

响应面分析法优化超声提取赣南脐橙皮中黄酮类化合物的工艺研究

杨 佳, 张国文*, 汪佳蓉, 冯利辉

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 研究响应曲面法超声辅助提取赣南脐橙皮中黄酮类化合物的工艺。在单因素试验的基础上, 利用 Design-Expert Software 7.1.3.1 设计了响应面试验, 研究提取温度、乙醇体积分数、液固比(V/m)和超声提取时间等因素对黄酮类化合物得率的影响。结果表明, 赣南脐橙皮中黄酮类化合物的最佳超声提取工艺为: 提取温度 75℃、乙醇体积分数 58.91%、液固比 30.68:1、提取时间 20.79min、提取 2 次, 模型预测可获得黄酮类化合物的得率为 3.298%, 验证实际得率为 3.351%。

关键词: 脐橙皮; 黄酮; 响应曲面; 超声辅助提取

Response Surface Methodology as An Approach to Optimizing Ultrasonic-assisted Extraction of Flavonoids from Navel Orange Peel

YANG Jia, ZHANG Guo-wen*, WANG Jia-rong, FENG Li-hui

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The ultrasonic-assisted extraction process of flavonoids from navel orange peel was studied. On the basis of single factor tests, response surface analysis was designed by Design-Expert Software 7.1.3.1, and the effects of extraction time, ethanol concentration, ratio of liquid to solid, and temperature on the yield of flavonoids were investigated. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: with 58.91% ethanol as the extraction solvent and a ratio of liquid to solid of 30.68 ml/g, twice extraction at 75 °C for 20.79 min. The predicted yield of flavonoids was 3.298%, close to the practical yield of flavonoids of 3.351%.

Key words: navel orange peel; flavonoids; response surface methodology; ultrasonic-assisted extraction

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)16-0094-04

江西赣南脐橙具有果大色艳, 甜酸适度、脆嫩爽口、化渣汁多、香气浓郁等特点而深受消费者喜爱。2008 年赣南脐橙产量达 65 万吨, 脐橙皮约占果重的 20%~35%, 其中含有丰富的精油、果胶、黄酮类化合物和色素等成分, 是一种宝贵的食物资源^[1]。黄酮类化合物具有抗氧化、抗癌、抑菌消炎和防动脉粥样硬化等许多生理活性^[2-3], 在赣南脐橙皮内诸多黄酮化合物中橙皮苷的含量最高。黄酮类化合物的提取方法有水提、醇提、碱液提取、微波辅助法、超声辅助法和高速逆流色谱法等^[4]。超声辅助法作为一种新兴的提取方法, 在植物有效成分的提取中已有较广泛的运用, 此方法具有省时、高效和节能等优点^[5]。本研究利用响应

面分析法优化了超声波提取赣南脐橙皮中黄酮类化合物的工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

橙皮粉: 市售赣南脐橙, 取其果皮, 在 50℃ 恒温烘干后粉碎过 40 目筛。

橙皮苷标准品 中国药品生物制品检定所; 无水乙醇、氢氧化钠、浓盐酸均为分析纯试剂。

RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; UV-2450 紫外分光光度计 日本岛津公司; SHZ-D(III) 循环水式真空泵 巩义市英峡予华仪器厂; KQ3200DE 数控

收稿日期: 2009-04-23

基金项目: 科技部国家重点实验室资助项目(SKLF-MB-200807); 江西省教育厅科技计划项目(GJJ08025)

作者简介: 杨佳(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。E-mail: yangjia19851985@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 张国文(1966—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品化学与食品安全。E-mail: gwzhang@ncu.edu.cn

超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 橙皮苷标准曲线的绘制^[6]

准确称取 0.0178g 橙皮苷标品, 用含 0.1% NaOH 的 75% 乙醇溶液溶解并定容于 50ml 容量瓶中, 摇匀, 得 0.356mg/ml 标品储备液。再从此储备液中取 7ml, 用同一碱性乙醇液定容于 25ml 容量瓶中, 摇匀。准确吸取该对照品液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0ml 分别置于 10ml 比色管中, 用该碱性乙醇溶液定容至刻度。从对照品溶解开始计算 1 h 后以含 0.1% NaOH 的 75% 乙醇液为空白, 在 362nm 波长处测定吸光度, 得吸光度(Y)与橙皮苷浓度(X)的标准回归方程 $Y=0.0154X-0.0056$, $R^2=0.9998$ 。

1.2.2 样品中黄酮类化合物含量的测定

准确称取样品 2g, 放入三角瓶中加入一定体积、一定浓度的乙醇溶液室温下浸泡 1h, 再在一定温度下超声辅助提取一定时间, 抽滤, 滤液回收乙醇, 浓缩液调至一定 pH 值, 静置过夜, 待黄酮类化合物全部结晶析出, 离心, 得黄酮类化合物沉淀。取各组中不同实验条件下所得粗样, 用含 0.1% NaOH 的 75% 乙醇溶液溶解并定容于 50ml 容量瓶中, 摇匀, 用移液管精确移取 0.1ml 于 10ml 比色管中, 采用 1.2.1 节的方法测定其在 362nm 波长处的吸光度, 然后按照公式(1)计算赣南脐橙皮中黄酮类化合物的得率。

$$\text{黄酮类化合物得率(\%)} = \frac{(A_{362\text{nm}} + 0.0056) \times 5000 \times 10^{-6}}{0.0154 \times 2} \times 100 \quad (1)$$

1.2.3 响应面试验设计^[7-8]

根据预实验对乙醇体积分数、超声时间、提取温度、液固比、超声功率及 pH 值的综合考虑, 选择乙醇体积分数(A)、提取时间(B)、液固比(C)、提取温度(D)为考察因素; 选择超声功率 60W、频率 40kHz、结晶 pH5; 提取两次; 采用 Box-Behnken 设计法设计响应面试验对提取工艺进行优化试验。+1、0、-1 分别代表自变量的高、中、低水平, 自变量编码值与真实值之间的关系分别为 $x_1=(A-60)/5$ 、 $x_2=(B-20)/5$ 、 $x_3=(C-30)/5$ 、 $x_4=(D-70)/10$ 。试验因素水平及编码见表 1。

表 1 试验因素水平及编码

Table 1 Variables and levels in the four-variable/three-level response surface design

水平	因素			
	A 乙醇体积分数(%)	B 提取时间(min)	C 液固比(V/m)	D 提取温度(°C)
-1	55	15	25	60
0	60	20	30	70
1	65	25	35	80

2 结果与分析

2.1 乙醇体积分数对黄酮类化合物提取的影响

由图 1 可见, 随着乙醇体积分数的增加, 黄酮类化合物得率也随之增大, 当乙醇浓度达到 60% 时, 其得率最大, 之后随着乙醇浓度的增加得率反而降低。主要原因可能是乙醇体积分数不同, 极性也不同, 在超声波的影响下, 当乙醇体积分数为 60% 时与黄酮类化合物的极性相似, 溶解度最大^[9]; 乙醇体积分数小于 60% 时黄酮类化合物并未完全浸出, 而大于 60% 时, 一些脂溶性物质的溶解度增加, 影响了黄酮类化合物的溶解。故将乙醇体积分数选定在 60% 左右。

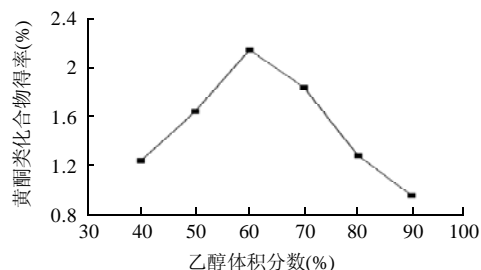


图 1 乙醇体积分数对黄酮类化合物提取的影响

Fig.1 Effects of ethanol concentration on extraction yield of flavonoids

2.2 超声辅助提取时间对黄酮类化合物提取的影响

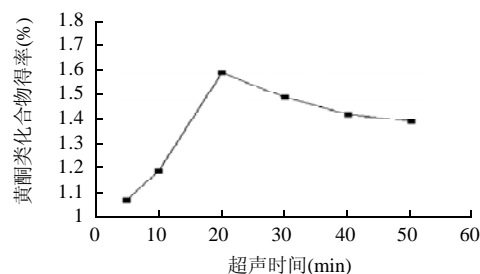


图 2 提取时间对黄酮类化合物提取的影响

Fig.2 Effects of extraction time on flavonoids extraction

图 2 可见, 超声提取时间为 20min 时, 黄酮类化合物的得率最高。随着提取时间的再延长, 其得率降低。可能是由于超声时间太长, 会破坏黄酮类化合物的结构, 导致其得率降低。超声提取时间 20min 左右为宜。

2.3 液固比对黄酮类化合物提取的影响

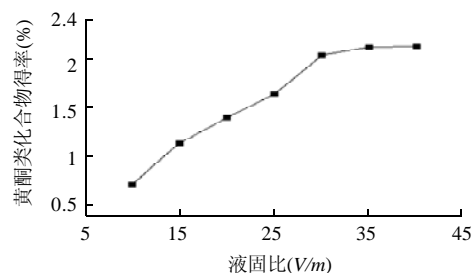


图 3 液固比对黄酮类化合物提取的影响

Fig.3 Effects of ratio of liquid on solid on extraction yield of flavonoids

从图3可以看出,当液固比达到30:1之后,再增大液固比黄酮类化合物得率增加缓慢,液固比太小黄酮提取不充分,太大则浪费试剂,综合考虑,选择液固比30:1左右为佳。

2.4 提取温度对黄酮类化合物提取的影响

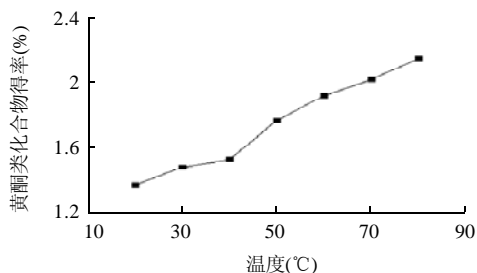


图4 提取温度对黄酮类化合物提取的影响

Fig.4 Effects of extraction temperature on extraction yield of flavonoids

由图4可见,随着温度的提高,黄酮类化合物得率增大,由于实验仪器条件的限制,超声温度只能达到80℃,因此选择60~80℃为佳。

2.5 超声功率对黄酮类化合物提取的影响

在超声功率60~120W(40%~80%额定功率)范围内,随着功率的增加,黄酮化合物的得率没有明显的变化,但会引起温度升高较快,而影响试验结果。为此,试验选择超声功率60W、频率40kHz。

2.6 黄酮类化合物提取工艺回归模型的建立及方差分析

应用Design-Expert7.1.3.1软件对表2中的数据进行方差分析,得到乙醇浓度、提取时间、液固比和提取温度与黄酮类化合物得率之间的二次多项回归方程:

$$Y=3.298-0.01583x_1+0.015x_2+0.021667x_3+0.059167x_4-0.025x_1x_2+0.0175x_1x_3-0.025x_1x_4+0.005x_2x_3-0.0125x_3x_4-0.06775x_1^2-0.0665x_2^2-0.0465x_3^2-0.06525x_4^2$$

由表3可以看出回归方程的 $P < 0.0001$,模型的总决定系数达0.9590,说明该模型能解释95.90%响应值的变化。失拟项不显著,表明方程对实验拟合良好,实验误差小。变异系数为0.6119%,说明实验有较好的精确度和可靠性,可以用该回归方程代替真实实验点对实验结果进行分析和预测。由表3中数据可知, x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 、 x_1x_2 、 x_1x_4 、 x_1^2 、 x_2^2 、 x_3^2 和 x_4^2 项对黄酮类化合物的提取率影响显著^[10];提取时间和温度交互项的系数为0,说明它们之间的影响较小。

2.7 响应面分析

如果一个响应曲面坡度相对平缓,表明其可以忍受处理条件的变异,而不影响到响应值的大小,相反,如果一个响应曲面坡度非常陡峭,表明响应值对于处理条件的改变非常敏感^[11]。从图5可以看出,随着乙醇体

积分数的增加黄酮类化合物得率先增大后缓慢减小,超声时间对黄酮类化合物得率的影响的变化趋势也是随着超声时间先增加后降低。从图6可看出,超声温度对黄酮类化合物得率的影响变化趋势受乙醇浓度的交互作用的影响,当乙醇处于较低时,黄酮类化合物得率随温度的增加而增大,当乙醇体积分数增加到一定大小时,其随超声温度的增加后减小。从图5和图6可以得出,要达最佳提取效果所需的乙醇体积分数为57.5%~62.5%,超声时间为17.5~22.5min,温度为75℃左右。

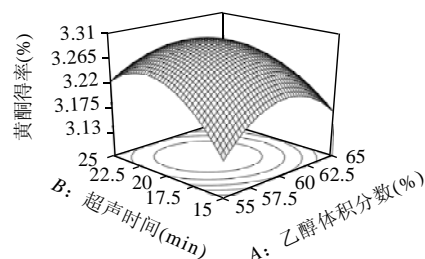


图5 时间和乙醇体积分数对黄酮提取响应曲面

Fig.5 Response surface plot for the extraction yield of flavonoids under different extraction time and ethano concentrations

表2 响应面法设计与试验结果

Table 2 Arrangement and results of the four-variable/three-level response surface central composite design

试验号	因素(编码值)				黄酮类化合物得率(%)
	x_1	x_2	x_3	x_4	
1	-1	-1	0	0	3.13
2	1	-1	0	0	3.18
3	-1	1	0	0	3.21
4	1	1	0	0	3.16
5	0	0	-1	-1	3.11
6	0	0	1	-1	3.18
7	0	0	-1	1	3.23
8	0	0	1	1	3.25
9	-1	0	0	-1	3.09
10	1	0	0	-1	3.10
11	-1	0	0	1	3.26
12	1	0	0	1	3.17
13	0	-1	-1	0	3.14
14	0	1	-1	0	3.15
15	0	-1	1	0	3.19
16	0	1	1	0	3.22
17	-1	0	-1	0	3.22
18	1	0	-1	0	3.13
19	-1	0	1	0	3.21
20	1	0	1	0	3.19
21	0	-1	0	-1	3.08
22	0	1	0	-1	3.12
23	0	-1	0	1	3.22
24	0	1	0	1	3.26
25	0	0	0	0	3.30
26	0	0	0	0	3.31
27	0	0	0	0	3.31
28	0	0	0	0	3.29
29	0	0	0	0	3.28

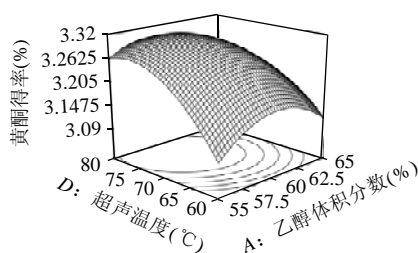


图6 温度和乙醇体积分数对黄酮提取的响应曲面

Fig.6 Response surface plot for the extraction yield of flavonoids under different extraction temperatures and ethanol concentrations

表3 回归模型方差分析

Table 3 ANOVA for the regression response surface model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	0.1253	14	0.0090	23.4039	< 0.0001	*
x_1	0.0030	1	0.0030	7.8649	0.0141	*
x_2	0.0027	1	0.0027	7.0588	0.0188	*
x_3	0.0056	1	0.0056	14.7277	0.0018	**
x_4	0.0420	1	0.0420	109.8257	< 0.0001	**
x_1x_2	0.0025	1	0.0025	6.5359	0.0228	*
x_1x_3	0.0012	1	0.0012	3.2026	0.0952	
x_1x_4	0.0025	1	0.0025	6.5359	0.0228	*
x_2x_3	0.0001	1	0.0001	0.2614	0.6171	
x_2x_4	0	1	0	0	1.0000	
x_3x_4	0.0006	1	0.0006	1.6339	0.2219	
x_1^2	0.0298	1	0.0298	77.8389	< 0.0001	**
x_2^2	0.0287	1	0.0287	74.9931	< 0.0001	**
x_3^2	0.0140	1	0.0140	36.6677	< 0.0001	**
x_4^2	0.0276	1	0.0276	72.2003	< 0.0001	**
残差	0.0053	14	0.0053			
失拟项	0.0047	10	0.0047	2.7500	0.1709	
纯误差	0.0007	4	0.0002			
总和	0.1307	28				
决定系数(R^2)	0.9590		变异系数(CV)	0.6119%		

注: *.在 0.05 水平显著; **.在 0.01 水平极显著。

对回归方程中四个因素分别求偏导,并令等式为零,解方程可得到四个因素的最佳水平值,分别为:
 $x_1 = -0.2175$, $x_2 = 0.1588$, $x_3 = 0.1358$, $x_4 = 0.4821$, 转换后得到提取的最佳条件为提取温度 74.82℃、乙醇体积分数 58.91%、液固比 30.68:1、提取时间 20.79min、提

取 2 次,模型预测可获得黄酮类化合物提取得率为 3.298%。由于仪器温度无法控制到计算出的精确度,取 75℃。为了验证模型的可靠性,在最佳实验条下进行了三次平行实验,黄酮类化合物的平均得率为 3.351%,与模型预测理论值 3.298% 相差 0.053%。

3 结论

在单因素的基础上用响应曲面法对赣南脐橙皮中黄酮类化合物的超声提取工艺条件进行优化。实验结果表明,超声辅助提取赣南脐橙皮中黄酮类化合物的最佳提取工艺为提取温度 75℃、乙醇体积分数 58.91%、液固比 30.68:1、提取时间 20.79min、提取次数为 2 次,模型预测可获得黄酮类化合物得率为 3.298%。对结果进行实验验证,在最佳实验条下进行了三次平行实验,黄酮类化合物平均得率为 3.351%,与预测理论值相差 0.053%。

参考文献:

- [1] 房蓓蓓,殷钟意,郭育铭,等.柑橘皮渣综合利用技术研究进展[J].重庆工商大学学报:自然科学版,2008,25(2):177-180.
- [2] MA Y Q, YE X Q, HAO Y B, et al. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from penggan (*Citrus reticulata*) peel[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2008, 15(3): 227-232.
- [3] 严赞开,严奉伟,曾杨,等.桔皮中提取橙皮苷方法的研究[J].湖北农学院学报,2000,20(2):166-167.
- [4] 朱秀灵,戴清源,阚苗.橙皮甙的提取、纯化及检测方法概述[J].江西食品工业,2008(4):048-051.
- [5] 宋秋华,张磊,梁飞,等.黄酮类化合物提取和纯化工艺研究进展[J].山西化工,2007,27(4):24-27.
- [6] 卢静华,王亚娟,于玲.陈皮中橙皮苷超声提取工艺研究[J].时珍国医国药,2006,7(4):604.
- [7] 吴亚琼,张建新.旋转回归设计优化超声波橘皮总黄酮提取工艺[J].食品研究与开发,2008,29(3):13-16.
- [8] WANI A A, KAUR D, AHMED I, et al. Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(8): 1514-1520.
- [9] 樊瑞胜,陈平,刘岩,等.桔皮类黄酮乙醇提取工艺研究[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2006,22(4):97-100.
- [10] 庞伟.苹果多酚的分离纯化及抗氧化性研究[D].西安:西北大学,2007.
- [11] 陈莉,屠康,王海,等.采用响应曲面法对采后红富士苹果热处理条件的优化[J].农业工程学报,2006,22(2):159-163.