

响应面法优化超声提取柚皮总黄酮工艺的研究

于桂香¹, 于咏梅¹, 张中华², 俞守能¹, 刘建萍¹

(1. 中国农业大学烟台研究院, 山东 烟台 264670; 2. 烟台市土地资产经营中心, 山东 烟台 264000)

摘要:利用超声波法提取蜜柚果皮中的总黄酮,在单因素试验的基础上,采用响应面法对主要工艺参数进行优化并得到回归模型。结果表明:回归模型较好地反映了黄酮得率与乙醇浓度、提取温度、超声时间的关系;最佳工艺条件为乙醇浓度 81%、提取温度 61.5℃、超声时间 45 min。在此工艺条件下,蜜柚果皮黄酮得率为 6.667 mg/g,与回归模型预测值的相对误差为 0.01%。

关键词:柚皮;黄酮;超声提取;参数优化;响应面法

中图分类号:R 284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)08-0023-04

蜜柚(*Citrus grandis* L.)属芸香科柑橘属水果,具有较高的营养价值和药用价值。柚果实中除含有多种氨基酸、维生素和矿物质元素外,还含有柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、柚皮素芸香苷、类柠檬苦素、胰岛素类似物、酚酸、香精油等多种生理活性成分,并且这些成分在柚皮中的含量明显高于柚果实^[1]。传统中医认为,柚皮具有止咳、化痰、理气、抗炎、止痒等功效。现代医学研究表明,柚皮提取物具有抗氧化、抗衰老、抗癌、抗微生物、抑酶、降血糖、降血压、预防动脉粥样硬化等活性。柚皮中富含的总黄酮是柚皮产生这些生理调节和药理作用的主要成分。总黄酮的提取方法主要有水提法、碱性水或碱性稀醇提取法、有机溶剂提取法等。

超声波是一种弹性机械振动波,它能产生强烈振动,产生高速度、强烈的空化效应,能破坏植物的细胞,使溶媒渗透到植物细胞内,促使液-固之间发生分子的相互渗透,促进有效成分的溶解,加快有效成分进入介质^[2-3]。因此,超声提取具有缩短时间,能耗低、效率高等特点。现运用响应面法(RSA)考察主要因素对超声提取柚果皮黄酮得率的影响,筛选出超声提取蜜柚果皮总黄酮的最佳工艺条件,旨在为蜜柚果皮的综合利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蜜柚(市售),果皮自然风干。硝酸铝、亚硝酸钠、氢

氧化钠、乙醇、三氯化铝等,均为分析纯。芦丁,生化试剂。

1.2 仪器与设备

Cary50 紫外-可见分光光度计,美国瓦里安公司;FW100 高速万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;FA2004 电子天平,上海精科天平有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;DZF-6050 真空干燥箱,上海恒科学仪器有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣实验设备有限公司;SHZ-III 型循环水真空泵,上海亚荣生化仪器厂;SZ-93 自动双重纯水蒸馏器,上海亚荣生化仪器厂;PHS-2C 精密酸度计,上海雷磁仪器厂;KQ5200DE 数控超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 芦丁标准曲线及回归方程 精确称取 0.0203 g 芦丁标准品,用 60% 的乙醇溶解,定容至 100 mL 容量瓶中,配制成 0.203 g/L 的芦丁对照品溶液。准确移取 0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 mL 的芦丁的对照品溶液于 25 mL 的容量瓶中,加 60% 乙醇至 5 mL,5% NaNO₂ 0.75 mL,摇匀后放置 5 min;然后加入 10% Al(NO₃)₃ 0.75 mL,摇匀后放置 5 min;再加入 10 mL 1 mol/L NaOH,用 60% 乙醇稀释至刻度,摇匀后放置 10 min;以相应试剂作空白,于 510 nm 处测吸光度,制作芦丁标准曲线,线性回归得到黄酮浓度 C 与吸光度 A 的方程: $C = 82.283A - 0.0749$, 决定系数 $R^2 = 0.9999$ 。

1.3.2 蜜柚果皮中总黄酮的提取及含量的测定 精密称取 1.0 g 蜜柚果皮粉,在设定条件下进行超声提取 1 次,取上清液浓缩蒸干加乙醇定容,按 1.3.1 的方法测得总黄酮得率。

1.3.3 单因素试验 以乙醇浓度 80%,料液比 1:20 (w/v)、超声时间 30 min,提取温度 50℃,pH 7.8、提取次数为 1 次作为基本条件,分别调整各因素,进行单因素试验。单独考察不同乙醇浓度(50%、60%、70%、80%、

第一作者简介:于桂香(1960-),女,山东烟台人,本科,副教授,现主要从事天然产物化学研究工作。E-mail: ytyuguixiang@126.com。

责任作者:刘建萍(1962-),女,四川内江人,博士,教授,现主要从事天然产物化学研究工作。E-mail: liujp816@126.com。

基金项目:中国农业大学烟台研究院科研基金资助项目(2010)。

收稿日期:2011-02-18

90%)、料液比(1:10,1:15,1:20,1:25,1:30)、超声时间(20,25,30,35,40 min)、提取温度(20,30,40,50,60℃)、提取次数(1,2,3,4次)对蜜柚果皮总黄酮提取效果的影响,每个处理3次重复。

1.3.4 主要因素的确定 Plackett-Burman 设计 依据单因素试验的结果。利用 SAS 软件实验设计中的“Two-level”即二水平设计筛选主要因素。A 为料液比,B 为提取次数,C 为时间,D 为溶剂浓度,E 为温度,F 为 pH。1 取每个因素里最高响应值 A(吸光度)所对应的水平,-1 则取每个因素里最低响应值 A 所对应的水平^[4]。

1.3.5 最优水平的确定 Box-Behnken 设计 试验因素的水平编码见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素和水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken experiment design

水平 Level	乙醇浓度 Ethanol Concentration/%	温度 Temperature/℃	时间 Time /min
-1	70	50	30
0	80	60	40
1	90	70	50

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇浓度的确定 由图 1 可知,随乙醇浓度的增加吸光度增大,在 80% 的乙醇浓度条件下达到最大。所以选用 80% 的乙醇浓度。

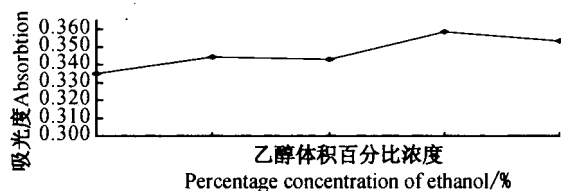


图 1 乙醇浓度对提取效果的影响

Fig. 1 Effects of ethanol concentration on extraction results

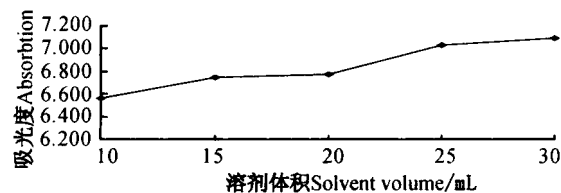


图 2 料液比对提取效果的影响

Fig. 2 Effects of different material to liquid ratio on extraction results

2.1.2 料液比的选择 由图 2 可知,总吸光值(1 mL 浸提溶液吸光度值×溶剂浸提后总体积)随料液比增加而增加,但增幅不大,选择料液比较小可以节约成本。综合考虑,采用 1:20 的料液比。

2.1.3 超声时间的选择 由图 3 可知,在 20~40 min 内,随着超声时间的延长,吸光度值逐渐增加,若进一步延长提取时间,吸光度值不再增加,所以选取 40 min。

2.1.4 提取温度的选择 由图 4 可知,在 20~60℃ 之

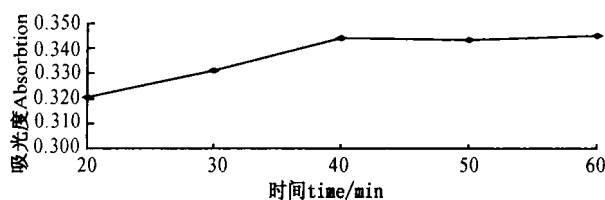


图 3 超声时间对提取效果的影响

Fig. 3 Effects of ultrasonic time on extraction results

间,随着温度的升高提取液吸光度值逐渐增加,在 60℃ 时达到最大值,故选用 60℃。

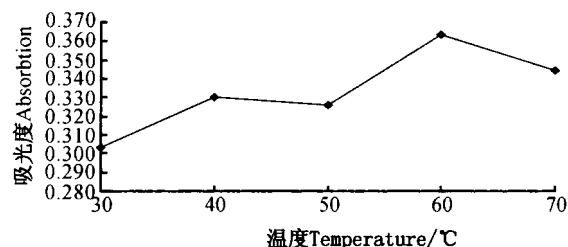


图 4 温度对提取效果的影响

Fig. 4 Effects of temperature on extraction results

2.1.5 提取次数的选择 由图 5 可知,随着提取次数增加总吸光度值并没有明显增加,第 1~4 次提取后的总吸光度值差别很小,从节约成本及提取效率的角度考虑,选用提取 1 次。

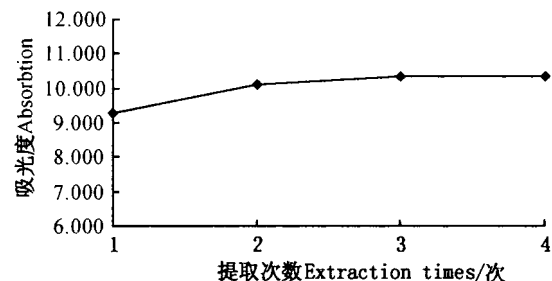


图 5 提取次数对提取效果得影响

Fig. 5 Effects of extraction times on its results

2.1.6 pH 值的选择 由图 6 可知,pH 值在 9 左右时,吸光的 pH 值选用 9 度值较大,而后随着 pH 值的增加吸光度逐渐降低,因此提取溶剂。

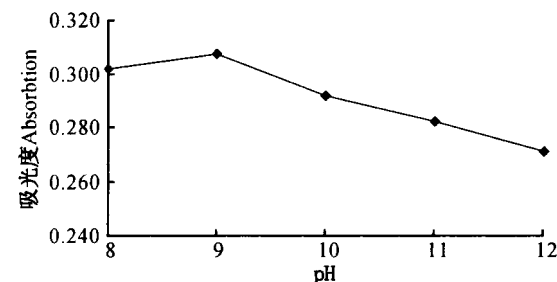


图 6 pH 值对提取效果的影响

Fig. 6 Effects of pH value on extraction results

2.2 Plackett-Burman 设计统计分析结果

2.2.1 响应值结果 由 Plackett-Burman 设计方案的结果见表 2,将表 2 数据进行方差分析,结果见表 3。

表2 Plackett-Burman 设计方案及响应值

Table 2 Plackett-Burman design scheme and its response value

序号 Number	乙醇浓度 Ethanol concentration	料液比 Ratio of material to liquid	时间 Time	温度 Temperature	pH	提取次数 Extraction times	吸光度 Absorbance
1	1	-1	-1	1	1	-1	0.343
2	1	1	-1	-1	-1	-1	0.294
3	-1	1	-1	1	-1	1	0.301
4	1	-1	1	-1	-1	1	0.333
5	-1	-1	-1	-1	1	1	0.279
6	-1	-1	1	1	-1	-1	0.356
7	-1	1	1	-1	1	-1	0.329
8	1	1	1	1	1	1	0.373

2.2.2 主要因素的确定 从表3可看出,对响应值吸光度影响的显著性排列顺序为时间>温度>乙醇浓度>pH>提取次数>料液比。时间、温度、乙醇浓度3个因素的 F 值置信度均在95%以上,而其它因素的置信度均低于95%。故选择时间、温度、乙醇浓度这3个因素为主要因素作进一步的响应面分析,以确定这些因素所对应的最优水平。

表3 各因素的方差分析

Table 3 Variance analysis of different factors table

方差来源 Source of variance	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	$Pr > F$
乙醇浓度 Ethanol concentration	1	0.000761	380.25	0.0326 *
料液比 Ratio of material to liquid	1	2.45E-05	12.25	0.1772
时间 Time	1	0.003785	1 892.25	0.0146 *
温度 Temperature	1	0.002381	1 190.25	0.0184 *
pH	1	0.000200	100	0.0635
提取次数 Extraction time	1	0.000162	81	0.0704
误差 Error	1	0.000002		

2.3 响应面法对超声提取工艺参数的优化

2.3.1 设计方案及响应值结果 由Box-Behnken设计方案所得的结果见表4。其中 x_1 、 x_2 、 x_3 分别对应乙醇浓度、温度、时间。

2.3.2 总黄酮得率回归模型的建立和显著性检验 对试验数据利用Design Expert 7.1软件进行回归分析,各因素经回归拟合后,得到蜜柚果皮黄酮得率 Y 与提取各因素变量的二次回归方程模型为: $Y=6.71+0.042x_1+0.12x_2+0.14x_3+0.065x_1x_2+0.046x_1x_3+5.625\times 10^{-6}x_2x_3-0.22x_1^2-0.46x_2^2-0.16x_3^2$ 。式中,乙醇浓度 x_1 、温度 x_2 、时间 x_3 在设计中均经量纲性编码处理,故方程中各项系数绝对值的大小直接反映了各因素对指标值的影响程度,系数的正负反映了影响的方向。为了检验方程的有效性,对超声提取蜜柚果皮总黄酮的数学模型进行方差分析,并对各因子的偏回归系数进行检验,结果见表5。一次项中 x_2 、 x_3 的回归系数极显著, x_1 显著,说明提取温度和时间对总黄酮得率有极显著影响,乙醇浓度有显著影响;交互项中 x_1x_2 的偏回归系数显著,说明乙醇浓度和提取温度的交互作用对总黄酮得率有显著影响;二次项的偏回归系数均达到极显著水平,说明

各因素和指标之间不是简单的线性关系,而是二次关系。该回归模型极显著,决定系数达0.9899,调整后决定系数为0.9768,且失拟项不显著,说明该方程对试验拟合较好。

表4 Box-Behnken 设计方案及响应值

Table 4 Box-Behnken design scheme and its response value

试验号 Number	乙醇浓度 x_1 Ethanol concentration $x_1/\%$	温度 x_2 Temperature $x_2/^\circ\text{C}$	时间 x_3 Time/min	总黄酮得率 Total extracting rate of flavonoids/mg. g ⁻¹
1	80	60	40	6.68178
2	90	70	40	6.21893
3	70	60	30	6.14489
4	70	70	40	6.05232
5	80	60	40	6.71879
6	80	70	30	6.12637
7	70	60	50	6.38557
8	80	60	40	6.68178
9	80	70	50	6.36705
10	90	60	30	6.1819
11	80	50	30	5.83016
12	80	60	40	6.73422
13	80	60	40	6.75025
14	70	50	40	5.97825
15	90	50	40	5.88568
16	90	60	50	6.60771
17	80	50	50	6.07081

表5 方差分析
Table 5 Variance analysis

来源 Source	SS	df	MS	F 值 F value	$Pr > F$
回归模型 Regression model	1.63	9	0.18	75.88	<0.0001 ***
x_1	0.014	1	0.014	5.83	0.0465 *
x_2	0.12	1	0.12	52.46	0.0002 ***
x_3	0.16	1	0.16	69.15	<0.0001 ***
x_1x_2	0.017	1	0.017	7.05	0.0327 *
x_1x_3	8.568E-003	1	8.568E-003	3.60	0.0997
x_2x_3	1.266E-010	1	1.266E-010	5.314E-008	0.9998
x_1^2	0.21	1	0.21	88.76	<0.0001 ***
x_2^2	0.87	1	0.87	366.77	<0.0001 ***
x_3^2	0.11	1	0.11	44.85	0.0003 ***
残差 Residual error	0.017	7	2.382E-003		
失拟项 Lack of fit	0.013	3	4.284E-003	4.49	0.0906
净误差 Net error	3.820E-003	4	9.550E-004		
总变异 Total variation	1.64	16			

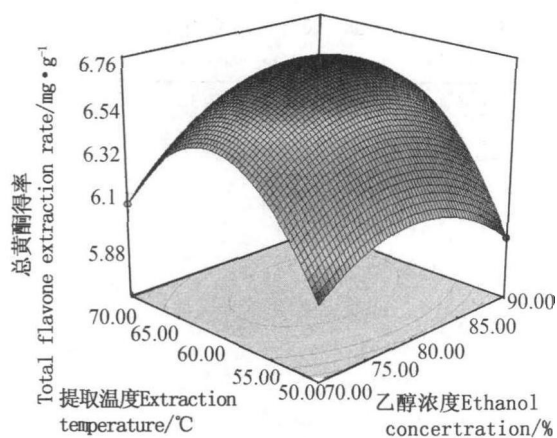
注:***表示差异极显著($P<0.01$);*表示差异显著($P<0.05$)。

Note:***, difference was extremely significant($P<0.01$); *, difference was significant ($P<0.05$).

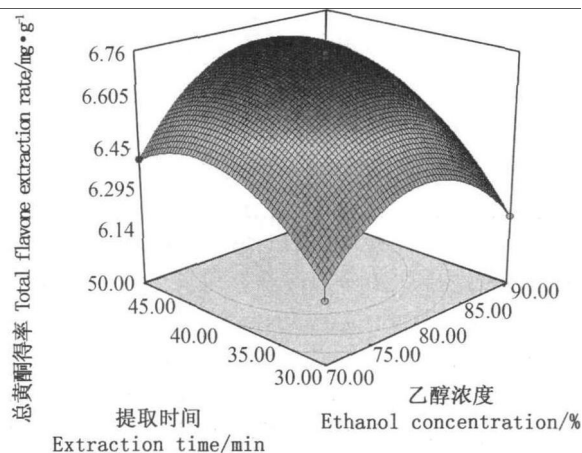
2.3.3 蜜柚果皮黄酮提取的响应面分析 根据回归方程做出响应面,考察拟合响应曲面的形状,分析乙醇浓度和提取温度、提取时间对总黄酮得率的影响,结果见图7。由图7(a)可知,温度和乙醇浓度对试验指标的影响皆为明显的二次抛物线,总黄酮得率随温度的升高和乙醇浓度的增加快速增加,且有明显的交互作用。根据相似相溶原理,当乙醇浓度极性与黄酮极性相近时,有利于黄酮的溶出。同时温度的升高使得分子解附和扩散运动速度加快,从而提高了黄酮的溶出速率和得率。如果温度过高,乙醇在高温下挥发较多,导致提取溶剂损失较大,从而影响提取黄酮的得率。因此,适当增大

乙醇浓度和提高温度有助于提高黄酮得率。由图 7(b)可知,总黄酮得率与超声时间具有明显的二次抛物线关系,在近 45 min 处出现峰值,说明在一定范围内时间的

延长有助于黄酮的充分扩散溶出,但达到一定时间后再延长,会使大量水溶性杂质如多糖溶出,提取液变的粘稠对黄酮产生吸附作用,不利于黄酮的快速扩散溶出。



(a)



(b)

图 7 乙醇浓度、超声时间和提取温度对黄酮得率的影响

Fig. 7 Effects of ethanol concentration, ultrasonic time and extraction temperature to extracting rate of flavonoids

2.3.4 提取工艺条件的确定及可靠性验证 在模型取值范围内选择最低点为出发点,依模型使用快速上升法进行优化,可得到超声提取蜜柚总黄酮的最佳理论工艺条件为:乙醇浓度 81.64%,提取温度 61.48℃,超声时间 44.75 min,最佳工艺条件下总黄酮得率为 6.760 mg/g。以乙醇浓度 82%,提取温度 61.5℃、提取时间 45 min 进行 3 次验证试验,平均总黄酮得率 6.667 mg/g,与理论预测值相比,其相对误差约为 0.01%。因此,采用 RSA 法优化得到的提取条件准确可靠,具有实用价值。

3 结论

在单因素试验的基础上,采用 RSA 法优化了超声提取蜜柚总黄酮的工艺参数,建立了回归模型方程,该模型回归极显著,决定系数达 0.9899,且失拟项不显著,说明该方程能较好的预测蜜柚黄酮提取得率随各参数

变化的规律。

通过响应面图分析了各因素及其交互影响对超声提取蜜柚总黄酮得率的影响,找到整个区域上因素的最佳组合和响应值的最优值。根据优化提取条件进行验证试验,在乙醇浓度为 81%,提取温度 61.5℃、超声时间为 45 min 的条件下,蜜柚总黄酮得率为 6.667 mg/g。

参考文献

- [1] 邓婷婷,刘素纯,贺建华,等.柚皮提取物有效成分的研究概况[J].中国食物与营养,2008(6):16-19.
- [2] 牛春铃,吴胜举,沈壮志,等.盾叶薯蓣总皂苷超声提取及动力学[J].生物加工过程,2009,7(4):20-23.
- [3] 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.
- [4] 冯涛,曹东旭,高辉,等.利用响应面法确定竹叶中黄酮最佳提取条件[J].天津轻工业学院学报,2003,18(2):9-13.

Optimization of Ultrasonic—Assisted Extraction of Total Flavones from *Citrus grandis* Peel by Response Surface Analysis

YU Gui-xiang¹, YU Yong-mei¹, ZHANG Zhong-hua², YU Shou-neng¹, LIU Jian-ping¹

(1. Yantai Academy of China Agricultural University, Yantai, Shandong 264670; 2. Yantai Municipal Land Assets Management Center, Yantai, Shandong 264000)

Abstract: Using method of ultrasonic to total flavonoids from *Citrus grandis* were extracted based on the single factor test, by the methods of response surface to key process parameters were optimized and acquire regression model. The results showed that better reflects the relationship of the flavonoids yield and ethanol concentration, extraction temperature, extraction time. The ethanol concentration of 81%, extraction temperature of 61.5℃, extraction time 45 min were optimum conditions. Under this condition, the pomelo peel flavonoids yield was 6.667 mg/g, relative error was 0.01% than predicted value of regression model.

Key words: *Citrus grandis* peel; flavones; ultrasonication extraction; parameter optimization; method of response surface