

紫茉莉种外皮多酚提取工艺的响应面法优化研究

王新红, 吴秀红, 左玉香

(江苏盐城师范学院 化学化工学院, 江苏 盐城 224051)

摘要:以紫茉莉种外皮为原料,在单因素试验基础上,采用响应面优化设计,研究了提取时间、超声温度、液固比和乙醇浓度对多酚提取量的影响,并分析了各因素的显著性和交互作用。结果表明:优化的最优工艺为超声时间 46 min,超声温度 62℃,液固比 23 mL:1 g,乙醇浓度 75%。在此条件下紫茉莉种外皮多酚提取量为 4.41 mg/g,表明响应面回归方程模型科学合理,可用于实际预测。

关键词:紫茉莉种外皮;响应面法;多酚

中图分类号:S 685.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)07-0147-04

紫茉莉(*Mirabilis jalapa* L)属紫茉莉科紫茉莉属多年生草本花卉,在我国内地可普遍生长。紫茉莉易栽培管理,生命力极其旺盛。紫茉莉除观赏外,它的根、叶、花可入药,叶、胚乳可制化妆用香粉。研究表明,其根、茎、花、叶及种子中的主要化学成分具有一定的生物活性和药理作用,其药用主要在于它可以治疗利尿、泻热、活血散瘀;可治淋浊、急性关节炎、疥疮创伤、葡萄疮等疾病^[1-2]。具有重要生理活性的植物多酚类化合物可以作为活性氧消除剂和脂质抗氧化剂的来源^[3],也可以在抗自由基、抗肿瘤和抗心脑血管疾病等方面发挥药效^[4]。但是对于紫茉莉种外皮的活性成分的提取研究鲜见报道,对紫茉莉种外皮的活性成分提取进行深度开发研究具有重要意义和经济价值。该试验在单因素试验的基础上,采用响应面分析法^[5-6],在 Design-Expert 7.1.6 软件的支持下优化提取工艺,获得最优工艺参数,以期紫茉莉种外皮的工业和药学利用提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

紫茉莉种外皮:紫茉莉种子于 2011 年 8 月在盐城的花卉种植园采摘。剥开种子,弃掉内瓢,留下外皮,在 50℃下烘干至恒重,然后用植物粉碎机粉碎后过 100 目筛收集粉末,即为紫茉莉种外皮原料粉,放置在密封阴凉干燥处待用。

Folin-Ciocalteu 试剂由上海国药试剂有限公司提

供;无水乙醇、铁氰化钾、磷酸钠、氯化高铁、碳酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等均为分析纯。试验用水为双纯蒸馏水。

仪器与设备:德国耶拿公司 SPECORD-50 紫外分光光度计;FA2004N 型电子分析天平,上海精密科学仪器有限公司;KQ-500E 超声波仪器,昆山市超声仪器有限公司;HH-6 型数显恒温水浴锅,金坛市富华仪器有限公司;SHZ-III 型循环水式真空泵,上海亚荣生化仪器厂;RE-52AA 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 紫茉莉种外皮多酚类物质的提取 精确称取紫茉莉种外皮原料粉 2.00 g 放入烧瓶中,加入一定量的提取溶剂,在一定超声波条件下提取多酚类物质,抽滤后 40℃浓缩至一定体积,定容至 100 mL 后密封避光储存待测。

1.2.2 多酚的测定 采用 Folin-Ciocalteu 试剂法测定^[7]:准确吸取不同体积提取液于具塞比色管中,加入 2.0 mL Folin-Ciocalteu 试剂,4 min 后加入 2.0 mL 饱和 Na₂CO₃溶液,室温下静置 90 min 后,在 760 nm 处测量吸光度。根据标准曲线计算提取液中的多酚含量。用没食子酸做标准物质,提取液中总酚含量表示为每克干重植物中含有的没食子酸的量。没食子酸标准曲线方程: $y=0.0629x+0.0018$, $R^2=0.9947$,其中 y 表示吸光度, x 表示没食子酸含量(单位:mg/g)。

1.2.3 紫茉莉种外皮多酚提取的单因素试验 分别以超声温度、超声时间、液固比和乙醇浓度 4 个因素作单因素试验,研究各因素对多酚提取量的影响。

1.2.4 响应面分析法优化工艺条件 根据单因素试验结果,利用 Design-Expert 7.1.6 软件进行响应曲面设计,优化紫茉莉种外皮多酚的提取工艺。

第一作者简介:王新红(1974-),女,硕士,讲师,现主要从事天然植物活性成分的提取与活性测试方面的研究工作。E-mail:wangx-hong1227@163.com.

基金项目:江苏省高校自然科学基金基础研究资助项目(12KJD150012);2012 年盐城师范学院自然科学研究资助项目(12YCKL005)。

收稿日期:2012-12-10

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇浓度的确定 试验采用乙醇浓度分别为0%、30%、50%、70%、90%，在超声温度 50℃，超声时间 40 min，液固比 20:1(mL:g)的条件下，研究不同浓度的乙醇对紫茉莉种外皮中多酚提取率的影响。结果表明，多酚提取率随乙醇浓度增加呈现递增趋势，到乙醇浓度为 70%时提取率最大，而 70%以后多酚提取率呈下降趋势，因此试验选范围为 50%~90%的乙醇作溶剂较合适。

2.1.2 超声时间的确定 在超声温度 50℃、液固比 20:1(mL:g)的条件下，分别采用 70%的乙醇溶液浸提紫茉莉种外皮，研究超声时间从 10~60 min 对多酚提取率的影响。结果表明，随时间延长，超声波对物料的提取效应更加充分，多酚提取率随时间增加而增加，到达 40 min 时达到最大值，随时间的增加，提取量有所下降。因此超声提取时间的最合适范围为 30~40 min。

2.1.3 超声温度的确定 采用 70%的乙醇溶液，按液固比 20:1(mL:g)，超声时间 40 min，分别在 20、30、40、50、60、70℃的条件下对紫茉莉种外皮超声提取。结果表明，多酚提取量随着温度升高逐渐增大，在到达 50℃后提取量逐渐趋于平缓，可能是由于随着温度升高，多酚的化学结构遭到破坏，另外在高温下乙醇挥发使料液比改变，影响提取量。因此超声提取温度的最适范围为 30~70℃。

2.1.4 液固比的确定 在 50℃分别以液固比 10:1、15:1、20:1、25:1、30:1 (mL:g)的 70%乙醇溶液对紫茉莉种外皮超声浸提 50 min，考察液固比对多酚提取率的影响。由结果可知，多酚提取量随液固比增大而逐渐增大，20:1 后提取量趋于平缓，说明多酚的浸出量已达饱和，因此，液固比最合适范围为 15:1~25:1 (mL:g)。

2.2 响应面分析法优化工艺条件

2.2.1 响应面设计及结果分析 综合单因素试验结果，应用 Design Expert 7.1.6 软件，采用 Box-Behnken Design (BBD)建立数学模型^[8]，以紫茉莉种外皮多酚提取量(Y)为响应值，以超声时间(A)、超声温度(B)、液固比(C)和乙醇浓度(D)为自变量，通过响应曲面分析法优化提取条件。试验采用 4 因素 3 水平共 29 个试验组进行响应面分析。提取工艺响应面分析试验因素与水平设计见表 1，由 BBD 设计方案所得的结果见表 2。利用 Design Expert 7.1.6 统计软件对表 2 中试验数据进行回归拟合，得到紫茉莉种外皮多酚的提取量对所选 4 个因素的二次多项回归模型为： $Y = -0.47925 + 0.015976X_1 + 0.038708X_2 + 0.021339X_3 + 0.082955X_4 - 4.37500 \times 10^{-5}X_1X_2 + 4.07500 \times 10^{-4}X_1X_3 - 6.75000 \times 10^{-5}X_1X_4 - 4.0 \times 10^{-5}X_2X_3 - 1.78125 \times 10^{-4}X_2X_4 + 1.63750 \times 10^{-4}X_3X_4 - 2.00375 \times 10^{-4}X_1^2 - 1.86938 \times 10^{-4}X_2^2 - 1.08275 \times 10^{-3}X_3^2 - 4.84750 \times 10^{-4}X_4^2 \dots\dots\dots (1)$ 。

表 1 提取工艺响应面分析试验因素与水平

Table 1 Factors and levels in response surface analysis

因素	水平		
	-1	0	1
A 超声时间/min	30	40	50
B 超声温度/℃	40	50	60
C 液固比/mL·g ⁻¹	15:1	20:1	25:1
D 乙醇浓度/%	50	70	90

表 2 提取工艺响应面分析试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y 多酚提取量/mg·g ⁻¹
1	0	-1	-1	0	4.011
2	0	0	1	-1	3.892
3	0	0	0	0	4.351
4	0	0	-1	1	4.138
5	1	0	0	-1	3.991
6	0	-1	0	-1	3.807
7	0	1	0	1	4.204
8	0	1	0	-1	4.105
9	-1	0	0	1	4.211
10	0	0	0	0	4.348
11	-1	0	0	-1	3.899
12	1	0	0	1	4.195
13	0	1	-1	0	4.267
14	1	-1	0	0	4.147
15	0	0	1	1	4.269
16	0	0	0	0	4.340
17	-1	1	0	0	4.278
18	1	0	1	0	4.309
19	0	0	0	0	4.362
20	-1	0	-1	0	4.168
21	0	-1	0	1	4.191
22	0	1	1	0	4.303
23	1	1	0	0	4.316
24	-1	0	1	0	4.115
25	-1	-1	0	0	4.039
26	1	0	-1	0	4.036
27	0	0	0	0	4.338
28	0	0	-1	-1	3.892
29	0	-1	1	0	4.079

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.708	14	0.0505	73.857	<0.0001	***
X ₁	0.007	1	0.0067	9.823	0.0073	**
X ₂	0.120	1	0.1198	175.078	<0.0001	***
X ₃	0.017	1	0.0173	25.213	0.0002	**
X ₄	0.219	1	0.2192	320.402	<0.0001	***
X ₁ X ₂	0.001	1	0.0012	1.790	0.2022	
X ₁ X ₃	0.027	1	0.0266	38.828	<0.0001	***
X ₁ X ₄	0.003	1	0.0029	4.262	0.0580	
X ₂ X ₃	0.000	1	0.0003	0.374	0.5506	
X ₂ X ₄	0.020	1	0.0203	29.676	<0.0001	***
X ₃ X ₄	0.004	1	0.0043	6.270	0.0253	*
X ₁ ²	0.042	1	0.0417	60.896	<0.0001	***
X ₂ ²	0.036	1	0.0363	53.003	<0.0001	***
X ₃ ²	0.076	1	0.0760	111.133	<0.0001	***
X ₄ ²	0.244	1	0.2439	356.402	<0.0001	***
残差	0.010	14	0.0007			
失拟项	0.009	10	0.0009	9.9900	0.0200	*
纯误差	0.000	4	0.0001			
总离差	0.717	28				

注：*** 差异极度显著(P<0.0001)；** 差异高度显著(P<0.01)；* 差异显著(P<0.05)。

对以上模型进行方差分析的结果见表3。由表3可知,失拟项 $P=0.0200<0.05$,表明差异显著。模型 $P<0.0001$,表明回归模型极度显著,拟合程度好。各因素中一次项(X_1 、 X_2 、 X_3)和二次项(X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2)的 P 值均在0.05以下说明其对响应值 Y 影响显著,而交互项(X_1X_2 、 X_1X_4 、 X_2X_3)的 P 值有的大于0.05,说明其对结果影响不显著。

2.2.2 模型优化 为进一步确定最佳提取工艺参数,对回归模型(1)进行手动优化,删除不显著项,回归方程如

下: $Y=-0.16275+9.06333\times 10^{-3}X_1+0.036158X_2+0.019339X_3+0.080255X_4+4.07500\times 10^{-4}X_1X_3-1.78125\times 10^{-4}X_2X_4+1.63750\times 10^{-4}X_3X_4-2.00375\times 10^{-4}X_1^2-1.86938\times 10^{-4}X_2^2-1.08275\times 10^{-3}X_3^2-4.84750\times 10^{-4}X_4^2\cdots\cdots(2)$,由结果可知,删除不显著项后,失拟项($P=0.0154<0.05$)差异不显著, $R^2=0.9805$,说明模型拟合度良好,试验误差较小,因此可用该模型对超声波辅助提取紫茉莉种外皮多酚的工艺进行分析预测。

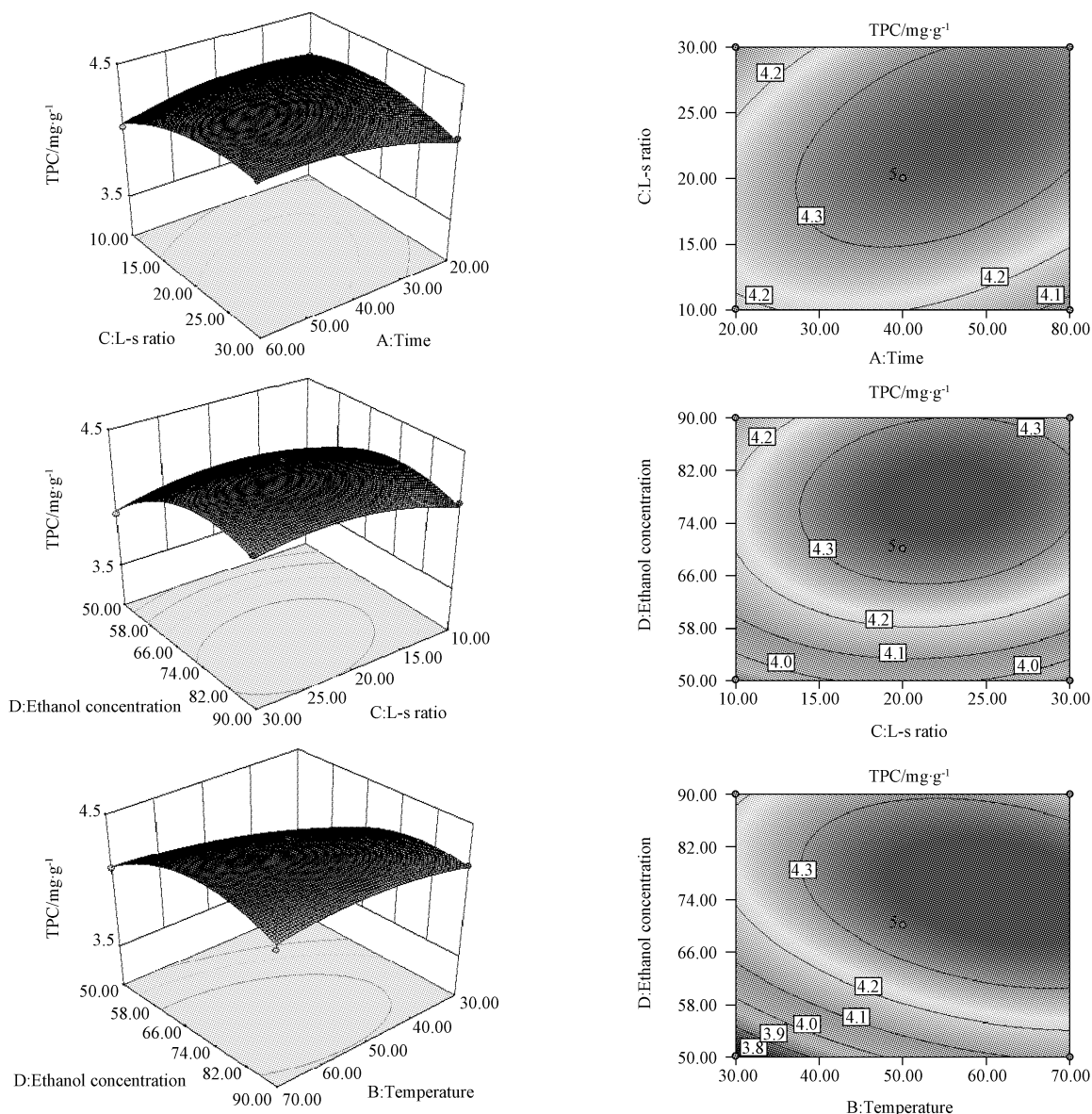


图1 2个因素交互作用对多酚提取量的影响

Fig. 1 Interactive effects of liquid-to-solid ratio, ethanol concentration, temperature and extract time on total phenol content

2.2.3 响应曲面图分析 响应面图形是响应值对各因素所构成的三维空间的曲面图。根据回归方程(2),作响应曲面图(图1左),图1是根据优化后的模型作出的提取时间(A)、超声温度(B)、液固比(C)和乙醇浓度(D)

分别对提取量(Y)的交互影响曲面图。由图1可以看出,3个因素对提取量的影响与单因素试验结果基本一致,呈现先增大后缓降的趋势,但乙醇浓度对多酚的影响较明显,其次是液固比,最后是时间。响应曲面对应

的等高线如图 1 右所示。图 1 中的等高线的形状均为椭圆形,则说明 2 个因素交互作用显著。图 1 直观地反映了各因素对响应值的影响。对图 1 进行分析可得出,乙醇浓度与液固比之间的交互作用最显著,其次是温度与乙醇浓度之间的交互作用,最弱液固比与时间的交互作用。

2.2.4 紫茉莉种外皮多酚提取工艺条件的优化与验证

从优化后模型中可求得最优工艺参数为超声时间 46.37 min,超声温度 61.78℃,液固比 23.35 : 1 (mL : g) 和乙醇浓度为 75.37%(体积百分数),此时紫茉莉种外皮多酚的最大提取量为 4.41 mg/g。对于优化后的最佳未包括在在响应面优化的试验中,所以需要进行验证。考虑到实际操作的可行性,将以上提取工艺条件做了修正,超声时间 46 min,超声温度 62℃,液固比 23 : 1 (mL : g),乙醇浓度 75%。试验进行 3 次平行试验,得到多酚的最终平均提取量为 4.397 mg/g,与理论预测值基本接近。这说明模型方程与实际情况拟合很好,优化的提取工艺参数真实可靠说明响应面分析法适用于工艺的回归分析和参数优化,具有实用价值。

3 结论

利用 Design Expert 7.1.6,采用 Box-Behnken Design 响应面分析法,建立了 4 个因素对多酚含量测定的模型。由模型进行回归分析表明,乙醇浓度对多酚的提取影响最显著,其次是液固比。由建立的回归模型显

著进一步得到了超声波辅助提取紫茉莉种外皮多酚最优工艺:在以 75%乙醇溶液为提取溶剂、液固比 23 : 1 (mL : g)、62℃浸提 46 min,多酚提取量为 4.397 mg/g,与理论预测值基本接近,证明在 BBD 响应面法优化得到的提取工艺条件下,可得到高的多酚提取量,结果准确可靠,可用于实际预测。这为该法在天然植物的活性成分的提取和分离中的应用提供了依据。

参考文献

- [1] 张益民,任玉峰,杨婷.紫茉莉果实水提液对月见草种子萌发和幼苗生长的影响[J].中国农学通报,2011,28:188-191.
- [2] 彭跃峰,鲁红学,周勇.紫茉莉茎提取物的生物活性研究[J].贵州农业科学,2006,34(6):22-24.
- [3] Yang S W, Ubillas R, Mc A J, et al. Three new phenolic compounds from a manipulated plant cell culture *Mirabilis jalapa* [J]. J Nat Prod, 2001, 64: 313-317.
- [4] Guo D J, Cheng H L, Chan S W, et al. Antioxidative activities and the total phenolic contents of tonic Chinese medicinal herbs [J]. Inflammopharmacology, 2008, 16: 201-207.
- [5] 余清,许慧星,肖小蓉,等.基于响应面分析法优化的乌饭树叶总黄酮提取条件[J].食品科学,2008,24(1):93-98.
- [6] 李东东,放茂良,刘琼,等.星点设计-响应面法优化超声提取青竹标多酚[J].中药材,2011,34(1):129-133.
- [7] Wang X H, Dai J T. A comparative study on antioxidant activity of water and ethanol extracts of ten Chinese herbs [J]. J Med Plants Res, 2012, 6 (11): 2210-2215.
- [8] 楠极,李远志,李婷,等.微波辅助提取番石榴叶中多酚物质的工艺研究[J].食品工业科技,2010,31(5):229-230.

Study on Optimization of Extraction Process by Response Surface from Total Phenol of *Mirabilis jalapa* Seed Epicarp

WANG Xin-hong, WU Xiu-hong, ZUO Yu-xiang

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Yancheng Teachers University, Yancheng, Jiangsu 224051)

Abstract: Taking *Mirabilis jalapa* seed epicarp as material, using response surface methodology (RSM), based on single factor experiments, the effect of extraction temperature, extraction temperature, liquid-to-solid ratio and ethanol concentration on extraction content of total phenol were investigated, and the significance of the various factors and interactions were analyzed. The results showed that the optimal extraction conditions were extraction time of 46 min, extraction temperature of 62℃, liquid-solid ratio of 23 : 1 mL/g and ethanol concentration of 75% (V/V). Under the optimization extraction conditions, the experimental yield of total phenol obtained was 4.41 mg/g. The established regression equation for total phenol extraction had an excellent fit, which was credible and can be used for practical prediction.

Key words: *Mirabilis jalapa* seed epicarp; response surface methodology; total phenol