

响应面法优化番石榴叶多酚的 超声提取工艺

楠 极¹,李远志^{2,*}

(1.内蒙古农业大学职业技术学院,内蒙古包头 014109;

2.华南农业大学食品院,广东广州 510642)

摘 要:以番石榴叶为原料,研究了多酚物质的超声辅助提取工艺,探讨了各因素对多酚物质提取含量的影响。通过二次响应面法,确定了超声辅助提取番石榴叶多酚物质的最佳提取条件,以 1:30(g/mL)的料液比加入 51%的乙醇,在 60℃的温度、60 W 的超声波功率下提取 47 min,多酚物质含量可达 143.38 mg/g。

关键词:番石榴叶,多酚物质,超声辅助提取,响应面法

Optimization of ultrasonic extraction of polyphenol from guava leaf using response surface methodology

NAN Ji¹, LI Yuan-zhi^{2,*}

(1.Vocational and Technical College of Inner Mongolia Agricultural University, Baotou 014109, China;

2.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Using guava leaf as raw material, extraction of guava leaf polyphenol by ultrasound-assisted method was studied in this paper. The influence of various factors on the extraction efficiency of polyphenol was discussed. With quadratic response surface design, the optimal extracting conditions for ultrasound-assisted extraction were established: 51% alcohol (v/v), the 1:30 (g/mL) of material-solution ratio, 60℃, 60 W ultrasonic power for 47 min. Under these conditions, the content of polyphenol reached 143.38 mg/g.

Key words: guava leaf; polyphenol; ultrasound-assisted extraction; response surface methodology

中图分类号: TS209

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2016)22-0300-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.22.050

番石榴叶为桃金娘科植物番石榴 (*Psidium guajava* L.) 的干燥叶及带叶嫩茎,具有一定的营养价值和保健作用,主要分布在广东、广西、福建、台湾、海南、四川等地^[1]。番石榴叶具有收敛、止泻、消炎作用,对腹泻、久痢、肠炎、肠胃溃疡、湿疹、瘙痒等症状有明显缓解效果^[2]。研究还发现,番石榴叶能软化血管、降低血脂、血糖和胆固醇,并具有抗氧化、抗菌活性和治疗咳嗽等功效^[3]。而大量实验研究证明,番石榴叶中产生这些功效作用的主要成分是多酚类物质^[4-5]。因此提取番石榴叶中功能性成分多酚物质具有一定意义。

植物多酚提取方法主要有溶剂浸提法、微波辅助提取法、超声辅助提取法和超临界流体萃取法等。超声辅助提取是一种物理破碎手段,主要是利用超声波强化提取过程,提高了植物有效成分的浸提。超声波产生了独特的机械振动和空化作用。当超声

强度达到一定程度时,能够破坏植物细胞壁结构,使细胞壁瞬间破裂,植物细胞内的有效成分得以释放,直接进入溶剂产生较高的提取率^[6-7]。超声辅助提取法与其他提取方法相比,具有操作简单、不需要昂贵的仪器设备、提取时间短、提取效率高、提取安全无毒等优点^[8]。石恩慧^[9]等利用超声提取板栗总苞多酚,得率为 23.20%;蒋边^[10]等利用超声提取杨桃多酚,得率为 28.5 mg/g;张旭等^[11]利用超声提取核桃青皮渣中多酚,得率为 5.520%。查阅相关文献,没有发现用超声辅助提取番石榴叶多酚物质的报道。本文采用响应面法对超声辅助提取番石榴叶中多酚物质的工艺进行优化,为其更有效地开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

干番石榴叶 广州市清香农产有限公司;没食

收稿日期:2016-06-17

作者简介:楠极(1985-),女,硕士,讲师,研究方向:食品加工、保藏与包装,E-mail:nanji855@qq.com。

*通讯作者:李远志(1953-),男,教授,研究方向:食品加工、保藏与包装,E-mail:liyzh@scau.edu.cn。

基金项目:广东省农业攻关科技计划项目(2012B020401004)。

子酸标准品、福林酚试剂、无水碳酸钠、无水乙醇均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

中药粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; FA2004 上皿电子天平 上海精科仪器公; KQ3200DB 型数控超声波清洗器 120 W,昆山市超声仪器有限公司; RE-52A 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-D 循环真空泵 巩义市英峪予华仪器厂; TU-1800 紫外可见分光光度计 北京普析通仪器有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 提取方法 将番石榴叶烘干(45℃)粉碎,过筛(40~60目)分离,称取1g番石榴叶粉置于250 mL锥形瓶中,加入一定量一定浓度的乙醇水溶液,用保鲜膜封口,完全浸润后,经超声波处理一定时间后抽真空过滤,将滤液定容到50 mL容量瓶中待测,每组做三次平行实验。

1.2.2 多酚物质含量的测定 番石榴叶中多酚物质含量的测定方法参照楠极^[12]微波辅助提取法中的多酚物质含量的测定方法。计算提取液中多酚物质含量时,参照楠极^[4]所作标准曲线回归方程($Y = 0.0008X + 0.0184, R^2 = 0.9993$)算出浓度,再换算成每克干番石榴叶粉中的多酚物质含量。

1.2.3 单因素实验 参考相关文献^[13-14],以乙醇浓度50%、料液比1:30(g/mL)、提取温度60℃、超声波功率84 W(70%)、提取时间45 min为固定水平,变换各单因素水平进行实验,考察其对番石榴叶多酚物质含量的影响。各因素水平为乙醇浓度30%、40%、50%、60%、70%、80%,料液比1:20、1:25、1:30、1:35、1:40 g/mL,提取温度30、40、50、60、70℃,提取时间10、20、30、40、50、60、70 min,超声波功率48、60、72、84、96、108、120 W。每组实验重复3次。

1.2.4 Plackett-Burman 设计优化提取条件 参照文献^[15-17],依据单因素实验的结果,利用“Two-Level”即二水平设计筛选主要因素。A为乙醇浓度,B为料液比,C为提取温度,D为超声波功率,E为提取时间,1取每个因素里最高含量所对应的水平,-1取每个因素里最低含量所对应的水平,实验因素水平编码见表1。

表1 实验因素及水平编码					
Table 1 Factors and levels coding					
实验因素	A 乙醇浓度 (%)	B 料液比 (g/mL)	C 提取温度 (℃)	D 超声波功率 (W)	E 提取时间 (min)
-1	80	1:40	30	72	10
1	50	1:30	60	48	45

1.2.5 响应面法 Box-Behnken 设计优化提取条件 参照文献^[15-17],根据设计要求,采用 Box-Behnken 设计方案,实验因素水平编码见表2。

1.3 数据分析

利用 SAS(SAS package version 9.0) 软件对数据进行多元回归拟合。

表2 实验因素及水平编码
Table 2 Factors and levels coding

实验因素	-1	0	1
X ₁ 乙醇浓度 (%)	45	50	55
X ₂ 提取温度 (℃)	55	60	65
X ₃ 提取时间 (min)	30	45	60

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 乙醇浓度对多酚物质含量的影响 由图1可以看出,随着乙醇浓度的增加番石榴叶提取液中多酚物质的含量先增大后减小,乙醇浓度为50%时出现了最大值,乙醇浓度超过50%时多酚物质的含量显著下降,在实验中表现为乙醇浓度低于50%时提取液颜色为黄绿色,当乙醇浓度超过50%时提取液颜色为绿色。这可能是大量的叶绿素被提取出来占据了优势,影响了多酚物质在乙醇溶液中的最佳溶解浓度^[12]。所以乙醇浓度选择在50%左右为宜。

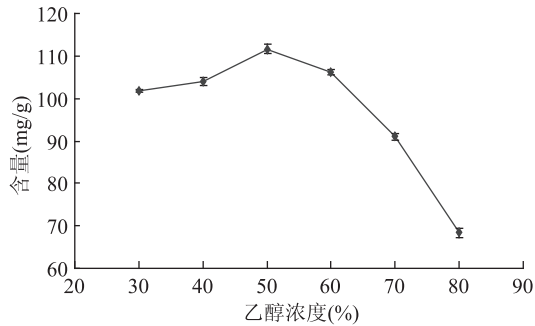


图1 乙醇浓度对多酚物质含量的影响
Fig.1 Effect of ethanol concentration on the content of polyphenol

2.1.2 料液比对多酚物质含量的影响 由图2可以看出,乙醇用量(料液比)从1:20到1:25含量增幅不大,在1:30时含量增高显著,之后随着料液比的增大,多酚物质含量的增加趋势变得缓慢,基本达到了平稳。所以考虑到提取溶剂量过大,对回收造成困难,另外从节约使用原料的角度,料液比选择1:30即可。

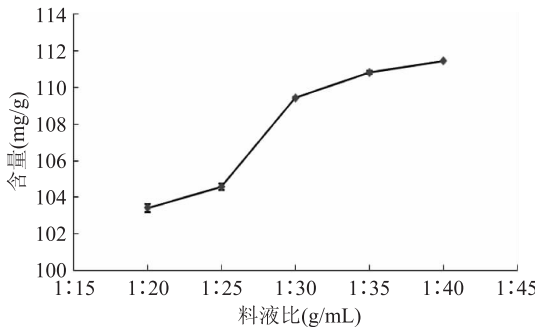


图2 料液比对多酚物质含量的影响
Fig.2 Effect of solid-liquid ratio on the content of polyphenol

2.1.3 提取温度对多酚物质含量的影响 由图3可以看出,随着提取温度的升高多酚物质的含量先增大后降低。当提取温度低于40℃时,随着提取温度

的升高,提取液中多酚物质的含量缓慢上升。当提取温度高于 40 ℃ 时,随着提取温度的继续升高,提取液中多酚物质的含量迅速上升,60 ℃ 时多酚含量达到最高。随后,随着温度的升高提取液中多酚物质的含量有所下降。这可能是因为随着温度的升高,植物组织软化加快,促进膨胀,增加可溶性物质的溶解度和扩散速度,但是温度过高时多酚物质发生非酶促氧化聚合或分解反应,导致含量有所下降^[18]。因此,提取温度选择在 60 ℃ 为宜。

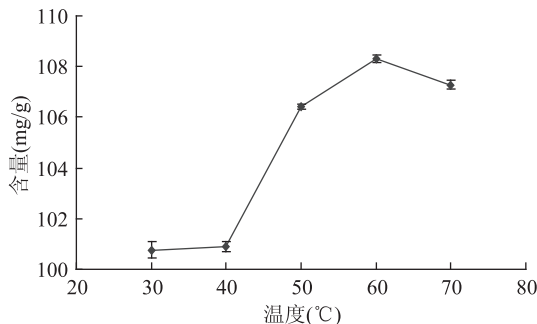


图3 提取温度对多酚物质含量的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on the content of polyphenol

2.1.4 提取时间对多酚物质含量的影响 由图 4 可以看出,随着提取时间的延长多酚物质含量基本匀速上升,当提取时间为 40~50 min 时达到最高点,之后伴随时间的继续延长稍有下降。这可能是因为随着提取时间过度的拖延,提取液中的多酚物质会发生氧化、聚合、分解等各种反应,从而使其含量有所下降。因此,提取时间选择在 45 min 为宜。

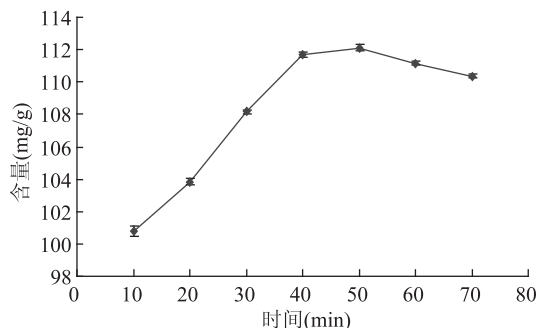


图4 提取时间对多酚物质含量的影响

Fig.4 Effect of extraction time on the content of polyphenol

2.1.5 超声波功率对多酚物质含量的影响 由图 5 可以看出,超声波功率对多酚物质含量影响并不大,功率从 48 W 到 120 W,多酚物质的含量都持续着缓慢上升的状态,但不显著。所以考虑到功率过高增加了其他物质的溶出,对后期的分离纯化造成困扰,超声波功率选择 48 W 即可。

2.2 Plackett-Burman 设计实验结果与统计分析

按照 Plackett-Burman 设计方案进行实验,结果见表 3。

由表 4 可知,五个因素对多酚物质含量影响的大小顺序为乙醇浓度 > 提取时间 > 提取温度 > 超声波功率 > 料液比。其中,乙醇浓度、提取时间、提取温度对含量的影响显著,因此,选择乙醇浓度、提取

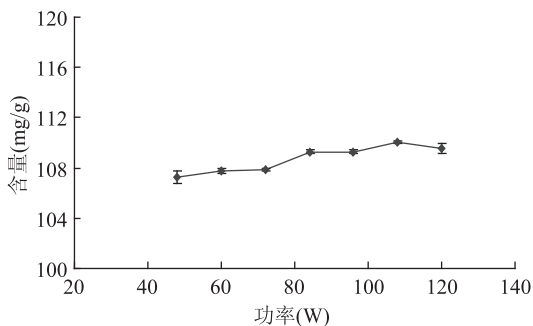


图5 超声波功率对多酚物质含量的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic power on the content of polyphenol
时间、提取温度作为进一步优化的因素做响应面分析,以确定这些因素所对应的最优水平。

表3 Plackett-Burman 实验结果

Table 3 Experimental results of Plackett-Burman

实验号	A	B	C	D	E	含量 (mg/g)
1	-1	-1	-1	1	1	79.68
2	1	-1	-1	-1	-1	117.35
3	-1	1	-1	-1	1	82.13
4	1	1	-1	1	-1	108.50
5	-1	-1	1	1	-1	79.85
6	1	-1	1	-1	1	128.54
7	-1	1	1	-1	-1	78.05
8	1	1	1	1	1	120.03

表4 各因素方差分析

Table 4 Analysis of variance for various factors

方差来源	自由度	F 检验	F 值	p
A 乙醇浓度	1	1167.10	1316.70	0.0008
B 料液比	1	15.36	15.36	0.0594
C 提取温度	1	17.25	19.46	0.0477
D 超声波功率	1	17.84	17.84	0.0517
E 提取时间	1	34.58	39.01	0.0247

2.3 二次响应面设计实验结果与统计分析

按照 Box-Behnken 设计方案进行实验,结果见表 5。

得到多元二次回归模型:

$$Y_1 = 142.4267 + 0.86375X_1 + 0.555X_2 + 0.73375X_3 - 1.309583X_1^2 - 0.085X_1X_2 - 0.8925X_1X_3 - 4.507083X_2^2 - 0.355X_2X_3 - 1.929583X_3^2$$

对该模型进行方差分析,结果见表 6,实验选用的模型极显著($p = 0.0001 < 0.001$),失拟项不显著($p = 0.0580 > 0.05$),模型的校正决定系数 R_{Adj}^2 为 98.82%,说明该模型能解释约 98% 响应值的变化,仅有总变异的 2% 不能用该模型解释;决定系数 R^2 为 99.58%,说明该模型拟和程度良好,实验误差小。综上所述,该模型是合适的,可以用此模型来分析和预测超声波对番石榴叶多酚物质的提取。

从表 6 可知:模型的一次项对番石榴叶多酚物质超声波提取的线性效应均表现显著;一次项中, X_2 对番石榴叶多酚物质超声波提取的曲面效应高度显

表6 方差分析

方差来源	自由度	SS	均方 MS	F 值	Pr > F	显著性
X ₁	1	5.97	5.97	68.37	0.0004	***
X ₂	1	2.46	2.46	28.23	0.0032	**
X ₃	1	4.31	4.31	49.34	0.0009	***
X ₁ X ₂	1	0.03	0.03	0.33	0.5900	
X ₁ X ₃	1	3.19	3.19	36.50	0.0018	**
X ₂ X ₃	1	0.50	0.50	5.77	0.0614	
X ₁ ²	1	6.33	6.33	72.54	0.0004	***
X ₂ ²	1	75.00	75.00	859.18	0.0001	***
X ₃ ²	1	13.75	13.75	157.48	0.0001	***
模型	9	103.47	11.50	131.69	0.0001	***
残差项	5	0.44	0.09			
失拟项	3	0.42	0.14	16.39	0.0580	不显著
误差	2	0.02	0.01			
总和	14	103.90				

注: $R^2 = 99.58\%$, $R^2_{Adj} = 98.82\%$, “***” 差异极显著 ($p < 0.001$); “**” 差异高度显著 ($p < 0.01$); “*” 差异显著 ($p < 0.05$)。

表5 Box-Behnken 实验结果
Table 5 Experimental results of Box-Behnken

实验号	X ₁ 乙醇 浓度	X ₂ 提取 温度	X ₃ 提取 时间	含量 (mg/g)
1	-1	-1	0	135.23
2	-1	1	0	136.17
3	1	-1	0	137.22
4	1	1	0	137.82
5	0	-1	-1	134.03
6	0	-1	1	136.50
7	0	1	-1	136.19
8	0	1	1	137.24
9	-1	0	-1	136.89
10	1	0	-1	140.31
11	-1	0	1	139.85
12	1	0	1	139.70
13	0	0	0	142.48
14	0	0	0	142.32
15	0	0	0	142.48

著、而 X₁ 和 X₃ 表现极显著;二次项均对番石榴叶多酚物质超声波提取的曲面效应极显著;交互项 X₁X₃ 交互效应高度显著,其他交互项不显著;表明各影响因素对番石榴叶多酚物质超声波提取的影响不是简单的线性关系。此外,还可以看出各因素对番石榴叶多酚物质超声波提取的影响的大小顺序为: X₁ > X₃ > X₂, 即乙醇浓度 > 提取时间 > 提取温度。

2.3.1 交互作用 图6 是对番石榴叶多酚含量影响较大的交互作用的响应面,乙醇浓度与提取时间的交互作用对多酚含量的影响显著,其他因素交互作用不显著。由图6 可以看出,当提取温度处在最佳值 60 ℃ 时,在一定范围乙醇浓度与提取时间所得到的响应面和等高线图存在极值,即是响应面的最高点,在此提取条件下,所得多酚物质的含量最高。当

提取时间一定时,随着乙醇浓度的增加,多酚物质含量先增大后减小;当提取乙醇浓度一定时,随着提取时间的增加,多酚物质含量先增大后减小。同时可以看出,在本实验水平范围之内,乙醇浓度和提取时间的曲面坡度均比较陡,说明这两个因素对多酚提取的影响都比较大。

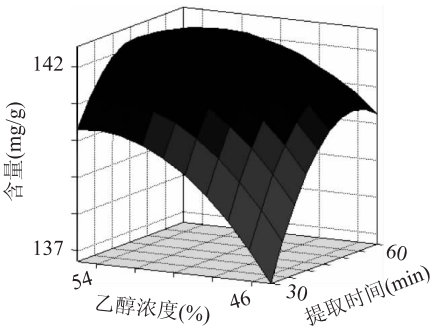


图6 乙醇浓度与提取时间对多酚含量的影响的响应面
Fig.6 Response surface for ethanol concentration and extraction time on the extraction amount of polyphenol

2.3.2 响应面的典型分析 为了进一步确证最佳点的值,采用 SAS 软件对实验模型进行响应面典型分析,以获得最大含量时的各提取条件,得番石榴叶多酚物质超声波提取最优条件为:乙醇浓度 51.44%,提取温度 60.27 ℃,提取时间 46.78 min,在此条件下,多酚物质的含量理论值为 142.61 mg/g。采用上述最优提取条件进行验证实验,同时考虑到实际操作的情况,将提取工艺参数修正为:乙醇浓度 51%,提取温度 60 ℃,提取时间 47 min,在此条件下提取 3 次,实际测得的平均多酚物质含量为 143.38 mg/g,与理论预测值误差在 10% 以内。表明该回归模型对番石榴叶多酚物质提取进行分析和预测是合适的。

3 结论

采用超声波辅助提取法,首先由 Plackett-Burman 设计方案确定了对提取效果有显著影响的三个因

素,分别为提取时间、乙醇浓度、提取温度。接着选择这三个因素进行响应面分析。三因素所对应的最佳水平为:乙醇浓度 51%,提取温度 60℃,提取时间 47 min,在此条件下多酚物质含量可达 143.38 mg/g。

参考文献

- [1] 蔡丹昭,刘华钢.大孔吸附树脂分离纯化番石榴叶总黄酮的研究[J].生命科学研究,2008,12(1):57-60.
- [2] Arima H,Danno GI.Isolation of antimicrobial compounds from Guava(*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation [J]. Biosci Biotechnol Biochem,2002(66):1727-1730.
- [3] Begum S,Siddiqui BS,Hassan SI.Triterpenoids from *Psidium guajava* leaves[J].Nat Prod Lett,2002(16):173-177.
- [4] 楠极,李远志.番石榴叶中多酚物质含量测定条件的优化[J].农产品加工,2009(3):181-192.
- [5] Lozoya X, Meckes M, Abou - Zaid M, et al.Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic Principle [J]. Archives Medical Research, 1994, 25(1):11.
- [6] Haizhou Li, Lester Pordesimo, Jochen Weiss.High intensity ultrasound- assisted extraction of oil from soybeans [J]. Food Research International,2004(37):731-738.
- [7] Athanasios C, Kimbaris, Nikolaos G, et al.Comparison of distillation and ultrasound - assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*) [J]. Ultrasonics Sonochemistry,2006(13):54-60.

(上接第 299 页)

表5 琼胶的理化指标

Table 5 Physicochemical properties of agar

项目	产品指标	GB 1975-2010
水分(w,%)	5.96	≤22
灰分(w,%)	3.81	≤5
水不溶物(w,%)	0.79	≤1
铅(pb计,mg/kg)	0.53	≤5
砷(As,mg/kg)	0.41	≤3
凝胶强度(g/cm ²)	873	高强度

压法提取石花菜琼胶,研究了柠檬酸浓度、提取时间、料液比、提取温度对琼胶提取率和凝胶强度的影响。单因素实验结果表明柠檬酸最适浓度为 0.03%,在此基础上进行响应面实验优化其它工艺条件,得出最佳提取工艺参数为:提取时间 33 min,料液比 1:36,提取温度为 110℃,此条件下琼胶提取率为 37.85%,与预测值基本相符,且琼胶感官性质、理化性质符合标准,凝胶强度为 873 g/cm²,属于高强度产品。

参考文献

- [1] 张淑平.海藻利用与食品胶体[M].北京:水利水电出版社,2009.
- [2] 李琴梅,戚勃.琼脂的物化特性及其在食品工业中的应用[J].中国食品添加剂,2009(6):170-174.

- [8] Farid E,Ahmed.Analysis of polychlorinated biphenyls in food products [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22(3): 170-185.
- [9] 石恩慧,李红,谷明灿,等.响应面法优化超声提取板栗总苞多酚工艺条件[J].中国食品学报,2013,13(5):69-76.
- [10] 蒋边,潘进权.响应面优化超声提取杨桃多酚的工艺研究[J].食品工业科技,2016,37(7):248-252.
- [11] 张旭,曹丽娟.核桃青皮渣中多酚的超声提取工艺研究[J].食品科技,2016,41(3):218-222.
- [12] 楠极,李远志.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):229-347.
- [13] Zheng Yi, Li Yong, Wang Weidong.Optimization of ultrasonic - assisted extraction and *in vitro* antioxidant activities of polysaccharides from *Trametes orientalis* [J]. Carbohydrate Polymers,2014,111:315-323.
- [14] Ying Zhi, Han Xiaoxiang, Li Jianrong. Ultrasound - assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves [J]. Food Chemistry,2011,127(3):1273-1279.
- [15] 欧宏宇,贾士儒.SAS 软件在微生物培养条件优化中的应用[J].天津轻工业学院学报,2001(1):14-17.
- [16] 杨文雄,高彦祥.响应面法及其在食品工业中的应用[J].中国食品添加剂,2005(2):68-71.
- [17] 郝学财,余晓斌,刘志钰,等.响应面方法在优化微生物培养基中的应用[J].食品研究与开发,2006,27(1):38-41.
- [18] 唐晓珍,刘宾.酸化乙醇法提取紫色小麦麸皮色素的工艺条件研究[J].中国粮油学报,2008,23(5):24-27.

- [3] Rodríguez M C, Matulewicz M C, M D Nosedá, et al. Agar from *Gracilaria gracilis*, (Gracilariales, Rhodophyta) of the patagonian coast of Argentina - Content, structure and physical properties [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(3): 1435-1441.
- [4] 薛志欣,杨桂朋,王广策.龙须菜琼胶的提取方法研究[J].海洋科学,2006,30(8):71-77.
- [5] Sousa A, Alves V D, Morais S, et al. Agar extraction from integrated multitrophic aquacultured *Gracilaria vermiculophylla*: Evaluation of a microwave-assisted process using response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(9): 3258-3267.
- [6] 赵谋明,邱慧霞,彭志英,等.江篱琼胶提胶新工艺的研究[J].食品与发酵工业,1997,23(2):3-7.
- [7] 闫绍鹏.鲜江篱提取琼胶及琼脂糖工艺研究[D].青岛:青岛科技大学,2014.
- [8] 赵亚红,王文侠,张显斌,等.高温高压提取甜菜废粕多糖的工艺及其抗氧化性研究[J].食品与发酵工业,2015(4):230-235.
- [9] 戚勃,杨贤庆,李来好,等.冷藏处理条件与龙须菜琼胶强度的关系[J].食品科学,2009,30(22):23-26.
- [10] 宋哲,汪兰,何会,等.不同生长期莲藕淀粉的凝胶特性、热重与核磁共振测定[J].食品科学,2009,30(23):105-109.
- [11] 林建原,季丽红.响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺[J].中国食品学报,2013,13(2):83-90.