	8.770 ± 0.008
7	40	70	500	60	8.680 ± 0.009	22	40	80	600	60	8.680 ± 0.006
8	40	80	500	50	8.810 ± 0.002	23	30	80	600	50	8.530 ± 0.005
9	40	90	600	50	8.680 ± 0.009	24	40	80	500	50	8.810 ± 0.002
10	40	80	500	50	8.830 ± 0.009	25	50	70	500	50	8.490 ± 0.002
11	40	70	600	50	8.460 ± 0.006	26	40	90	500	60	8.860 ± 0.004
12	40	70	500	40	8.130 ± 0.005	27	40	90	400	50	8.520 ± 0.003
13	40	70	400	50	8.310 ± 0.008	28	50	80	400	50	8.430 ± 0.004
14	40	80	600	40	8.190 ± 0.002	29	40	90	500	40	8.350 ± 0.006
15	40	80	400	40	8.050 ± 0.004						

F(%)的回归方程:

$$F = +8.81 + 0.011A + 0.11B + 0.077C + 0.24D - 0.078A^2 - 0.089B^2 - 0.23C^2 - 0.23D^2 + 0.013AB + 0.038AC + 0.018AD + 0.0025BC - 0.01BD + 0.013CD$$

由表3可知,回归模型方差分析显著性检验表

表3 回归模型的方差分析

Table 3 Variance analysis for regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	1.517975	14	0.108427	159.3117	<0.0001
A	0.001408	1	0.001408	2.069267	0.1723
B	0.154133	1	0.154133	226.4684	<0.0001
C	0.072075	1	0.072075	105.8999	<0.0001
D	0.710533	1	0.710533	1043.988	<0.0001
A <sup>2</sup>	0.039295	1	0.039295	57.73669	<0.0001
B <sup>2</sup>	0.051476	1	0.051476	75.63338	<0.0001
C <sup>2</sup>	0.336701	1	0.336701	494.7151	<0.0001
D <sup>2</sup>	0.340405	1	0.340405	500.1584	<0.0001
AB	0.000625	1	0.000625	0.918314	0.3542
AC	0.005625	1	0.005625	8.264824	0.0122
AD	0.001225	1	0.001225	1.799895	0.2011
BC	0.000025	1	0.000025	0.036733	0.8508
BD	0.0004	1	0.0004	0.587721	0.4560
CD	0.000625	1	0.000625	0.918314	0.3542
残差	0.009528	14	0.000681		
失拟误差	0.008408	10	0.000841	3.002976	0.1504
纯误差	0.00112	4	0.00028		
总误差	1.527503	28			

明,该回归模型显著( $P < 0.0001$ ),失拟项不显著( $P = 0.1504 > 0.05$ ),表明该模型具有统计学意义。模型的确定系数  $R^2 = 0.9938$ ,  $R^2_{adj} = 0.9875$ ,说明该模型拟合度较好,可以用于超声波辅助提取野金柴黄酮的工艺参数进行初步分析和预测。分析结果表明,方差的一次项 B、C、D,二次项 A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>、D<sup>2</sup> 对响应值的影响极显著( $P < 0.01$ ),交互项 AC 对响应值的影响显著( $P < 0.05$ )。由 F 值可知各因素对野金柴黄酮得率的影响大小关系为:超声时间 > 乙醇浓度 > 超声功率 > 液料比。

2.2.3 最优工艺条件的确定及模型验证 通过 Design-Expert 软件对回归方程进行计算,得到超声波辅助提取野金柴黄酮最佳工艺条件,在液料比 41.93:1,乙醇浓度 82.55%,超声功率 539.46 W,超声时间 56.49 min 的条件下,得到最高的黄酮得率为 8.90%。考虑到实际条件的可操作性,将最佳工艺条件调整为:液料比 40:1,乙醇浓度 80%,超声功率 540 W,超声时间 60 min。为验证结果的可靠性,采用上述优化出的工艺参数进行 3 次重复实验,得到野金柴黄酮的实际得率为  $8.82\% \pm 0.09\%$ 。同时,有文献报道,自然存放 1 个月的多穗柯粗粉总黄酮含量为 8.34%,且随着存放时间延长,总黄酮含量不断降低,自然存放 3 个月,总黄酮含量降为 7.46%<sup>[25]</sup>。实验所使用的材料野金柴是多穗柯干制叶,参考该结论,与新鲜多穗柯嫩叶相比,存放时间更长的野金柴总黄酮含量更低,本研究优化工艺后,所得的野金柴总黄酮得率较高,说明所得回归方程对野金柴黄酮得率进行分析和预测非常可靠,具有一定的实践指导意义。

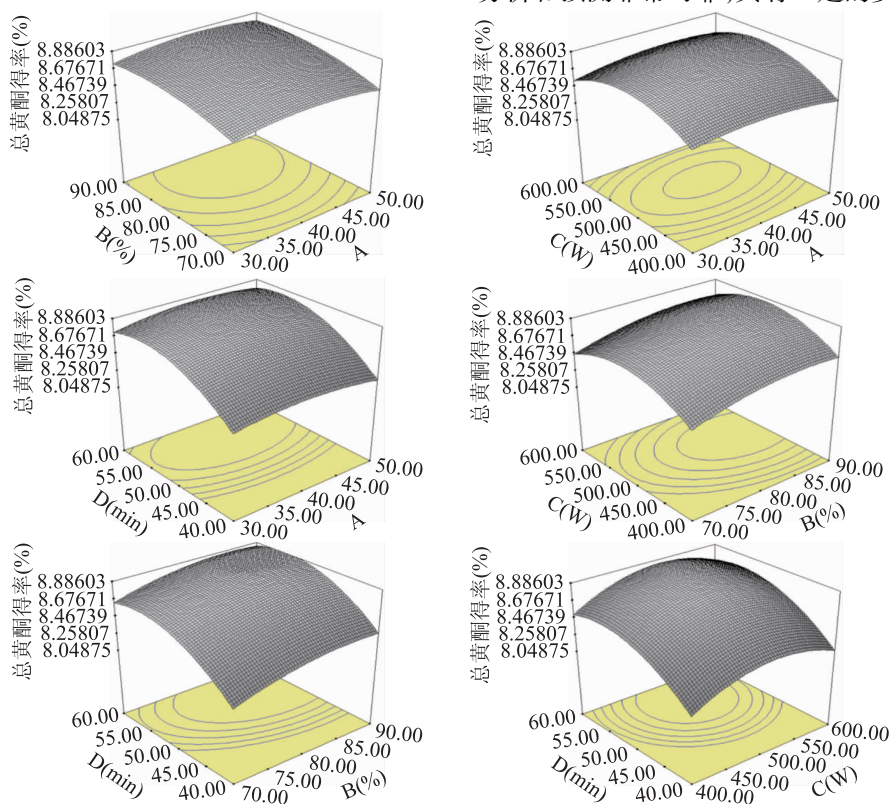


图5 液料比(A)、乙醇浓度(B)、超声功率(C)、超声时间(D)对总黄酮得率的影响

Fig.5 Effects of liquid-solid ratio(A), ethanol concentration(B), ultrasonic power(C) and ultrasonic time(D) on total flavonoids yield

### 2.3 野金柴黄酮抗氧化活性分析

2.3.1 DPPH 自由基清除能力测定 图6显示了不同浓度总黄酮、根皮苷、黄酮R对DPPH自由基的清除率。在一定范围内,野金柴总黄酮、根皮苷、黄酮R对DPPH自由基的清除能力都随浓度的增加而递增,当浓度增加至0.035~0.040 mg/mL时增加趋势放缓。且三者与V<sub>c</sub>对DPPH自由基的清除能力排序是V<sub>c</sub>>总黄酮>根皮苷>黄酮R, V<sub>c</sub>、总黄酮、根皮苷、黄酮R的IC<sub>50</sub>值分别为0.0190、0.0205、0.0222、0.0261 mg/mL。虽然黄酮R对DPPH自由基的清除能力比总黄酮和根皮苷要稍弱,但从数值上来看,黄酮R依旧有较强的DPPH自由基清除能力。

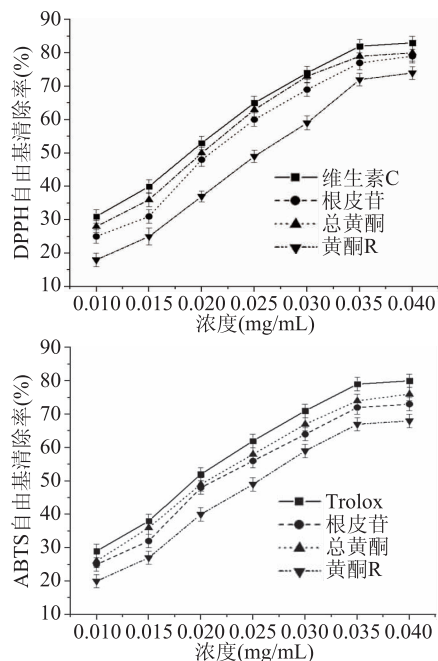


图6 不同浓度总黄酮、根皮苷、黄酮R对DPPH及ABTS自由基清除率

Fig.6 Scavenging rates of total flavonoids, phlorizin, and flavonoid R on DPPH and ABTS free radicals at different concentrations

2.3.2 ABTS 自由基清除能力测定 图6显示了Trolox、总黄酮、根皮苷、黄酮R对ABTS自由基的清除效果。一定浓度范围内, Trolox和总黄酮、根皮苷、黄酮R的ABTS自由基清除能力随浓度的增加而增大,呈现一定的量效依赖关系, Trolox、总黄酮、根皮苷、黄酮R的IC<sub>50</sub>值分别为0.0201、0.0220、0.0233、0.0266 mg/mL。在相同浓度下, Trolox的自由基清除能力最强, 黄酮R最弱, 原因可能是野金柴总黄酮中的主要成分是根皮苷, 黄酮R中含有槲皮苷等具有抗氧化能力的黄酮, 但含量相对较少, 因此抗氧化能力较低, 但仍有较好的ABTS自由基清除能力。

### 3 结论

本实验使用超声波辅助提取野金柴总黄酮, 并对提取工艺进行优化。通过响应面法构建了超声波辅助提取野金柴总黄酮的数学模型, 获得了最佳提取工艺。采用ADS-7型大孔树脂对野金柴黄酮中的根皮苷进行初步分离, 并对总黄酮、根皮苷和黄酮R

的抗氧化活性进行对比研究。结果表明: 各提取条件对野金柴总黄酮得率的影响大小关系为: 超声时间>乙醇浓度>超声功率>液料比。优化所得最佳提取工艺条件为液料比40:1, 乙醇浓度80%, 超声功率540 W, 超声时间60 min, 此条件下野金柴总黄酮得率为8.82%±0.09%。通过大孔树脂分离所得根皮苷, 黄酮R对DPPH自由基和ABTS自由基也有较好的清除效果, 是天然的抗氧化资源。目前关于野金柴黄酮的研究大都局限于总黄酮与根皮苷, 尚未发现关于野金柴中黄酮R的研究, 且对于野金柴的实际工业应用多为提取根皮苷, 忽略了对黄酮R进行进一步的生产利用。本实验通过研究野金柴总黄酮、根皮苷与黄酮R的抗氧化能力, 证明黄酮R具有优良的抗氧化效果, 说明提取完根皮苷的野金柴残渣也可以加以利用, 在实际生产中有其较高的利用价值。

### 参考文献

[1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴 第一册[M]. 北京: 科学出版社, 1972.

[2] 于沙蔚. 反相高效液相色谱法测定福建多穗柯中不同部位根皮苷的含量[J]. 海峡药学, 2018, 30(7): 59-60.

[3] 王代波, 刘国华, 封天洪. 野生多穗柯活性成分研究[J]. 种子科技, 2019, 37(15): 18, 21.

[4] 何春年, 彭勇, 肖伟, 等. 多穗柯甜茶的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1253-1255.

[5] 周北斗, 曾丽兰, 胡栋宝. 天然酚类化合物根皮素与根皮苷的抗氧化活性的DFT研究[J]. 分子科学学报, 2018, 34(6): 517-520.

[6] 金弘昕, 赵亚, 赖小平, 等. 野金柴化学成分分离和研究[J]. 中成药, 2012, 34(12): 2362-2364.

[7] 单思聪, 孙爽. 超临界萃取多穗柯黄酮及其抗运动氧化功能研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(20): 67-70.

[8] 陈阳. 多穗柯根皮苷的提取工艺优化及抗氧化、降血糖作用研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.

[9] 马金菊, 孙江飞, 武文浩, 等. 响应面法优化无花果叶总黄酮超声辅助提取工艺[J]. 中国酿造, 2018, 37(3): 140-144.

[10] 钱慧琴, 秦晶晶, 赵媛, 等. 月季不同部位总黄酮含量分析及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(20): 19-22.

[11] 毛瑜, 龙远春, 邓泽元, 等. 山药零余子黄酮的微波提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(20): 173-179.

[12] 李斌, 高凝轩, 刘辉, 等. 大孔树脂纯化黑果腺肋花楸多酚的工艺优化[J]. 食品科学, 2016, 37(16): 69-74.

[13] 李新明, 李群, 高忠东, 等. 苹果多酚及其活性单体的提取、分离纯化及降脂效果研究[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(13): 85-88.

[14] 王慧莹. 多穗柯根皮苷的提取纯化研究[D]. 长沙: 中南大学, 2014.

[15] 方荣, 杨茜, 李莉, 等. 湖北海棠中根皮苷含量测定[J]. 食品科技, 2008, 33(6): 195-196.

[16] 曾林晖, 邓泽元, 余修亮, 等. 蜂胶黄酮的超声波提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(12): 295-300.

[17] 黄越, 周春晖, 黄惠华. 不同提取方法猴头菇粗多糖的表征及其抗氧化活性的比较[J]. 食品工业科技, 2017, 38(3):

(下转第154页)



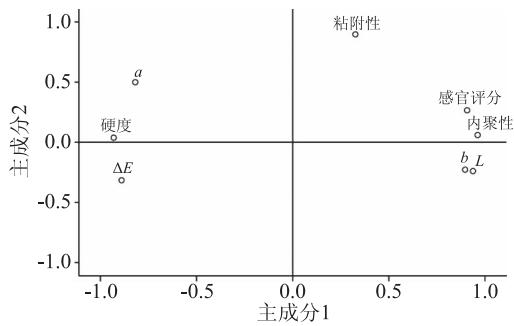


图6 灭菌工艺对捻转品质影响的主成分载荷图  
Fig.6 Effects of sterilization technology on principal component load diagram of the quality of Nianzhuang

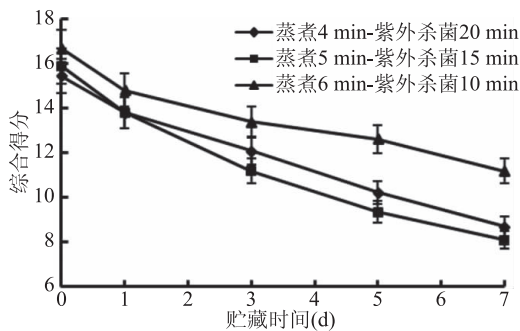


图7 灭菌工艺对捻转品质影响的综合得分  
Fig.7 Effects of sterilization technology on comprehensive scores of the quality of Nianzhuang

地保留新鲜捻转的翠绿色泽与有嚼劲的口感是后续研究的重点。

### 参考文献

- [1] 杨帆. 青麦仁加工、储藏中营养成分保持研究及加工生产线设计[D]. 郑州: 河南工业大学, 2016.
- [2] 张康逸, 康志敏, 马姗姗, 等. 青麦糕加工工艺研究[J]. 河南农业科学, 2013, 42(10): 149-152.
- [3] 张云忠, 季旭东. 青麦仁产业化初探[J]. 中国果菜, 2007(6): 39-40.
- [4] 何梦影, 张康逸, 郭东旭, 等. 响应面优化捻转抗老化剂的复配工艺[J]. 现代食品科技, 2018, 34(1): 195-202.
- [5] 张康逸, 何梦影, 郭东旭, 等. 不同干燥工艺对捻转品质和挥发性风味成分的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(2): 75-80.

(上接第 141 页)

80-86.

- [18] 许晖, 孙兰萍, 张斌, 等. 响应面法优化花生壳黄酮提取工艺的研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(1): 107-111.
- [19] 焦昆鹏, 马丽苹, 朱文学, 等. 响应面法优化花生茎叶黄酮的提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(2): 89-95.
- [20] 韩颖, 吕晓玲. 竹柳叶中黄酮类化合物的提取工艺和成分分析研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(14): 53-59.
- [21] Sun Y J, Liu D H, Chen J C, et al. Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- $\beta$ -carotene from *Citrus* peels[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2011, 18(1): 243-249.
- [22] Xu L, He W J, Lu M, et al. Enzyme-assisted ultrasonic-

[6] 张康逸, 郭东旭, 何梦影, 等. 不同包装方式对捻转贮藏过程中品质变化的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 286-291.

[7] 郑杭娟, 林慧敏. 解冻过程对水产品特性的影响[J]. 食品研究与开发, 2014(3): 127-129.

[8] 许俊齐, 贾君, 徐超, 等. 白灵菇即食产品加工工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2019(17): 153-157.

[9] 李锐, 江祖彬, 童光森, 等. 即食麻辣小龙虾加工工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(5): 138-143.

[10] Hertz F D, Halkier B. Meal box schemes a convenient way to avoid convenience food? Uses and understandings of meal box schemes among Danish consumers [J]. Appetite, 2017, 114: 232-239.

[11] Dhiman A K, Negi V, Attri S, et al. Development and standardization of instant food mixes from dehydrated pumpkin and pumpkin seed powder (*Cucurbita moschata* Duch ex Poir) [J]. International Journal of Bio-Resource and Stress Management, 2017, 8(2): 213-219.

[12] 骆红玲, 刘海英, 王荣. 即食香鱼的加工工艺研究[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(7): 738-743.

[13] 赵品, 林婉玲, 郝淑贤, 等. 酒糟罗非鱼间歇真空制加工工艺研究[J]. 南方水产科学, 2016(3): 84-90.

[14] 钟政昌, 王腾飞, 方江平. 均匀设计法优化西藏光核桃原果浆保鲜配方[J]. 食品科技, 2014, 39(5): 47-52.

[15] 刘计权, 刘亚明, 裴香萍, 等. 均匀设计法优选葛根栽培中的配方施肥模式研究[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(4): 1025-1027.

[16] Based PCCA. 番茄 ILs 果实性状的主成分分析与聚类分析[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(4): 907-913.

[17] 杨玲, 张彩霞, 康国栋, 等. '华红' 苹果果肉的流变特性及其主成分分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48(12): 2417-2427.

[18] Li X A. Comparative study of color change assessment for frozen ground beef using traditional colorimeter and digital image analysis[D]. Columbus: The Ohio State University, 2019.

[19] 刘光辉, 张蕾蕾, 王颖, 等. 几种糙米性质研究及隆梗软 1 号糙米蒸煮条件优化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(21): 25-31, 37.

[20] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.2-2016 食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[21] 伍婧, 王远亮, 李珂, 等. 基于主成分分析的不同醒发条件下挂面的特征质构[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 119-123.

microwave synergistic extraction and UPLC-QTOF-MS analysis of flavonoids from Chinese water chestnut peels [J]. Industrial Crops and Products, 2018, 117: 179-186.

[23] González-Centeno M R, Knoerzer K, Sabarez H, et al. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) - a response surface approach [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2014, 21(6): 2176-2184.

[24] Song J F, Li D J, Pang H L, et al. Effect of ultrasonic waves on the stability of all-trans lutein and its degradation kinetics [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2015, 27: 602-608.

[25] 李胜华, 伍贤进, 郝建平, 等. 多穗柯总黄酮提取工艺及其含量动态变化研究[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 139-141.