

超声辅助双水相提取刺梨黄酮的工艺优化及其对黄嘌呤氧化酶活性的抑制作用

庄乾飞, 刘丹丹, 陈泽雨, 尚祖飞, 刘晓燕, 马立志

Optimization of Ultrasonic-assisted Two-aqueous Extraction of Flavonoids from *Rosa roxburghii* Tratt and Its Inhibitory Effect on Xanthine Oxidase Activity

ZHUANG Qianfei, LIU Dandan, CHEN Zeyu, SHANG Zufe, LIU Xiaoyan, and MA Lizhi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022100316>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

超声波辅助双水相提取枇杷花总黄酮工艺优化及其抗氧化性

Optimization of Ultrasonic Assisted Aqueous Two-phase Extraction of Total Flavonoid from Loquat Flower and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2021, 42(19): 218-225 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010186>

响应面法优化三种天然产物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用

Optimization of the three natural products' inhibitory effect on xanthine oxidase by response surface methodology

食品工业科技. 2018, 39(5): 230-234,318 <https://doi.org/>

双水相体系萃取分离鲍鱼内脏中的 β -葡萄糖苷酶

Extraction of β -Glucosidase from Abalone Viscera by Aqueous Two-phase System

食品工业科技. 2020, 41(21): 164-171 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020010156>

双水相萃取技术的新发展

Progress of aqueous two-phase extraction technique

食品工业科技. 2017(08): 395-400 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.068>

基于黄嘌呤氧化酶活性抑制和斑马鱼高尿酸血症模型的降尿酸功效食药材筛选

Screening of Uric Acid-lowering Food and Medicinal Materials Based on Inhibiting Xanthine Oxidase Activity and Zebrafish Hyperuricemia Model

食品工业科技. 2021, 42(12): 334-339 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080220>

响应面法优化黑胡萝卜红色素双水相萃取工艺

Optimization of Extraction Technology of Anthocyanidins from *Daucus carota* L. by Aqueous Two-phase System Based on Response Surface Methodology

食品工业科技. 2021, 42(7): 195-200 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060219>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

庄乾飞, 刘丹丹, 陈泽雨, 等. 超声辅助双水相提取刺梨黄酮的工艺优化及其对黄嘌呤氧化酶活性的抑制作用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(17): 222–230. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100316

ZHUANG Qianfei, LIU Dandan, CHEN Zeyu, et al. Optimization of Ultrasonic-assisted Two-aqueous Extraction of Flavonoids from *Rosa roxburghii* Tratt and Its Inhibitory Effect on Xanthine Oxidase Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(17): 222–230. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100316

· 工艺技术 ·

超声辅助双水相提取刺梨黄酮的工艺优化及其对黄嘌呤氧化酶活性的抑制作用

庄乾飞¹, 刘丹丹¹, 陈泽雨¹, 尚祖飞¹, 刘晓燕^{1,2,3,*}, 马立志^{1,2,3,*}

(1. 贵阳学院食品与制药工程学院, 贵州贵阳 550005;

2. 贵州省果品加工工程技术研究中心, 贵州贵阳 550005;

3. 贵州省果品加工、贮藏与安全控制协同创新中心, 贵州贵阳 550005)

摘要: 本研究采用超声辅助双水相技术 (Ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction, UA-ATPE) 提取刺梨黄酮并探究其体外抑制黄嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase, XOD) 活性的作用。实验以刺梨黄酮得率为指标, 验证单因素及响应面优化黄酮提取工艺, 得到最优提取工艺为: 在 32% C₂H₅OH-20% (NH₄)₂SO₄ 双水相萃取体系下, 当料液比 1:59 (g/g), 超声时间 30 min, 温度 50 ℃, 功率 320 W 时, 黄酮的得率为 140.57±1.78 mg/g。且在此条件下, 刺梨黄酮体外抑制黄嘌呤氧化酶活性的 IC₅₀ 值为 12.72 mg/mL, 抑制活性较好。实验证明 UA-ATPE 提取刺梨黄酮类化合物的工艺优化, 有效提高了刺梨黄酮的得率。且提取的刺梨黄酮具有较好的抑制黄嘌呤氧化酶活性的作用, 可以作为一种天然的黄嘌呤氧化酶抑制剂。

关键词: 刺梨黄酮, 双水相萃取, 超声波, 黄嘌呤氧化酶

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)17-0222-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100316

本文网刊:



Optimization of Ultrasonic-assisted Two-aqueous Extraction of Flavonoids from *Rosa roxburghii* Tratt and Its Inhibitory Effect on Xanthine Oxidase Activity

ZHUANG Qianfei¹, LIU Dandan¹, CHEN Zeyu¹, SHANG Zufe¹, LIU Xiaoyan^{1,2,3,*}, MA Lizhi^{1,2,3,*}

(1. School of Food and Pharmaceutical Engineering, Guiyang University, Guiyang 550005, China;

2. Guizhou Fruit Processing Engineering Technology Research Center, Guiyang 550005, China;

3. Guizhou Collaborative Innovation Center of Fruit Processing, Storage and Safety Control, Guiyang 550005, China)

Abstract: In this study, ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction (UA-ATPE) was adopted to extract flavonoids from *Rosa roxburghii* Tratt and investigated its inhibitory effect of this flavonoid on xanthine oxidase activity *in vitro*. In this experiment, flavonoids yield of *Rosa roxburghii* Tratt was taken as the index to verify the single factor and response surface optimization of flavonoids extraction process. The optimal extraction process was obtained as follows: Under the condition of 32% C₂H₅OH-20% (NH₄)₂SO₄ two-phase aqueous extraction system, the yield of flavonoids was 140.57±1.78 mg/g when the solid-liquid ratio was 1:59 (g/g), the ultrasonic time was 30 min, the temperature was 50 ℃, and the power was 320 W. Under these conditions, the IC₅₀ value of xanthine oxidase was 12.72 mg/mL *in vitro*, indicating a good inhibitory activity. The experiment showed that the optimized technology of UA-ATPE extraction of flavonoids from *Rosa roxburghii* Tratt effectively improved the yield of flavonoids from *Rosa roxburghii* Tratt. And the flavonoids extracted from *Rosa roxburghii* Tratt had a good effect of inhibiting the activity of xanthine oxidase and could be used as a

收稿日期: 2022-11-02

作者简介: 庄乾飞 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工, E-mail: 654300458@qq.com。

* 通信作者: 马立志 (1964-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 农产品加工, E-mail: 418829419@qq.com。

natural xanthine oxidase inhibitor.

Key words: *Rosa roxburghii* flavonoids; aqueous two-phase extraction; ultrasonic; xanthine oxidase

刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt)是蔷薇属植物缙丝花的果实,主要分布在我国的贵州、四川和云南等地,其中以贵州的刺梨资源最为丰富^[1]。刺梨黄酮类化合物中包括木犀草素、儿茶素、异槲皮素、槲皮素、杨梅素、芦丁、山奈素等多种有效成分,具有抗氧化^[2]、辐射防护^[3]、防治糖尿病^[4-5]、预防动脉粥样硬化^[6]、抗癌^[7]与抗凋亡^[8-10]等生物活性。近年来,以无机盐和短链醇为基础的新型双水相体系(Aqueous two-phase system, ATPS)^[11-14]具有成本低、界面张力低、分辨率好、产率高、放大简单等优点,被认为是一种很有前景的提取技术,它具有提取和部分纯化目标物的功能,还可以在获得高得率的同时保持分子的生物活性。ATPS 应用于生物活性成分的提取技术已十分成熟,如酶^[15]、蛋白质^[16]、多糖^[17-19]和黄酮等,但还未应用于刺梨黄酮的提取。

黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XOD)是一种由两个完全对称亚单位组成的蛋白酶,是调控尿酸生成的关键酶。血液中尿酸含量增加会导致高尿酸血症(Hyperuricemia, HUA)^[20]。多项研究表明黄酮类化合物诸如山奈素、落新妇苷及其异构体^[21]、木犀草素、芹菜素、儿茶素等可以与黄嘌呤氧化酶的活性中心结合从而抑制其活性,这一发现提示黄酮类化合物或许可以作为 HUA 的有效发生抑制剂。目前, HUA 的治疗主要集中在抑制尿酸生成和促进尿酸排泄上,代表药物分别为别嘌醇和苯溴马隆^[22]。然而,这些药物在临床应用中有严重的副作用,如肝肾毒性和 Stevens-Johnson 综合征等^[23],因此寻找更加安全的植物提取物治疗 HUA 迫在眉睫。

当前有关刺梨黄酮双水相萃取的工艺优化和其抑制 XOD 活性方面的研究资料较少。植物提取物治疗 HUA 的研究主要集中在 XOD 抑制剂的筛选^[24-25]和影响尿酸转运蛋白的表达上^[26-27]。因此,本试验以刺梨为原料,旨在构建超声波辅助乙醇(C_2H_5OH)-硫酸铵 $((NH_4)_2SO_4)$ 双水相萃取刺梨黄酮的技术体系以及确定最佳提取工艺,为深入开发植物资源和工业生产中高效提取刺梨黄酮提供科学依据,并通过对刺梨黄酮提取物抑制黄嘌呤氧化酶效果的研究,为发现一种天然黄嘌呤氧化酶抑制剂及刺梨功能活性的研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

刺梨鲜果 购自贵州恒力源生物科技有限公司; XOD(50 U/mg)、黄嘌呤(98%)、芦丁(95%)、别嘌醇(98%) BR, 均购自上海源叶生物科技有限公司; 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、EDTA-2Na、硫酸铵、乙醇 均为分析纯; 水为纯水。

SCIENTZ-18N 冷冻干燥机 宁波新芝生物科

技股份有限公司; CS-2000Y 超帅多功能粉碎机 永康市天祺盛世工贸有限公司; FA2004N 电子天平 上海菁海仪器有限公司; KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; SHB-III 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; THERMO 酶标仪 百奥科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原料预处理 将刺梨鲜果切片后冷冻干燥,粉碎过 100 目筛后放入保鲜袋,于 2 ℃ 冰箱中保存。

1.2.2 $C_2H_5OH-(NH_4)_2SO_4$ 双水相相图绘制 采用浊度滴定法^[28]绘制 $C_2H_5OH-(NH_4)_2SO_4$ 双水相相图中双节线。向 40% $(NH_4)_2SO_4$ 溶液中滴加无水乙醇至溶液浑浊,记录加入 C_2H_5OH 溶液的质量,后加入蒸馏水至溶液澄清,记录加入蒸馏水的质量。反复操作并记录,操作完成之后计算出记录的 $C_2H_5OH-(NH_4)_2SO_4$ 质量浓度,绘制相图。

1.2.3 刺梨黄酮标准曲线的绘制 采用亚硝酸钠($NaNO_2$)-硝酸铝($Al(NO_3)_3$)比色法^[29]。配制 1 mg/mL 的芦丁标准溶液,分别取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 标准液,用 70% 乙醇定容至 1 mL,取 50 μ L 至 96 孔板后加入 30 μ L 5% $NaNO_2$,静置 6 min,再加入 30 μ L 10% $Al(NO_3)_3$,静置 6 min,加入 100 μ L 4% $NaOH$,反应 30 min 后于 510 nm 处测吸光值,绘制标准曲线得到回归方程 $A=1.3994x-0.0002$, $R^2=0.9991$ 。

1.2.4 构建双水相体系 固定体系质量为 50 g,根据乙醇-硫酸铵双水相相图,选取 14%、16%、18%、20%、22% 的硫酸铵质量分数和 28%、30%、32%、34%、36% 的乙醇质量分数,考察硫酸铵质量分数对黄酮得率的影响时,固定乙醇质量分数为 28%;考察乙醇质量分数对黄酮得率的影响时选取最佳硫酸铵质量分数,测定硫酸铵质量分数和乙醇质量分数对刺梨黄酮得率的影响。在 100 mL 离心管中构建 49.00 g 双水相体系(例: 49.00 g 32% C_2H_5OH -20% $(NH_4)_2SO_4$ 双水相体系,称取 9.80 g 硫酸铵和 15.68 g 无水乙醇,剩余质量由蒸馏水补充,混合均匀)后加入 1.00 g 的刺梨粉末,将离心管置于超声清洗器中超声,固定功率 400 W,温度 50 ℃,超声 30 min。用布氏漏斗抽滤,滤液置于分液漏斗中静置 20 min 使其分相完全,分离后分别测量上下相体积,计算相比(R);取上下相溶液测定其黄酮得率(Y),计算刺梨黄酮的分配系数(K)和萃取率(X)^[30]。

$$R = \frac{V_t}{V_b} \quad \text{式 (1)}$$

$$K = \frac{C_t}{C_b} \quad \text{式 (2)}$$

$$X(\%) = \frac{RK}{1+RK} \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

$$Y(\text{mg/g}) = \frac{C_t \times V_t \times n}{m} \quad \text{式 (4)}$$

式中: V_t 、 V_b 为上、下相体积, mL; C_t 、 C_b 为上、下相溶液黄酮浓度, mg/mL; n 为稀释倍数; m 为刺梨粉的质量, g。

1.2.5 单因素实验 分别考察超声功率(A)、超声时间(B)、超声温度(C)及料液比(D)对刺梨黄酮得率的影响。

1.2.5.1 超声功率对刺梨黄酮得率的影响 固定体系质量为 50 g, 考察不同的功率对黄酮得率的影响, 在离心管中加入 32% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 加入 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 加入 1.00 g 刺梨粉, 剩余质量由蒸馏水补充, 按照 1.2.4 方法进行实验, 超声功率分别设置为 240、280、320、360、400 W, 其它条件不变。

1.2.5.2 超声时间对刺梨黄酮得率的影响 考察不同的超声时间对黄酮得率的影响, 固定超声功率为上述条件最优值, 对其进行超声处理, 时间分别为 10、20、30、40、50 min, 其他条件不变。

1.2.5.3 超声温度对刺梨黄酮得率的影响 固定超声功率和时间为上述实验的最优值, 其他条件不变, 温度分别设置为 30、40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$, 考察不同的温度对黄酮得率的影响。

1.2.5.4 料液比对刺梨黄酮得率的影响 考察不同的料液比对黄酮得率的影响, 固定超声功率、时间和温度为上述实验的最优值, 其它条件不变, 料液比分别设置为 1:29、1:39、1:49、1:59、1:69(g/g)。

1.2.5.5 响应面试验 通过单因素实验结果确定 4 个因素的较优水平范围, 以黄酮得率为响应值, 设计 4 因素 3 水平的响应面试验, 如表 1 所示。

表 1 响应面试验设计

Table 1 Response surface experimental design

水平	因素			
	A 超声功率(W)	B 超声时间(min)	C 超声温度($^{\circ}\text{C}$)	D 料液比(g/g)
-1	280	20	40	1:49
0	320	30	50	1:59
1	360	40	60	1:69

1.2.6 刺梨黄酮提取物抑制黄嘌呤氧化酶活性研究 将优化工艺条件下的刺梨黄酮提取液用旋转蒸发仪浓缩后冷冻干燥, 保存至 -20°C 备用。

在酶促反应过程中, XOD 是通过调节两个基本氧化反应控制尿酸产生的关键酶, 包括催化次黄嘌呤转化为黄嘌呤和黄嘌呤转化为尿酸^[31]。取刺梨黄酮提取物冻干粉末, 用蒸馏水配制 8、10、12、14、16、18、20 mg/mL 浓度的提取液, 按照表 2 中各物质添加量进行试验, 向 96 孔板依次加入磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.5、50 mmol/L、含 200 $\mu\text{mol/L}$ EDTA-

2Na)、刺梨黄酮提取液、黄嘌呤氧化酶(0.1 U/mL)溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 min 后, 加入底物黄嘌呤溶液(0.15 mmol/L), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 20 min 后, 于 295 nm 处测定吸光值^[32]。

$$\text{黄嘌呤氧化酶抑制活性XOI}(\%) = \frac{(A_E - A_I)}{A_E} \times 100 \quad \text{式 (5)}$$

式中, $A_E = A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白对照组}}$; $A_I = A_{\text{样品组}} - A_{\text{空白组}}$ 。

表 2 酶活测定体系的组成(μL)

Table 2 Composition of the enzyme activity assay system (μL)

溶液	样品组	空白组	对照组	空白对照组	别嘌呤组
磷酸缓冲液	130	140	140	150	130
刺梨黄酮提取物(别嘌呤)	10	10	0	0	10
黄嘌呤氧化酶	10	0	10	0	10
黄嘌呤	100	100	100	100	100

1.3 数据处理

所有数据均为 3 次重复实验的平均值, 所有实验数据运用 SPSS 25 进行显著性分析及 Origin 2017 软件绘制趋势曲线图; 响应面实验采用 Design-Expert 11 软件进行方差分析, 半抑制浓度(IC_{50})通过 SPSS 25 软件计算。

2 结果与分析

2.1 乙醇-硫酸铵双水相相图和双水相体系确定

2.1.1 乙醇-硫酸铵双水相相图 由图 1 可知, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ -(NH_4)₂SO₄ 在较大浓度范围内均具有良好的成相能力, 与报道一致^[33]; 双节线上的点为临界点, 双节线以下的区域, 两种溶剂均溶于水而不分相, 称为均相区; 而体系总组成配比取在双节线上方的区域, 体系就会分为两相, 称为双相区。其中上相为富乙醇相, 下相为富盐相, 黄酮类物质极性较小而富集于上相。因此, 在实验时, 乙醇和硫酸铵的配比应取在双节线上方, 并取上相溶液作为待测液进行研究。

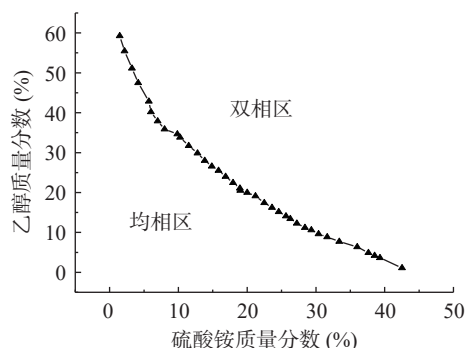


图 1 乙醇-硫酸铵双水相相图

Fig.1 Phase diagram of ethanol-ammonium sulfate aqueous two-phase system

2.1.2 双水相体系确定

2.1.2.1 硫酸铵质量分数对刺梨黄酮分相萃取的影响 图 2 表明, (NH_4)₂SO₄ 质量分数小于 20% 时, 黄酮得率、萃取率和分配系数均随着质量分数的增

加而增加($P<0.05$), 当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数为 20% 时, 刺梨黄酮得率(116.57 mg/g)、萃取率(63.47%)及分配系数(1.57)均达到最高; 当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数超过 20% 后, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 在双水相体系会在中析出, 会造成硫酸铵和乙醇对水分子的竞争, 极性增大^[34], 使上相乙醇的体积减小, 从而导致刺梨黄酮的溶出受到抑制, 使萃取率和分配系数下降。因此 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ATPS 中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的最佳添加质量分数为 20%。

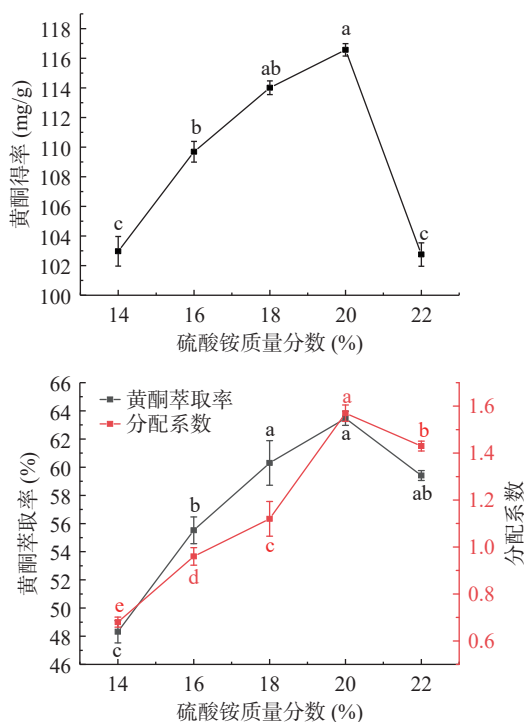


图2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数对黄酮得率、萃取率及分配系数的影响

Fig.2 Effect of mass fraction of ammonium sulfate on the yield of flavonoids, extraction rate and partition coefficient

注: 图中不同小写字母表示差异显著 $P<0.05$; 图 3~图 7 同。

2.1.2.2 乙醇质量分数对刺梨黄酮分相萃取的影响

如图 3 所示, 随着 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 质量分数增加, 刺梨黄酮得率、萃取率和分配系数呈先增大后减小的趋势($P<0.05$)。乙醇质量分数为 32% 时, 3 个指标均达到最大值, 分别为 122.79 mg/g、95.98% 和 11.141, 而后随着 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 质量分数的增加, 3 个指标均出现下降。这可能是黄酮在乙醇中的溶解度更大, 随着 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 质量分数增加, ATPS 的分相能力增加^[35], 而在 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 质量分数过高时, 会导致下相盐的析出, 同时其他物质在上相中的溶出量也大大增加, 这会导致黄酮的析出减少^[36]。因此确定 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ATPS 最佳的乙醇质量分数为 32%。

2.2 单因素实验

2.2.1 超声功率对黄酮得率的影响 如图 4 所示, 刺梨黄酮的得率随着超声功率的增加而呈先增加后降低的趋势, 当超声功率达到 320 W 时, 得率达到最大值 125.48 mg/g, 而当超声功率超过 320 W 后, 黄酮

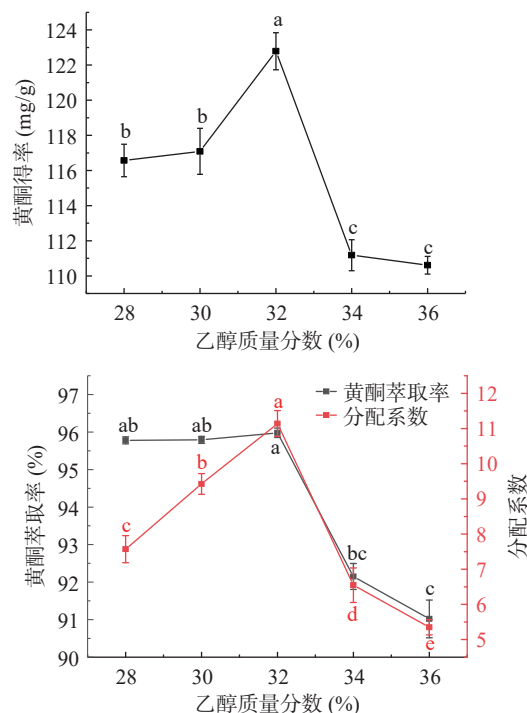


图3 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 质量分数对黄酮得率、萃取率及分配系数的影响

Fig.3 Effect of ethanol mass fraction on the yield of flavonoids, extraction rate and partition coefficient

得率略有减小, 无显著性差异($P>0.05$)。这可能是由于超声波加速了刺梨粉在提取液中运动, 从而增加黄酮的溶出, 继续增大超声功率时, 功率过大导致刺梨细胞过度破碎, 刺梨黄酮类成分发生聚合或分解等反应^[37], 造成刺梨黄酮得率下降。因此, 当超声功率为 320 W 时, 刺梨黄酮得率较好。

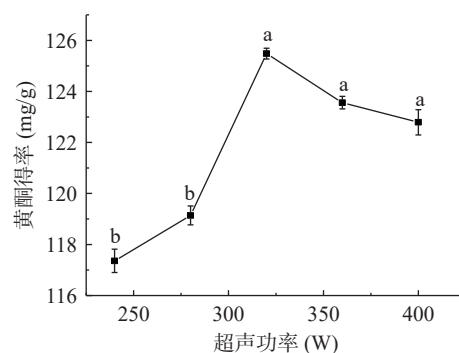


图4 超声功率对刺梨黄酮得率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic power on the yield of *Rose roxburghii* Tratt flavonoids

2.2.2 超声时间对黄酮得率的影响 由图 5 知, 刺梨黄酮得率随着时间的增加, 出现先上升($P<0.05$)后下降的趋势, 当超声时间增加到 30 min 时, 黄酮得率达到峰值 125.34 mg/g, 随后降低。随着超声时间延长, 细胞裂解完全, 黄酮得率增加; 超过一定时间, 可能会使刺梨中的皂苷类等物质溶出, 使黄酮类物质在上相的溶出量减少^[37]。因此, 确定黄酮超声提取的最适时间为 30 min。

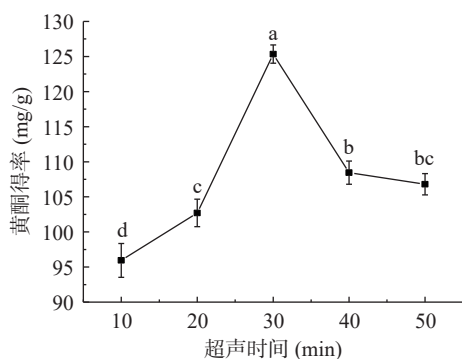


图5 超声时间对刺梨黄酮得率的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic time on the yield of *Rose roxburghii* Flavonoids

2.2.3 超声温度对黄酮得率的影响 如图6所示,刺梨黄酮得率随着温度的增加,出现先上升后下降的趋势($P<0.05$),当超声温度达到 50 ℃ 刺梨黄酮得率达到峰值,为 125.29 mg/g,继续增大超声温度,黄酮得率下降。可能是当 ATPS 温度过高时,黄酮类成分发生结构变化甚至氧化分解等反应^[38]。因此,当超声提取温度为 50 ℃ 时,黄酮得率较高。

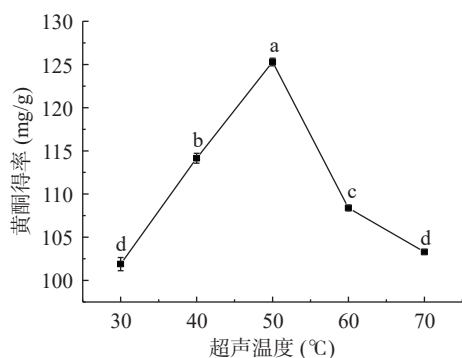


图6 超声温度对刺梨黄酮得率的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic temperature on the yield of *Rose roxburghii* Flavonoid

2.2.4 料液比对黄酮得率的影响 由图7显示,随着料液比的增大,刺梨黄酮得率出现先上升后下降的趋势($P<0.05$)。当料液比为 1:59(g/g)时,刺梨黄酮得率最大,达到 137.19 mg/g,可能是溶剂增多导致提取液与刺梨粉末接触面积增大,促进黄酮类成分自刺梨

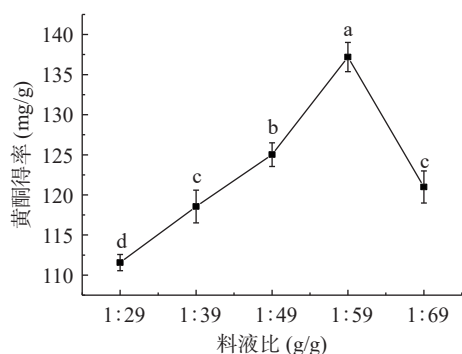


图7 料液比对刺梨黄酮得率的影响

Fig.7 Effect of solid-to-liquid ratio on the yield of *Rose roxburghii* Flavonoid

粉中溶出。但当液料比继续增加到 1:69(g/g)时,黄酮得率显著下降($P<0.05$)。可能是由于上相体积增大导致黄酮浓度下降,同时还会造成其他物质的溶出加剧,也会抑制黄酮的提取^[36]。除此之外,料液比过大会造成 C_2H_5OH 和 $(NH_4)_2SO_4$ 使用量增加,增加生产成本。综上所述最适料液比为 1:59(g/g)。

2.3 响应面试验结果

2.3.1 响应面试验结果分析 采用 Box-Behnken 响应面法优化双水相萃取刺梨黄酮的结果如表3所示。

表3 试验设计及对应的响应值
Table 3 Experimental design and corresponding response values

实验号	A: 超声功率	B: 超声时间	C: 超声温度	D: 料液比	Y: 黄酮得率(mg/g)
1	0	0	-1	1	113.2
2	0	-1	0	-1	102.71
3	1	0	-1	0	121.89
4	0	0	0	0	138.47
5	1	0	1	0	120.81
6	0	1	1	0	106.93
7	0	1	0	1	107.08
8	-1	0	-1	0	120.12
9	1	0	0	-1	123.53
10	0	0	0	0	140.4
11	1	1	0	0	113.91
12	0	-1	0	1	100.24
13	0	1	-1	0	110
14	-1	0	0	1	114.54
15	1	0	0	1	116.86
16	0	0	0	0	142.77
17	0	0	0	0	142.83
18	0	0	0	0	143.35
19	0	-1	-1	0	111.28
20	1	0	0	0	110.02
21	-1	0	0	-1	118.14
22	-1	1	0	0	112.13
23	-1	0	1	0	119.77
24	0	0	1	1	110.28
25	0	0	1	-1	107.73
26	0	0	-1	-1	114.15
27	0	1	0	-1	108.01
28	0	-1	1	0	106.52
29	-1	-1	0	0	109.54

采用 Design-Expert11 对刺梨黄酮得率结果进行拟合,得到回归方程如下:

$$Y=141.56+1.06A+1.48B-1.55C-1.01D+0.3250AB-0.1825AC-0.7675AD+0.4225BC+0.3850BD+0.8750CD-8.10A^2-20.96B^2-12.92C^2-16.20D^2$$

方差分析结果如表4所示,回归模型达到极显著水平($P<0.01$),实测值与预测值相近,试验决定系数 $R^2=0.9801$ 、校正决定系数 $R^2_{adj}=0.9601$ 和变异系数 C.V.%=2.13%,表明模型拟合程度较好;超声功率、超声时间、超声温度及料液比之间相互作用的响应面曲线图如图8所示。通过响应面图可直观地看出各因素之间相互影响的显著性,模型中的 AD、BD 对刺梨黄酮得率的影响差异极显著($P<0.01$),AB、AC、BC、CD 对刺梨黄酮得率的影响差异不显

表 4 二次模型方差统计分析

Table 4 Anaiysis of the variance (ANOVA) for the second-order polynomial model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1412.48	14	100.89	42.29	<0.0001	**
A	0.9075	1	0.9075	0.3804	0.5473	
B	274.37	1	274.37	115.00	<0.0001	**
C	0.3234	1	0.3234	0.1355	0.7183	
D	3.32	1	3.32	1.39	0.2579	
AB	1.95	1	1.95	0.8156	0.3817	
AC	5.59	1	5.59	2.34	0.1480	
AD	12.53	1	12.53	5.25	0.0379	**
BC	3.29	1	3.29	1.38	0.2596	
BD	14.98	1	14.98	6.28	0.0252	**
CD	4.95	1	4.95	2.07	0.1717	
A ²	56.75	1	56.75	23.78	0.0002	**
B ²	993.80	1	993.80	416.53	<0.0001	**
C ²	236.96	1	236.96	99.31	<0.0001	**
D ²	89.36	1	89.36	37.45	<0.0001	**
残差	33.40	14	2.39			
失拟项	16.41	10	1.64	0.3862	0.8986	
纯误差	16.99	4	4.25			
总和	1445.88	28				

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

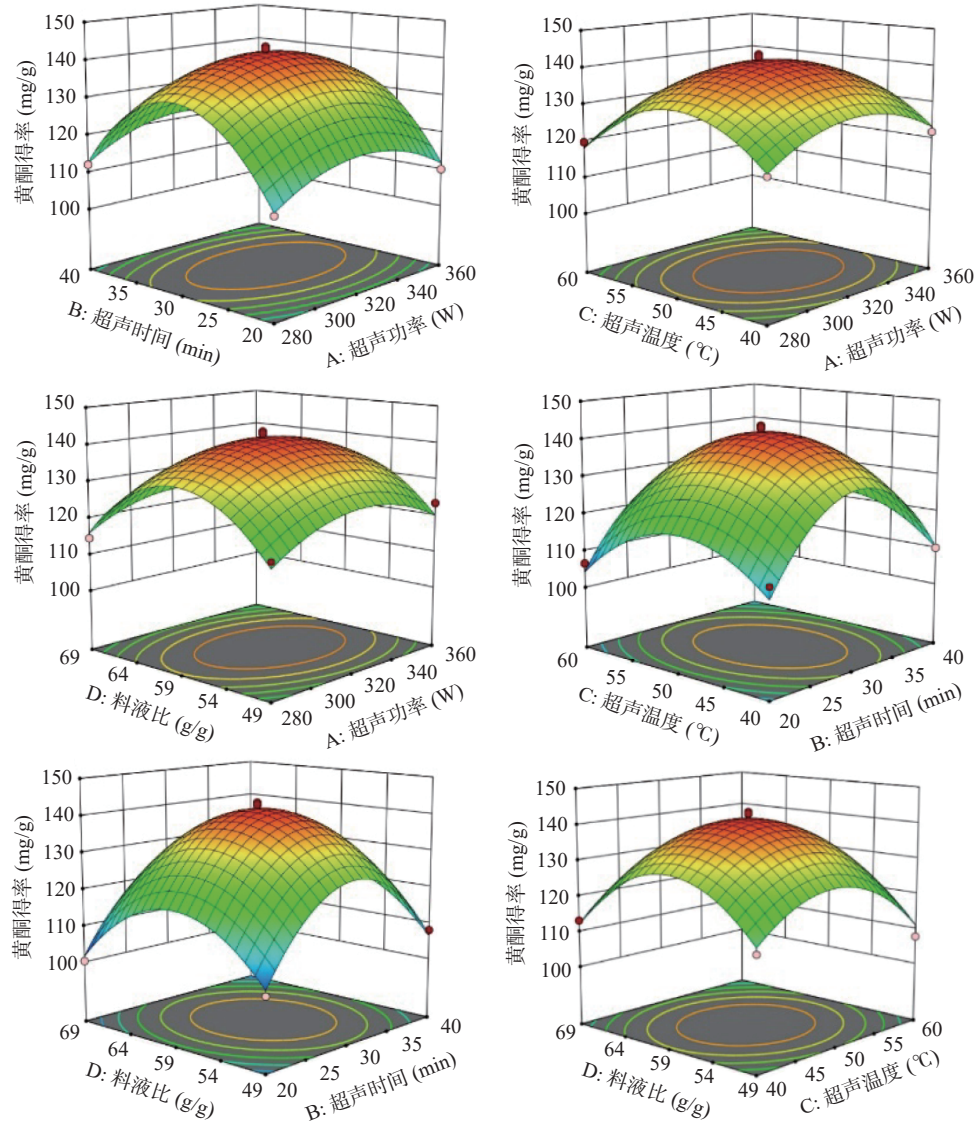


图 8 各因素对响应值影响的曲面图

Fig.8 Surface plot of the influence of various factors on the response value

著($P>0.05$),此模型可以对双水相提取刺梨黄酮的结果进行分析和预测。4个因素对刺梨黄酮得率的影响次序为 $B>D>A>C$,即超声时间>料液比>超声功率>超声温度。

2.3.2 最佳工艺条件的预测及验证实验 根据 Box-Behnken 响应面模型,以最大得率为指标,预测的双水相提取刺梨黄酮的最佳工艺条件为:超声功率 322.78 W,时间为 30.35 min,温度 49.39 °C,料液比 1:58.66 g/g,理论黄酮得率为 141.69 mg/g,为了验证预测值的准确性,兼顾实际应用,将最佳工艺条件调整为:超声功率 320 W,时间为 30 min,温度 50 °C,料液比 1:59 g/g,在此工艺条件下进行验证,平行试验 3 次,测得刺梨黄酮平均得率为 (140.57 ± 1.78) mg/g,与预测值较近,表明该模型适用于刺梨黄酮的提取,所得刺梨黄酮纯度可达 18.72%。

2.4 刺梨黄酮提取物对 XOD 的抑制效果分析

研究发现,活性物如:木犀草素、芹菜素^[39]、表没食子儿茶素^[40]、槲皮素^[41]等黄酮类物质可以通过与 XOD 活性中心结合从而抑制黄嘌呤氧化酶的活性,减少尿酸生成。如图 9 所示,刺梨黄酮提取物对 XOD 表现出较好的抑制作用,且随着刺梨黄酮提取物浓度的增加,抑制率也逐渐升高,表现出较好剂量-效应关系;通过 SPSS 分析计算,得到刺梨黄酮提取物对 XOD 的 IC_{50} 为 12.72 mg/mL,与 0.24 mmol/L (0.0324 mg/mL)别嘌呤抑制率相当,与葛根水提物 (11.24 mg/mL)和老鹳草水提物 (11.61 mg/mL)^[42]、辣木叶的醇提物 (10.55 mg/mL)^[43]、银杏叶醇提物

(13.67 mg/mL)^[44]抑制活性接近。证明刺梨黄酮提取物对于 XOD 有较好的抑制效果,可以作为一种天然的 XOD 活性抑制剂。

3 结论

本研究采用超声辅助双水相技术提取刺梨黄酮,确定最佳提取工艺为:32% C_2H_5OH ~20% $(NH_4)_2SO_4$ ATPS,超声功率 320 W,时间 30 min,温度 50 °C,料液比 1:59 (g/g)。此工艺下刺梨黄酮的得率为 140.57 mg/g,其对 XOD 的抑制 IC_{50} 值为 12.72 mg/mL。本试验表明刺梨黄酮提取物能够较好的抑制黄嘌呤氧化酶的活性,可以作为一种较好的天然 XOD 抑制剂开发利用。

参考文献

- [1] CHEN C, TAN S, REN T, et al. Polyphenol from *Rosa roxburghii* Tratt fruit ameliorates the symptoms of diabetes by activating the P13K/AKT insulin pathway in db/db mice[J]. *Foods*, 2022, 11(5): 636.
- [2] ZENG F F, GE Z W, LIMWACHIRANON J, et al. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of *Rosa roxburghii* fruit and identification of main bioactive phytochemicals by UPLC-Triple-TOF/MS[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2017, 52(4): 897-905.
- [3] XU S J, WANG X, WANG T Y, et al. Flavonoids from *Rosa roxburghii* Tratt prevent reactive oxygen species-mediated DNA damage in thymus cells both combined with and without PARP-1 expression after exposure to radiation *in vivo*[J]. *Aging-Us*, 2020, 12(16): 16368-16389.
- [4] ZHU J Z, ZHANG B, WANG B X, et al. *In-vitro* inhibitory effects of flavonoids in *Rosa roxburghii* and *R. sterilis* fruits on alpha-glucosidase: Effect of stomach digestion on flavonoids alone and in combination with acarbose[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 54: 13-21.
- [5] DING X J, YU Y H, DING Z H. Interaction between active compounds from *Rosa roxburghii* Tratt and beta-glucosidase: Characterization of complexes and binding mechanism[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2022, 165: 8.
- [6] WU P H, HAN S C H, WU M H. Beneficial effects of hydroalcoholic extract from *Rosa roxburghii* Tratt fruit on hyperlipidemia in high-fat-fed rats[J]. *Acta Cardiologica Sinica*, 2020, 36(2): 148-159.
- [7] WANG J M, WANG G P, WANG X T, et al. Chemical constituents and bioactivities of *Rosa roxburghii*: A systematic review[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 42: 14.
- [8] YUAN H F, WANG Y R, CHEN H, et al. Protective effect of flavonoids from *Rosa roxburghii* Tratt on myocardial cells via autophagy[J]. *3 Biotech*, 2020, 10(2): 9.
- [9] XU S J, ZHANG F, WANG L J, et al. Flavonoids of *Rosa roxburghii* Tratt offers protection against radiation induced apoptosis and inflammation in mouse thymus[J]. *Apoptosis*, 2018, 23(9-10): 470-483.
- [10] XU P, LIU X X, XIONG X W, et al. Flavonoids of *Rosa roxburghii* Tratt exhibit anti-apoptosis properties by regulating PARP-1/AIF[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017, 118(11): 3943-3952.
- [11] DORDEVIC T, ANTOV M. Ultrasound assisted extraction in aqueous two-phase system for the integrated extraction and separa-

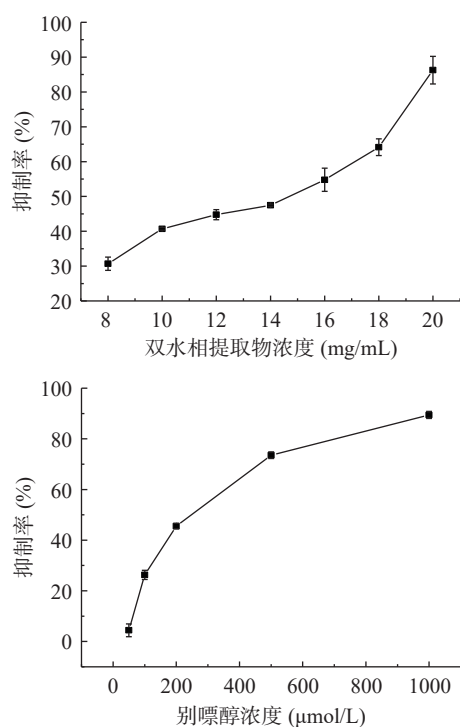


图9 不同浓度的刺梨黄酮提取物和别嘌呤对黄嘌呤氧化酶活性的影响

Fig.9 Effects of different concentrations of *Rose roxburghii* Tratt extract and allopurinol on the activity of xanthine oxidase

- tion of antioxidants from wheat chaff[J]. *Separation and Purification Technology*, 2017, 182: 52–58.
- [12] WANG W H, LI W L, CHEN C Y, et al. Antioxidant ability of *Chenopodium formosanum* extracted using an ethanol–ammonium sulfate two-phase system[J]. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2022, 9(1): 1–8.
- [13] WANG W X, YANG J B, YANG J. Optimization of ultrasound-assisted aqueous two phase extraction of polyphenols from olive leaves[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2021, 51(8): 821–831.
- [14] ZHU J, KOU X, WU C, ET AL. Enhanced extraction of bioactive natural products using ultrasound-assisted aqueous two-phase system: Application to flavonoids extraction from jujube peels[J]. *Food Chemistry*, 2022, 395: 133530.
- [15] AHMAD M M, PRZYBYCIEN T. Towards optimal aqueous two-phase extraction system flowsheets for protein purification[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2013, 88(1): 62–71.
- [16] RUFINO A F, ALMEIDA M R, SHARMA M, et al. Separation of albumin from bovine serum applying Ionic-liquid-based aqueous biphasic systems[J]. *Applied Sciences*, 2022, 12(2): 707.
- [17] HU J, LIU J, HUANG X, et al. Efficient extraction of polysaccharides from *Lycium barbarum* L. by aqueous two-phase system combined with tissue-smashing extraction[J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 184: 115036.
- [18] LI G, MA X K, JIANG Y M, et al. Aqueous two-phase extraction of polysaccharides from *Selaginella doederleinii* and their bioactivity study[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 118: 274–282.
- [19] MAO G, YU P, ZHAO T, et al. Aqueous two-phase simultaneous extraction and purification of a polysaccharide from *Grifola frondosa*: Process optimization, structural characteristics and antioxidant activity[J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 184: 114962.
- [20] SUNG Y Y, YUK H J, KIM D S. Saengmaeksan, a traditional herbal formulation consisting of *Panax ginseng*, ameliorates hyperuricemia by inhibiting xanthine oxidase activity and enhancing urate excretion in rats[J]. *Journal of Ginseng Research*, 2021, 45(5): 565–574.
- [21] QIAO J, LU G, WU G, et al. Influence of different pretreatments and drying methods on the chemical compositions and bioactivities of *Smilacis glabrae Rhizoma*[J]. *Chinese Medicine*, 2022, 17(1): 1–21.
- [22] DAI H N, LÜ S, QIAO Z A, et al. The active components of sunflower (*Helianthus annuus* L.) calathide and the effects on urate nephropathy based on COX-2/PGE2 signaling pathway and the urate transporter URAT1, ABCG2, and GLUT9[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 16.
- [23] HU Y, SHI Y F, CHEN H, et al. Blockade of autophagy prevents the progression of hyperuricemic nephropathy through inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 2022.
- [24] 徐梦琪, 徐德平. 土茯苓降尿酸活性成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(11): 1860–1865. [XU M Q, XU D P. Anti-uric acid constituents from *Rhizoma Smilacis Glabrae*. [J]. *Natural Product Research and Development*, 2020, 32(11): 1860–1865.]
- [25] 刘静波, 郭兵兵, 张燕. 玉米须抑制黄嘌呤氧化酶活性成分的提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(13): 232–235. [LIU J B, GUO B B, ZHANG Y. Extraction of anti-xanthine oxidase substances from corn silk[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(13): 232–235.]
- [26] 郭亚芳, 甘静, 李东东, 等. 中草药对尿酸转运体的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(9): 839–842. [GUO Y F, GAN J, LI D D, et al. Effect of Chinese herbal medicine on uric acid transporter[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology*, 2020, 21(9): 839–842.]
- [27] 符静泉, 郭为, 韦曼莉, 等. 猫须草水提物对痛风性肾病大鼠肾脏 URAT1、OAT1 及病理的影响[J]. 中成药, 2021, 43(4): 877–882. [FU J Q, GUO W, WEI M L, et al. Effects of aqueous extract of *Orthosiphon stamineus* on renal URAT1, OAT1 and pathology of rats with gouty nephropathy[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2021, 43(4): 877–882.]
- [28] 姜健, 刘波, 李刚, 等. 离子液体双水相萃取及检测牛血中血红蛋白[J]. 化学研究与应用, 2022, 34(9): 2142–2148. [JIANG J, LIU B, LI G, et al. Extraction and detection of hemoglobin in bovine blood by ionic liquid-based aqueous biphasic system[J]. *Chemical Research and Application*, 2022, 34(9): 2142–2148.]
- [29] WANG L, LUO Y, WU Y N, et al. Fermentation and complex enzyme hydrolysis for improving the total soluble phenolic contents, flavonoid aglycones contents and bio-activities of guava leaves tea[J]. *Food Chemistry*, 2018, 264: 189–198.
- [30] QIN B L, LIU X C, CUI H M, et al. Aqueous two-phase assisted by ultrasound for the extraction of anthocyanins from *Lycium ruthenicum Murr*[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2017, 47(9): 881–888.
- [31] LÜ S M, ZHANG M Q, CHEN J S, et al. Study on the anti-hyperuricemic bioactivity and chemical components of *Sterculiae lychnophorae Semen*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 95: 105173.
- [32] LOH K E, CHIN Y S, ISMAIL I S, et al. Rapid characterisation of xanthine oxidase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum morifolium* Ramat using metabolomics approach[J]. *Phytochemical Analysis*, 2022, 33(1): 12–22.
- [33] 俞耀文, 戴国庆, 华浩立, 等. 乙醇-硫酸铵双水相体系提取桃花总黄酮及其抗氧化性能[J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 187–195. [YU Y W, DAI G Q, HUA H L, et al. Ethanol-ammonium sulfate aqueous two-phase extraction of total flavonoids from peach blossom and its antioxidant activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(4): 187–195.]
- [34] 汪建红. 双水相辅助内部沸腾法提取桂花叶黄酮[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(4): 22–28. [WANG J H. Extraction of flavonoid in *Osmanthus* leaves by aqueous two-phase system assisted inner ebullition method[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(4): 22–28.]
- [35] DERRIEN M, BADR A, GOSSELIN A, et al. Optimization of a green process for the extraction of lutein and chlorophyll from spinach by-products using response surface methodology (RSM)[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 79: 170–177.
- [36] 于建丽, 王汝华, 孟琬星, 等. 桑叶黄酮的双水相萃取及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(9): 32–39. [YU J L, WANG R H, MENG W X, et al. Aqueous two-phase extraction of *Mulberry* leaf flavonoids and their antioxidant activity[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(9): 32–39.]
- [37] 玉澜, 龙海华, 唐森, 等. 超声波辅助乙醇-硫酸铵双水相体系提取绞股蓝总黄酮工艺研究[J]. 中国饲料, 2021(13): 24–28. [YU L, LONG H H, TANG S, et al. Ultrasonic assisted ethanol-ammonium sulfate aqueous two-phase system extraction of total flavonoids from *Gynostemma pentaphyllum*[J]. *China Feed*, 2021(13): 24–28.]
- [38] 臧青民, 李秋珊, 徐燕波, 等. 超声波辅助双水相体系优化橘

- 红花总黄酮提取工艺及其抗氧化活性[J]. 化学试剂, 2022, 44(4): 557-563. [ZANG Q M, LI Q S, XU Y B, et al. Optimization of ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction of total flavonoids from *Exocarpium citri grandis* flowers and its antioxidant activity[J]. Chemical Reagents, 2022, 44(4): 557-563.]
- [39] HUI, ZHANG, HUI-PENG, et al. Screening for selective inhibitors of xanthine oxidase from *Flos Chrysanthemum* using ultrafiltration LC-MS combined with enzyme channel blocking[J]. *Journal of Chromatography, B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2014, 961: 56-61.
- [40] LI F, LIU Y P, XIE Y Y, et al. Epigallocatechin gallate reduces uric acid levels by regulating xanthine oxidase activity and uric acid excretion *in vitro* and *in vivo*[J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2020, 9(2): 331-338.
- [41] BOUCHEFFA S, SOBHI W, ATTOUI A, et al. Effect of the main constituents of *Pistacia lentiscus* leaves against the DPPH radical and xanthine oxidase: experimental and theoretical study[J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2022, 40(20): 9870-9884.
- [42] 郝婷婷. 七种药用植物降尿酸效果评价[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2020. [HAO T T. Evaluation of seven medicinal plants in uric acid levels reducing effect[D]. Shenyang: Liaoning University, 2020.]
- [43] 钟英英, 周佳明, 叶美凤, 等. 辣木叶提取物对黄嘌呤氧化酶活性的抑制[J]. 食品工业, 2020, 41(11): 55-58. [ZHONG Y Y, ZHOU J M, YE M F, et al. Effects of *Moringa oleifera* leaves extracts on lipase activity[J]. The Food Industry, 2020, 41(11): 55-58.]
- [44] 申启荣. 中药黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选及抑制动力学研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2015. [SHEN Q R. The screening and study on the inhibition kinetics of xanthine oxidase inhibitors from Chinese herbal medicine[D]. Nanchang: Nanchang University, 2015.]