

响应面法优化蒲桃籽中三萜类化合物的提取工艺及其抗氧化活性分析

刘嘉鑫, 陈小梅, 曾慧, 王淑美, 向丽敏

Optimization of the Extraction Process of Triterpenoids from the Seeds of *Syzygium jambos* L. Alston by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity

LIU Jiaxin, CHEN Xiaomei, ZENG Hui, WANG Shumei, and XIANG Limin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022020016>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

响应面法优化黑化红枣三萜酸提取工艺及抗氧化活性研究

Optimization of Extraction and Antioxidant Activities of Triterpenic Acids from Blacked Jujube by Response Surface Methodology
食品工业科技. 2021, 42(12): 176-183

猴头菇三萜提取工艺优化及其抗氧化活性分析

Optimization of Extraction Process of *Hericium erinaceus* Triterpenes and Its Antioxidant Activity
食品工业科技. 2021, 42(22): 153-159

响应面法优化结香花总黄酮提取工艺及其抗氧化活性

Optimization of the Extraction Technology of Total Flavonoids from *Edgeworthia chrysantha* Lindl. by Response Surface Analysis and Its Antioxidant Activities *in Vitro*
食品工业科技. 2020, 41(19): 192-197

响应面法优化山豆根多糖提取工艺及其分级醇沉组分的抗氧化活性

Optimization Extraction of Polysaccharide from *Sophora tonkinensis* Gagnep by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity of Fractionated Alcohol Precipitation Components
食品工业科技. 2019, 40(22): 157-162

响应面优化马骨髓蛋白的提取工艺及其抗氧化活性研究

Optimization of Extraction Technology of Horse Bone Marrow Protein by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity
食品工业科技. 2021, 42(12): 151-159

尾巨桉树皮提取物抗氧化活性及其成分分析

Analysis of Antioxidant Activity and Active Components of *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* Bark Extracts
食品工业科技. 2019, 40(1): 23-28



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

刘嘉鑫, 陈小梅, 曾慧, 等. 响应面法优化蒲桃籽中三萜类化合物的提取工艺及其抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 192-199. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020016

LIU Jiaxin, CHEN Xiaomei, ZENG Hui, et al. Optimization of the Extraction Process of Triterpenoids from the Seeds of *Syzygium jambos* L. Alston by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(23): 192-199. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020016

· 工艺技术 ·

响应面法优化蒲桃籽中三萜类化合物的提取工艺及其抗氧化活性分析

刘嘉鑫¹, 陈小梅¹, 曾慧², 王淑美^{2,3,4,*}, 向丽敏^{1,3,4,*}

(1. 广东药科大学中药学院, 广东广州 510006;

2. 广东药科大学药学院, 广东广州 510006;

3. 国家中医药管理局中药数字化质量评价技术重点实验室, 广东广州 510006;

4. 广东中药质量工程技术研究中心, 广东广州 510006)

摘要: 以蒲桃籽为原料, 通过单因素实验考察各因素对蒲桃籽中三萜类化合物得率的影响。运用 Design-Expert 12 软件设计响应面法优化提取工艺, 并进行模型诊断和工艺验证。最后对提取得到的蒲桃籽三萜进行 DPPH·、ABTS⁺清除能力的测定, 评价其抗氧化活性。结果表明, 蒲桃籽三萜类化合物的最优提取工艺为甲醇体积分数 44.30%、料液比 1:47.18 g/mL、提取时间 101.07 min (实验调整为 101 min)。此条件下, 实际得率 (12.11 mg/g) 与理论得率 (12.28 mg/g) 之间的偏差仅为 1.26% (<5%), 误差较小。蒲桃籽三萜类化合物 DPPH·、ABTS⁺清除能力的 IC₅₀ 值分别为 24.93、12.16 μg/mL, 并且抗氧化活性与其浓度呈现出一定的量效关系。此优化实验有效可行, 且蒲桃籽三萜类化合物具有较强的抗氧化活性。本文的研究为蒲桃资源的开发利用提供了一定的理论依据。

关键词: 蒲桃籽, 三萜, 提取工艺, 响应面法, 抗氧化活性

中图分类号: TS201.1; R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)23-0192-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020016

本文网刊:



Optimization of the Extraction Process of Triterpenoids from the Seeds of *Syzygium jambos* L. Alston by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity

LIU Jiaxin¹, CHEN Xiaomei¹, ZENG Hui², WANG Shumei^{2,3,4,*}, XIANG Limin^{1,3,4,*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

3. Key Laboratory of Digital Quality Evaluation of Chinese Materia Medica of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

4. Engineering Technology Research Center for Chinese Materia Medica Quality of Guangdong Province, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In this study the single factor experiments were employed to determine the effects of various factors on extraction rate of triterpenoids in the seeds of *S. jambos* L. Alston using the yields as indicator. Then Box-Behnken design and response surface methodology were employed to optimize the extraction process using the Design-Expert 12 software. Moreover, the antioxidant activity of triterpenoids in the seeds of *S. jambos* L. Alston was evaluated by determining the

收稿日期: 2022-02-10

基金项目: 2020 年广东大学生科技创新培育专项资金资助项目 (pdjh2020b0306)。

作者简介: 刘嘉鑫 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药化学成分的研究与应用, E-mail: 1206358058@qq.com。

* 通信作者: 王淑美 (1966-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药药效物质基础及质量控制研究, E-mail: 2395903468@qq.com。

向丽敏 (1988-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药学, E-mail: xianglimin88@163.com。

scavenging capacity of DPPH and ABTS free radical. The results showed that the optimal conditions were as follows: Methanol concentration 44.30%, solid-liquid ratio 1:47.18 g/mL, extraction time was 101.07 min (adjusted to 101 min in the experiment). Under these conditions, the deviation between the experimental extraction yield value (12.11 mg/g) and the predicted value (12.28 mg/g) of triterpenoids in the seeds of *S. jambos* L. Alston was only 1.26% (<5%), and the error was small. The IC_{50} values of scavenging rates on DPPH and ABTS free radicals were 24.93 and 12.16 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The antioxidant activity showed a certain dose effect relationship with the sample concentration. The results indicated that this optimization test was effective and feasible, and the extracted *S. jambos* L. Alston triterpenoids had good antioxidant activity *in vitro*. The present study provides supplement information for the potential use of the seeds of *S. jambos* L. Alston in food and medicine ingredients.

Key words: *Syzygium jambos* L. Alston; triterpenoids; extraction process; response surface; antioxidant activity

由于不健康的饮食及生活习惯, 糖尿病已成为全球主要的公共卫生问题^[1], 患病人数逐年上升^[2]。糖尿病及其并发症的发生、发展与氧化应激密切相关^[3-5], 应用抗氧化治疗可逆转氧化应激对组织的损伤, 从而阻止或延缓糖尿病及其并发症的发生、发展, 从天然产物中寻找有效的抗氧化剂将成为预防和治疗糖尿病及其并发症药物开发的有效策略^[6]。

蒲桃(*Syzygium jambos* L. Alston), 又称香果、响鼓等, 为桃金娘科(Myrtaceae)蒲桃属植物, 在我国福建、广东等地有栽培^[7]。除了可作为热带水果食用外, 蒲桃药用历史也较为悠久。据《中华本草》记载, 蒲桃种子可健脾止泻, 多用于脾虚泄泻及糖尿病的治疗; 现代药理学研究表明蒲桃不同部位均有降血糖作用, 尤以种子的降糖作用最强^[8-9]。三萜类化合物是许多具有降血糖中药的有效成分^[10-11], 具有显著的抗氧化活性, 在糖尿病防治方面具有巨大的潜力。三萜类化合物是蒲桃的主要化学成分之一^[12], 也是其发挥降糖活性的有效成分之一^[13]。蒲桃不同药用部位均含有乌苏烷型三萜^[12, 14-15]。但目前国内外对蒲桃属植物三萜成分的研究主要集中在果实和茎叶部位^[12-15], 对蒲桃籽三萜的研究罕见报道。

一般来说, 三萜类化合物常用的提取方法有碱水提取法、超临界 CO_2 提取法、超声辅助提取法、有机溶剂提取法等^[16-17]。某些皂苷含有羧基, 可溶于碱水, 可以采用碱水提取法提取, 但是该法提取效率低^[16]。超临界 CO_2 提取法及超声辅助提取法提取效率高, 能耗低, 但对设备要求较高, 提取成本高, 不适合规模化生产^[17-18]。与其他提取方法相比, 有机溶剂提取法具有提取周期短、操作简便, 适应性广的优点^[16], 因此本文选择有机溶剂提取法来研究蒲桃籽三萜的提取工艺, 在单因素实验考察甲醇体积分数、料液比、提取时间对蒲桃籽三萜得率影响的基础上, 采用响应面试验优化其提取工艺, 并采用 DPPH 和 ABTS 法评价了其体外抗氧化活性, 为后续蒲桃资源的开发利用、糖尿病的防治及天然食品抗氧化剂的开发奠定了一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蒲桃籽 2019 年 6 月在广东药科大学大学城校区的校园内采摘, 经广东药科大学中药学院向丽敏博

士鉴定为蒲桃(*Syzygium jambos* L. Alston); 乌苏酸对照品 纯度 95%, 实验室自制; 石油醚 分析纯, 天津市百世化工有限公司; 甲醇、冰乙酸 分析纯, 天津市致远化学试剂有限公司; 高氯酸 分析纯, 广州市安捷汇贸易有限公司; 香草醛(香兰素) 分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 2, 2'-联苯基-1-苦基肼基、2, 2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐、抗坏血酸、过硫酸钾 分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司; 5% 的香兰素-冰乙酸溶液 精密称取香兰素 2.5 g, 于 50 mL 的棕量瓶, 加冰乙酸定容至刻度线, 摇匀即得。

DFY-200C 摇摆式高速粉碎机 温岭市林大机械有限公司; JM-B2002 电子天平 余姚市纪铭称重校验设备有限公司; ME104 万分之一天平 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; SB-1300 旋转蒸发仪 广州腾朗科技仪器有限公司; SHZ-D(III)循环水式真空泵 巩义市予华有限责任公司; DLSB-5110 低温冷却液循环泵 郑州长城科工贸有限公司; KQ-500DE 数控超声清洗器 昆山市超声仪器有限公司; UV-2600 紫外可见分光光度计 岛津仪器苏州有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蒲桃籽前处理 取适量干燥的蒲桃籽药材粉碎, 过 1 号筛, 得到蒲桃籽粗粉。取 100 g 蒲桃籽粗粉与 5 倍量石油醚于 65 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中加热回流脱脂 1 h, 重复操作 2 次。过滤, 将脱脂后的蒲桃籽粗粉平铺于法兰盘中, 在通风橱放置过夜, 期间时常翻动, 待其彻底挥去石油醚后过 2 号筛, 所得蒲桃籽粉末保存备用^[19-20]。

将未脱脂蒲桃籽粗粉、脱脂蒲桃籽粗粉在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下加热回流 30 min, 得到醇提物过滤, 在 550 nm 下测其吸光度值 A 。由于 $A_{\text{脱脂样品}} > A_{\text{未脱脂样品}}$, 所以选择脱脂粉末作为本实验的研究对象。

1.2.2 蒲桃籽三萜提取工艺 称取 0.5 g 蒲桃籽脱脂粉末, 根据后续不同实验参数条件, 加入不同体积分数的甲醇溶液, 在不同的提取温度、时间、料液比下进行回流提取。提取结束后室温冷却 10 min 定容, 移取上清液, 过滤, 即为蒲桃籽三萜类化合物提取液。

1.2.3 单因素实验 精密称取 0.5 g 蒲桃籽粗粉, 按照设定条件进行提取, 分别考察甲醇体积分数、提取

温度、提取时间以及料液比对蒲桃籽三萜得率的影响:固定料液比 1:10 g/mL,提取温度 50 ℃,提取时间 30 min 下,考察甲醇体积分数(10%、30%、50%、70%、80%、95%)对蒲桃籽三萜得率的影响;固定料液比 1:10 g/mL,甲醇体积分数 50%,提取时间 30 min 下,考察提取温度(40、50、60、70、80、90 ℃)对蒲桃籽三萜得率的影响;固定料液比 1:10 g/mL,甲醇体积分数 50%,提取温度 50 ℃ 下,考察提取时间(20、40、60、90、120 min)对蒲桃籽三萜得率的影响;固定甲醇体积分数 50%,提取温度 50 ℃,提取时间 30 min 下,考察料液比(1:10、1:40、1:50、1:70、1:80 g/mL)对蒲桃籽三萜得率的影响。

1.2.4 响应面法优化提取工艺 上述实验结果显示蒲桃籽中三萜类化合物的得率随着温度的升高而逐渐上升,但是由于甲醇的沸点为 64.7 ℃,而且温度过高会引起部分三萜类化合物结构发生变化,本实验将 60 ℃ 作为最佳提取温度(固定温度)。

选取甲醇体积分数(A)、提取时间(B)、料液比(C)三个因素为自变量,以蒲桃籽中三萜类化合物得率(D)为响应值,运用 Design-Expert 12 软件进行三因素三水平的 Box-Behnken 响应面设计,试验因素水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素和水平
Table 1 Test factors and levels of Box-Behnken design

水平	因素		
	A 甲醇体积分数(%)	B 提取时间(min)	C 料液比(g/mL)
-1	30	60	1:10
0	50	90	1:40
1	70	120	1:70

1.2.5 三萜类化合物含量测定 取 1 mg/mL 乌苏酸对照品溶液 0.2 mL 于 80 ℃ 下蒸干。依次加入 0.3 mL 5% 的香兰素-冰乙酸溶液和 1 mL 高氯酸,混匀。60 ℃ 恒温加热 20 min,取出后立即置于冷水中冷却 5 min,最后加入 5 mL 冰乙酸稀释摇匀,以空白试剂(0.3 mL 5% 的香兰素-冰乙酸溶液+1 mL 高氯酸+5 mL 冰乙酸,混匀)为参比,在 400~800 nm 下扫描吸收图谱,选择其最大吸收峰 550 nm 为检测波长^[21]。将对照品分别配制成 100、200、400、600、800、1000 μg/mL,根据上述方法测得吸光度值 A,并得到回归方程 $Y=0.0011x+0.0239$, $R^2=0.9995$ 。

根据上述方法测得样品吸光度值,并结合回归方程及以下公式计算得到蒲桃籽中三萜类化合物得率 W:

$$W = \frac{V \times c \times D}{m}$$

式中:W 表示蒲桃籽中三萜类化合物的得率,mg/g;V 表示吸取的蒲桃籽样品溶液的体积,mL;c 表示提取液中三萜的浓度,mg/mL;D 表示稀释倍数;m 表示粉末的重量,g。

1.2.6 抗氧化活性试验

1.2.6.1 DPPH 自由基清除能力的测定 取 14 g 脱脂粉末,按上述试验所得最优工艺提取,蒸干后得 1.5 g 浸膏。配制为 15、20、25、30、35、40、45 μg/mL 的样品溶液,各取 20 μL,加入 20 μL 0.2 mmol/L DPPH 溶液,摇匀后避光 30 min 后,以甲醇为空白对照, V_C 为阳性对照,在 517 nm 下测定其吸光度,进行 3 次平行实验^[18,22]。按照以下公式计算其 DPPH·清除能力。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{D_1}{D_2}\right) \times 100$$

式中: D_1 表示样品或阳性对照吸光度; D_2 表示空白对照吸光度。

1.2.6.2 ABTS⁺清除能力的测定 7 mmol/L 的 ABTS 溶液和 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液等体积(5 mL)混合,室温避光条件下反应 14~16 h 制得 ABTS 储备液。将储备液用 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释(约 40~45 倍),直至测得其在 734 nm 下吸光度为 0.700 ± 0.020 。各取 0.5 mL 浓度为 1、5、10、15、20、25 μg/mL 的样品溶液,加 3 mL ABTS 工作液振荡摇匀,黑暗反应 8 min,检测其在波长 734 nm 处的吸光度值 A_1 ,纯水代替 ABTS 工作液测得吸光度值 A_2 ,同样用纯水代替样品溶液测得其吸光度值 A_0 。以 V_C 为阳性对照,进行 3 次平行实验^[21,23],按照以下公式计算其 ABTS⁺清除能力。

$$\text{ABTS自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A_1 表示样品/阳性对照+ABTS 工作液的吸光度值; A_2 表示样品/阳性对照+纯水的吸光度值; A_0 表示纯水/阳性对照+ABTS 工作液的吸光度值。

1.3 数据处理

所有试验平行测定 3 次,取平均值。数据采用 Graphpad prism 8 进行统计整理和绘图。采用 Design-Expert 12 软件进行响应面优化及方差分析; $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 甲醇体积分数对三萜得率的影响 由图 1 可知,三萜类化合物得率随甲醇体积分数的增加,呈现出先上升后下降的趋势。甲醇体积分数为 50% 时,其得率达到最大值 9.90 mg/g,说明蒲桃籽三萜类成分在甲醇体积分数为 50% 时溶解度最大。而甲醇体积分数超过 50% 后,三萜的得率逐渐降低。一方面可能与三萜的极性有关^[24],随着甲醇体积分数的增加,部分三萜类化合物的溶解度下降而导致总三萜类化合物的得率降低;另一方面则是因为一些醇溶性杂质、脂溶性杂质等随之溶出^[25],与三萜类成分产生了竞争^[26],从而导致了蒲桃籽中三萜类成分的得率下降。综上,应选择甲醇体积分数为 30%、50%、70%

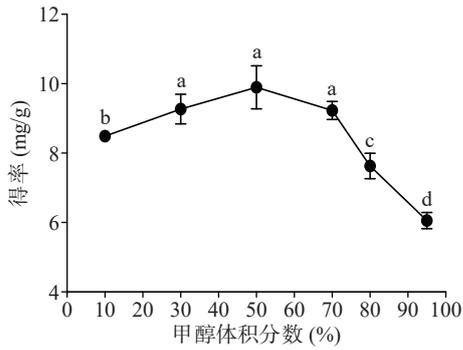


图 1 甲醇体积分数对三萜类化合物得率的影响

Fig.1 Effect of methanol volume fraction on the yield of triterpenoids

注: 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 图 2~图 4 同。

的溶剂进行响应面优化。

2.1.2 提取温度对三萜得率的影响 由图 2 可知, 随着温度的升高, 其得率逐渐上升。可能是由于随着温度的升高, 高分子的热运动加剧, 使得甲醇溶液更容易渗透、扩散进入药粉组织细胞内, 而有利于三萜类化合物的提取^[25], 但是超过 80 °C 可能会引起部分三萜类化合物结构的变化。且考虑到甲醇的沸点为 64.7 °C^[27], 将 60 °C 作为最佳提取条件。

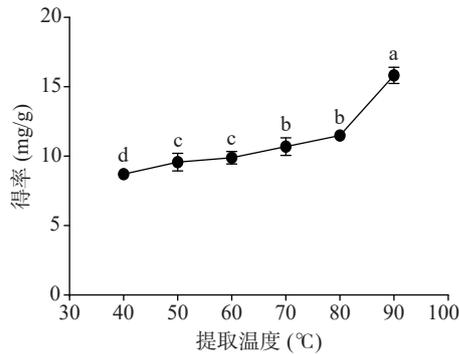


图 2 提取温度对三萜类化合物得率的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on the yield of triterpenoids

2.1.3 提取时间对三萜得率的影响 由图 3 可知, 在本试验条件范围内, 提取时间对蒲桃籽中三萜类化合物的得率影响较小, 总体来看得率随时间的变化呈现出平缓-上升-再下降的趋势。提取时间为 90 min 时,

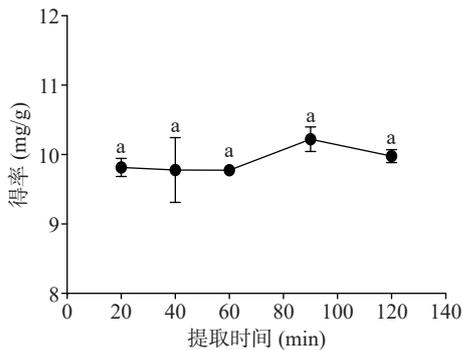


图 3 提取时间对三萜类化合物得率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on the yield of triterpenoids

得率达到最大值 10.22 mg/g。说明在提取 90 min 时, 蒲桃籽粉末与甲醇溶液可以充分接触, 其组织细胞基本破裂, 三萜类化合物的溶出已经达到最大的限度。而继续延长加热提取时间, 不仅不会提高三萜类化合物的得率, 反而会使某些三萜成分的稳定性降低^[25]。甚至随着时间的延长, 会有更多的杂质产生, 这些杂质可能与三萜类化合物产生反应, 形成吸附作用或者与三萜类化合物竞争溶剂, 使得三萜类化合物的得率降低^[28]。综上, 应选择 60、90、120 min 的提取时间进行响应面优化。

2.1.4 料液比对三萜得率的影响 由图 4 可知, 得率随料液比的增加呈现出先上升后下降的趋势。料液比达到 1:40 时, 蒲桃籽中三萜类化合物的得率达到了最大值 11.97 mg/g。可能是不同的料液比会对蒲桃籽粉末产生不同的细胞外渗透压^[24], 从而导致其细胞破裂程度不同, 进而使得三萜得率不同。当其料液比较小时, 由于其粉末与溶剂之间的浓度梯度较小, 使得甲醇溶液与蒲桃籽粉末的接触面积较少, 加热回流受限, 甲醇溶液不能完全渗透扩散进入药粉的组织细胞内, 从而使其三萜类化合物不能全部提出。而当其料液比增加时, 甲醇溶液与蒲桃籽粉末的接触面积增加, 三萜的得率逐渐增加; 直至料液比达到 1:40 时, 其三萜的提取达到上限饱和。此后, 溶剂继续增加, 反而会形成稀释, 其甲醇溶液与蒲桃籽粉末的有效碰撞面积减少, 三萜得率下降^[21, 26]。同时, 由于其甲醇溶液增加, 杂质也随之增加, 杂质既可能影响三萜类化合物的提取, 也能吸附三萜类化合物或者与其发生反应, 使之得率降低。且料液比增大, 不仅产生浪费, 还会对之后的富集纯化等实验加大难度。综上, 应选择 1:10、1:40、1:70 g/mL 的料液比进行响应面优化。

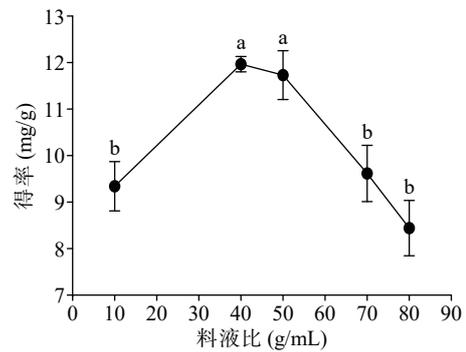


图 4 料液比对三萜类化合物得率的影响

Fig.4 Effect of material-liquid ratio on the yield of triterpenoids

2.2 响应面试验优化提取工艺

2.2.1 响应面试验设计 运用 Design-Expert 12 软件对蒲桃籽中三萜类化合物的提取工艺进行优化, 共产生 17 组实验 (包括 5 组零点实验进行误差校正), 其设计结果见表 2。

2.2.2 建立回归模型及方差分析 运用 Design-

表 2 Box-Behnken 试验设计和结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

实验号	A 甲醇体积分数	B 提取时间	C 料液比	D 得率(mg/g)
1	0	0	0	11.92
2	-1	-1	0	10.80
3	1	0	-1	7.74
4	0	1	-1	8.72
5	0	-1	-1	9.00
6	0	0	0	12.36
7	1	-1	0	11.20
8	0	0	0	11.81
9	-1	0	1	10.95
10	0	0	0	12.06
11	1	1	0	10.89
12	0	0	0	12.44
13	0	1	1	10.29
14	1	0	1	9.62
15	-1	0	-1	7.80
16	0	-1	1	10.49
17	-1	1	0	11.81

Expert 12 软件对表 2 的数据进行二次多项式回归拟合, 并进行方差分析, 结果见表 3。得到二次多项回归方程为(A: 甲醇体积分数; B: 提取时间; C: 料液比; D: 得率; 以下均同):

$$D=12.118-0.24A+0.027B+1.012C-0.33AB-0.319AC+0.023BC-0.771A^2-0.171B^2-2.322C^2$$

其中, 模型的决定系数 $R^2=0.9717$, 表明模型拟合情况良好, 试验因素与得率之间的关系较为明显, 蒲桃籽中三萜类化合物的得率的变化中, 97.17% 来自于试验因素^[25]。因此, 此模型可以很好地解释得率与三个因素的关系。调整系数 $R^2_{Adj}=93.53\%$, 表明此模型误差较小, 能很好地解释 93.53% 的得率的变化, 可以用模型来代替实际值, 所以此模型可以进行蒲桃籽中三萜类化合物提取的工艺优化^[25-26]。变异系数 CV(%) 代表试验结果的精度, 其 CV 值越小, 实验结果越可靠^[26]。本模型的 CV(%)=3.66%, 重现性较好, 可以用于蒲桃籽中三萜类化合物提取的工艺预测与优化。

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	36.0783	9	4.0087	26.6858	0.0001	**
A	0.4599	1	0.4599	3.0615	0.1236	
B	0.0058	1	0.0058	0.0385	0.8499	
C	8.1950	1	8.1950	54.5537	0.0002	**
AB	0.4364	1	0.4364	2.9051	0.1321	
AC	0.4069	1	0.4069	2.7084	0.1438	
BC	0.0022	1	0.0022	0.0146	0.9071	
A ²	2.5003	1	2.5003	16.6446	0.0047	**
B ²	0.1226	1	0.1226	0.8160	0.3964	
C ²	22.7097	1	22.7097	151.1779	<0.0001	**
残差	1.0515	7	0.1502			
失拟项	0.7540	3	0.2513	3.3783	0.1351	不显著
纯误差	0.2976	4	0.0744			
总离差	0.3713	16				

注: ** $P<0.01$ 表示差异极显著; * $P<0.05$ 表示差异显著。

由表 3 可知, 模型 $P=0.0001$, <0.01 , 差异极显著, 说明实验方法可靠。失拟项 $P=0.1351$, >0.05 , 差异不显著, 说明本数据模型拟合良好, 预测值与真实值之间的偏差较小^[26], 模型可以用来描述各因素与得率之间的关系。

因素 C(料液比) $P<0.01$, 差异极显著, 说明料液比对蒲桃籽中三萜类化合物的得率有极显著的影响; 而 A(甲醇体积分数)和 B(提取时间) $P>0.05$, 无显著性, 说明二者对蒲桃籽三萜得率的影响不显著。试验因素的 F 值越大, 说明其对响应值得率的影响越大^[25]。因此, 影响蒲桃籽中三萜类化合物得率的因素由大到小是: $C>A>B$, 即料液比>甲醇体积分数>提取时间。交互项 AB、AC、BC 均不显著($P>0.05$), 说明这些因素之间的内在联系不大。A²、C² 的 $P<0.01$, 差异极显著。

2.2.3 模型诊断 拟合得到的模型可以通过残差分析来进行诊断。这种方法主要是建立在模型无法完全解释的变异基础上, 通过图形来诊断的。在诊断过程中, 有两个判断极其重要, 即残差方差齐性与正态分布。首先判断残差方差齐性, 若预测值的内部 t 化残差呈随机分布, 则其残差方差齐性符合要求。由图 5(a)可以看出, 其呈散点分布, 符合要求。其次判断正态分布, 若残差呈正态分布, 则其拟合的曲线呈线性。由图 5(b)可以看出, 其残差呈正态分布。因此, 可以诊断得出本试验实验值与实际值偏差较小, 拟合的模型有价值^[29]。

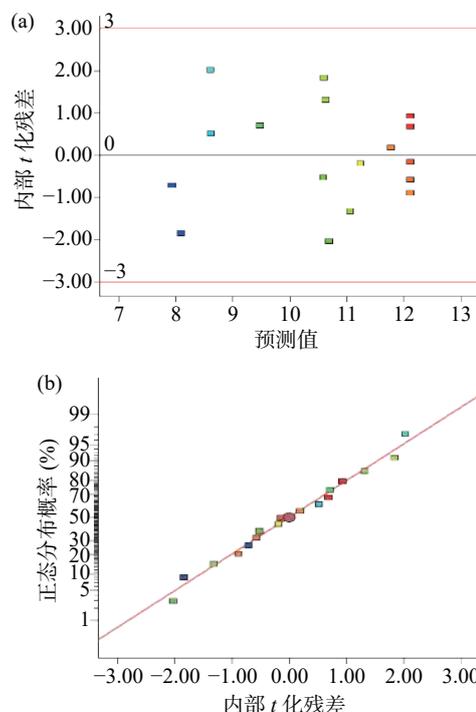


图 5 模型诊断工具图

Fig.5 Diagnostic tool diagram of the model

注: (a) 表示预测值内部 t 化残差分布; (b) 表示内部 t 化残差正态分布概率。

2.2.4 工艺优化 运用 Design-Expert 12 软件得到

蒲桃籽中三萜类化合物的最佳提取工艺是: 甲醇体积分数 44.30%、料液比 1:47.18、提取时间 101.07 min (实验时调整为 101 min), 此条件下的理论得率为 12.28 mg/g。

根据以上条件进行三组平行实验提取蒲桃籽中的三萜类化合物, 得到的平均浓度为 256.76 $\mu\text{g/mL}$, 得率为 12.11 mg/g, 其 RSD(%) 为 0.82%, 实际的得率与理论得率之间的偏差仅为 1.26% (<5%), 偏差较小, 说明用此方法优化后的蒲桃籽中三萜类化合物的提取工艺可行。

2.3 抗氧化活性试验

2.3.1 DPPH 自由基清除能力的测定结果 由图 6 可见, 蒲桃籽中三萜类化合物对 DPPH· 的清除能力与三萜类化合物浓度有一定的量效关系, IC_{50} 值为 24.93 $\mu\text{g/mL}$ 。在 15~30 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内, 随着蒲桃籽中三萜类化合物浓度的增大, 其对 DPPH 自由基的清除能力增强, 且各浓度间清除能力具有显著差异 ($P < 0.05$), 当蒲桃籽中三萜类化合物浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 时, DPPH· 清除率为 83.90%, 清除能力显著, 与 V_C 相近。

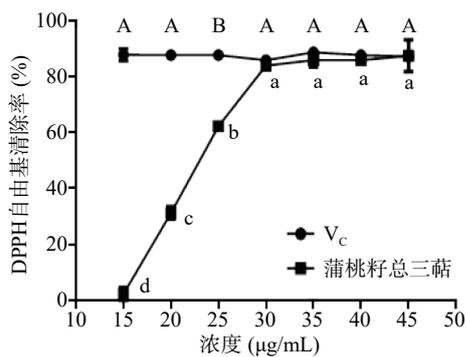


图 6 蒲桃籽总三萜、 V_C 的 DPPH· 清除能力测定结果

Fig.6 Results of DPPH scavenging ability of total triterpenoids in the seeds of *S. jambos* L. Alston and V_C

注: 不同小写字母表示蒲桃籽总三萜在不同浓度下抗氧化活性差异显著 ($P < 0.05$); 不同大写字母表示 V_C 在不同浓度下抗氧化活性差异显著 ($P < 0.05$); 图 7 同。

2.3.2 ABTS⁺ 清除能力的测定结果 由图 7 可见, 蒲桃籽中三萜类化合物对 ABTS⁺ 的清除率呈现一定的量效关系, IC_{50} 值为 12.16 $\mu\text{g/mL}$ 。在 1~25 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内, 随着蒲桃籽中三萜类化合物浓度的增大, 其对 ABTS⁺ 的清除能力增强, 且各浓度间清除能力具有显著差异 ($P < 0.05$), 当蒲桃籽中三萜类化合物浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时, 清除能力达到 91.29%, 略低于 V_C , 表现出很强的清除能力。与上述三萜类化合物对 DPPH· 清除能力相比, 其对 ABTS⁺ 的清除能力更强, 这可能是由于三萜类化合物具有较高的供氢能力, 结果与灵芝三萜类化合物类似^[30]。

从上述结果可以看出蒲桃籽中三萜类化合物对不同的自由基 (DPPH·、ABTS⁺) 均有较强的清除能力, 与 V_C 相近或略低, 抗氧化活性强, 可以作为潜在的抗氧化剂。

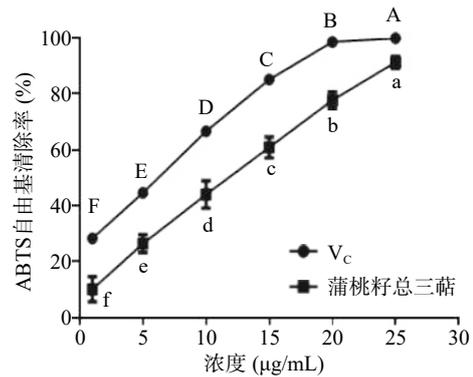


图 7 蒲桃籽总三萜、 V_C 的 ABTS⁺ 清除能力测定结果

Fig.7 Results of ABTS⁺ scavenging ability of total triterpenoids in the seeds of *S. jambos* L. Alston and V_C

3 结论

本研究以蒲桃籽为原料, 通过响应面优化得到蒲桃籽中三萜类化合物的最优提取工艺为: 甲醇体积分数 44.30%、料液比 1:47.18 mg/L、提取时间 101 min。在该工艺下, 实际得率 (12.11 mg/g) 与理论得率 (12.28 mg/g) 之间的偏差仅为 1.26% (<5%)。且蒲桃籽中三萜类化合物具有较强的 DPPH·、ABTS⁺ 清除能力 (与 V_C 相近或略低), IC_{50} 值分别为 24.93、12.16 $\mu\text{g/mL}$, 抗氧化活性较强。本研究为今后蒲桃资源的综合开发利用奠定了基础, 也为其日后作为天然糖尿病防治资源或者食品天然抗氧化剂等提供了数据支撑。

参考文献

- [1] BAI A Y, TAO L Y, HUANG J, et al. Effects of physical activity on cognitive function among patients with diabetes in China: a nationally longitudinal study[J]. *BMC Public Health*, 2021, 21(1): 481.
- [2] KAMALRAJ R, NEELAKANDAN S, KUMAR M R, et al. Interpretable filter based convolutional neural network (IF-CNN) for glucose prediction and classification using PD-SS algorithm[J]. *Measurement*, 2021, 183(9): 109804.
- [3] HOJS R, EKART R, BEVC S, et al. Markers of inflammation and oxidative stress in the development and progression of renal disease in diabetic patients[J]. *Nephron*, 2016, 133(3): 159-162.
- [4] RANI M P, ANUPAMA N, SREELEKSHMI M, et al. Chlorogenic acid attenuates glucotoxicity in H9c2 cells via inhibition of glycation and PKC α upregulation and safeguarding innate antioxidant status[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 100: 467-477.
- [5] ZHAO Y, CHEN S J, WANG J C, et al. Sesquiterpene lactones inhibit advanced oxidation protein product-induced MCP-1 expression in podocytes via an IKK/NF- κ B-dependent mechanism[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 2015: 934058.
- [6] 党娅, 尤丽, 杨彬彦. 蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠肝、肾损伤的改善作用 [J]. *食品工业科技*: 1-11 [2022-05-10]. [DANG Y, YOU L, YANG B Y. The improvement effect of blueberry anthocyanin on liver and kidney injury in type 2 diabetic mice[J]. *Science and Technology of Food Industry*: 1-11 [2022-05-10].]

- [7] 孙晓波, 张晓纯, 郭松, 等. 响应面法优化蒲桃叶总黄酮的提取工艺及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(2): 115-122. [SUN X B, ZHANG X C, GUO S, et al. Optimization of total flavonoid extraction from *Syzygium jambos* Leaves by response surface methodology and its antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2022, 43(2): 115-122.]
- [8] 温正辉, 凌梅娣, 余思萍, 等. 蒲桃不同药用部位乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性的抑制作用研究[J]. 中国药房, 2019, 30(23): 3246-3251. [WEN Z H, LING M D, YU S P, et al. Study on inhibitory effects of ethanol extract of different medicinal parts from *Syzygium jambos* on the activities of α -glycosidase and α -amylase[J]. China Pharmacy, 2019, 30(23): 3246-3251.]
- [9] 李玲, 黄能慧. 蒲桃种子提取物对四氧嘧啶糖尿病鼠血糖的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2004(5): 413-415. [LI L, HUANG N H. An experimental study on effects of *Syzygium jambos* (Linn.) seed extract on alloxan diabetes[J]. Journal of Guiyang Medical College, 2004(5): 413-415.]
- [10] 钱露, 刘萍, 雷雨欣, 等. 番石榴叶总三萜对STZ诱导糖尿病大鼠的降糖作用与相关机制[J]. 解剖学研究, 2018, 40(5): 407-411. [QIAN L, LIU P, LEI Y X, et al. Hypoglycemic effect and related mechanism of total triterpenoids from *Psidium guajawa* leaves on STZ-induced diabetic rats[J]. Anatomy Research, 2018, 40(5): 407-411.]
- [11] 刘灿, 马兰青, 孙媛霞. 罗汉果甜苷降糖机制及生物合成研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(11): 2023-2031. [LIU C, MA L Q, SUN Y X. Hypoglycemic mechanisms and biosynthesis of mogrosides from *Siraitia grosvenorii* fruit: A review[J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(11): 2023-2031.]
- [12] 林大都, 刘嘉炜, 李武国, 等. 蒲桃茎化学成分及其体外细胞毒活性研究[J]. 中草药, 2014, 45(14): 1993-1997. [LIN D D, LIU J W, LI W G, et al. Chemical constituents from stems of *Syzygium jambos* var. *jambos* and their *in vitro* cytotoxicity[J]. Chinese Herbal Medicines, 2014, 45(14): 1993-1997.]
- [13] LI Y Y, XU J L, YUAN C H, et al. Chemical composition and anti-hyperglycaemic effects of triterpenoid enriched *Eugenia jambolana* Lam. berry extract[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 28: 1-10.
- [14] 林大都. 蒲桃属药用植物蒲桃化学成分研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013. [LIN D D. Studies on the chemical constituents from the stem of *Syzygium jambos*[D]. Guangzhou: Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2013.]
- [15] 杨瑶, 李渊渊, 黄玉平, 等. 阔叶蒲桃中三萜类化学成分研究[J]. 云南师范大学学报(自然科学版), 2021, 41(6): 38-43. [YANG Y, LI Y Y, HUANG Y P, et al. Triterpenoids from *Syzygium latilimum*[J]. Journal of Yunnan Normal University (National Sciences Edition), 2021, 41(6): 38-43.]
- [16] 林继辉, 赖俊杰, 刘蒙佳. 响应面法优化超声波提取杏鲍菇三萜化合物的工艺研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2021, 30(2): 111-117. [LIN J H, LAI J J, LIU M J. Optimization of ultrasonic extraction of triterpenoids from *Pleurotus eryngii* with the response surface methodology[J]. Journal of Yunnan Nationalities University: Natural Sciences Edition, 2021, 30(2): 111-117.]
- [17] 陈琼, 许雪华, 蒋变玲. 大麦若叶青汁粉总三萜超声提取工艺研究[J]. 兰州文理学院学报(自然科学版), 2021, 35(2): 39-45. [CHEN Q, XU X H, JIANG B L. Researches on ultrasonic extraction of total triterpenes from barley young leaves[J]. Journal of Lanzhou University of Arts and Science (Natural Science), 2021, 35(2): 39-45.]
- [18] 孙晓波, 吴慧贤, 王小明, 等. 蒲桃叶多酚微波辅助提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(4): 34-42. [SUN X B, WU H X, WANG X M, et al. Optimization of polyphenols from *Syzygium jambos* leaves by microwave-assisted extraction and its antioxidant activity[J]. China Food Additives, 2022, 33(4): 34-42.]
- [19] 杨婷婷, 房雷雷, 辛慧洁, 等. 响应面法优化超声辅助提取酸枣仁中阿魏酰斯皮诺素[J]. 食品工业, 2019, 40(4): 151-155. [YANG T T, FANG L L, XIN H J, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of 6'-feruloylspinosin from *Zizyphi spinosae* semen by response surface methodology[J]. The Food Industry, 2019, 40(4): 151-155.]
- [20] 李颜桃, 仲崇华, 张健荣, 等. 沙棘籽多酚超声耦合真空提取工艺的研究[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(11): 151-156. [LI Y T, ZHONG C H, ZHANG J R, et al. Ultrasonic coupled vacuum extraction process of polyphenols from *Hippophae hamnoides* seed[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 36(11): 151-156.]
- [21] 付亚玲, 姚俊修, 张仁堂. 响应面法优化黑化红枣三萜酸提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 176-183. [FU Y L, YAO J X, ZHANG R T. Optimization of extraction and antioxidant activities of triterpenic acids from blacked jujube by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(12): 176-183.]
- [22] JAMUNA S, SAKEENAK S S, ASHOKKUMAR R, et al. Potential antioxidant and cytoprotective effects of essential oil extracted from *Cymbopogon citratus* on OxLDL and H₂O₂ LDL induced Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)[J]. Food Science and Human Wellness, 2017, 6(2): 60-69.
- [23] NORZAGARAY V C D, VALDEZ O A, SHELTON L M, et al. Residual biomasses and protein hydrolysates of three green microalgae species exhibit antioxidant and anti-aging activity[J]. Journal of Applied Phycology, 2017, 29(1): 189-198.
- [24] 姚秋娟, 冯嵩, 王玉启, 等. 圆齿野鸦椿果皮总三萜的提取工艺及其抗肿瘤活性[J]. 中国现代中药, 2020, 22(10): 1689-1695. [YAO Q J, FENG H, WANG Y Q, et al. Study on extraction technology and anticancer activity of triterpenoids extracted from *Euscaphis konishii* Pericarp[J]. Modern Chinese Medicine, 2020, 22(10): 1689-1695.]
- [25] 景炳年, 魏磊, 周雍, 等. 山银花总三萜超声辅助提取工艺优化及其抗菌抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 174-181. [JING B N, WEI L, ZHOU Y, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction process for total triterpenoids from *Lonicera confuse* and its antibacterial and antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(1): 174-181.]
- [26] 段丽萍, 孙炜炜, 苗丽坤, 等. 艾叶总三萜的提取工艺优化及其抑菌活性[J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 88-95. [DUAN L P, SUN W W, MIAO L K, et al. Extraction optimization of total

- triterpenoids from *Artemisia argyi* and its antibacterial activity[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(5): 88–95.]
- [27] 王君. 丙酮-甲醇混合物萃取精馏分离过程合成与模拟[J]. *安徽理工大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(4): 6–9. [WANG J. Synthesis and simulation of extractive distillation separation process for acetone-methanol mixture stream[J]. *Journal of Anhui University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2016, 36(4): 6–9.]
- [28] 邹思, 易骏, 吴岩斌, 等. 虎奶菇菌核总三萜提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. *海峡药学*, 2020, 32(1): 25–29. [ZOU S, YI J, WU Y B, et al. Optimization of extraction process of total triterpenoids and antioxidant activity of the sclerotia from *Pleurotus tuber-regium*[J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2020, 32(1): 25–29.]
- [29] 李玉珍, 肖怀秋, 赵谋明, 等. 冷榨花生粕蛋白多肽-亚铁螯合物制备工艺优化及结构分析[J]. *中国粮油学报*, 2017, 32(4): 64–69. [LI Y Z, XIAO H Q, ZHAO M M, et al. Optimization of preparation technology for cold-pressed peanut meal albumen polypeptide-ferrous chelator and structure analysis[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2017, 32(4): 64–69.]
- [30] DONG Q Y, HE D J, NI X D, et al. Comparative study on phenolic compounds, triterpenoids, and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* affected by different drying methods[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2019, 13(4): 3198–3205.]