

超声波协同酶法提取菝葜中总黄酮工艺参数优化* Optimizing of Ultrasonic Assisted Enzymatic Extraction of Total Flavonoids from *Smilax china*

曾承露¹, 陈慈航¹, 黄庶识², 李 锋^{1,2**}

ZENG Chenglu¹, CHEN Cihang¹, HUANG Shushi², LI Feng^{1,2}

(1. 黔南民族师范学院化学化工学院, 贵州都匀 558000; 2. 广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530007)

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Qiannan Normal College for Nationalities, Duyun, Guizhou, 558000, China; 2. Laboratory of Biophysics of Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:【目的】为开发菝葜(*Smilax china*)资源提供理论和实践依据。【方法】采用超声波辅助酶法提取菝葜中总黄酮,通过单因素试验考察酶用量、pH 值、酶解时间和酶解温度对菝葜中黄酮得率的影响。在此基础上,再利用响应面法优化提取条件,研究 pH 值、酶解时间和酶解温度 3 个自变量之间的交互作用对黄酮得率的影响。【结果】最佳提取工艺条件为 pH 值 5. 10,酶解时间 48 min,酶解温度为 53℃,在此条件下总黄酮得率达到 2. 289%。【结论】该优化工艺合理可行,可用于菝葜中总黄酮的提取。

关键词:菝葜 总黄酮 酶法 超声波 响应面法

中图分类号: TQ461 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2017)04-0401-06

Abstract:【Objective】To provide theoretical and practical foundations for the exploitation of *Smilax china* resources, the total flavonoids in *Smilax china* were extracted by ultrasonic assisted enzyme method. 【Methods】The effects of enzyme dosage, pH value, hydrolysis time and hydrolysis temperature on the yield of flavonoids in *Smilax china* were investigated in single factor experiments. On the base of this, the optimum conditions for the extraction of total flavonoids from *Smilax china* were determined by using response surface methodology. And the effects of interaction between pH, hydrolysis time and enzymatic hydrolysis on the yield of flavonoids were studied. 【Results】The optimum conditions were as follows: pH was 5. 10, hydrolysis time was 48 min, and hydrolysis temperature was 53℃. Under these conditions, the total yield of flavonoids reached 2. 289%. 【Conclusion】The optimal technology is reasonable and feasible and can be used for the extraction of total flavonoids from *Smilax china*.

Key words: *Smilax china*, total flavonoids, enzymatic, ultrasonic, response surface methodology

收稿日期: 2017-06-11

作者简介: 曾承露(1986-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事天然产物提取分离研究。

* 贵州省教育厅自然科学研究青年项目(黔教合 KY[2015]459), 贵州省科学技术联合基金项目(黔科合 LH 字[2014]7418), 贵州省教育厅自然科学研究重点项目(黔教合 KY[2014]286)和贵州省大学生创新创业训练项目(201510670023)资助。

** 通信作者: 李 锋(1982-), 男, 讲师, 主要从事天然产物功能研究, E-mail: huagonglff@163. com。

0 引言

【研究意义】菝葜(*Smilax china* L.), 又名金刚藤, 其用药部位为百合科菝葜属植物的干燥根茎, 为《中国药典》2010 年版所收载品种, 大多数分布于长江以南各省, 其中贵州产 33 种、3 变种, 分布于全省

各地,为贵州民间用中药,主要用于治疗痢疾、肠胃炎、风湿性关节炎和跌打损伤等,还可用于胃癌、食管癌、直肠癌、糖尿病等的治疗^[1-2]。菝葜被广泛应用于治疗各种疾病,得益于其含有丰富的有效成分,如皂苷类、黄酮类、甾醇类等^[3-4]。【前人研究进展】关于菝葜黄酮类成分的研究已有较多报道,且研究表明,黄酮化合物可能是菝葜发挥药效的主要物质基础^[5-7]。目前菝葜有效成分提取仍采用传统提取技术——水提醇沉工艺,其活性成分很难得到保证,同时由于菝葜生长周期长,野生资源逐渐减少。因此,对现有提取工艺进行改革,可提高有效成分提取率从而达到充分利用植物资源和提高药物疗效的目的。【本研究切入点】酶法提取是一种较为新型的方法,具有提取黄酮类化合物的潜力。植物有效成分通常被包裹在细胞壁内,而细胞壁的主要成分为果胶质、纤维素和半纤维素等,用果胶酶和纤维素酶催化这些物质水解,破坏细胞壁,可减少扩散阻力,使细胞壁内的有效成分溶出。酶法提取条件温和、简单,克服活性成分在高温下易分解的缺点,是一种安全、有效、无污染的提取方法^[8]。超声波是利用超声空化效应,破坏细胞组织,有助于细胞内的活性物质溶出和扩散,具有效率高、时间短的优点^[9-10]。超声波辅助酶法兼具酶法和超声波法的优点,已用于芹菜总黄酮^[11]、锁阳多糖^[12]、香菇多糖^[13]等方面的研究,但尚未见用于提取菝葜黄酮的相关报道。【拟解决的关键问题】以野生菝葜为原料,采用响应面法对超声波协同酶法提取菝葜总黄酮的工艺条件进行优化,从而选取最佳工艺参数,以检验超声波耦合生物酶法获得中药活性成分的可行性,以期能为开发菝葜资源提供理论和实践依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

野生菝葜采自贵州省都匀市,洗净烘干后,将其粉碎过 80 目筛,储藏备用;芦丁标准品购自中国药品生物制品检定所;纤维素酶(酶活力/(U/g) ≥ 15 000,批号:20140319)和果胶酶(酶活力/(U/g) ≥ 50,批号:20131210)购自国药集团化学试剂公司;实验过程中所用化学试剂均为国产分析纯。

超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);HH-S2 型数显恒温水浴锅(郑州英峪予华仪器有限公司);AG-285 型十万分之一电子天平(赛多利斯);PHS-3C 型 pH 计(上海精密仪器);优普超纯水器(成都超纯水有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 标准曲线绘制

参照文献[14],标准曲线回归方程为 $Y = 14.714X + 0.0019, R^2 = 0.9998$ 。

1.2.2 提取液制备及总黄酮得率测定

称取 1.00 g 菝葜置于锥形瓶中,加入一定 pH 值水溶液,经超声波作用一段时间后,加入一定体积复合酶(等体积 1 mg/mL 果胶酶与 1 mg/mL 纤维素酶混合,下同),在一定温度下浸泡一定时间后,抽滤,离心;取上清液 1 mL 稀释一定倍数,按上述制作标准曲线方法分别加入化学试剂,在波长为 508 nm 下测定吸光度,代入回归方程计算样品液中黄酮类化合物的含量。按式(1)计算样品得率:

$$Y = \frac{c \times v \times n}{M \times 1000} \times 100\% \quad (1)$$

式中:Y 是总黄酮得率,%;c 是总黄酮浓度,mg/L;v 是样品体积,mL;n 是稀释倍数;M 是菝葜质量,g。

1.3 单因素试验

精密称取菝葜粉末 1 g,加入 50 mL 一定 pH 值水溶液后,使用功率 500 W 超声波清洗器作用 10~60 min,停止超声,加入一定量复合酶。依次以酶用量 0.2 mL、0.4 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL、1.4 mL;酶解时间 15 min、30 min、45 min、60 min、75 min、90 min;酶解温度 40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃;pH 值 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5;粒径 50 目、80 目、100 目、150 目、200 目为因素,提取液经过抽滤,离心,取上清液稀释一定倍数,按照 1.2 节项下测定溶液吸光度,考察以上因素对总黄酮提取率的影响。

1.4 响应面优化试验

综合考虑单因素试验结果,固定超声波作用时间和料液比,筛选出对总黄酮得率影响显著的因素进行后续优化试验。利用 Desing-Expert V8.0.6 的中心组合试验设计原理,选取 pH 值(A)、酶解时间(B)、酶解温度(C)3 个因素,以总黄酮得率为响应值,因素及水平见表 1。

表 1 响应面实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of reponse surface analysis

水平 Levels	因素 Factors		
	pH 值 pH value	酶解时间 Hydrolysis time(min)	酶解温度 Hydrolysis temperature(℃)
-1	4.5	30	45
0	5.0	45	50
+1	5.5	60	55

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 超声波作用时间对菝葜总黄酮得率的影响

由图1可知,随着超声波作用时间增加,总黄酮得率也随之增长;当超声波作用时间超过20 min后,总黄酮得率增加幅度明显变缓。这是因为随着作用时间的增加,溶质与溶剂的接触时间随之增加,总黄酮融入溶剂的量增多;20 min后总黄酮得率增幅明显降低,所以从节能降耗方面考虑,选取超声波作用时间20 min进行后续试验。

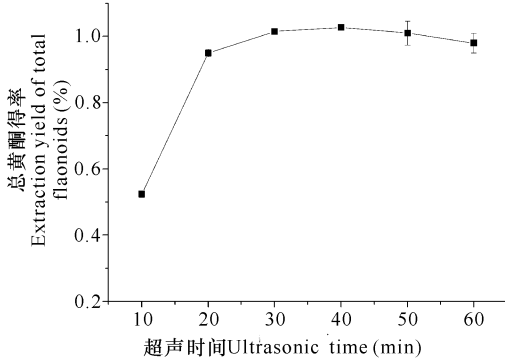


图1 超声时间对总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic time on the extraction yield of total flavonoids

2.1.2 酶用量对总黄酮得率的影响

由图2可知,随着酶用量的添加,总黄酮得率逐步提高;酶添加量超过0.4 mL,总黄酮得率并没有显著增加。这可能是由于酶添加量低于最佳值时,酶解不彻底,黄酮溶出的量少;酶添加量大于0.4 mL时,虽然酶解反应彻底,但考虑到提取成本问题,因此选择添加0.4 mL复合酶溶液为宜。

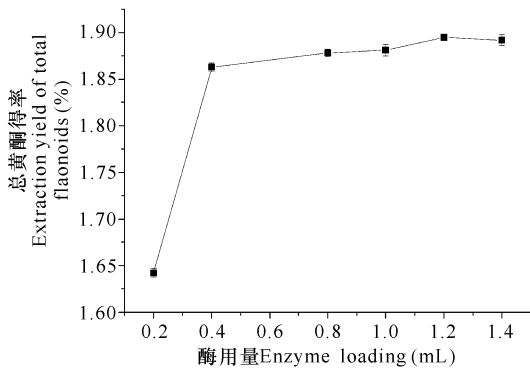


图2 酶用量对总黄酮得率的影响

Fig. 2 Effect of enzyme loading on the extraction yield of total flavonoids

2.1.3 pH值对总黄酮得率的影响

从图3可看出,随着pH值的增加,总黄酮得率明显增加,pH值5.0时达到最高值,pH值继续增

大,反而总黄酮提取率开始下降。这表明混合酶在pH值为5.0时具有较高的催化效率,所以选取pH值为5.0进行后续单因素试验。

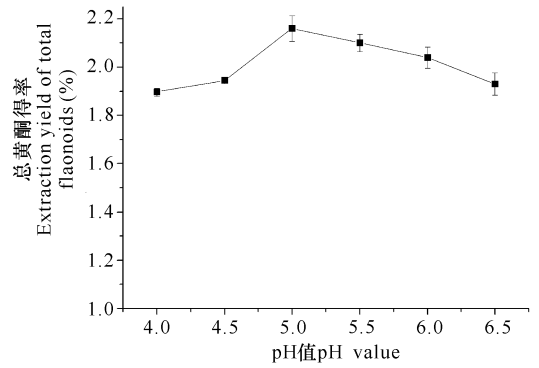


图3 pH值对总黄酮得率的影响

Fig. 3 Effect of pH on the extraction yield of total flavonoids

2.1.4 酶解时间对总黄酮得率的影响

由图4可知,菝葜总黄酮得率随酶解时间的增加不断升高,酶解时间为45 min时,达到最大值,45 min之后总黄酮得率开始缓慢下降。这是因为随着时间的增加,细胞内的黄酮释放融入溶剂中的量增多,但提取时间过长,溶液中的黄酮易被氧化,因此选择酶解时间为45 min进行后续试验。

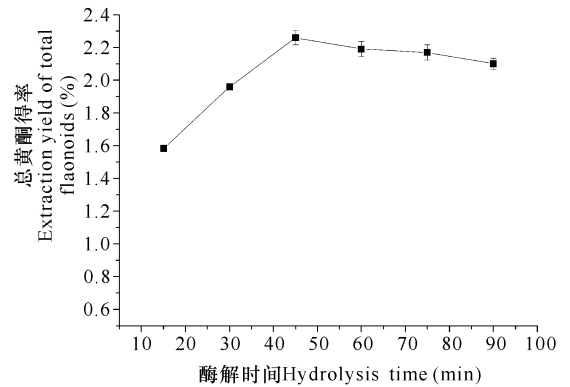


图4 酶解时间对总黄酮得率的影响

Fig. 4 Effect of hydrolysis time on the extraction yield of total flavonoids

2.1.5 酶解温度对总黄酮得率的影响

由图5可知,酶解温度对总黄酮得率有显著影响。当温度小于50℃时,随着酶解温度升高,总黄酮得率逐渐增加,说明温度使酶的活性逐渐增强,促进复合酶对细胞壁的破坏,有利于黄酮释放,从而提高总黄酮得率;当温度高于50℃后,提取率明显开始降低,可能是由于高温导致酶活性降低,也可能是由于高温导致黄酮分子结构发生变化。因此选择酶解温度为50℃。

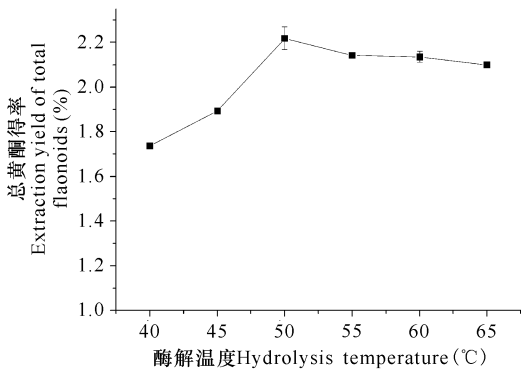


图5 酶解温度对总黄酮得率的影响

Fig. 5 Effect of hydrolysis temperature on the extraction yield of total flavonoids

2.1.6 粉末粒径对总黄酮得率的影响

由图6可知,随着菟蓿粉末直径越来越小,总黄酮提取率也逐步升高;粉末直径越小,其植物细胞结构破坏越严重,而且表面与酶溶液的接触面积也增大,从而进一步提高总黄酮得率。80目以后,总黄酮提取率增幅不明显,从经济角度考虑,选择80目的粉末作为后续试验。

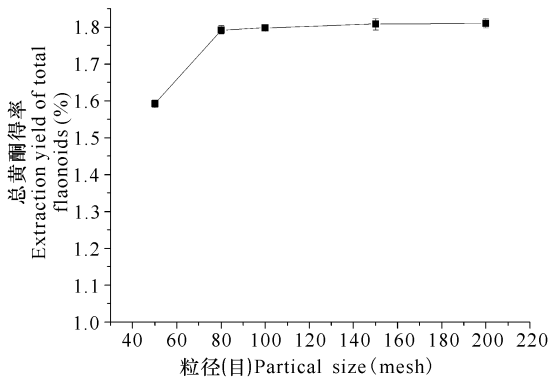


图6 粉末粒径对总黄酮得率的影响

Fig. 6 Effect of partical size on the extraction yield of total flavonoids

2.2 响应面法试验结果

2.2.1 响应面优化实验结果

采用 Desing - Expert V8.0.6 软件对表2中菟蓿总黄酮得率数据进行回归拟合分析,得到回归方程:

$$Y = -15.28225 + 6.4025A - 0.065133B + 0.10775C + 0.018667AB + 0.031AC + 1.3333 \times 10^{-4}BC - 0.877A^2 - 3.85556 \times 10^{-4}B^2 - 2.57 \times 10^{-3}C^2,$$

式中: Y 为总黄酮得率, A 、 B 和 C 分别为 pH 值、酶解时间和酶解温度。

由表3可知, $P < 0.0001$ 表明回归模型极度显著;失拟项 $P = 0.4456 > 0.05$, 表明失拟项差异不显著,说明回归模型与实验数据拟合度较高。 $R^2 =$

0.9834, 表明实测值与预测值高度相关,拟合度大于98%。在此试验设计中,模型方程的一次项 $C (P = 0.0011 < 0.05)$ 影响显著;二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 的 P 值均小于0.001,表明影响均极显著;交互项 AB 和 AC 的 P 值均小于0.01,表明影响也极显著。此回归模型结果说明各因素对总黄酮得率的影响不是简单的线性关系。

表2 试验设计表及结果

Table 2 Experimental design of Box-Behnken and corresponding results

试验号 No.	pH 值 pH value	酶解时间 Hydrolysis time(min)	酶解温度 Hydrolysis temperature(°C)	总黄酮得率 Yield of total flavonoids (%)
1	-1	-1	0	2.15
2	1	-1	0	1.88
3	-1	1	0	1.84
4	1	1	0	2.13
5	-1	0	-1	2.03
6	1	0	-1	1.91
7	-1	0	1	1.98
8	1	0	1	2.17
9	0	-1	-1	2.08
10	0	1	-1	2.10
11	0	-1	1	2.19
12	0	1	1	2.25
13	0	0	0	2.27
14	0	0	0	2.30
15	0	0	0	2.32
16	0	0	0	2.35
17	0	0	0	2.29

表3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance of Box-Behnken experiment

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	0.40	9	0.045	46.09	<0.0001
A	1.012×10^{-3}	1	1.012×10^{-3}	1.04	0.3411
B	5×10^{-5}	1	5×10^{-5}	0.052	0.8269
C	0.028	1	0.028	28.45	0.0011
AB	0.078	1	0.078	80.77	<0.0001
AC	0.024	1	0.024	24.75	0.0016
BC	4×10^{-4}	1	4×10^{-4}	0.41	0.5414
A^2	0.20	1	0.20	208.51	<0.0001
B^2	0.032	1	0.032	32.64	0.0007
C^2	0.017	1	0.017	17.91	0.0039
残差 Residual	6.795×10^{-3}	7	9.707×10^{-4}		
失拟 Lack of fit	3.075×10^{-3}	3	1.025×10^{-3}	1.10	0.4456
纯误差 Pure error	3.72×10^{-3}	4	9.3×10^{-4}		
总和 Total	0.41	16			

$R^2 = 0.9834$

注:差异显著 ($P < 0.05$), 差异极显著 ($P < 0.01$)

Note: Significant ($P < 0.05$), very significant ($P < 0.01$)

2.2.2 响应面交互因素分析

对表2实验结果进行二次多元回归拟合,得到二次回归方程的响应面图(图7)。通过响应面三维图,即可知任意两因素之间交互作用对黄酮得率的影响,并从中确定提取工艺的最佳水平范围。由图7可知,在所选的因素水平范围内存在最大值,即响应面的最高点。等高线形状越扁平表明因素之间的交互作用越显著,对响应值的影响越大^[15]。还可以看出三维曲线图底部投影的等高线图呈椭圆,即pH值与酶解温度、酶解时间两者之间交互作用对黄酮得率的影响显著。

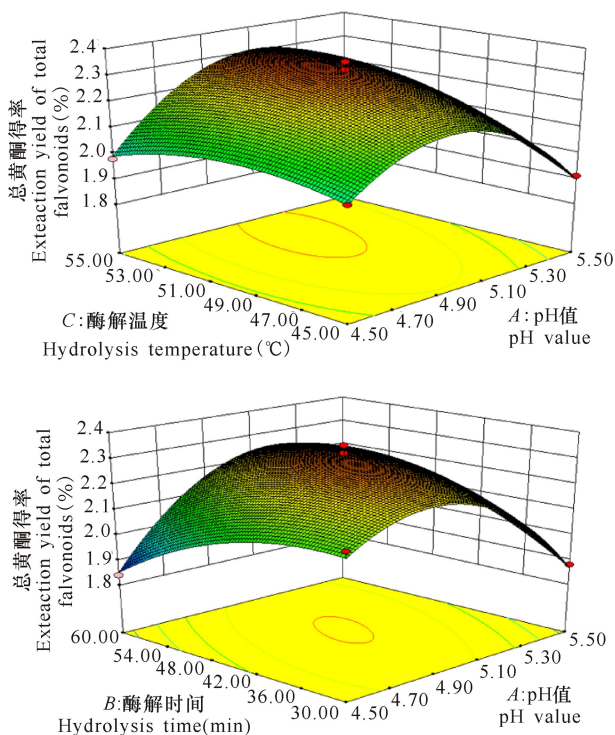


图7 各交互作用对总黄酮得率影响的响应曲面

Fig. 7 Response surface plots showing the interactive effects of different factors on the extraction yield of total flavonoids

2.2.3 最优条件预测及验证

通过 Design-Expert 软件求解回归方程得到最优提取工艺参数 pH 值、酶解时间和酶解温度分别为 5.10, 48.1 min 和 52.95°C 时,提取率预测值达到 2.325%。考虑到实验的可操作性,将提取工艺参数进行修正,选取 pH 值为 5.10,酶解时间为 48 min 和酶解温度为 53°C 进行 3 次验证试验,黄酮得率平均值为 2.289%,预测值和实验值相对误差 1.54%,表明响应面法所建立回归方程所预测的优化提取工艺参数准确可靠,具有实用价值。

3 讨论

试验采用超声波与生物酶法结合提取菝葜中黄
广西科学 2017年8月 第24卷第4期

酮类化合物。超声波在液体中通过高频振动,对菝葜粉末表面产生强大的剪切力,从而破坏植物细胞组织。超声波同时结合生物酶的高效、专一性,选择可以破坏植物细胞壁的纤维素酶和果胶酶,破坏植物细胞壁结构,使黄酮类化合物暴露并溶解或悬浮于溶剂中。基于以上原理建立超声耦合酶法提取菝葜黄酮类化合物,以期获得较高提取率。

实验发现,反应体系 pH 值、酶解温度和酶解时间对总黄酮得率都有显著影响。酶用量和粉末粒径虽然对黄酮提取率有一定影响,但随着酶用量和粒径目数增大,提取率增加并不显著,考虑到生产成本,故不再进一步优化。不同粉末粒径的提取率差异小的原因,可能是在超声作用过程中超声波空化致使细胞壁结构遭到破坏,变得松散。pH 值和温度直接影响酶活力,生物酶作用于细胞壁需要一段时间,因此各因素之间不是独立存在的,而是具有一定的交互作用。

4 结论

本实验在单因素的基础上筛选对黄酮得率影响显著的因素进行响应面优化分析,通过 Design-Expert 软件建立多元回归方程,得到最优工艺参数 pH 值、酶解时间和酶解温度分别为 5.10, 48 min 和 53°C,在此条件下黄酮得率为 2.289%,与预测值(2.325%)基本吻合。与传统提取方法相比,超声波辅助酶法具有选择性高、时间短、无有机溶剂污染等优点,且设备简单,有效成分溶出率显著提高,符合当今绿色化学技术的发展趋势,对菝葜有效成分的提取具有重要意义。

参考文献:

- [1] 李时珍. 本草纲目(校点本)[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:1293-1296.
LI S Z. Compendium of material medica[M]. Beijing: People's Medical Publishing House,1982:1293-1296.
- [2] 王志刚,秦民坚,郝利君,等. 超声法提取菝葜中总黄酮的正交实验研究[J]. 中国野生植物资源,2009,28(5):54-57.
WANG Z G, QIN M J, HAO L J, et al. Orthogonal test of total flavonoids extraction from *Smilax china* L. jones by ultrasonic method[J]. Chinese Wild Plant Resources,2009,28(5):54-57.
- [3] 徐燕,王海燕,蒋家月,等. 菝葜中的甾体皂苷及其细胞毒活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):92-96.
XU Y, WANG H Y, JIANG J Y, et al. Studies on steroidal saponins from *Smilax china* and their cytotoxic ac-

- tivities[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(11): 92-96.
- [4] 李燕婧, 钟正贤, 陈学芬. 黄杞总黄酮的抗血栓作用及其机理研究[J]. 广西科学, 2015, 22(2): 143-147.
LI Y J, ZHONG Z X, CHEN X F. Experimental study of total flavonoids of *Engelhardtia roxburghiana* on antithrombotic effects and its mechanisms [J]. Guangxi Sciences, 2015, 22(2): 143-147.
- [5] 晏绿金, 文莉, 干国平, 等. 菝葜抗炎活性物质筛选研究[J]. 中药材, 2008, 31(7): 1054-1056.
YAN L J, WEN L, GAN G P, et al. Screening anti-inflammatory from *Smilax china* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2008, 31(7): 1054-1056.
- [6] 曹波. 金刚藤含药血清对人肝癌 SMMC-7721 细胞 POLD1 基因表达的影响[D]. 南宁: 广西医科大学, 2013.
CAO B. Effect of *Smilax china* L. containing serum on the expression of POLD1 mRNA in human hepatocarcinoma[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2013.
- [7] 范银洲, 向海艳, 罗艳琴, 等. RP-HPLC 同时测定金刚藤 4 个黄酮类成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 62-65.
FAN Y Z, XIANG H Y, LUO Y Q, et al. Determination of four flavonoids in *Smilax china* by RP-HPLC [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2014, 20(10): 62-65.
- [8] 王芸芸, 李莉, 李香玉, 等. 复合酶法提取甘草渣中总黄酮[J]. 化学与生物工程, 2008, 25(8): 49-51.
WANG Y Y, LI L, LI X Y, et al. Composite enzymatic extraction of total flavonoids from licorice slag [J]. Chemistry & Bioengineering, 2008, 25(8): 49-51.
- [9] XIE J H, SHEN M Y, XIE M Y, et al. Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(1): 177-184.
- [10] PINGRET D, FABIANO-TIXIER A S, LE BOURVELLEC C, et al. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 111(1): 73-81.
- [11] 张翔宇, 谭兴和, 蔡文, 等. 超声波协同酶法提取芹菜中总黄酮的工艺优化[J]. 中国酿造, 2015, 34(1): 50-53.
ZHANG X Y, TAN X H, CAI W, et al. Optimization of total flavonoids extraction technology from celery by ultrasonic-enzyme synergistic method [J]. China Brewing, 2015, 34(1): 50-53.
- [12] 张慧瑛, 罗光宏, 郝军元, 等. 超声波-生物酶法提取锁阳多糖工艺优化及其抗肿瘤活性[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 59-64.
ZHANG H Y, LUO G H, HAO J Y, et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from *Cynomorium songaricum* and their antitumor activity [J]. Food Science, 2016, 37(12): 59-64.
- [13] 张双灵, 李文香, 赵海燕, 等. 超声波协同酶法提取香菇多糖的工艺优化[J]. 食品科技, 2016, 41(3): 192-196.
ZHANG S L, LI W X, ZHAO H Y, et al. Lentinan extraction by amylase assistant with ultrasonic [J]. Food Science and Technology, 2016, 41(3): 192-196.
- [14] 黄德娜, 李锋, 曾承露. 复合酶法提取鱼腥草中黄酮类化合物工艺优化[J]. 食品科技, 2016, 41(7): 211-216.
HUANG D N, LI F, ZENG C L. Optimizing conditions for enzymatic extraction of flavonoids from *Houttuynia cordata* Thund [J]. Food Science and Technology, 2016, 41(7): 211-216.
- [15] 宋丽军, 侯旭杰, 李雅雯, 等. 核桃青皮中多酚的超高压提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 178-182.
SONG L J, HOU X J, LI Y W, et al. Extra-high pressure extraction of polyphenols from walnut green peels by response surface methodology [J]. Food & Machinery, 2015, 31(4): 178-182.

(责任编辑: 尹 闯)