

超声波强化响应面法优化提取桔皮黄酮

苏东林 单 杨 李高阳 张菊华 张 群

(湖南省农产品加工研究所 长沙市芙蓉区马坡岭 410125)

(国家柑橘加工技术研发分中心 长沙市 410125)

(国家柑橘质量安全监督检验中心 长沙市 410125)

摘 要 从提取溶剂及提取条件等方面对柑桔皮总黄酮超声波辅助提取工艺进行优化研究。以黄酮得率为考察指标,用单因子试验对提取溶剂进行筛选,用析因试验对提取条件进行分析,通过最陡爬坡试验和中心组合设计试验,优化超声波辅助提取工艺。结果表明,乙醇和水组成的复合体系是理想的提取溶剂;液料比、提取时间、乙醇浓度、pH 值都对柑桔皮总黄酮提取产生一定的影响,其中液料比和提取时间的影响最为显著。超声波辅助提取工艺优化条件为:液料比 37mL/g,提取时间 83min;在此条件下总黄酮的最大提取量为 3.321%。经验证试验表明,该方法是一种实用的提取方法。

关键词 柑桔皮;总黄酮;超声波;提取;响应面优化

中图分类号:R 284.2;O 657.32

文献标识码:A

文章编号:1004-8138(2009)06-1391-07

1 前言

柑桔果实全身都是宝,其皮、肉都是正统的中药,在我国有着悠久的药用历史。柑桔皮所含营养成分除氨基酸外,其余均高于果肉,尤其是富含黄酮类、类胡萝卜素等物质,使柑桔皮及其提取物具有抗癌、消炎镇痛抗过敏、防止心血管疾病和抗病毒等多重生理功效^[1-6]。目前,在柑桔类果皮的生理活性成份的研究和综合利用方面,国内还处于起步阶段;除少数果皮用于中药和制取香精油及饲料外,大部分被直接丢弃或填埋,不仅严重浪费了资源,更对环境造成了巨大危害。近年来,不少学者对柑桔皮中黄酮类物质的提取技术进行了多方面积极和有益的探索,但主要还是集中在对传统提取方法的优化改良上;超声波辅助提取是其间的一大亮点^[7-13]。由于桔皮干燥后比较坚硬,不易破碎,用传统溶剂提取方法存在浸取时间长、劳动强度大、原料预处理能耗大、热敏性活性物质易破坏等缺点。而超声波作为近年来发展的一门新技术,具有穿透力强、选择性高、加热速度快、控制方便、受热体系温度均匀、强化萃取分离过程的传质速率和效果、节约能量及不需要特殊分离步骤等优点^[14]。目前,该技术已广泛用于中药中黄酮类、皂苷类、多糖、色素、挥发油等有效成分的提取^[15-17]。本文先对柑桔皮中黄酮类化合物的提取溶剂进行研究,确定最佳溶剂后再利用响应面对影响黄酮类化合物提取的其他各种因素如溶剂浓度、料液比、pH 值、提取时间等进行综合考察,

国家高技术研究发展计划(2007AA 10Z307);湖南省“十一五”科技重大专项(2006NK1002)

联系人,手机:(0)13975171329;E-mail: sdi791228@163.com

作者简介:苏东林(1979—),男,湖南省邵东县人,助理研究员,研究方向为食品生物技术及农产品精深加工。

单杨(1963—),男,湖南省攸县人,研究员/博士生导师,主要从事农产品(食品)质量安全、精深加工及食品生物技术研究工作。

收稿日期:2009-05-12;接受日期:2009-05-16

以确定其最佳提取工艺,为柑桔皮的进一步开发利用奠定基础。

2 实验部分

2.1 试验材料

半干温州蜜柑桔皮,湖南熙可食品有限公司提供;其中粗蛋白、粗脂肪、挥发油、水分、灰分的含量分别为 4.7%、2.5%、1.2%、9.8% 和 4.2%。

芦丁[中国医药(集团)上海化学试剂公司];其他试剂均为国产分析纯;自配缓冲液。

2.2 仪器设备

DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏试验设备有限公司);FA 1104 上皿电子天平(上海精科天平制造);KUDOS SK2200LH 型台式超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司;工作频率 40/59kHz;消耗功率 $M_{ax}90W$);UV-2450 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);FW 100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);DELTA 320 型 pH 计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

2.3 试验方法

2.3.1 样品处理

样品经恒温(55℃)干燥,粉碎后过 60 目(0.30mm)筛备用。

2.3.2 黄酮类物质含量的测定

1) 标准方程的建立

AlCl₃ 显色法^[18],275nm 比色测定不同浓度芦丁标准品溶液吸光度,绘制校准曲线:

$$A = 28.891X + 0.0002 (r^2 = 0.9998) \quad (1)$$

式中: A ——吸光度; X ——芦丁含量, mg/mL。

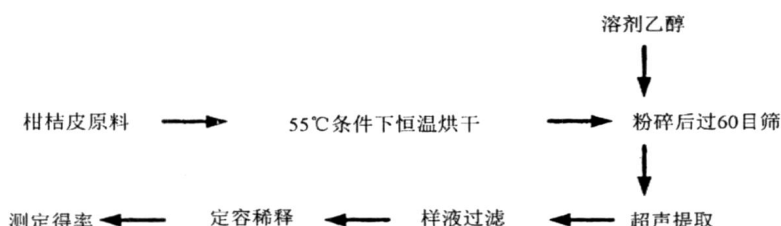
2) 样品中黄酮类物质含量的测定

取各组不同试验条件下所得的定容样液依法显色;按下式计算桔皮黄酮得率(以芦丁计)。

$$Y = (A - 0.0002) \times 8.653 \div M \quad (2)$$

式中: Y ——黄酮得率, %; A ——样液吸光度; M ——试验样品质量, g; 8.653, 换算系数。

2.3.3 提取工艺流程



2.3.4 提取过程优化

筛选出合适的提取溶剂后,用响应面法对提取条件进行优化研究,整个试验分 3 个阶段进行。首先,用析因试验^[19,20]确定影响提取效果的主要因素;其次,通过最速上升试验^[21]找到稳定区域;最后,用中心组合试验^[22]拟合稳定点附近的响应模型,并优化得出最佳工艺条件和最大提取量并进行验证试验,证明该方法的可靠性。每个处理 3 个重复,取其平均值进行分析。

2 4 数据分析

试验用 SA S 9 0 统计软件响应面法进行试验设计与数据分析, 并拟合出模型^[23, 24]。

3 结果与讨论

3 1 不同提取溶剂对柑桔皮总黄酮提取效果的影响

在预试验的基础上, 确定提取工艺的超声条件为 40kHz、70% 的输出功率^[25]。

在同等条件下(液料比 30mL/g, 提取时间 80m in, 自然 pH 值), 不同溶剂对柑桔皮总黄酮提取效果的影响试验结果见表 1。由表 1 可知: 甲醇水溶液对柑桔皮总黄酮的超声提取效果最好, 提取液当中总黄酮的含量最大; 其次是乙醇水溶液, 无水乙醇的提取效果最差。但甲醇价格昂贵、毒性强, 给应用带来极大的不便。相对而言, 乙醇和水的复合体系提取效果虽然略次于甲醇, 但操作方便、安全性高。故综合考虑, 选用乙醇和水的复合体系作为提取溶剂。

表 1 几种溶剂对柑桔皮总黄酮提取效果的比较试验

提取溶剂	水	70% 丙酮	70% 甲醇	70% 乙醇	70% 氯仿	无水乙醇
黄酮得率(%)	2 673	3 042	3 417	3 369	3 211	2 483

3 2 析因试验设计和结果

用 2⁴ 部分因子设计, 对影响柑桔皮总黄酮提取效果的液料比、提取时间、乙醇浓度、pH 值等 4 个主要影响因素进行研究。各因子编码值及试验设计和试验结果分别见表 2 和表 3。

表 2 析因试验设计因子及编码值

水平	因素			
	x ₁ 液料比(mL/g)	x ₂ 提取时间(m in)	x ₃ 乙醇浓度(%)	x ₄ pH 值
- 1	15	40	50	3
0	25	60	70	5
+ 1	35	80	90	7

表 3 析因试验设计及试验结果

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	黄酮得率(%)
1	1	1	1	1	3 327
2	1	1	1	- 1	3 260
3	1	1	- 1	1	3 215
4	1	1	- 1	- 1	3 186
5	1	- 1	1	1	2 732
6	1	- 1	1	- 1	2 761
7	1	- 1	- 1	1	2 883
8	1	- 1	- 1	- 1	2 853
9	- 1	1	1	1	3 188
10	- 1	1	1	- 1	3 107
11	- 1	1	- 1	1	3 086
12	- 1	1	- 1	- 1	3 058
13	- 1	- 1	1	1	2 539
14	- 1	- 1	1	- 1	2 476
15	- 1	- 1	- 1	1	2 437
16	- 1	- 1	- 1	- 1	2 393

注: X₁= (x₁- 25)/10; X₂= (x₂- 60)/20; X₃= (x₃- 70)/20; X₄= (x₄- 5)/2。

对表 3 的试验结果进行方差分析, 发现各处理间的差异显著。对各因素进行回归分析可知, X₂ (P< 0 0001) 对试验结果影响最显著, 其次是 X₁ (P= 0 0001); X₃ (P= 0 4319) 和 X₄ (P= 0 3797) 对试验结果的影响均不显著。根据表 3 的结果得出拟合方程(3), 模型的拟合性良好(r²= 0 9467)。

从方程(3)可以看出, X_2 和 X_1 的系数均为正数, 说明在试验所选择的零水平处, Y 值随提取时间延长、液料比增加而增大。

$$Y = 1.678156250 + 0.012081250X_1 + 0.013603125X_2 + 0.000871875X_3 + 0.009781250X_4 \quad (3)$$

析因试验通常只能分析各因子对试验结果影响的大小, 从而筛选出对试验结果影响显著的因子, 而不能确定最优点所在的区域, 因此根据因子对指标的影响差异情况, 继续设计一个最速上升试验来寻找最优点所在的区域。从表 3 及方程(3)可知 X_2 和 X_1 对试验结果影响大, 因而选择 X_2 和 X_1 进行最速上升试验, X_3 和 X_4 固定在中心点水平。

3.3 最速上升试验及结果

针对 X_2 和 X_1 设计最速上升试验, 试验设计和结果如表 4。从表 4 可知, 随着爬坡的进行, Y 值增加, 在处理 3 处即达到最高点, 之后又开始下降, 说明该点对应的条件值为提取时间 80min, 液料比 35mL/g 时, 总黄酮得率接近了最优点, 可以选择这一点作为中心组合设计的原点。

表 4 最速上升试验及结果

试验号	1	2	3	4	5
液料比 x_1 (mL/g)	25	30	35	40	45
提取时间 x_2 (min)	60	70	80	90	100
黄酮得率(%)	2.816	3.086	3.359	3.314	3.108

3.4 中心组合(CCD)试验结果

根据最速上升试验结果, 采用 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理^[24], 对 X_2 和 X_1 两因素进行试验设计, 各因子编码值、试验设计和试验结果分别见表 5 和表 6。

表 5 响应面分析法试验因素与水平编码表 ($Y = 1.414$)

因素	水平				
	- Y	- 1	0	+ 1	+ Y
提取时间 x_2 (min)	66	70	80	90	94
液料比 x_1 (mL/g)	27.3	30	35	40	42.7

表 6 中心组合试验设计及结果

试验号	X_2	X_1	黄酮得率(%)
1	- 1	- 1	2.978
2	- 1	1	2.921
3	1	- 1	3.133
4	1	1	3.288
5	- Y	0	2.906
6	+ Y	0	3.108
7	0	- Y	3.146
8	0	+ Y	3.298
9	0	0	3.341
10	0	0	3.385
11	0	0	3.358
12	0	0	3.372

注: $X_1 = (x_1 - 35)/5$; $X_2 = (x_2 - 80)/10$ 。

采用 SAS 9.0 RSREG 程序对表 6 中心组合试验设计所得数据进行响应面回归分析, 得出以黄酮得率(Y)为因变量, 两因素(X_2, X_1)为自变量的二次多项式回归方程(4):

$$Y = -10.39088928 + 0.28184150X_1 + 0.11087476X_2 - 0.00192987X_1^2 + 0.00106000X_1X_2 - 0.00268684X_2^2 \quad (4)$$

根据表 6 所示的试验结果绘出稳定区域内 Y 值随 X_1 和 X_2 变化的关系图(图 1)是一个开口向



下的曲面图, 说明在试验区域内有最高点, 即试验结果 Y 在试验区域内有最大值。因素 X_1 和 X_2 与响应值间的相互作用可通过响应面和等高线图直观反应出来(见图 1)。

表 7 中心组合试验设计的模型方差分析结果

回归	自由度	平方和	确定系数	F 值	显著水平 P 值
线性项	2	0.094394	0.2673	21.95	0.0017
平方项	2	0.234605	0.6643	54.56	0.0001
交互项	1	0.011236	0.0318	5.23	0.0623
总回归	5	0.340235	0.9635	31.65	0.0003
		响应均值	3.186167		
		均方根	0.046369		
		r^2	0.9635		
		变异系数	1.4553		

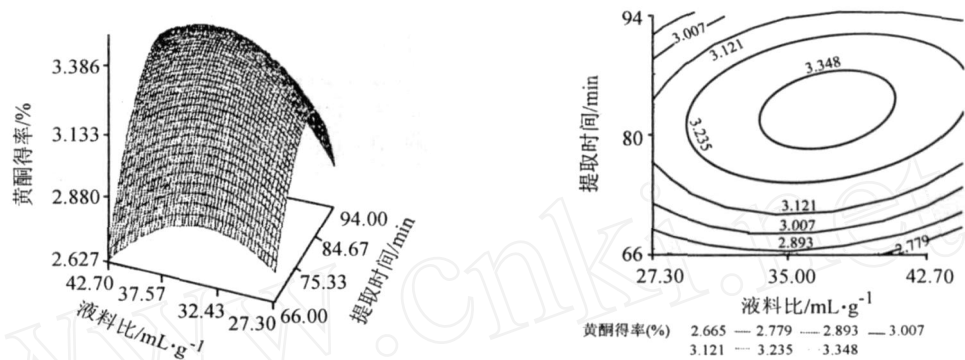


图 1 $Y = f(x_1, x_2)$ 的响应面(左)与等高线(右)图

对表 6 的试验结果进行回归分析可得出二次多项式的拟合方程(4), 依此模型可预测在稳定状态下的最大值是 $Y = 3.386057\%$, 以及与之相对应的编码水平为 $X_1 = 0.482277$ 和 $X_2 = 0.348390$, 分别对应的实际值是 $x_1 = 37.411385$ 和 $x_2 = 83.483905$ 。为了检测试验结果是否与真实情况相一致, 我们根据以上试验结果($x_1 = 37, x_2 = 83$)进行了验证试验。试验结果表明, 最优条件下提取液中总黄酮的含量为 3.321%, 与预测的最大值很接近。

模型的完备性可由方差分析及确定系数两方面考察, 对表 6 的结果进行方差分析(表 7)可以发现, 模型在 99% 的概率水平上是非常显著的, 模型的确定系数为 0.9635, 意味着该二次模型能很好的解释试验数据的变异性, 因而模型是充分的。从另一种意义上讲, 这种试验方法是可靠的, 因此可用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析。从回归模型的方差分析结果还发现, 回归模型的线性项和平方项对该模型的影响极为显著, 二者都在 99% 的概率水平上极显著。因此方程(4)为柑桔皮黄酮类化合物的超声提取条件的参数优化提供了一个较合适的数学模型, 具有一定的实用价值。

3.5 讨论

传统的常规溶剂浸提, 不仅劳动强度大, 而且热敏物质易破坏^[26]; 微波法也存在着耗时长、提取率较低的缺点^[27]; 虽然应用加速溶剂萃取技术能够缩短桔皮黄酮的提取时间, 但对试验设备要求较高, 且黄酮得率也相对较低^[28]; 由于显色方法以及选定的超声条件和桔皮品种不同, 同样以乙醇为溶剂超声波辅助提取桔皮黄酮, 本文的得率要明显高于吴亚琼等人的试验结果^[10]。超声波以其促进反应的高效性、强选择性、操作简便、副产物少、产率高及产物易于提纯等优点, 已广泛用于天然产物的提取^[14]。本文虽然得到了超声波强化提取桔皮黄酮的优化工艺参数, 并且建立了一个

相对稳定的数学模型;但要满足工业化大生产的需求,还必须从缩短提取时间、提高黄酮得率和方便操作等环节着手改进。另外,还可以考虑联合其他方法共同作用来提取桔皮黄酮(比如超声波+酶),真正实现对柑桔皮的效益利用。

4 结论

超声波辅助提取柑桔皮中黄酮类生物活性物质是行之有效的方法,提取时间短,温度低,效率高。

(1) 柑桔皮中黄酮随提取溶剂的不同提取量有较大的差别,70%乙醇较适合其总黄酮的提取。

(2) 通过响应面分析法得出超声波辅助提取柑桔皮总黄酮的最佳工艺条件为:液料比 37 mL/g,提取时间 83min、乙醇浓度 70%、pH 值 5;在此条件下总黄酮的最大提取量为 33.21%。

参考文献

- [1] 高彦祥, 方政. 柑橘类果汁加工副产品综合利用研究进展[J]. 饮料工业, 2005, 8(1): 1—7.
- [2] Sun C D, Chen K S, Chen Y. Contents and Antioxidant Capacity of Limonin and Nomilin in Different Tissues of Citrus Fruit of Four Cultivars During Fruit Growth and Maturation[J]. *Food Chemistry*, 2005, 93(4): 599—605.
- [3] Miller E G, Porter J L, Binnie W H. Further Studies on the Anticancer Activity of Citrus Limonoids[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2004, 52(15): 4908—4912.
- [4] Orallo F, Canina M, Alvarez E. Implication of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Inhibition in the Vaso-relaxant Activity of the Citrus-Fruits Flavonoid (+ or-) Naringenin[J]. *Planta Medica*, 2005, 71(2): 99—107.
- [5] Gao K, Xu A L, Krul C. The Major Phenolic Acids Formed During Human Microbial Fermentation of Tea, Citrus, and Soy Flavonoid Supplements, Only 3, 4-Dihydroxyphenylacetic Acid Has Antiproliferative Activity[J]. *Journal of Nutrition*, 2006, 136(1): 52—57.
- [6] 单杨. 柑桔加工技术研究与产业化开发[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 423—427.
- [7] 曾荣华, 陆海勤, 丘泰球. 双频超声强化提取黄柏中小檗碱的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 769—772.
- [8] 汤建国, 汪秋安, 单杨. 从柑橘皮中超声提取橙皮甙[J]. 精细化工, 2004, 21(3): 171—173.
- [9] 赵雪梅, 叶兴乾, 席屿芳. 胡柚皮中黄酮类化合物提取及抗氧化性研究[J]. 果树学报, 2003, 20(4): 261—265.
- [10] 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.
- [11] Ma Y Q, Ye X Q, Fang Z X et al. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Extracts from Ultrasonic Treatment of Satsuma Mandarin (Citrus Unshiu Marc.) Peels[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(14): 5682—5690.
- [12] Lu Y H, Zhang C W, Bucheli P et al. Citrus Flavonoids in Fruit and Traditional Chinese Medicinal Food Ingredients in China[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2006, 61(2): 57—65.
- [13] 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.
- [14] 胡爱军, 丘泰球, 刘石生等. 物理场强化油脂浸出技术[J]. 中国油脂, 2002, 27(3): 10—12.
- [15] 张德, 程树平, 韩海洪等. 超声法从唐古特大黄根茎中提取大黄降脂素[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(2): 217—219.
- [16] 何荣海, 马海乐, 骆新峥. 条斑紫菜多糖超声提取及其对 U937 细胞生长抑制影响的研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(8): 165—168.
- [17] 曹龙奎, 包鸿慧, 周睿. 超声波强化提取玉米黄色素工艺优化研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(5): 222—225.
- [18] 苏东林, 单杨, 李高阳. 紫外分光光度法测定柑桔皮中总黄酮的含量[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(8): 124—128.
- [19] 林德光. 析因试验的调优技术[J]. 生物数学学报, 1992, 7(2): 142—148.
- [20] 李钦民, 陈智民. 使用 SAS 软件进行多因素析因试验设计-SAS/QC(612)软件中 factex 过程的使用[J]. 数理统计与管理, 2002, 21(5): 32—36, 61.
- [21] 孙丽平, 刘立明, 堵国成等. 基于途径分析促进 α -酮戊二酸过量积累的数学模型技术[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(1): 113—117.
- [22] 何国庆, 熊皓平, 阮晖等. 啤酒花多酚类化合物提取工艺的优化研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(4): 163—166.
- [23] Box G E P, Hunter W G. *Statistics for Experiments: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building* [M]. New

York: Wiley, 1990 129—133

[24] Anderson T W. *An Introduction to Multivariate Statistical Analysis* [M]. New York: Wiley, 1990 186—189

[25] 苏东林 柑桔皮中黄酮类物质的提取、分离及纯化研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007. 49—51

[26] 王立娟 桔皮总黄酮的提取条件[J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(5): 70—72

[27] 张熊祿 微波法从柑桔皮中提取类黄酮[J]. 食品科学, 2005, 26(3): 119—121

[28] 张玉, 吴慧明, 余建伟等. 加速溶剂萃取技术提取柑橘皮中总黄酮的工艺研究[J]. 食品科技, 2007, 32(11): 213—215

Optimization of Processing Parameters for Ultrasonic Extraction of Total Flavonoids from Citrus Peel by Response Surface Method

SU Dong-Lin SHAN Yang LI Gao-Yang ZHANG Ju-Hua ZHANG Qun

(Hunan Agricultural Product Processing Institute, Changsha 410125, P. R. China)

(National Research and Development Center for Orange Processing, Changsha 410125, P. R. China)

(National Citrus Quality Safety Supervision and Test Center, Changsha 410125, P. R. China)

Abstract The extraction of total flavonoids from citrus peel was optimized from extracting solvents and other extracting conditions with ultrasonic wave-assisted extraction technique. The optimization extraction process was studied by single factor design experiment, fractional factorial design experiment, the steepest ascent design experiment and central composite design experiment. The mixture of ethanol and water was the best solvent, the factors such as ratio of solution to material, extracting time, ethanol concentration and pH value had effects on the extracting rate. The ratio of solution to material and extracting time were the most significant factors for extraction. The optimal condition described as follows: the ratio of solution to material was 37mL/g and extracting time was 83min by the steepest ascent experiment and the central composite design. Under the optimized condition, the highest extracting amount of total flavonoids from citrus peel was 3.321%. The study provided useful information and reference for the optimization of extraction conditions and processes of total flavonoids from citrus peel by ultrasonic wave-assisted equipment.

Key words Citrus Peel; Total Flavonoids; Ultrasonic Wave; Extraction; Response Surface Optimization

欢迎有敬业精神的同志自荐为本刊编委

本刊编委产生的方式有三种: 自荐、推荐和聘请, 自荐是本刊提倡的方式。凡不计报酬、乐意献身于科技期刊出版事业、基本具有副高级以上技术职称、对本刊有所贡献的同志, 都可以自荐为本刊编委。

自荐者可与本刊编辑部联系。地址: 北京市延庆石河营东街 10 号楼 201 室《光谱实验室》编辑部 秦丽娟 何 霜; 邮政编码: 102100; 电话: (010)52513126; 电子信箱 (E-mail): gpss@chinajournal.net.cn。

《光谱实验室》编辑部