

菱角壳中总黄酮提取工艺的优化

Optimization of extraction of total flavonoids from water caltrop pericarp

刘冬敏<sup>1,2</sup> 王建辉<sup>1</sup> 刘永乐<sup>1</sup> 谭力<sup>2</sup> 王斌<sup>2</sup>

LIU Dong-min<sup>1,2</sup> WANG Jian-hui<sup>1</sup> LIU Yong-le<sup>1</sup> TAN Li<sup>2</sup> WANG Bin<sup>2</sup>

(1. 湖南省水生生物资源食品加工工程技术研究中心, 湖南 长沙 410114;

2. 湖南科技学院化学与生物工程学院, 湖南 永州 425199)

(1. Hunan Provincial Engineering Research Center for Food Processing of Aquatic Biotic Resources, Changsha, Hunan 410114, China; 2. School of Chemistry and Bioengineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou, Hunan 425199, China )

**摘要:**为优化超声波辅助提取菱角壳总黄酮工艺,在单因素试验基础上,采用 Box-Behnken 中心组合设计原理和响应面分析法对提取温度、提取时间、乙醇浓度等主要参数进行优化,并建立回归模型。结果表明,该模型较好地反映了总黄酮提取得率各主要参数的关系;优化得到的最佳工艺条件为提取温度 72 ℃,提取时间 38 min,乙醇浓度 52%。该条件下,菱角壳总黄酮提取得率为 5.61%,与模型预测值相符,该工艺可用于菱角壳总黄酮的提取。

**关键词:**菱角壳;总黄酮;超声波;辅助提取;工艺优化

**Abstract:** In order to optimize ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from water caltrop pericarp, response surface methodology was used to acquire regression models for optimization of extraction temperature, extraction time and ethanol concentration based on single factor investigations. The results showed that this model reflected good relationship of the flavonoids yield and these factors. The optimal conditions for achieving the high extraction yield of flavonoids were temperature of 71.77 ℃, time of 37.96 min and ethanol concentration of 51.82%. Under the optimum conditions, the extraction yield of flavonoids reached 5.61% and fitted the models well. The obtained model could be used for extraction of total flavonoids from water caltrop pericarp.

**Keywords:** water caltrop pericarp; total flavonoids; ultrasonic; assisted extraction; process optimization

菱角(*Trapa spp.*)又称水栗、龙角,是中国传统的水生

经济作物。其脆嫩多汁,营养丰富,被历代医家视为“养生之果”<sup>[1]</sup>。中国菱角资源丰富,种植面积达 4 万 hm<sup>2</sup>,年产量约 24 万 t<sup>[2]</sup>。菱角壳是菱角加工的主要副产物,约占菱角质量的 25%。其富含多糖、多酚、黄酮等多种生理活性成分,日益受到了食品、医药行业的青睐<sup>[3-4]</sup>。然而,菱角加工中往往将其废弃或作青储饲料、堆肥之用,不仅浪费了大量菱壳资源,还造成了环境污染<sup>[5]</sup>。已有研究<sup>[6-9]</sup>报道菱角壳中的黄酮类化合物具有良好的抗氧化、抑制癌细胞增殖、减缓细胞氧化损伤等功效。前人<sup>[10-13]</sup>曾采用正交试验或响应面试验研究菱角壳中黄酮的提取工艺,但均存在提取试剂有害或提取率低的问题,不能有效应用于工业生产。为了综合利用菱角资源,提高产品附加值,本研究拟以乙醇作为提取溶剂,采用超声波辅助提取方法从菱角壳中提取总黄酮,并运用响应面法优化其提取工艺,旨在为黄酮物质的分离纯化及鉴定,以及菱角壳的综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菱角壳:采自湖南湘潭市;

芦丁标准品:99%,美国 Sigma 公司;

氢氧化钠、乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

电子天平:BS124S 型,德国赛多利斯集团;

紫外可见分光光度计:UV2800SPC 型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;

高速冷冻离心机:GL20 型,长沙英泰仪器有限公司;

旋转蒸发器:RE-52A 型,西安予辉仪器有限公司;

循环水真空泵:SHZ-DIII 型,西安予辉仪器有限公司;

超声波提取机:BILON-1000CT 型,上海比朗仪器制造有限公司;

粉碎机:LK-2000A 型,新昌县城关红利数控制造厂;

**基金项目:**湖南省水生生物资源食品加工工程技术研究中心开放基金资助项目(编号:2015GCZX08);湖南科技学院科学研究项目(编号:14XKY107)

**作者简介:**刘冬敏,女,湖南科技学院助教,硕士。

**通讯作者:**王建辉(1980—),男,长沙理工大学教授,博士。

E-mail: wangjh0909@163.com

**收稿日期:**2015-11-25

电热炉:TLD 型,上海化科实验器材有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 原料预处理 取新鲜菱角壳于 80 ℃烘干至恒重,粉碎过 100 目筛,经石油醚脱脂后备用。

1.2.2 菱角壳总黄酮的测定 参考文献[14]的方法绘制标准曲线,并测定黄酮含量,所得标准曲线回归方程为: $y=1.052\ 7x-0.017\ 2(R^2=0.998\ 0)$ 。按式(1)计算黄酮提取率。

$$E=\frac{C\times V\times V_1}{W\times V_2\times 1\ 000}\times 100\%,\tag{1}$$

式中:  
 $E$ ——样品总黄酮提取得率,%;  
 $C$ ——经吸光度值计算得出的总黄酮浓度,mg/mL;  
 $V_1$ ——测定吸光度时样液定容后的体积,mL;  
 $V$ ——提取样品溶液总体积,mL;  
 $V_2$ ——检测时所取提取样液的体积,mL;  
 $W$ ——试样质量,g。

1.2.3 菱角壳总黄酮提取及响应面设计

(1)菱角壳总黄酮提取条件的初步确定:取 10.00 g 菱角壳原料于 500 mL 烧杯中,加入乙醇提取剂,置于超声提取机中提取,5 000 r/min 离心 10 min,收集上清液并定容至 100 mL。按 1.2.2 中的方法测定菱角壳中总黄酮的提取得率,通过单因素试验初步确定乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间、超声波功率这 5 个因素的水平。

(2)全因子试验设计:依据单因素试验结果,利用 Design-expert 8.06 软件设计(PB)Plackett-Burman 试验,选择单因素试验中提取率较高的条件为 PB 试验的 0 水平,筛选出乙醇浓度、料液比、提取温度、超声功率、提取时间中对总黄酮提取得率有显著影响的因素。然后通过最陡爬坡试验确定中心点,进行 Box-Benhknen 中心组合试验设计。

1.3 数据处理

采用 Design Expert 8.06 统计软件,按照 Central Composite 的原理进行回归试验设计并对数据进行分析,方差分析的显著性水平设置为 0.05。

2 结果与分析

2.1 PB 试验结果

经过单因素试验,初步确定乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间、超声波功率这 5 个因素的水平依次为 50%、1:25 (g/mL)、70 ℃、40 min、360 W。在此基础上进行 PB 试验设计,其水平编码及结果分别见表 1、2,用 Design Expert 8.06 对其进行回归模型方差分析,结果见表 3,得到回归方程:

$$Y=4.07+0.25A+0.067B+0.42C-0.11D-0.27E。$$

(2)

其  $P=0.018\ 0<0.05$ ,同时筛选出对总黄酮提取得率有显著影响的因素有乙醇浓度、提取温度和提取时间。

2.2 最陡爬坡试验

根据 PB 试验中各主要因素的效应大小设计最陡爬坡试验,结果见表 4。由此得出的最优值即为二次旋转中心组合设计的中心点,即 A(乙醇浓度)52%、C(提取温度)72 ℃、E(提取时间)38 min。

表 1 PB 设计因素及其编码水平

Table 1 Factors and levers in PB design

| 水平 | A 乙醇浓度/% | B 液料比<br>(mL·g <sup>-1</sup> ) | C 温度/<br>℃ | D 超声波<br>功率/W | E 时间/<br>min |
|----|----------|--------------------------------|------------|---------------|--------------|
| −1 | 40       | 20                             | 60         | 240           | 30           |
| 0  | 50       | 25                             | 70         | 300           | 40           |
| 1  | 60       | 30                             | 80         | 360           | 50           |

表 2 PB 设计方案及响应值

Table 2 PB design scheme and its response value

| 试验号 | A  | B  | C  | D  | E  | 总黄酮提取<br>得率/% |
|-----|----|----|----|----|----|---------------|
| 1   | −1 | −1 | −1 | −1 | −1 | 3.73          |
| 2   | 1  | −1 | 1  | 1  | 1  | 3.86          |
| 3   | −1 | 1  | 1  | −1 | 1  | 4.03          |
| 4   | 1  | −1 | 1  | 1  | −1 | 5.00          |
| 5   | 1  | 1  | −1 | 1  | 1  | 3.92          |
| 6   | −1 | −1 | 1  | −1 | 1  | 4.19          |
| 7   | 1  | 1  | 1  | −1 | −1 | 5.50          |
| 8   | −1 | −1 | −1 | 1  | −1 | 3.53          |
| 9   | 1  | −1 | −1 | −1 | 1  | 3.71          |
| 10  | 1  | 1  | −1 | −1 | −1 | 3.91          |
| 11  | −1 | 1  | 1  | 1  | −1 | 4.36          |
| 12  | −1 | 1  | −1 | 1  | 1  | 3.09          |

表 3 PB 试验方差分析<sup>†</sup>

Table 3 ANOVA of PB test

| 方差来源 | 自由度 | 均方        | F 值        | P 值     | 显著性 |
|------|-----|-----------|------------|---------|-----|
| 模型   | 5   | 0.783 253 | 6.878 494  | 0.018 0 | *   |
| A    | 1   | 0.731 313 | 6.422 356  | 0.044 4 | *   |
| B    | 1   | 0.053 092 | 0.466 254  | 0.520 2 |     |
| C    | 1   | 2.124 931 | 18.661 040 | 0.005 0 | * * |
| D    | 1   | 0.141 217 | 1.240 162  | 0.308 1 |     |
| E    | 1   | 0.865 714 | 7.602 659  | 0.033 0 | *   |
| 残差   | 6   | 0.113 870 |            |         |     |
| 总和   | 11  |           |            |         |     |

<sup>†</sup> \* \* 表示极显著(P<0.01); \* 表示显著(P<0.05)。

表 4 最陡爬坡试验及结果

Table 4 Design and result of the steepest ascent experiment

| 试验号 | A  | C  | E  | 总黄酮提取得率/% |
|-----|----|----|----|-----------|
| 1   | 50 | 70 | 40 | 4.77      |
| 2   | 52 | 72 | 38 | 5.55      |
| 3   | 54 | 74 | 36 | 4.18      |
| 4   | 56 | 76 | 34 | 4.56      |
| 5   | 58 | 78 | 32 | 3.97      |
| 6   | 60 | 80 | 30 | 3.75      |

2.3 Box-Benhknen 设计及结果

根据最陡爬坡试验确定的中心点进行 Box-Benhknen 试验,响应面设计的水平编码及结果分别见表 5、6。

表 5 Box-Benhknen 试验设计因素和水平

Table 5 Factors and levels of Box-Benhknen experiment design

| 水平 | C 温度/℃ | E 时间/min | A 乙醇浓度/% |
|----|--------|----------|----------|
| −1 | 70     | 36       | 50       |
| 0  | 72     | 38       | 52       |
| 1  | 74     | 40       | 54       |

表 6 Box-Benhknen 设计方案及响应值

Table 6 Box-Benhknen design scheme and its response value

| 试验号 | C  | E  | A  | 总黄酮提取得率/% |
|-----|----|----|----|-----------|
| 1   | 0  | 1  | −1 | 4.38      |
| 2   | 0  | 0  | 0  | 5.73      |
| 3   | 1  | 0  | −1 | 4.01      |
| 4   | 1  | −1 | 0  | 4.27      |
| 5   | 0  | 0  | 0  | 5.47      |
| 6   | 0  | 0  | 0  | 5.81      |
| 7   | 1  | 0  | 1  | 4.21      |
| 8   | −1 | 1  | 0  | 4.94      |
| 9   | 0  | −1 | 1  | 3.96      |
| 10  | −1 | 0  | 1  | 4.27      |
| 11  | 1  | 1  | 0  | 3.86      |
| 12  | −1 | 0  | −1 | 4.19      |
| 13  | 0  | 0  | 0  | 5.53      |
| 14  | 0  | −1 | −1 | 5.13      |
| 15  | −1 | −1 | 0  | 4.37      |
| 16  | 0  | 0  | 0  | 5.49      |
| 17  | 0  | 1  | 1  | 4.39      |

使用 Design-Expert 8.0.6 软件进行二次响应面分析,得到的预测模型为:

$$Y=5.60-0.18C-0.019E-0.11A-0.24CE+0.029CA+0.29EA-0.77C-0.47E^2-0.66A^2。$$
 (3)

由表 7 可知,该模型回归显著( $P=0.002\ 4<0.01$ ),失拟项不显著( $P=0.066\ 0>0.05$ ),从决定系数  $R^2=0.933\ 0$  可看出,该模型的拟合程度较好,具有一定的实践指导意义。

2.4 响应曲面的拟合及最佳操作点的确定

图 1~3 是根据回归方程做出的响应面图。由图 1 可知,提取温度和提取时间对响应值的影响皆为明显的二次抛物线。温度的升高有利于分子解附和扩散,较长时间提取有利于黄酮溶出,提高提取得率。但温度过高或者提取时间太长,乙醇挥发、黄酮物质降解或者杂质溶出增多都会影响总黄酮提取得率<sup>[15-17]</sup>。由图 2、3 可知,总黄酮提取得率与乙醇浓度、提取温度、提取时间均有明显的二次抛物线关系,且

表 7 响应面方差分析<sup>†</sup>

Table 7 ANOVA of response surface

| 方差来源           | 自由度 | 均方        | F 值        | P 值     | 显著性 |
|----------------|-----|-----------|------------|---------|-----|
| 模型             | 9   | 0.761 415 | 10.825 040 | 0.002 4 | * * |
| C              | 1   | 0.249 737 | 3.550 516  | 0.101 5 |     |
| E              | 1   | 0.002 951 | 0.041 955  | 0.843 5 |     |
| A              | 1   | 0.097 086 | 1.380 276  | 0.278 5 |     |
| CE             | 1   | 0.238 662 | 3.393 054  | 0.108 0 |     |
| CA             | 1   | 0.003 339 | 0.047 472  | 0.833 7 |     |
| EA             | 1   | 0.346 727 | 4.929 416  | 0.061 9 | *   |
| C <sup>2</sup> | 1   | 2.520 819 | 35.838 510 | 0.000 5 | * * |
| E <sup>2</sup> | 1   | 0.944 263 | 13.424 590 | 0.008 0 | * * |
| A <sup>2</sup> | 1   | 1.855 739 | 26.383 060 | 0.001 3 | * * |
| 残差             | 7   | 0.070 338 |            |         |     |
| 失拟             | 3   | 0.132 229 | 5.527 868  | 0.066 0 |     |
| 净误差            | 4   | 0.023 920 |            |         |     |
| 总和             | 16  |           |            |         |     |

<sup>†</sup> \* \* 表示极显著( $P<0.01$ ); \* 表示显著( $P<0.05$ )。

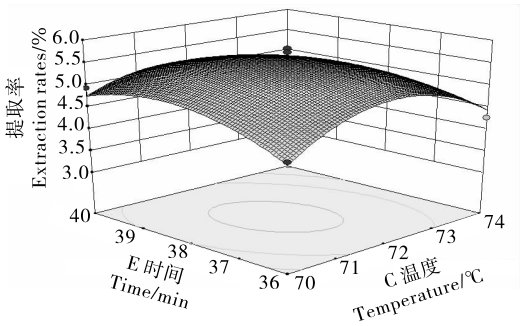


图 1 提取时间和提取温度交互影响总黄酮提取得率的响应面图

Figure 1 Response surface plot for effects of extraction time and temperature on extraction yield of total flavonoids

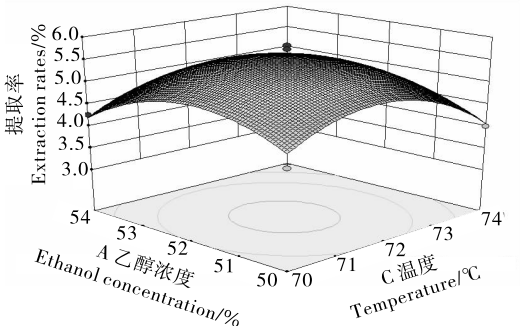


图 2 乙醇浓度和提取温度交互影响总黄酮提取得率的响应面图

Figure 2 Response surface plot for effects of ethanol concentration and extraction temperature on extraction yield of total flavonoids

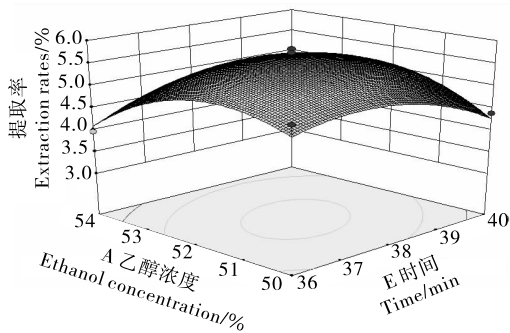


图 3 乙醇浓度和提取时间交互影响总黄酮提取得率的响应面图

Figure 3 Response surface plot for effects of ethanol concentration and extraction time on extraction yield of total flavonoids

乙醇浓度和提取时间具有显著的相互作用。通过 Design expert 8.06 软件进行二次响应面回归分析,响应曲面在 52% 的乙醇浓度、72 ℃、提取 38 min 时出现峰值,说明在一定的范围内,适当增大乙醇浓度至与黄酮类物质极性相近,适当提高提取温度,适当缩短提取时间有利于提高总黄酮提取得率。通过响应面优化,得出的最佳提取条件为:提取温度 71.77 ℃,提取时间 37.96 min,乙醇浓度 51.82%,此条件下总黄酮提取得率预测值为 5.62%。

2.2.5 验证实验 为方便实际操作,验证实验中将响应面优化所得的各工艺参数修正为提取温度 72 ℃,提取时间 38 min,乙醇浓度 52%。在此条件下得到的总黄酮平均提取得率为 5.61%,与预测值相符度为 99%。这说明响应面法优化得到的提取条件可靠,具有一定的实践价值。

### 3 结论

以乙醇作为提取溶剂从菱角壳中提取总黄酮,在单因素试验的基础上,运用 Design-Expert 8.0.6 软件进行 PB 试验设计、爬坡试验和 Box-Behnken 中心组合设计,得出菱角壳中总黄酮提取的最佳工艺条件为:提取温度 72 ℃,提取时间 38 min,乙醇浓度 52%。经验证,此条件下总黄酮提取得率为 5.61%,符合模型预测值,适合于菱角壳总黄酮的提取。与前人<sup>[10-13]</sup>研究结果相比,此工艺的提取得率更高,提取试剂安全无毒,能为菱角壳的综合利用提供依据。但在实际生产中,必须考虑乙醇试剂的回收及重复利用问题,以降低生产成本。

#### 参考文献

[1] 龙海荣. 菱角壳黄酮的提取、分离及抗氧化活性研究[D]. 广西: 广西大学, 2009: 1-3.

[2] 赵文亚. 菱角的营养保健功能及开发利用[J]. 农产品加工: 学刊, 2007(12): 43-44.

[3] 梁锦丽. 菱角的营养保健功能及其产品开发进展[J]. 农产品加工: 学刊, 2009(11): 78-80.

[4] 伍茶花, 丁扬洲, 裴刚, 等. 不同菱角壳提取物抑制肺癌 A549 细胞生长的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(1): 27-30.

[5] 唐劲松, 王海蓝, 严洪清, 等. 果蜡涂膜对菱角采后品质和生理的影响[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 142-148.

[6] Lin Qiu-sheng, Yu Hai-ning, Das U N, et al. Water caltrop pericarps extracts attenuate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Human umbilical vein endothelial cell injury[J]. Advanced Materials Research, 2012, 554-556: 1 757-1 761.

[7] Kim Y S, Hwang J W, Han Y K, et al. Antioxidant activity and protective effects of *Trapa japonica* pericarp extracts against tert-butylhydroperoxide-induced oxidative damage in Chang cells[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 64(2): 49-56.

[8] Yasuda M, Yasutake K, Hino M, et al. Inhibitory effects of polyphenols from water chestnut (*Trapa japonica*) husk on glycolytic enzymes and postprandial blood glucose elevation in mice [J]. Food Chemistry, 2014, 165(20): 42-49.

[9] Lin Qiu-sheng, Shen Jun-hui, Ning Ying, et al. Inhibitory effects of water caltrop pericarps on the growth of human gastric cancer cells in vitro[J]. Current Pharmaceutical Design, 2013, 19(42): 7 473-7 478.

[10] 李鹏婧, 柳旭光, 龙海荣, 等. 超声波辅助提取菱角壳总黄酮及抗氧化性研究[J]. 食品科技, 36(1): 167-171.

[11] 李维莉, 马银海, 张亚平, 等. 菱角壳总黄酮超声辅助提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 140-142.

[12] 宋棋芬, 高广春, 曹琳茸, 等. 南湖菱壳总黄酮的水提醇沉工艺[J]. 浙江农业科学, 2013, 1(8): 1 029-1 031.

[13] 侯莉莉, 徐燕燕, 吴佳琴, 等. 响应面法优化菱角壳总黄酮的提取工艺[J]. 农产品加工, 2015(8): 25-28.

[14] 柳旭光. 青钱柳黄酮的提取分离、抗氧化活性及其应用研究[D]. 广西: 广西大学, 2012: 92-93.

[15] 罗丽, 梁琪, 张炎, 等. 响应面法优化超声波辅助提取沙枣果总黄酮工艺[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 269-274.

[16] Wang Shi-hao, Kao Ming-yuan, Wu She-ching, et al. Oral administration of *Trapa taiwanensis* Nakai fruit skin extracts conferring hepatoprotection from CCl<sub>4</sub>-caused injury [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(8): 3 686-3 692.

[17] Tien-tso W U, Shiao S Y, Chang Rei-chu, et al. Effect of drying temperature and extraction solvent on the antioxidant, color and sensory properties of *Angelica Sinensis* leaves[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2013, 37(4): 371-379.