

水蒲桃种子总多酚提取工艺的响应曲面法优化

郑妮,张生潭,汪铁山,林敬明*

(南方医科大学珠江医院药剂科,广州 510282)

[摘要] 目的:确定水蒲桃种子总多酚超声提取的最佳工艺条件。方法:以总多酚含量为指标,采用响应面对主要工艺参数进行优化并得到回归模型。结果:当提取溶剂乙醇的体积分数 38%,提取时间 32 min,液料比 47:1 时,在此工艺条件下的总多酚提取率为 16.32%。结论:响应面分析法回归模型的预测值与实测值的相对误差为 0.7%,该回归方程与实际情况拟合较好。

[关键词] 水蒲桃种子;总多酚;提取;响应面分析

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0041-04

Ultrasonic-assisted Extraction of Total Polyphenol from Seeds of *Syzygium jambos* by Response Surface Methodology

ZHENG Ni, ZHANG Sheng-tan, WANG Tie-shan, LIN Jing-ming*

(Department of Pharmacy, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the ultrasonic-assisted extraction process of total polyphenol from Seeds of *Syzygium jambos*. **Method:** Response surface analysis was conducted for optimizing the main technical parameters with the content of total polyphenol as index, and received the regression model. **Result:** The best parameters were as follows: the ratio of liquid to material was 47:1 (mL:g), ethanol concentration was 38%, ultrasonic extraction time was 32 min. Under this conditions, the extraction yield of total polyphenol was 16.32%. **Conclusion:** The relative error was 0.7% between the regression model predicted and measured by response surface method, the regression equation fitted well with the actual situation.

[Key words] seeds of *Syzygium jambos*; total polyphenol; extraction; response surface methodology

水蒲桃 *Syzygium jambos* Alston 又名水石榴、香果、响鼓、南蕉等,富含挥发油、黄酮类、多酚等化合物。《本草再新》中记载蒲桃“味甘酸,性热,无毒;入脾、肺二经;暖胃健脾。治肺虚寒嗽,破血积疽瘤。”蒲桃的叶、花、果、种子和树皮均可入药,多酚类化合物是水蒲桃的主要有效成分之一,具有抗病原微生物、抗氧化以及抗肿瘤^[1-3]等广泛的药理活性。响应曲面法(RSM)是利用合理的实验设计,采用多

元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系,回归分析寻求最优工艺的有效方法^[4],Box 等学者 20 世纪 50 年代完善了响应面方法学后,RSM 法已在诸多领域及工艺优化得到了应用^[5]。本研究使用 Design-Expert 8.0.4 软件^[6],采用 RSM 法优化水蒲桃种子多酚的提取工艺,以期水蒲桃种子资源的充分利用、减少能源和降低溶剂消耗等提供有益参考。

1 材料

水蒲桃于 2009 年 05 月采自广东药学院大学城校区,经广州珠江医院药剂科张守尧教授鉴定为 *Syzygium jambos*,去果皮阴干粉碎后过 2 号筛。没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110831-200302),酒石酸钾钠,七水合硫酸亚铁,磷

[收稿日期] 20101212(003)

[第一作者] 郑妮,硕士研究生,从事天然产物的研究开发与临床药学研究,E-mail: zhengni8787@163.com

[通讯作者] *林敬明,Tel:020-61643557,E-mail: linjm1231@21.cn.com

酸氢二钠,磷酸二氢钾,无水乙醇,石油醚(沸点60~90℃)均为分析纯;水为蒸馏水。

Lambda 35 型紫外分光光度计(Perkin Elmer), RD200 型电子天平(Germany Sartorius)。

2 方法与结果

2.1 酒石酸亚铁法测定水蒲桃总多酚的含量 精密称取没食子酸对照品 25.03 mg,置于 100 mL 量瓶中,蒸馏水溶解并定容至刻度,摇匀,即得 $0.2503 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的没食子酸对照品溶液,低温保存备用。精密吸取没食子酸对照溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,加蒸馏水至体积为 5.0 mL,再加入酒石酸亚铁溶液 5.0 mL,用 pH 7.5 的磷酸盐缓冲溶液定容至 25 mL,随行空白,在 540 nm 处测定吸光度(A)。以没食子酸的质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,绘制标准曲线得线性回归方程 $A = 15.4980C + 0.0002 (r = 0.9999)$,结果表明,没食子酸在 $0.01 \sim 0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度呈良好的线性关系^[7]。

2.2 水蒲桃中总多酚的提取及含量测定 称取一定量粉碎后的水蒲桃种子,加入 5 倍量体积的石油醚超声脱脂 3 次,每次 30 min,粉末过滤后挥干石油醚,将提取溶剂和脱脂后的水蒲桃种子粉末按一定液料比超声提取一定时间,过滤,收集上清液,定容至 100 mL 量瓶中,精密吸取上述样品溶液 0.5 mL,按 2.3.1 项下操作方法测定吸光度,并根据回归方程计算水蒲桃种子总多酚的含量。多酚含量以提取率表示,用下式计算:

$$\text{多酚提取率(以没食子酸计)} = \frac{10^3 \times (V \times c) \times \beta}{m} \times 100\%$$

V, c 分别为所测定样液的体积(mL)和浓度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); β 为提取液总酚的稀释因子; m 为加入水蒲桃种子粉末的质量(g)。

2.3 提取过程中的单因素对多酚含量的影响 影响水蒲桃多酚含量的因素很多,其中提取溶剂、提取时间、液料比 3 个因素影响显著。本研究在进行响应面分析前,先通过单因素试验确定试验因素与水平。

2.3.1 提取溶剂对多酚含量的影响 固定提取时间 30 min,液料比为 50:1,考察提取溶剂的影响。由图 1 可知,45% 乙醇溶液提取时总多酚提取率最高,为 16.26%,但随着乙醇体积分数进一步提高,总酚提取率逐渐降低。可能乙醇体积分数过高时,一些醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分等溶出增

多,这些成分与总酚竞争同乙醇-水分子结合,使组织的通透性下降,干扰因素随之增大。且乙醇的食用安全性高,价格较低,可回收利用,因而选用 45% 乙醇作为提取溶剂。

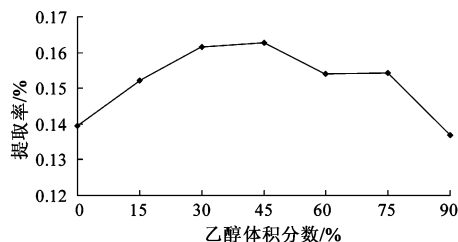


图 1 提取溶剂对多酚提取率的影响

2.3.2 提取时间对多酚含量的影响 固定提取时间为 30 min,乙醇体积分数为 45%,考察提取时间的影响,由图 2 可知,适当延长提取时间有助于提高多酚提取率,在 30 min 时达到了极大值,但随着时间的延长,提取率反而有所下降,其原因有可能是多酚在高温下发生了降解、缩合、氧化等化学反应,而使测定值下降。所以提取时间以 30 min 最好。

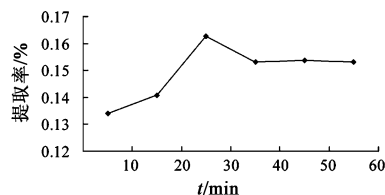


图 2 提取时间对多酚提取率的影响

2.3.3 提取液料比对多酚含量的影响 固定液料比为 50:1,乙醇体积分数为 45%,考察提取液料比的影响。由图 3 可知,随着液料比逐渐增大,提取液中粗多酚的提取率增加,当液料比大于 50:1 以后,随着液料比继续增大,提取液中的粗多酚提取率呈下降趋势。这可能是由于液料比在 50:1 时溶剂对粗多酚的溶解已基本达到饱和,继续增加溶剂用量,并不能显著提高粗多酚的提取率。因此,从提取效果、减少溶剂用量方面综合考虑,液料比选用 50:1 比较合适。

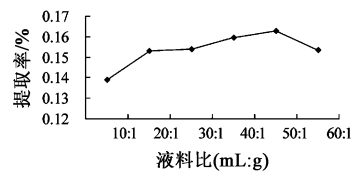


图 3 提取液料比对多酚提取率的影响

2.4 运用中心组合实验优化提取工艺 在单因素实验基础上,根据 Box-Benhnken 实验设计原理,选

取影响水蒲桃总多酚提取率(Y)测定中的3个主要因素:提取溶剂(X_1)、提取时间(X_2)、液料比(X_3)进行优化组合。以 $-1, 0, 1$ 代表自变量水平,试验因素及水平编码如表1所示。具体试验设计方案见表2,利用 Design-Expert 8.0.4 软件进行 RSA 设计和分析。

表1 水蒲桃种子总多酚提取工艺 Box-Behnken

试验因素水平及编码

编码水平	X_1 乙醇 体积分数/%	X_2 提取 时间/min	X_3 液料比 /mL·g ⁻¹
-1	30	20	40:1
0	45	30	50:1
1	60	40	60:1

表2 水蒲桃种子总多酚提取工艺响应面分析方案及结果

No.	X_1	X_2	X_3	多酚提取率/%
1	0	0	0	16.267 3
2	0	0	0	16.264 2
3	0	1	-1	15.980 3
4	-1	-1	0	15.873 9
5	0	1	1	15.372 0
6	1	1	0	15.903 2
7	-1	1	0	15.829 2
8	0	-1	1	15.001 6
9	1	0	1	15.583 6
10	0	0	0	16.269 8
11	-1	0	1	15.733 0
12	0	0	0	16.265 7
13	-1	0	-1	16.024 0
14	0	-1	-1	15.339 2
15	1	-1	0	15.493 5
16	0	0	0	16.268 8
17	1	0	-1	15.960 1

利用 Design-Expert 8.0.4 软件对表2 试验数据进行多元回归拟合,3 个因素 17 个试验,零点实验重复 5 次,得到总多酚提取率对提取溶剂(X_1)、提取时间(X_2)、液料比(X_3)的二次多项回归模型为 $Y = 16.27 - 0.065X_1 + 0.17X_2 - 0.20X_3 + 0.11 X_1X_2 - 0.021X_1X_3 - 0.068X_2X_3 - 0.045X_1^2 - 0.45X_2^2 - 0.40X_3^2$, 响应值中粗多酚的提取率实验值与回归方程预测值的相关系数 $R^2 = 0.973 2$, 可知拟合情况良

表3 响应面回归模型的分析

方差来源	f	SS	MS	F	P
X_1	1	0.033 8	0.033 8	3.749 0	0.094 1
X_2	1	0.236 8	0.236 8	26.300 3	0.001 4
X_3	1	0.325 4	0.325 4	36.132 0	0.000 5
X_1X_2	1	0.051 6	0.051 6	5.732 1	0.047 9
X_1X_3	1	0.001 8	0.001 8	0.202 9	0.666 0
X_2X_3	1	0.018 3	0.018 3	2.034 3	0.196 8
X_1^2	1	0.008 6	0.008 6	0.953 3	0.361 4
X_2^2	1	0.841 5	0.841 5	93.445 1	<0.000 1
X_3^2	1	0.663 0	0.663 0	73.628 1	<0.000 1
Model	9	2.291 2	0.254 6	28.269 7	0.000 1
Error	7	0.063 0	0.009 0		
Total	16	2.354 3			

好,从另一方面说明采用响应曲面法进行水蒲桃中总多酚提取的优化试验设计所得回归方程模型是可行的^[8]。方差分析结果表明,经 F 检验显示总模型方程显著,且提取时间和液料比对水蒲桃多酚提取率的影响显著。模型的调整确定 $R^2 = 0.938 8$, 说明该模型能解释 93.88% 响应值的变化,因而该模型拟合程度比较好,可以用此模型对粗多酚提取进行分析和预测^[9]。

从表3 回归方程系数显著性检验可知,模型一次项 X_2, X_3 极显著, X_1 不显著,从 F 值可看出单因素的影响顺序 $X_3 > X_2 > X_1$, 即液料比 > 提取时间 > 乙醇体积分数;二次项 X_2^2, X_3^2 极显著, X_1^2 不显著;交互项 X_1X_2 显著, X_1X_3, X_2X_3 不显著。 X_1, X_2, X_3 及其交互作用对响应值的影响如图4~6所示。

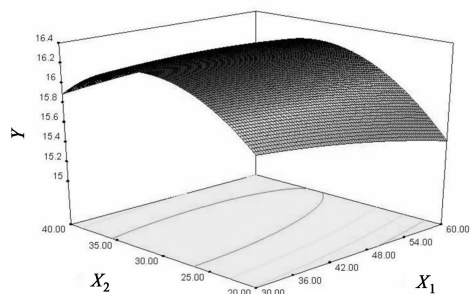


图4 乙醇体积分数和提取时间对多酚提取率的影响

图4~6 直观地反映了各因素交互作用对响应值的影响。比较3 组图可知,提取溶剂的液料比和提取时间对水蒲桃多酚提取率的影响最为显著,表现为曲线较陡;而乙醇体积分数显著性最低,相应表现为曲线较为平滑,且随其数值的增加或减少,响应值没有显著性变化^[10]。

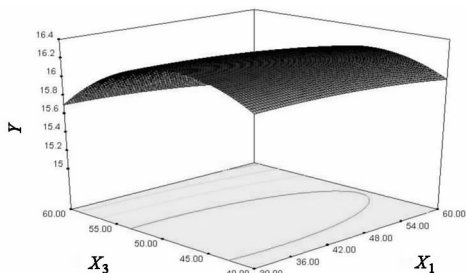


图 5 乙醇体积分数和液料比对多酚提取率的影响

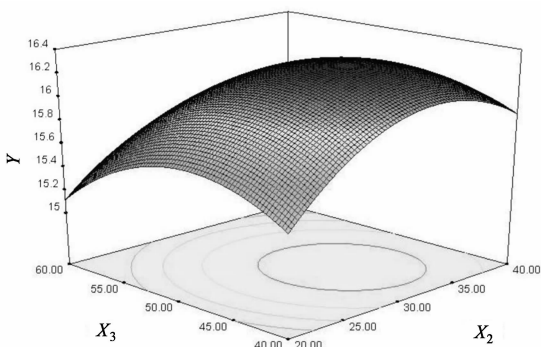


图 6 提取时间和液料比对多酚提取率的影响

2.5 最优提取条件的选择 通过软件 Design-Expert 8.0.4 求解方程, 得出了最优提取工艺条件为 38% 乙醇提取 32 min, 液料比为 47:1, 此时水蒲桃多酚的提取率可达 16.32%。为了证实预测的结果, 用试验中得到的最佳提取工艺条件重复试验 3 次, 平均水蒲桃总多酚的提取率为 $(16.30 \pm 0.01)\%$, 与预测值基本一致 (相对误差 0.7%), 说明该方程与实际情况拟合很好, 充分验证了所建模型的正确性^[11], 响应曲面法适用于对水蒲桃总多酚的超声波提取工艺进行回归分析和参数优化。

3 讨论

目前常用的植物多酚的含量测定方法有高锰酸钾滴定法、酒石酸亚铁分光光度法、Folin-Denis 法、Folin-Ciocalteus 法、铁氰化钾分光光度法等。但高锰酸钾滴定法滴定终点较难观察; 铁氰化钾分光光度法对测定条件要求严格; Folin-Denis 法灵敏度较高, 简便易行, 但显色不太稳定, 对环境温度要求也高; Folin-Ciocalteus 显色剂配制繁琐, 消耗时间长。因此, 本试验选用酒石酸亚铁分光光度法作为水蒲桃总多酚的含量测定方法。结果表明, 酒石酸亚铁分光光度法灵敏度高, 重复性好, 操作简便快捷, 可用于水蒲桃总多酚的含量测定。

响应面拟合方程运用效应曲面模型进行分析,

基于非线性模式进行设计和研究, 只有在考察的临近区域里才能充分近似真实情况, 因此本研究首先通过单因素试验选定了参与响应面试验的提取溶剂乙醇的体积分数、提取时间、液料比 3 个主要因素, 并设立不同水平, 然后应用响应面分析法建立了影响多酚提取率的二次多项数学模型, 经检验该模型具有显著的统计学意义, 不仅科学合理, 准确可靠, 而且快速可行, 可用于生产预测。

[参考文献]

- [1] Corine D D, Michel D, Joëlle Q L. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae) [J]. J Ethnopharmacol, 2000, 71(2):307.
- [2] Jyothi M V, Mandayam S N, Padmere M L, et al. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels [J]. Food Chem, 2007, 105(2):619.
- [3] Archana B, Nabasree D, Bratati D. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit [J]. Food Chem, 2005, 90(4):727.
- [4] 李玄, 沙跃, 张宇燕, 等. 响应面分析法优化脑络安胶囊提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15):11.
- [5] 熊子文, 罗雨萍, 张丽丽. 响应面法优化野艾蒿总黄酮的超声波提取工艺 [J]. 食品科学, 2010, 31(8):41.
- [6] 房海灵, 郭巧生, 申海进. 响应面法优化野菊花多糖含量测定的前处理条件 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(13):1665.
- [7] 武芸, 郑小江, 卜贵军, 等. 响应面分析法优化海金沙草多糖的提取工艺 [J]. 食品科学, 2010, 31(18):109.
- [8] 王明艳, 鲁加峰, 王晓顺, 等. 响应面法优化天冬多糖的提取条件 [J]. 食品科学, 2010, 31(6):93.
- [9] 杨磊, 刘婷婷, 卫蔚, 等. 响应面法优选新疆紫草总萜醌的匀浆提取工艺研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4):572.
- [10] 徐蓉, 陈钧, 徐骅, 等. 响应面法优化黄连黄柏中总生物碱的提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9):28.
- [11] 马捷琼, 袁博, 刘鲤民, 等. 声磁发生器结合响应曲面优化平盖灵芝提取工艺的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11):8.

[责任编辑 全燕]