

# 响应面法优化黄金茶总黄酮提取工艺及对胰蛋白酶活性影响的研究

王宁, 林小翠, 王文君

(江西农业大学食品科学与工程学院, 江西南昌 330045)

**摘要:**以黄金茶为原材料,采用超声辅助法提取黄金茶的总黄酮,研究了超声时间、超声功率、乙醇体积分数、料液比对得率的影响。在此基础上,采用 Box-Behnken 中心组合法进行 4 因素 3 水平试验设计,以黄金茶总黄酮得率为响应值,进行响应面分析,并初步探究经聚酰胺树脂纯化的黄酮对胰蛋白酶活性的影响。得到最优工艺条件为:超声时间 30 min、超声功率 57.59 W、乙醇体积分数 52.03%、料液比 1:23.85。在此工艺下总黄酮的得率为 19.38%±0.12%,实际值与预测值之间的相对误差仅为 1.9%,变异系数仅为 0.6%,重复性比较好。同时建立了乙醇溶液提取黄金茶总黄酮的二次数学模型,对目标产物提取具有良好的预测作用。在此工艺条件下得到的总黄酮经聚酰胺树脂纯化,30%的乙醇洗脱浓缩。纯化后的黄酮对胰蛋白酶的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 1.36 mg/mL。

**关键词:**黄金茶;总黄酮;超声波;响应面法;胰蛋白酶

文章编号:1673-9078(2018)03-121-130

DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.03.018

## Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu. Leaves by Response Surface Methodology and Its Effect on Trypsin Activity

WANG Ning, LIN Xiao-cui, WANG Wen-jun

(College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** Using *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu. leaves as raw material, the total flavonoids of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu. leaves were extracted by ultrasonic-assisted method. The effects of ultrasonic time, ultrasonic power, ethanol volume fraction, solid-liquid ratio on the yield were investigated. On the basis of single factor tests, Box-Behnken center combination experiment was used to carry out four factors and three levels experiment design. The yield of total flavonoids of *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu. leaves was used as the response value for the response surface analysis, and the effect of the flavonoids purified from polyamide resin on the trypsin activity was explored. The optimal process conditions were as follows: ultrasonic time 30 min, ultrasonic power 57.59 W, ethanol concentration 52.03% and solid-liquid ratio 1: 23.85. Under these conditions, the yield of total flavonoids was 19.38% ± 0.12%. The relative error between the actual value and the predicted value was only 1.9%, and the coefficient of variation was only 0.6%. The extraction method also showed good repeatability. A second mathematical model of total flavonoids extracted from ethanol solution was established, which has a good predictive value for the extraction of the target product. The total flavonoids obtained were purified by polyamide resin and concentrated by elution with 30% ethanol. The half-inhibitory concentration value (IC<sub>50</sub> value) of the purified flavonoids on trypsin was 1.36 mg/mL.

**Key words:** *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu; total flavonoids; ultrasonic; response surface methodology; trypsin

黄金茶,学名柳叶腊梅(*Chimonanthus salicifolius*

收稿日期:2017-10-24

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31560459);江西省科技厅农业处重点项目(20141BBF60034);江西省高等学校科技落地计划资助项目(KJLD13027)

作者简介:王宁(1992-),女,在读硕士,主要从事食品营养学研究

通讯作者:王文君(1971-),男,教授,博士生导师,主要从事食品化学与分子营养学研究

*S. Y. Hu.*),别名山腊梅,浙南又称石凉茶,香风茶,岩马桑,茅山茶食,属真蕨目、为腊梅科(*Calycanthaceae*)蜡梅属(*Chimonanthus Lindl.*)半常绿灌木植物,主要分布于安徽南部、湖北、湖南、浙江和江西等地<sup>[1]</sup>。山腊梅中含有挥发油、生物碱、黄酮、香豆素、萜类、微量元素、维生素和 18 种矿物质等天然活性成分<sup>[2,3]</sup>,因而具有降血糖<sup>[4]</sup>、免疫调节<sup>[5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6]</sup>、消脂降压和预防心脑血管疾病等作用<sup>[7]</sup>。20

世纪 70 年代起,山蜡梅叶制成的制剂有山蜡梅叶颗粒、山蜡梅叶片、山蜡梅叶胶囊、山蜡梅清感茶和脾胃舒胶囊等各种制剂均已进入市场,其使用量逐年增加,也是畲族群众最常用的畲药之一<sup>[2,8]</sup>。山蜡梅叶因能祛风解表;芳香化湿;可治疗流感,中暑,慢性支气管炎等症而被《中华本草》收录<sup>[8]</sup>,并在 2014 年经国家卫计委批准成为药食同源的新食品原料之一。

黄酮类化合物是一类具有 2-苯基色原酮结构的化合物,实际上是以黄酮为母核衍生的一类黄色色素,即以 C6-C3-C6 为基本碳架的一系列化合物,其在植物中主体部分与糖结合成苷类,小部分以苷元形式存在,具有抗心律失常、溶解血栓<sup>[9]</sup>、抗菌<sup>[10]</sup>、抗病毒<sup>[11]</sup>、镇痛和降血脂等作用<sup>[12]</sup>。如马莹娟等<sup>[13]</sup>证明柿叶黄酮类化合物能够明显改善亚急性衰老小鼠学习记忆能力,提高脑组织的抗氧化能力,降低脑内炎症水平,具有延缓脑衰老的作用。黄酮类化合物具有很多功能活性,在到达人体各部位之前必然会经过消化道,它与消化酶之间的相互作用将会成为今后研究的热点。胰蛋白酶是存在于人和动物肠道中的一种重要的消化酶,并且是所有胰脏蛋白酶原的共同激活剂<sup>[14]</sup>。正常情况下胰蛋白酶在血液中的含量非常低,但是胰腺炎、肺气肿、癌症及各种脑血管等疾病患者体内都存在过量的胰蛋白酶,现代医学证明,胰蛋白酶抑制剂对急性慢性胰腺炎、肺气肿和出血性休克等疾病有一定的疗效<sup>[15]</sup>。赵红辉等<sup>[16]</sup>证明二氢杨梅素的添加量为胰蛋白酶的 44 倍(摩尔比)时,对胰蛋白酶的催化活性抑制率达到 34.8%。植物黄酮是一类潜在的类胰蛋白酶抑制剂;胰蛋白酶既是消化酶,也对机体的新陈代谢起着至关重要的调节作用。初步探究黄金茶中的黄酮对胰蛋白酶的抑制作用,对于临床应用、新药设计具有一定的意义。

近年来,超声技术普遍用于提取植物中天然活性成分,如黄酮<sup>[16]</sup>、多酚<sup>[18]</sup>、多糖<sup>[19]</sup>、氨基酸<sup>[20]</sup>和果胶<sup>[21]</sup>等,该法具有耗时短、节省溶剂和降低能源消耗的优点;同时可提高化学动力学、溶解度以及试验的再现性<sup>[22]</sup>。盛丹丹等通过正交试验优化超声提取黄金茶中总黄酮的工艺<sup>[23]</sup>。与正交和均匀设计相比,Box-Behnken 设计可以评价指标和因素间的非线性关系,使用方便,条件预测性好,对实验影响因素的研究较为全面<sup>[24]</sup>。

本文以黄金茶为原材料,在单因素和响应面实验设计的基础上对黄金茶中的总黄酮提取工艺进行优化,旨在获得最佳的工艺参数,为黄金茶的综合开发利用提供理论依据。同时初步探究黄金茶总黄酮经聚酰胺树脂,30%乙醇洗脱液纯化后的产物对胰蛋白酶

活性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

黄金茶,采自浙江丽水,粉碎后过 60 目筛备用;硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠、乙醇,均为国产分析纯;聚酰胺(60~80 目),上海摩速科学器材有限公司;芦丁标准品,成都曼思特生物科技有限公司;苯甲酰精胺对硝基苯胺(BApNA)、胰蛋白酶、Tris.cl(pH=7.4),购自北京索莱宝有限公司;冰醋酸、二甲亚砜(DMSO),西陇科学股份有限公司。

GPX-9248A 干燥箱/培养箱(两用),上海跃进医疗器械厂;AUY120 型电子天平,日本岛津有限公司;V-5600 可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;SHZ-D 循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限公司;M2 型酶标仪,美国 Molecular Device 公司;Scientz-10N 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司 HH-60;数显恒温搅拌循环水箱,常州国华电器有限公司;FLB-100 型万能高速粉碎机,上海菲力博食品机械有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 样品预处理

将黄金茶叶子用微型植物试样粉碎机粉碎,过 60 目筛备用。

将最优工艺提取出的黄酮过聚酰胺树脂纯化,用 30%的乙醇洗脱,旋蒸,并冷冻干燥,配制成一系列浓度的样品溶液。

#### 1.2.2 总黄酮含量的测定

##### 1.2.2.1 芦丁标准曲线制备

根据参考文献<sup>[25,26]</sup>,精确称取 60 °C 下烘干至恒重的芦丁标准品 10 mg 于小烧杯中,加一定 70%的乙醇溶解,转移到 25 mL 容量瓶中,摇匀并定容,即为 0.4 mg/mL 的标准溶液。精确吸取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 的标准溶液,分别置于 6 个 25 mL 容量瓶中,加 5%的亚硝酸钠 0.3 mL,静置 6 min,再加 10%的 Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 0.3 mL,静置 6 min,最后加 4%的氢氧化钠溶液 4 mL,用 70%的乙醇定容至刻度,摇匀,放置 15 min 后用可见分光光度计在 510 nm 波长下测定吸光度,绘制芦丁标准曲线。

##### 1.2.2.2 黄金茶中总黄酮得率的测定

准确称取黄金茶粉末 0.25 g 于 25 mL 容量瓶中,加入定量一定浓度的乙醇溶液,在一定超声功率下,

超声一定时间,将提取液转移至 25 mL 容量瓶中,用相应浓度的乙醇定容至刻度,摇匀,过滤。准确吸取 1 mL 滤液于 25 mL 容量瓶中,按照标准曲线中的显色方法显色,测定吸光度,根据回归方程,计算总黄酮的含量,得出得率:

$$\text{总黄酮得率}(\%) = (c \times 25 \times 25 \times 100\%) / (m \times 1000)$$

式中,  $c$  为 0.25 g 黄金茶粉末经乙醇提取后所得黄酮的浓度 (mg/mL);  $m$  为黄金茶粉末的质量 (g)。

### 1.2.3 单因素实验

#### 1.2.3.1 超声时间对得率的影响

准确称取黄金茶粉末 0.25 g 于 25 mL 容量瓶中,加入 5 mL (1:20) 的 70% 乙醇溶液,超声功率为 72 W,分别超声 10 min、15 min、20 min、25 min 和 30 min,将提取液转移至 25 mL 容量瓶中,用相应浓度的乙醇定容至刻度,摇匀,过滤。准确吸取 1 mL 滤液于 25 mL 容量瓶中,按照 1.2.2 的方法测定其得率,每组实验重复 3 次。

#### 1.2.3.2 超声功率对得率的影响

准确称取黄金茶粉末 0.25 g 于 25 mL 容量瓶中,加入 70% 的乙醇 5 mL (即料液比 1:20),分别在功率 36、54、72、90、108 W 条件下,作用 25 min,然后转移至 25 mL 容量瓶,用相应浓度的乙醇定容,摇匀后过滤。准确吸取 1 mL 滤液于 25 mL 容量瓶中,按照 1.2.2 的方法测定其得率,每组实验重复 3 次。

#### 1.2.3.3 乙醇提取分数对得率的影响

准确称取黄金茶粉末 0.25 g 于 25 mL 容量瓶中,分别加入体积分数为 40%、50%、60%、70% 和 80% 的乙醇溶液 5 mL,作用 25 min,然后转移至 25 mL 容量瓶,用相应浓度的乙醇定容,摇匀后过滤。分别取滤液 1 mL 于 25 mL 容量瓶,按照 1.2.2 的方法测定其得率,每组实验重复 3 次。

#### 1.2.3.4 料液比对得率的影响

准确称取黄金茶粉末 0.25 g 于 25 mL 容量瓶中,分别加入相应体积 60% 的乙醇溶液,使其料液比分别为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35,作用 25 min,超声功率为 72 W,然后转移至 25 mL 容量瓶,用相应浓度的乙醇定容,摇匀后过滤。分别取滤液 1 mL 于 25 mL 容量瓶,按照 1.2.2 的方法测定其得率,每组实验重复 3 次。

### 1.2.4 响应面实验设计

由单因素实验得到的结果,采用响应面法中的 Box-Behnken 的中心组合实验,选择对黄金茶总黄酮得率具有显著影响的四个因素:超声时间 (A)、超声功率 (B)、乙醇体积分数 (C) 和料液比 (D),采用四因素三水平的响应面实验设计,见表 1。

表 1 Box-Behnken 实验设计

Table 1 Experimental design of Box-Behnken

因素	水平		
	-1	0	1
A 超声时间/min	20	25	30
B 超声功率/W	54	72	90
C 乙醇体积分数/%	50	60	70%
D 液料比/(g/mL)	20:1	25:1	30:1

### 1.2.5 纯化后总黄酮对胰蛋白酶活性的影响

据参考文献<sup>[27]</sup>,试验方法略作调整。胰蛋白酶储存液配制:称取胰蛋白酶 6 mg,溶于 10 mL 的 Tris-HCl (pH=7.4) 缓冲液,其摩尔浓度为  $1 \times 10^{-6}$  mol/L。底物配制 (现配现用):称取 13 mg 的 BApNA,溶于 1 mL 二甲基亚砜 (DMSO),其摩尔浓度为 0.03 mol/L。配置 33% 的冰醋酸。

使用 96 孔板测定胰蛋白酶活性:先加入 50  $\mu$ L 的 Tris-HCl,然后加入 50  $\mu$ L 的 BApNA,再加入 50  $\mu$ L 的样品,37  $^{\circ}$ C 水浴 10 min,加入 80  $\mu$ L 的胰蛋白酶,37  $^{\circ}$ C 水浴 10 min,期间不断搅拌,最后加入 33% 的冰醋酸中止反应,并在 410 nm 处测定吸光度值,所有的试验重复三次。

$$\text{胰蛋白酶抑制率}(\%) = \left( \frac{A_{EG} - A_{BCG}}{A_{NCG} - A_{BG}} \right) \times 100$$

式中:为  $A_{EG}$  样品试验组的吸光度值;  $A_{BCG}$  为缓冲溶液代替酶的吸光度值;  $A_{NCG}$  为缓冲溶液代替样本的吸光度值;  $A_{BG}$  为缓冲溶液代替酶和底物的吸光度值。

### 1.2.6 数据分析

采用 F 检验对响应面实验数据进行方差分析以评价模型的统计学意义,数据分析软件采用 Design Expert 8.0.6。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线绘制

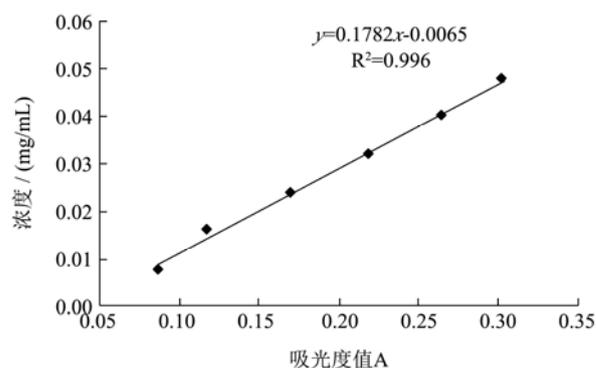


图 1 芦丁标准曲线

Fig.1 The standard curve of rufin

芦丁标准曲线的绘制以芦丁标准溶液浓度为纵坐标,以吸光度值 A 为横坐标,绘制芦丁标准曲线的散点图,如图 1,芦丁标准曲线的回归方程为  $y=0.1782x-0.0065$ ,  $R^2=0.996$ ,表明芦丁标准溶液在 0.087~0.302 mg/mL 范围内线性关系良好。

## 2.2 单因素分析

### 2.2.1 超声时间对黄金茶总黄酮得率的影响

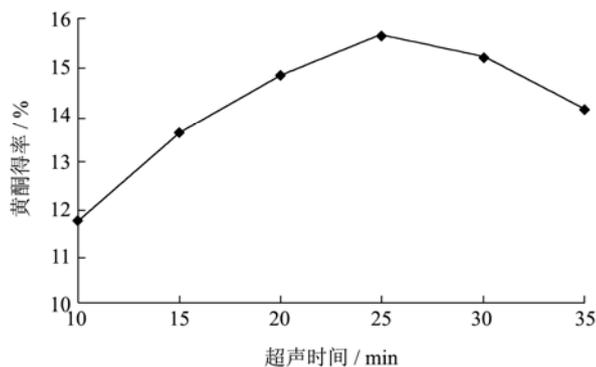


图 2 超声时间对黄金茶总黄酮得率的影响

Fig.2 The effect of ultrasonic time on the yield of total flavonoids

由图 2 可得,超声时间在 10~25 min 之间,黄金茶总黄酮的得率随着超声时间的延长而增加,在 25 min 时得率达到最高;之后,总黄酮的得率随着超声时间而略微下降,可能是由于超声波强烈的空化效应、机械振动、破碎作用,导致植物细胞膜破裂,细胞内其他物质如粘液的流出影响了提取效果;另一方面由于超声波的热效应,可能影响了黄酮类物质的稳定性及黄酮类物质在溶剂中达到了饱和。因此,选择超声提取时间为 20~30 min 进行 Box-Behnken 实验设计。

### 2.2.2 超声功率对黄金茶总黄酮得率的影响

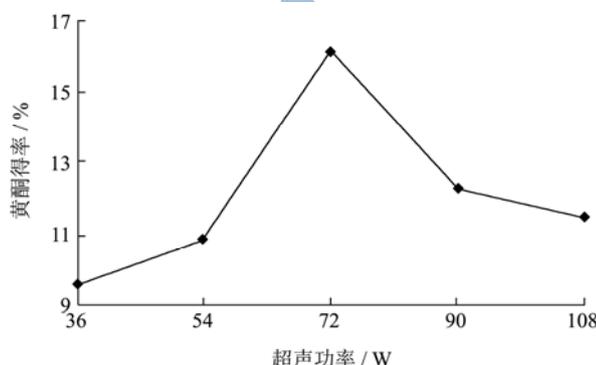


图 3 超声功率对黄金茶总黄酮得率的影响

Fig.3 The effect of ultrasonic treatment power on total flavonoids yield

由图 3 可得,当超声功率小于 72 W 时,总黄酮得率随着功率的增加快速提高,当功率超过 72 W 之后,其得率逐渐下降。这是因为超声波可以使植物细

胞壁形成较多的小孔,增强细胞膜的透性,利于胞内物质的溶出,但是功率过大会对黄酮类物质造成破坏,并且会增加能耗,增加提取成本<sup>[24]</sup>。因此,选择超声提取功率为 54~90 W 进行 Box-Behnken 实验设计。

### 2.2.3 乙醇提取分数对黄金茶总黄酮得率的影响

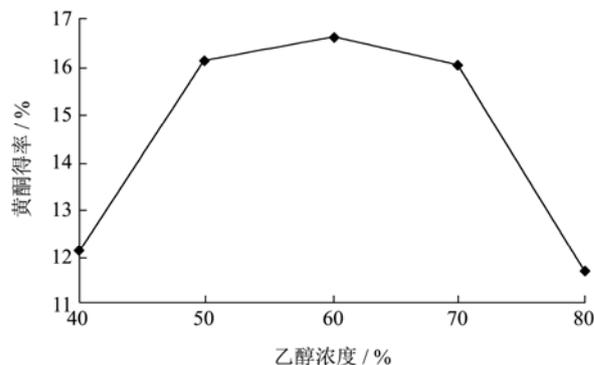


图 4 乙醇浓度对黄金茶总黄酮得率的影响

Fig.4 The effect of ethanol concentration on the yield of total flavonoids

由图 4 可得,乙醇体积分数为 40%~60% 时,提取效果随乙醇浓度的增加而增加,乙醇浓度超过 60% 时,总黄酮得率下降。这可能是乙醇体积分数过高,黄金茶的色素、脂溶性物质和糖类及黏性物质等物质大量渗出,影响总黄酮提取,同时破坏了黄酮的稳定性,导致了黄酮得率明显下降<sup>[28]</sup>。因此,选择乙醇体积分数为 50%~70% 进行 Box-Behnken 实验设计。

### 2.2.4 料液比对黄金茶总黄酮得率的影响

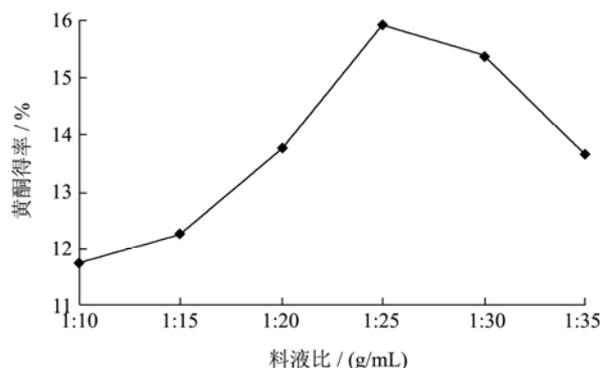


图 5 料液比对黄金茶总黄酮得率的影响

Fig.5 The effect of solid-liquid ratio on the yield of total flavonoids

由图 5 可得,料液比在 1:10~1:25 时,总黄酮得率逐渐升高,当料液比继续增大时,总黄酮得率略有下降。当料液比较小时,原料中的黄酮不能完全溶解到溶剂中,造成提取不完全、提取效率低。增大溶剂用量可以使内部的植物细胞和外部溶剂之间产生更大的浓度差,有利于黄酮的扩散更迅速地进行,因而具有较高的得率<sup>[29]</sup>。并且当料液比超过一定范围时,

可能使一些杂质溶出,与黄酮类物质竞争溶剂;或者杂质影响黄酮在溶剂中的溶解度。考虑到节能减排、提高效率,选择料液比为1:20~1:30进行Box-Behnken实验设计。

采用Design-Expert 6.0.1软件对表2中数据进行多项式拟合回归,建立多元二次回归模型: $Y(\%) = -43.055 + 1.534 \times A + 1.544 \times C - 0.054 \times D - 0.057 \times A^2 - 0.015 \times C^2 - 0.019 \times D^2 + 6.65 \times 10^{-3} \times A \times C + 0.041 \times A \times D$ ,实验因素对得率的影响不单单是线性关系,A、C、D、AC、AD对得率Y的影响非常显著。表3回归统计分析结果表明:模型的 $F=51.67$ , $p<0.0001$ ,表明实验的二次模型是非常显著的,具有统计学意义。失拟项 $p$ 值 $=0.0912>0.05$ ,决定系数经调整后 $R^2=0.9354$ ,说明所

得方程与实际拟合中非正常误差所占比例小,即失拟项是不显著的。结果显示此模型与实际结果是非常拟合的,可以科学地表示影响得率的各因素与响应值之间的关系,可用该模型对黄金茶中总黄酮得率进行很好地分析和预测。由表3可知,乙醇体积分数C( $p<0.0001$ )极显著,超声时间A( $p=0.002$ )高度显著。二次项 $A^2$ ( $p<0.0001$ ), $C^2$ ( $p<0.0001$ )极显著, $D^2$ ( $p=0.002$ )高度显著,超声时间和料液比的交互作用极显著。由 $p$ 值和F值可看出,各因素对黄金茶总黄酮得率影响的顺序为:乙醇体积分数>超声时间>料液比,超声功率对总黄酮的得率无影响效果。两因素的交互作用对总黄酮得率的影响极显著的是:超声时间和料液比的交互作用。

表2 Box-Behnken 实验设计及实验数据结果

Table 2 Box-Behnken experiment design and the experimental results

实验号	A(超声时间/min)	B(超声功率/W)	C(乙醇浓度/%)	D[料液比/(g/mL)]	黄酮得率/%
1	20	54	60	1:25	17.78
2	30	54	60	1:25	18.58
3	20	90	60	1:25	18.00
4	30	90	60	1:25	18.44
5	25	72	50	1:20	18.53
6	25	72	70	1:20	15.90
7	25	72	50	1:30	19.38
8	25	72	70	1:30	16.44
9	20	72	60	1:20	18.13
10	30	72	60	1:20	17.42
11	20	72	60	1:30	15.64
12	30	72	60	1:30	18.98
13	25	54	50	1:25	18.98
14	25	90	50	1:25	18.67
15	25	54	70	1:25	16.84
16	25	90	70	1:25	17.46
17	20	72	50	1:25	17.95
18	30	72	50	1:25	18.09
19	20	72	70	1:25	14.66
20	30	72	70	1:25	16.13
21	25	54	60	1:20	19.11
22	25	90	60	1:20	19.20
23	25	54	60	1:30	19.20
24	25	90	60	1:30	19.51
25	25	72	60	1:25	19.78
26	25	72	60	1:25	19.60
27	25	72	60	1:25	19.51
28	25	72	60	1:25	19.42
29	25	72	60	1:25	19.29

表3 二次回归模型的方差分析结果

Table 3 The variance analysis results of the quadratic regression model

来源	平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
model	49.17	8	6.15	51.67	< 0.0001	**
A	2.50	1	2.50	21.04	0.0002	**
C	16.73	1	16.73	140.67	< 0.0001	**
D	0.062	1	0.062	0.52	0.4800	
A <sup>2</sup>	13.70	1	13.70	115.17	< 0.0001	**
C <sup>2</sup>	15.61	1	15.61	131.23	< 0.0001	**
D <sup>2</sup>	1.50	1	1.50	12.60	0.0020	**
AC	0.44	1	0.44	3.72	0.0682	
AD	4.10	1	4.10	34.47	< 0.0001	**
残差	2.38	20	0.12			
失拟项	2.24	16	0.14	4.09	0.0912	
纯误差	0.14	4	0.034			
总离差	51.55	28				

注: \*.显著影响(p<0.05); \*\*.影响极显著(p<0.01)。

### 2.3 响应面分析与优化

响应曲面三维图可以直观地反映各因素对响应值的影响程度和因素间的交互作用强弱。等高线的形状反映出交互作用影响效应的强弱与大小。

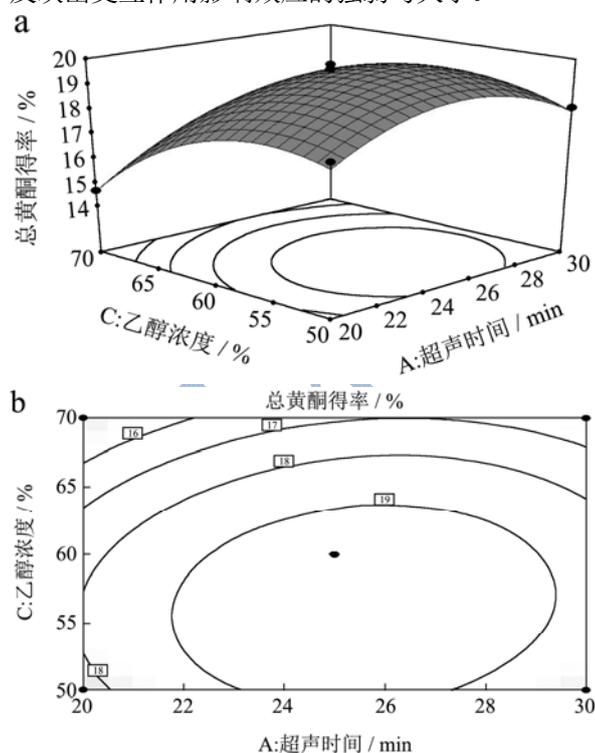


图6 超声时间与乙醇体积分数交互作用影响总黄酮得率的曲面图和等高线图

Fig.6 Response surface and contour plots for the effect of the interaction of ultrasonic time and ethanol volume fraction on the yield of total flavonoids

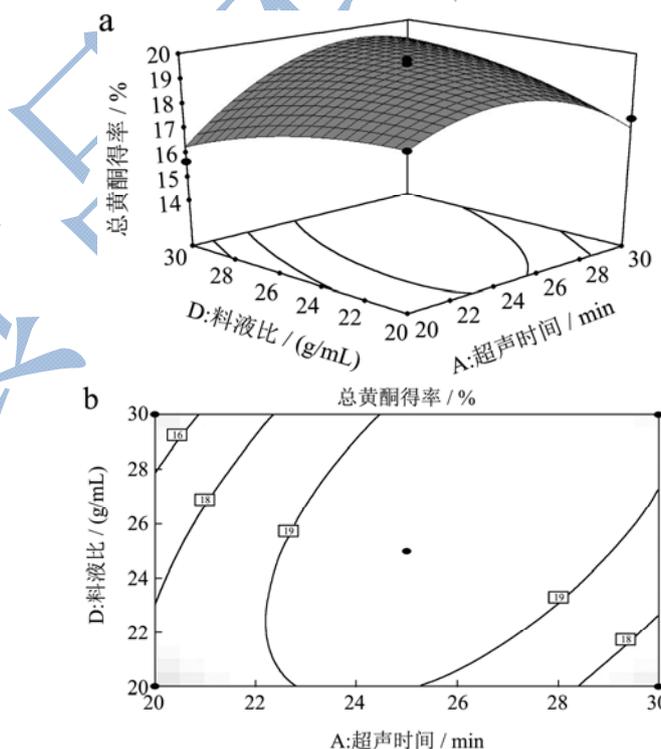


图7 超声时间与料液比交互作用影响总黄酮得率的曲面图和等高线图

Fig.7 Response surface and contour plots for the effect of solid-liquid ratio and ultrasonic treatment time on the yield of total flavonoids

椭圆形表示两种因素的交互作用影响显著，而圆形则表示两种因素的交互作用影响不显著<sup>[24]</sup>。比较图6和图7，发现超声时间与料液比的交互作用比超声时间与乙醇体积分数的交互作用对得率的影响显著。

如图6，可以看出超声时间与乙醇体积分数对总

黄酮得率的交互作用和等高线图, 二者的交互作用并不是很显著。将乙醇体积分数固定在 60% 水平时, 总黄酮得率随着超声时间的增加而先增加后降低, 当超声时间达 25 min 最大值后开始降低。在一定范围内, 总黄酮得率随着乙醇体积分数的升高而增加, 从图 6 中也可以看出超声时间对得率的曲线较为陡峭, 说明在提取过程中超声时间对得率的影响小于乙醇体积分数。

图 7 表示超声时间与料液比对黄金茶总黄酮得率的交互作用的影响效应。其等高线图表明料液比与超声时间的交互作用影响显著。当把料液比固定在 1:20 水平上时, 随着超声时间的增加, 总黄酮得率呈现先增大后减小的趋势, 在 25 min 左右, 总黄酮得率达到最大点, 随着时间增加, 而略有降低。可能由于超声波对植物细胞膜振裂的累加作用, 粘液等杂质的溢出相应增加, 使浸提液粘度增大, 扩散速度降低, 影响总黄酮的得率。

#### 2.4 最佳工艺的预测和验证

利用 Design-expert 8.0.6 的 optimization 功能, 将总黄酮得率的 Goal 选项选择为 maximize, 可得到最优方案为: 超声时间为 30 min、超声功率为 57.59 W、乙醇体积分数为 52.03%、料液比 1:23.85, 黄金茶中总黄酮得率预测值为 19.01%。考虑实际操作过程的方便性, 选择提取工艺参数为: 超声时间为 30 min, 超声功率为 58 W、乙醇体积分数为 52%、料液比 1:24, 在该工艺下进行三次平行实验所得的总黄酮平均得率为  $19.38\% \pm 0.12\%$ , 与预测值之间的相对误差仅为 1.9%, 变异系数仅为 0.6%, 重复性非常好。该模型能较好的预测黄金茶总黄酮的得率。与耿敬章等<sup>[30]</sup>采用超声协同复合酶提取山腊梅中的黄酮相比, 该试验中黄金茶总黄酮得率略高。究其原因, 一方面是原料产地和品种不同, 耿所用的山腊梅叶采自陕南植物园, 文献中<sup>[1]</sup>未见其在陕西广泛分布; 本文中所用材料购自浙江丽水, 山腊梅在浙江境内分布较广, 可见山腊梅更喜浙江气候和水土条件。另一方面山腊梅中的黄酮含量与其采摘月份有关, 从 5 月到 10 月, 黄酮类总含量呈现逐步递增趋势<sup>[31]</sup>。

#### 2.5 纯化后总黄酮对胰蛋白酶活性的测定结果

经聚酰胺树脂纯化, 30% 的乙醇洗脱的总黄酮对胰蛋白酶的抑制活性随着黄酮浓度的增加而增加, 但是当黄酮浓度达到一定值后, 其对胰蛋白酶的抑制率

急剧下降(图 8)。

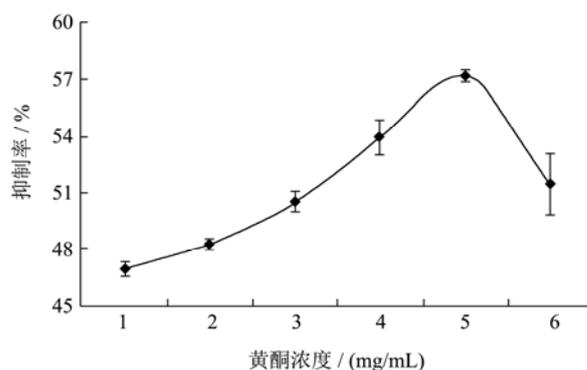


图 8 纯化后黄酮对胰蛋白酶活性的影响

Fig.8 The effect of the purified flavonoids on the activity of trypsin

纯化后黄酮中可能含有芦丁、槲皮素、山奈酚和木犀草素等<sup>[4,32]</sup>成分, 许明等<sup>[15]</sup>发现异槲皮素、芦丁对胰蛋白酶无明显的抑制作用, 而槲皮素对胰蛋白酶有较强的抑制作用, 对胰蛋白酶的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )为 0.115 mol/L, 最大抑制率为 80%, 对胰蛋白酶的抑制类型为非竞争与反竞争混合型。纯化后黄金茶中的总黄酮对胰蛋白酶的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )为 1.04 mg/mL, 当样品浓度为 1.36 mg/mL, 抑制率达到 57.14%, 随后抑制率随样品浓度的增加而下降。这可能与黄金茶黄酮中各成分与胰蛋白酶的作用机制、作用位点以及抑制类型有关; 并且样品溶液是混合物, 在抑制胰蛋白酶活性时各成分可能存在协同或者拮抗的作用。赵红辉等<sup>[33]</sup>证明当类黄酮浓度为 0.8  $\mu$ mol 时, 槲皮素对胰蛋白酶活性的抑制率达到最大, 为 46% 左右。类黄酮对胰蛋白酶活性的抑制率大小为槲皮素 > 木犀草素 > 山奈酚 > 芦丁 > 芹菜素。笔者猜测总黄酮中对胰蛋白酶发挥主要抑制作用可能是槲皮素及其衍生物。

胰蛋白酶抑制剂主要来自动物、植物和微生物中, 目前研究比较多的是大豆中的胰蛋白酶抑制剂, 程芬芬等<sup>[34]</sup>采用硫酸钠盐析法从大豆乳清废水中选择性回收大豆胰蛋白酶抑制剂, 且以商品化的 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂为对照表征 STI 的理化性质和界面性质。在临床上, 胰蛋白酶抑制剂用于保护胰脏、防止凝血异常、抑制脑血管通透性增高、治疗脑水肿、抑制和治疗癌症, 在农业防虫害方面也得到了应用<sup>[15]</sup>。分析黄金茶黄酮对胰蛋白酶的抑制能力, 为其在食品、医药保健行业中更合理有效的利用提供依据。

### 3 结论

通过超声波辅助乙醇溶剂提取黄金茶中的黄酮, 用分光光度法测定总黄酮的含量, 对超声时间、超声

功率、乙醇体积分数、料液比各因素进行单因素分析及响应面优化提取工艺, 得出最优条件为超声时间为 30 min, 超声功率为 58 W、乙醇体积分数为 52%、料液比 1:24, 测得黄金茶总黄酮在此条件下的得率为  $19.38\% \pm 0.12\%$ , 实验结果与预测结果较为吻合。该研究为黄金茶黄酮的提取工艺提供了理论依据, 为提高黄金茶的综合利用奠定了理论基础。30%的乙醇洗脱的总黄酮对胰蛋白酶具有明显的抑制作用, 对胰蛋白酶的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 1.04 mg/mL, 当样品浓度为 1.36 mg/mL, 抑制率达到 57.14%。鉴于黄金茶黄酮类化合物具有多种功能活性以及对胰蛋白酶的抑制性, 可应用到保健食品、医药领域, 为扩大黄金茶的开发利用提供基础依据。

### 参考文献

- [1] 毕武,姚霞,何春年,等. 香风茶的传统应用与研究现状[J]. 中国现代中药,2013,15(11):1012-1018  
BI Wu, YAO Xia, HE Chun-nian, et al. The traditional application and research status of XiangFeng Tea [J]. Modern Medicine Journal of China, 2013, 15(11): 1012-1018
- [2] 程科军,徐金标,柳叶蜡梅化学成分及药理活性的研究概况[J]. 丽水农业科技,2015,2:3-4  
CHENG Ke-jun, XU Jin-biao. A review of the chemical constituents and pharmacological activity from *Chimonanthus nitens* Oliv. Leaves [J]. Lishui Agricultural Science and Technology, 2015, 2: 3-4
- [3] 叶玉娟,叶龙华. 柳叶蜡梅的研究综述及开发应用前景[J]. 黄山学院学报,2015,17(5):68-69  
YE Yu-juan, YE Long-hua. A review of the research and application prospect of *Chimonanthus nitens* Oliv. leaves [J]. Journal of Huangshan University, 2015, 17(5): 68-69
- [4] CHEN Hui, OUYANG Ke-hui, JIANG Yan, et al. Constituent analysis of the ethanol extracts of *Chimonanthus nitens* Oliv. leaves and their inhibitory effect on  $\alpha$ -glucosidase activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 98: 829-836
- [5] 杨林波,江伟华,巴东娇,等. 柳叶蜡梅灌肠剂对慢性盆腔炎大鼠免疫功能及炎症因子的影响[J]. 中国中医药科技,2012,19(4):346-347  
YANG Lin-bo, JIANG Wei-hua, BA Dong-jiao, et al. Effects of *Chimonanthus nitens* Oliv. leaves on immune function and inflammatory factors in rats with chronic pelvic inflammatory disease [J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2012, 19(4): 346-347
- [6] 陈斐. 柳叶蜡梅提取物抑制 HeLa 细胞生长及诱导细胞凋亡的研究[D]. 杭州:浙江大学,2010  
CHEN Fei. The growth inhibition and the apoptosis of HeLa cells with *Chimonanthus salicifolius* extract [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010
- [7] 张尊敬,刘忠达. 山蜡梅的成分及药理作用研究近况[J]. 浙江中医杂志,2009,44(11):849-850  
ZHANG Zun-jing, LIU Zhong-da. A review of the composition and pharmacological action of *Chimonanthus nitens* [J]. Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2009, 44(11): 849-850
- [8] 许可为. 中药山蜡梅的药用价值研究概况[J]. 科技视界,2013,33:388  
XU Ke-wei. An overview of the medicinal value of Chinese medicinal *Chimonanthus nitens* [J]. Science & Technology View, 2013, 33: 388
- [9] Mds I A, Kh T A, Mohammad K M, et al. A comparative study of the antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and thrombolytic potential of the fruits and leaves of *Spondias dulcis* [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2013, 3(9): 682-691
- [10] Taukoorah U, Lall N, Mahomoodally F. Piper betle L.(betel quid) shows bacteriostatic, additive, and synergistic antimicrobial action when combined with conventional antibiotics [J]. South African Journal of Botany, 2016, 105: 133-140
- [11] Wu C H, Fang C Y, Hsu H Y, et al. Luteolin inhibits Epstein-Barr virus lytic reactivation by repressing the promoter activities of immediate-early genes [J]. Antiviral Research, 2016, 132-99
- [12] 张丹萍,丁丁. 黄酮类化合物药理作用的研究[J]. 北方药学,2015,12(8):150-151  
ZHANG Dan-ping, DING Ding. Study on pharmacological action of flavonoids [J]. Journal of North Pharmacy, 2015, 12(8): 150-151
- [13] 马莹娟,尚玉莹,王德杰,等. 柿叶黄酮类化合物对 D-半乳糖致衰老小鼠的抗炎抗氧化神经保护作用[J]. 复旦学报(医学版),2015,42(1):7-12,30  
MA Ying-juan, SHANG Yu-ying, WANG De-jie, et al. Neuroprotective effects of flavonoids extracted from the leaves of *Diospyros kaki* in D-galactose induced aging mice by attenuating oxidative stress and neuroinflammation [J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2015, 42(1): 7-12, 30
- [14] 霍坤. 黄酮类化合物与胰蛋白酶的相互作用及葡萄糖和亚油酸的影响[D]. 石家庄:河北医科大学,2013

- HUO Kun. Studies on the interactions of flavonoids with Trypsin and influence of glucose and linoleic acid on the binding [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2013
- [15] 许明. 苦荞黄酮类化合物的稳定性及其与胰蛋白酶相互作用的研究[D]. 太原: 山西大学, 2013
- XU Ming. Study on the stability of the Flavonoid from Tartary Buckwheat and the interaction with trypsin [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2013
- [16] 赵红辉, 韦庆益, 宁正祥, 等. 二氢杨梅素与胰蛋白酶相互作用特性的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 53-55
- ZHAO Hong-hui, WEI Qing-yi, NING Zheng-xiang, et al. Study on the interaction between dihydroxanthin and trypsin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(11): 53-55
- [17] 崔福顺, 李官浩, 金清, 等. 响应面法优化超声辅助提取人参茎叶总黄酮的工艺研究[J]. 食品科技, 2013, 38(8): 252-256
- CUI Fu-shun, LI Guan-hao, JIN Qing, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction on total flavonoids from Ginseng stem and leaf by response surface methodology [J]. Food Science and Technology, 2013, 38(8): 252-256
- [18] Norziah M H, Amia E T, Syahariza Z A, et al. The effects of ultrasound assisted extraction on antioxidative activity of polyphenolics obtained from *Momordica charantia* fruit using response surface approach [J]. Food Bioscience, 2016, 17: 7-16
- [19] 胡文兵, 杨占威, 陈慧, 等. Plackett-Burman 和 Box-Behnken 酶法提取青钱柳多糖工艺及结构初探[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29: 671-679
- HU Wen-bing, YANG Zhan-wei, CHEN Hui, et al. Optimization of ultrasonic and enzyme-assisted extraction of polysaccharides from *cyclocarya paliurus* by plackett-burman and box-behnken experiment and analysis of its structure [J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29: 671-679
- [20] 彭真汾, 谢倩, 池毓斌, 等. 响应面法优化超声法提取橄榄果实游离氨基酸工艺[J]. 食品科学, 2017, 38(20)
- PENG Zhen-fen, XIE Qian, CHI Yu-bin, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of free amino acids from canarium album response surface methodology [J]. Food Science, 2017, 38(20)
- [21] 宋思圆, 苏平, 王丽娟, 等. 响应面法优化超声提取黄秋葵花果胶多糖工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 283-289
- SONG Si-yuan, SU Ping, WANG Li-juan, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction by response surface methodology and antioxidant activities of pectic polysaccharide from okra flowers [J]. Food Science, 2017, 38(2): 283-289
- [22] Wong K H, Li G Q, LI K M, et al. Optimisation of Pueraria isoflavonoids by response surface methodology using ultrasonic-assisted extraction [J]. Food Chemistry, 2017, 231: 231-237
- [23] 盛丹丹, 李楠, 叶振南, 等. 黄金茶中总黄酮超声提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(12): 1-4
- SHENG Dan-dan, LI Nan, YE Zhen-nan, et al. The extraction technology of total flavonoids from golden tea by ultrasonic method [J]. Food Research and Development, 2014, 35(12): 1-4
- [24] 陈兰, 李喜宏, 王腾月, 等. 响应面法优化枣核总黄酮超声提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(24): 292-295
- CHEN Lan, LI Xi-hong, WANG Teng-yue, et al. Study on optimization of the extraction of total flavonoids from date seeds by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(24): 292-295
- [25] 黄琼. 桑葚叶黄酮类化合物提取工艺的优化[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(7): 81-84
- HUANG Qiong. Optimization of extraction process of flavonoids from mulberry leaves [J]. Food Research and Development, 2016, 37(7): 81-84
- [26] 王志坤, 林新春, 李妃, 等. 竹叶中总黄酮的提取工艺及应用[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(9): 1-4
- WANG Zhi-kun, LIN Xin-chun, LI Fei, et al. Applied study on extraction of total flavonoids from bamboo leaves [J]. Food Research and Development, 2011, 32(9): 1-4
- [27] Da S B C, De-Oliverac F R, Machado O L T, et al. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from Inga vera seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor [J]. Process Biochemistry, 2016, 51(6): 792-803
- [28] 寇亮, 李璐, 陆丽娜, 等. 响应面法优化柠条锦鸡儿总黄酮超声提取工艺及其体外抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(17): 225-231
- KOU Liang, LI Lu, LU Li-na, et al. Optimization of extraction of total flavonoids from *Caragana korshinskii* kom with ultrasound technology by response surface analysis and evaluation of its antioxidant activity in vitro [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(17): 225-231
- [29] 胡卫成, 王新风, 沈婷, 等. 响应面法优化莲蓬壳总黄酮超声提取条件及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2015, 36(24): 51-56
- HU Wei-cheng, WANG Xin-feng, SHEN Ting, et al.

- Optimization of the extraction process for flavonoids from lotus (*Nelumbo nucifera Gaertn.*) receptacle and their antioxidant activities [J]. *Food Science*, 2015, 36(24): 51-56
- [30] 耿敬章. 柳叶腊梅叶总黄酮超声波协同复合酶提取及抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(21): 124-129
- GENG Jing-zhang. Extraction of total flavonoids from *Chimonanthus salicifolius* S.Y.H leaves by complex enzymatic hydrolysis assisted ultrasonic and its antioxidant activity [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(21): 124-129
- [31] 聂鞞, 房海灵, 黄丽莉, 等. 山蜡梅叶中 3 种黄酮类成分含量动态变化研究[J]. *江西农业大学学报*, 2013, 35(2): 357-360
- NIE Wei, FANG Hai-ling, HUANG Li-li, et al. Determination of the contents of three flavonoids in leaves of *Chimonanthus nitens Oliv.* and their dynamic changes [J]. *江西农业大学学报*, 2013, 35(2): 357-360
- [32] 陈慧, 盛丹丹, 王文君. 黄金茶醇提取物成分及抗氧化活性的研究[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(1): 26-32
- CHEN Hui, SHENG Dan-dan, WANG Wen-jun. Study on the constituents and antioxidant activity of gold tea alcohol extract [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(1): 26-32
- [33] 赵红辉. 类黄酮与胰蛋白酶相互作用特性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012
- ZHAO Hong-hui. Research on the interaction of flavonoids and trypsin [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012
- [34] 程芬芬, 刘春, 杨晓泉. 大豆胰蛋白酶抑制剂的制备及性质[J]. *食品科学*, 2017, 38(3): 37-44
- CHENG Fen-fen, LIU Chun, YANG Xiao-quan. Preparation and properties of soybean trypsin inhibitor [J]. *Food Science*, 2017, 38(3): 37-44