

响应面法优化八月瓜果皮总多酚的超声提取工艺

符智荣¹, 李雪峰¹, 周登维², 张晓旭², 欧阳玉祝^{2*}

(1. 吉首大学师范学院, 湖南吉首 416000; 2. 吉首大学化学化工学院, 湖南吉首 416000)

摘要 [目的] 优化八月瓜果皮超声水解提取总多酚的工艺条件。[方法] 以八月瓜果皮为研究对象, 通过单因素试验和响应面试验考察了水解 pH、水解温度和水解时间对总多酚得率的影响, 建立了数学模型。[结果] 用乙醇作为溶剂, 按 1:20(g/mL) 固液比加 60% 乙醇水溶液, 在最优条件下 (pH 5.23, 水解温度 53.76 °C, 水解时间 115.66 min), 模型对总多酚得率的预测值为 5.63%。优化条件组合 (pH 5.23, 水解温度 54 °C, 水解时间 116 min) 试验下总多酚得率为 5.58%, 模型预测值与组合试验结果吻合。[结论] 试验结果为八月瓜的开发提供了理论依据。

关键词 八月瓜; 总多酚; 水解; 响应面法

中图分类号 TS201.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)34-0001-03

Optimization on Ultrasonic Extraction Technology of Total Polyphenol in *Akebia trifoliata* Pericarp by Response Surface Method

FU Zhi-rong¹, LI Xue-feng¹, ZHOU Deng-wei², OUYANG Yu-zhu^{2*} et al (1. Normal College of Jishou University, Jishou, Hunan 416000; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou, Hunan 416000)

Abstract [Objective] The aim was to optimize extraction technology of total polyphenol by ultrasonic-hydrolysis. [Method] With *Akebia trifoliata* pericarp as the research object, Influence of pH, hydrolysis temperature and time on extraction yield of total polyphenol was investigated by single factor experiment and response surface method. Mathematical model of the experiment was established. [Result] The results show that using ethanol as solvent, according to 1:20(g/mL) solid-liquid ratio addition 60% ethanol aqueous solution, model on predictive value of total polyphenols extraction yield was 5.63% at pH of 5.23, 53.76 °C hydrolysis 115.66 min. Extraction ratio of total polyphenols under combination experiment of optimal condition was 5.58%. The model predicted values and the combination experiment result was identical. [Conclusion] The results provide reference for the exploitation of *Akebia trifoliata*.

Key words *Akebia trifoliata*; Total polyphenol; Hydrolysis; Response surface method

八月瓜 (*Akebia trifoliata*), 又名八月炸、牛滚瓜, 主要分布在我国西南各省、区、市。八月瓜是木通科植物三叶木通的果实, 可入药和食用, 是一种药食两用绿色水果^[1]。研究表明, 八月瓜含有丰富的有机酸、可溶性糖、维生素、氨基酸、多酚和微量元素, 具有良好的医疗保健作用^[2-3]。随着野生八月瓜的引种种植, 八月瓜的研究也不断精细化。欧阳玉祝等^[4-5]对八月瓜籽油提取和营养成分进行了分析, 并对油中脂肪酸组成与含量进行了研究; 符智荣等^[6]用 GC-MS 分析了八月瓜果皮挥发油的化学成分; 吴莹等^[7]用 GC-MS 分析了八月瓜果实香气的化学成分; 谢小霞等^[8]综述了三叶木通的药学现状; 林卉等^[9]对八月瓜果皮齐墩果酸的超临界 CO₂ 萃取工艺条件进行了优化。八月瓜果皮中含有丰富的多酚, 多酚化合物通过苷键或酯键与其他生物大分子结合, 这些键的断裂直接影响多酚的得率。笔者根据 Box-behnken 试验原理^[10-11], 优化了八月瓜果皮超声水解提取总多酚的工艺条件, 以期对八月瓜的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器。 日本岛津 UV-2450 型紫外可见分光光度计; KQ-250E 型超声波清洗器; SHB-III 循环水式多用真空泵; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器; JA2003N 型电子天平; M22 中量制备仪。

1.1.2 材料与试剂。 八月瓜购自湘西古丈市场, 鲜果购回

后将果皮和果肉分开, 果皮晒干, 用粉碎机打碎至 30 目, 备用。试剂包括无水乙醇、盐酸、氢氧化钠、没食子酸、氢氧化钙、钨酸钠、钼酸钠、磷酸、硫酸锂和单质溴 (国产分析纯)。

1.2 方法

1.2.1 总多酚的超声提取。 取 5 g 八月瓜果皮粉末于 200 mL 圆底烧瓶中, 按 1:20(g/mL) 料液比加 100 mL 60% 乙醇水溶液, 加稀盐酸调节 pH, 置于超声波清洗器中, 控制一定温度搅拌水解一定时间, 抽滤得提取液。提取液中加过量饱和的澄清石灰水溶液, 50 °C 沉淀 50 min, 过滤, 沉淀用足量 3% 稀硫酸溶解, 抽滤, 滤液用 60% 乙醇定容至 50 mL 容量瓶中, 用紫外可见分光光度计测定总多酚含量。

1.2.2 分析方法。

1.2.2.1 没食子酸标准曲线的绘制。 称取 48 mg 没食子酸标准品, 用无水乙醇溶解, 定容至 10 mL 容量瓶中, 配制 4.8 mg/mL 标准母液。吸取标准母液, 用浓度稀释法制得 0.24、0.20、0.16、0.12、0.08、0.04 mg/mL 系列标准溶液。取 1 mL 样品, 按参考文献^[12]加入 1 mL 20% 碳酸钠, 再加入 1 mL Folin-Ciocalteu 试剂定容至 25 mL 容量瓶中, 用紫外可见分光光度计测定 760 nm 波长处吸光度, 以吸光度为横坐标, 浓度为纵坐标绘图, 数据用计算机进行线性回归, 得回归方程: $C = 0.2747A + 0.0004$, $R^2 = 0.9990$ 。式中, C 为没食子酸浓度, mg/mL; A 为标准溶液的吸光度。

1.2.2.2 样品总多酚的测定。 取 1 mL 样品溶液, 按“1.2.2.1”方法用紫外可见分光光度计测定 760 nm 波长处吸光度, 将吸光度代入回归方程计算总多酚浓度, 计算总多酚的质量, 按下式计算总多酚的得率:

$$\text{总多酚得率} = \frac{\text{提取液中总多酚质量}}{\text{八月瓜果皮粉末质量}} \times 100\%$$

基金项目 湖南省湘西自治州科技计划项目 (州财企函[2013]7 号)。
作者简介 符智荣 (1974—), 男, 湖南泸溪人, 讲师, 从事天然产物化学研究。* 通讯作者, 教授, 硕士, 从事天然产物化学研究。
收稿日期 2017-09-25

2 结果与分析

2.1 单因素影响试验

2.1.1 pH 的影响。八月瓜果皮中的多酚化合物通过苷键或酯键与其他生物大分子结合,这些苷键或酯键在不同的 pH 下水解成多酚化合物,水解程度大小直接影响总多酚得率。为了考察水解 pH 对总多酚得率的影响,取 50 mL 提取液,按“1.2.1”方法 50 ℃ 超声水解 60 min。由图 1 可知,水解 pH 对总多酚得率有较大影响,pH 太大或太小都不利于水解反应的发生,pH=4 时达最大值,多酚得率为 4.78%。碱性条件下水解效率比酸性条件下低,由于苷键易在酸性条件下水解,说明多酚在植物中可能是通过苷键与生物大分子结合。

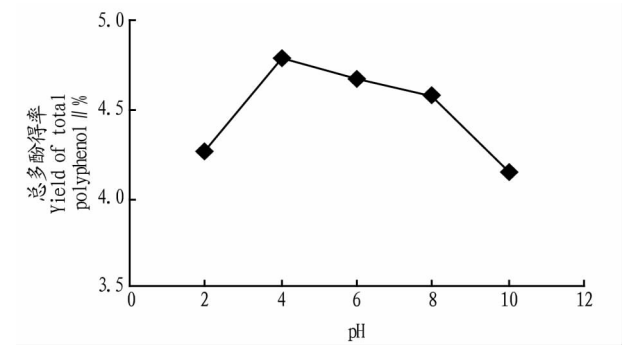


图 1 pH 对总多酚得率的影响

Fig.1 Influence of pH on extraction yield of total polyphenol

2.1.2 水解时间的影响。水解时间长短对水解程度有直接的影响,因此,水解时间对多酚得率有直接影响。为了考察水解时间的影响,取 50 mL 提取液,调节 pH 至 5,按“1.2.1”方法在 50 ℃ 下水解 60~150 min。由图 2 可知,随水解时间的增加,总多酚得率增加,到 90 min 达最大值(5.04%),随后减小。水解时间太短,水解不完全,萃取效率低;水解时间太长,多酚易氧化。

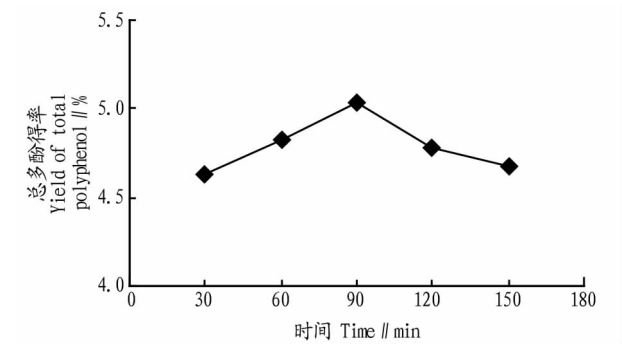


图 2 水解时间对总多酚得率的影响

Fig.2 Influence of time on extraction yield of total polyphenol

2.1.3 水解温度的影响。多酚为多环多羟基化合物,酚羟基具有良好的还原性,水解温度过高将导致多酚的氧化,因此,水解温度对多酚得率有较大影响。为了考察水解温度的影响,取 50 mL 提取液,调节 pH 至 5,按“1.2.1”方法在不同温度下超声水解 60 min。由图 3 可知,水解温度为 50 ℃ 时总多酚得率达最大值(5.11%),水解温度低,水解效率低,水解温度高,多酚易氧化。

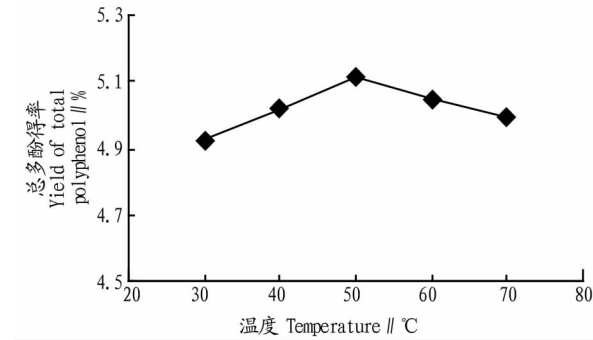


图 3 水解温度对总多酚得率的影响

Fig.3 Influence of temperature on extraction yield of total polyphenol

2.2 响应面优化试验

2.2.1 优化试验水平表设计。单因素试验得出 pH=4、水解时间 90 min、水解温度 50 ℃ 为最佳条件。单因素试验不能体现各因素的交互影响。为了考察各因素的交互影响,在单因素试验的基础上,进行响应面组合优化,设计 3 因素 3 水平优化组合试验。因素与水平见表 1。

表 1 Box-behnken 试验因素与水平

Table1 Factor and levels table of Box-behnken experiment

编码值 Code value	pH	时间 Time//min	温度 Temperature//℃
-1	2	60	40
0	4	90	50
1	6	120	60

2.2.2 试验方案设计及结果。将表 1 试验因素与水平按照 Design Expert 8.0 软件进行因素组合设计,并按“1.2.1”方法进行超声水解试验,考察各单因素组合对总多酚得率的影响,结果见表 2。

表 2 Box-behnken 试验设计与试验结果

Table 2 Design and results of Box-behnken experiment

序号 No.	pH	时间 Time//min	温度 Temperature//℃	提取率 Extraction rate//%
1	2	120	50	4.83
2	6	90	60	4.91
3	6	60	50	4.69
4	2	90	40	4.53
5	4	90	50	5.62
6	4	90	50	5.55
7	2	90	60	4.98
8	4	90	50	5.54
9	4	60	40	4.98
10	4	90	50	5.54
11	4	60	60	4.52
12	4	120	60	5.31
13	4	90	50	5.62
14	4	120	40	4.43
15	2	60	50	5.38
16	6	120	50	5.52
17	6	90	40	4.69

2.2.3 数学模型的二次方程。将表 2 组合试验结果用 Box-behnken 试验软件进行解析,得模型的二次多项式数学模型为: $Y = 5.570 + 0.011X_1 + 0.065X_2 + 0.140X_3 + 0.340X_1X_2 -$

$0.058X_1X_3 + 0.340X_2X_3 - 0.250X_1^2 - 0.220X_2^2 - 0.550X_3^2$ 。

2.2.4 模型数据的回归统计与方差分析。表 2 数据用 Box – behnken 试验软件进行回归统计,并进行方差分析,解释出模型和各因素相互影响的显著性、净误差和模型的相关性。结果表明,模型的 F 值为 144.39, $P < 0.0001$,模型的相关系数(R)为 0.9946,根据 Box – behnken 分析,模型表现为极显著。 X_3 、 X_1X_2 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 的 $P < 0.0001$,表现为极显著,表明 3 个所选因素对响应值都有显著影响,其中 pH 与时间、时间与温度的交互影响极显著。失拟和净误差较小。调整后的相关系数(R_{Adj}^2)为 0.9878,表明 98.78% 来自于所选变量,该模型对试验拟合情况较好,可以较好地分析和预测总多酚的水解^[13-14]。

2.3 响应面分析 将表 2 数据用 Design – Expert 8.0 软件进行三维图像分析,考察 3 个因素的交互性影响,结果见图 4~6。分析响应面图的坡度陡峭程度,可以预测考察因素的交互影响大小。响应面坡度越陡峭、等高线越密集,且呈椭圆形表示两因素相互影响较大,反之影响较小^[15]。图 4 和图 6 响应面陡峭,等高线呈椭圆形,表明 pH 与时间、时间与温度的交互影响较大,与方差分析结果一致。利用 Design – Expert 8.0 预测总多酚的水解条件:pH 为 5.23,水解时间为 115.66 min,水解温度为 53.76 ℃。在上述最优条件下,模型对总多酚得率的预测值为 5.63%。

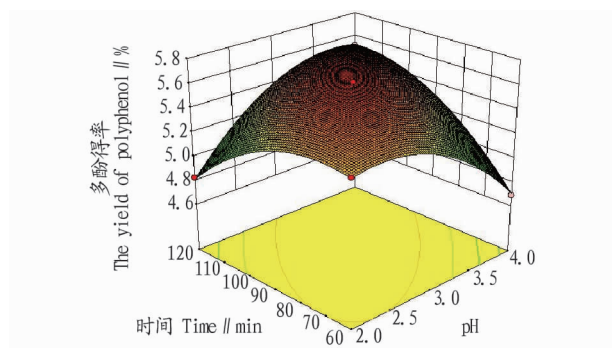


图 4 时间与 pH 的响应面

Fig.4 Response surface chart of time and pH

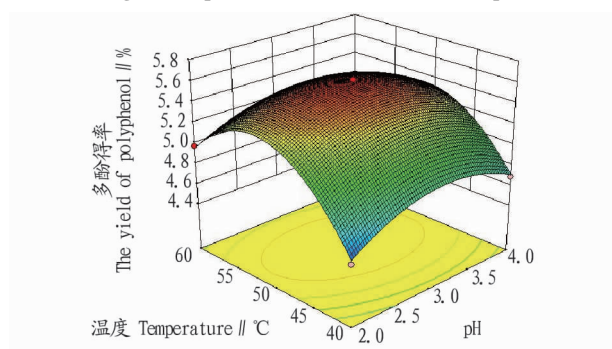


图 5 温度与 pH 的响应面

Fig.5 Response surface chart of temperature and pH

2.4 最佳工艺组合试验 为了考察该模型对总多酚预测值的合理性,对上述模型预测的水解条件进行组合试验,平行试验 5 次,取平均值。试验中考虑到试验条件的可操作性,

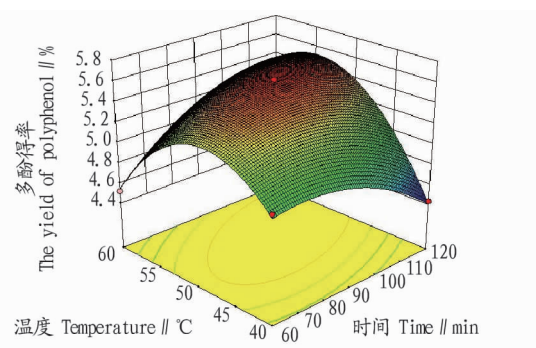


图 6 温度与时间的响应面

Fig.6 Response surface chart of temperature and time

将水解时间调整为 116 min,水解温度调整为 54 ℃,pH 保持不变,为 5.23。结果表明,组合试验得出总多酚得率的平均值为 5.58%,5 次试验的相对标准偏差为 1.98%。试验值与模型预测值吻合。

3 结论

超声水解是集水解和超声提取于一体的提取分离方法,在天然植物活性成分提取中的应用已显示出明显的优势,已经成为提取分离研究的常用方法。研究结果表明,Design – Expert 优化的最佳条件:pH 为 5.23,水解时间为 115.66 min,水解温度为 53.76 ℃,上述条件下,模型对总多酚得率的预测值为 5.63%。在 pH 为 5.23、水解温度 54 ℃、水解时间 116 min 条件下组合试验,八月瓜果皮总多酚得率为 5.58%,试验值与模型预测值吻合。

参考文献

- [1] 万明长,刘学武,班小重,等. 三叶木通栽培条件下果实性状及营养成分分析[J]. 贵州农业科学,2008,36(3):121-122.
- [2] 汪国龙,范玉,刘庆银,等. 八月瓜果实主要营养成分含量测定[J]. 湖北农机化,2008(5):35.
- [3] 班小重,万明长,张朝君,等. 野生果树八月瓜的资源收集与利用评价[J]. 贵州农业科学,2008,36(4):17-18.
- [4] 欧阳玉祝,李雪峰,姚懿桓. 离子沉淀法分离八月瓜果皮中的总多酚[J]. 食品科学,2014,35(16):76-79.
- [5] 欧阳玉祝,李勇,吴道宏,等. 八月瓜籽中脂肪酸的超声提取及 GC – MS 分析[J]. 食品科学,2010,31(20):322-324.
- [6] 符智荣,李雪峰,欧阳玉祝,等. 八月瓜果皮挥发油的 GC – MS 分析[J]. 广东化工,2014,41(15):42-43.
- [7] 吴莹,张百忍. 八月瓜果实香气的 GC – MS 分析[J]. 中国酿造,2012,31(6):169-171.
- [8] 谢小霞,葛发欢. 三叶木通药学研究现状与展望[J]. 现代医药卫生,2009,25(14):2165-2167.
- [9] 林卉,陈秋银,罗赞艳,等. 超临界 CO₂ 萃取八月瓜果皮中齐墩果酸条件优化[J]. 山东化工,2015,44(4):24-26.
- [10] 欧阳玉祝,李雪峰,魏燕,等. D-101 大孔树脂对连翘中黄酮类成分的吸附特性研究[J]. 核农学报,2013,27(10):1534-1538.
- [11] 陈燕勤,陈德军,杨再磊,等. 基于响应曲面法优化文冠果种仁油的提取工艺研究[J]. 化学与生物工程,2012,29(2):33-35.
- [12] 曹艳萍,代宏哲,曹伟,等. Folin – Ciocalteu 比色法测定红枣总酚[J]. 安徽农业科学,2008,36(4):1299-1302.
- [13] 郭元亨,马李一,郑华,等. 响应曲面法优化微波辅助提取胭脂虫红色素工艺[J]. 林产化学与工业,2011,31(4):87-92.
- [14] 杨佳宇,徐勇威,孙亚丽,等. 响应面法优化田基黄总黄酮的吸附工艺[J]. 吉首大学学报(自然科学版),2012,33(6):89-94.
- [15] 刘奉强,肖鉴谋,刘太泽. 应用响应面法优化超声波提取荆芥中总黄酮的工艺[J]. 南昌大学学报(工科版),2011,33(2):149-155.