

响应面法优化柚皮苷的提取条件

陈欲云^a, 杨跃寰^b, 曾燕^c, 蔡中荟^a, 马清萍^a

(四川理工学院 a. 化学与制药工程学院; b. 生物工程学院; c. 计算机学院, 四川 自贡 643000)

摘要:采用超声波提取法从成熟鲜柚皮中提取柚皮苷,运用响应面法优化柚皮苷提取条件。考察料液比、提取时间、乙醇浓度等因素对柚皮苷提取率的影响。响应面实验结果表明:柚皮苷超声波提取的最佳条件为料液比 1:35,乙醇浓度 65%,提取时间 60 min,此工艺条件下所得柚皮苷得率为 6.26%。

关键词:柚皮苷;响应面法;提取工艺

中图分类号:Q814

文献标志码:A

引言

柚皮苷是一种二氢黄酮类化合物,其化学结构于 1928 年首次由 Asahina 和 Inubuse 提出,柚皮苷主要存在于柑橘类植物、葡萄柚、豆类、樱桃、可可、唇齿科植物和番茄中^[1],Rouseff^[2]报道,柚皮苷在西柚汁中的含量为 800 mg/L;普通柚果汁中柚皮苷含量为 40~138 ppm,葡萄柚汁中柚皮苷含量为 136~362 ppm,枳实及枳壳和化橘红中柚皮苷含量分别为 1.87~22.72%和 0.3~29.2%^[3]。柚皮苷具有多种生物活性,在食品工业中,柚皮苷可以作为苦味剂添加到食品和饮料中^[4],在医药方面,柚皮苷具有抗肿瘤^[5]、抗氧化^[6]和抗菌^[7]等作用。

我国柚子种植历史悠久,分布广泛,广东、广西、福建、浙江和四川等地均有种植。本文以新鲜柚皮为材料,研究柚皮中柚皮苷的提取工艺,为柚皮处理,增加柚子的附加值提供新思路。

黄酮的传统提取方法主要有热水浸提法、碱提酸沉法和有机溶剂提取法,超声波辅助提取技术是一种高效、增产和节能的提取分离技术^[8]。Biesaga^[9]的研究表明,超声波和微波提取法对黄酮类化合物中的糖基和甲

氧基有保护作用。实验采用超声波提法,并借助响应面法优化柚皮苷的提取工艺条件,为柚皮苷的工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

柚皮苷标准品,上海金穗生物科技有限公司;成熟鲜柚,采摘于四川自贡贡井区建设镇。

1.2 仪器

756PC 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),As20500T 型超声波提取器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 柚皮苷标准曲线的建立

参考文献[10]中,取干燥至恒重的柚皮苷标准品称量 17.4 mg,溶于 70%的乙醇-水溶液,在容量瓶中配制成 100 mL 溶液,浓度为 0.174 mg/mL,待用。

取 7 只具塞比色管,分别精确移取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 标准品溶液,然后向各比色管滴加 10%氢氧化钾溶液 1 mL,再用 70%乙醇-水溶液定容至 10 mL,在 40 °C 恒温水浴锅中水浴 60 min,用可见-

收稿日期:2014-04-16

项目基金:四川理工学院基金项目(2013KY04);四川省教育厅项目(10ZB125)

作者简介:陈欲云(1977-),女,福建平潭人,讲师,硕士,主要从事天然产物研究与应用方面的研究,(E-mail)chenyuyun@yeah.net

紫外分光光度法在 410 nm 处测吸光值。线性回归得到柚皮苷浓度与吸光度值的回归方程 $y = 26.026x - 0.0003, R^2 = 0.9995$ 。

1.3.2 柚皮苷提取实验方案

柚皮粉制备,将成熟鲜柚的黄色外果皮剥除后得到的白色海绵状中果皮,洗净,切成 1 cm 左右的小块,放在干燥箱中 45 °C 干燥至恒重,用高速粉碎机粉碎成粉末,过 40 目筛,置于干燥器中备用。

精确称量 1 g 的柚皮粉,置于 250 mL 的锥形瓶中,按照实验设计方案采用超声波提取法提取柚皮苷,提取频率为 40 kHz。根据单因素实验结果,选取料液比、提取时间、乙醇浓度 3 个因素作为实验因素,采用 Design - Expert8.0.7.1 软件中的响应曲面法 (Box - Behnken Design, BBD) 设计原理优化柚皮苷提取工艺参数。以柚皮苷提取率为响应值设计实验,见表 1,然后按照 Design - Expert8.0.7.1 软件设计的实验顺序做实验。

表 1 实验因素水平表

因素	水平		
A 料液比	1:25 (-1)	1:30 (0)	1:35 (1)
B 乙醇浓度	65% (-1)	70% (0)	75% (1)
C 提取时间/min	55 (-1)	60 (0)	65 (1)

注:“()”中为该因素在软件中的编码值。

2 结果与分析

按照 Design - Expert8.0.7.1 软件设计的实验顺序测得实验结果(表 2)。

X_1 为料液比, X_2 为乙醇浓度, X_3 为提取时间, Y 为响应值表示柚皮苷提取率,利用 Design - Expert8.0.7.1 软件对柚皮苷提取率的响应面设计实验结果进行回归分析,得到二元多次方程(模型):

$$Y = -1.78 + 8.91X_1 + 5.560 \times 10^{-3}X_2 + 0.050X_3 - 0.097X_1X_2 - 0.011X_1X_3 - 7.950 \times 10^{-5}X_2X_3 - 13.04X_1^2 + 1.184 \times 10^{-5}X_2^2 - 3.585 \times 10^{-4}X_3^2$$

对回归方程进行方差分析,结果见表 3,失拟相 $F = 4.38 < F_{0.05}(3,4) = 6.59$,表明失拟相不具有显著性,说明模型拟合是合适的;模型 $F = 4.30 > F_{0.05}(9,7)$,说明 Quadratic 回归方程的检验具有显著性,此时回归方差模型也是具有显著性的,说明该模型拟合程度较好,实验误差小,用此模型对柚皮苷提取条件进行分析和预测是合理的。回归模型分析方程及表 3 显示提取时间的一次相和二次项及料液比的一次相对提取率都有显著影响,而乙醇浓度对提取率的影响不显著。

表 2 柚皮中柚皮苷提取率的响应面实验设计及结果

std	run	料液比 X_1A	乙醇浓度 X_2	提取时间 X_3	提取率 %
12	1	0	1	1	3.752
2	2	1	-1	0	6.305
17	3	0	0	0	5.588
16	4	0	0	0	4.813
9	5	0	-1	-1	4.283
11	6	0	-1	1	5.225
4	7	1	1	0	5.513
6	8	1	0	-1	4.084
14	9	0	0	0	4.980
10	10	0	1	-1	3.605
8	11	1	0	1	4.879
1	12	-1	-1	0	3.485
3	13	-1	1	0	4.625
7	14	-1	0	1	4.143
15	15	0	0	0	4.838
13	16	0	0	0	5.195
5	17	-1	0	-1	3.119

表 3 响应面法对柚皮苷提取率的 ANOVA 分析结果

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	9.743×10^{-4}	9	1.083×10^{-4}	4.30	0.0337	*
X_1	8.470×10^{-5}	1	8.470×10^{-5}	3.37	0.1092	*
X_2	3.441×10^{-6}	1	3.441×10^{-6}	0.14	0.7225	
X_3	3.275×10^{-4}	1	3.275×10^{-4}	13.01	0.0087	**
X_1X_2	9.332×10^{-5}	1	9.332×10^{-5}	3.71	0.0956	*
X_1X_3	1.311×10^{-6}	1	1.311×10^{-6}	0.052	0.8260	
X_2X_3	1.580×10^{-5}	1	1.580×10^{-5}	0.63	0.4542	
X_1^2	7.160×10^{-6}	1	7.160×10^{-6}	0.28	0.6130	
X_2^2	3.689×10^{-7}	1	3.689×10^{-7}	0.015	0.9070	
X_3^2	3.381×10^{-4}	1	3.381×10^{-4}	13.43	0.0080	**
残差	1.762×10^{-4}	7	2.517×10^{-5}			
失拟项	1.351×10^{-4}	3	4.502×10^{-5}	4.38	0.938	
误差	4.111×10^{-5}	4	1.028×10^{-5}			
总和	1.150×10^{-3}	16				

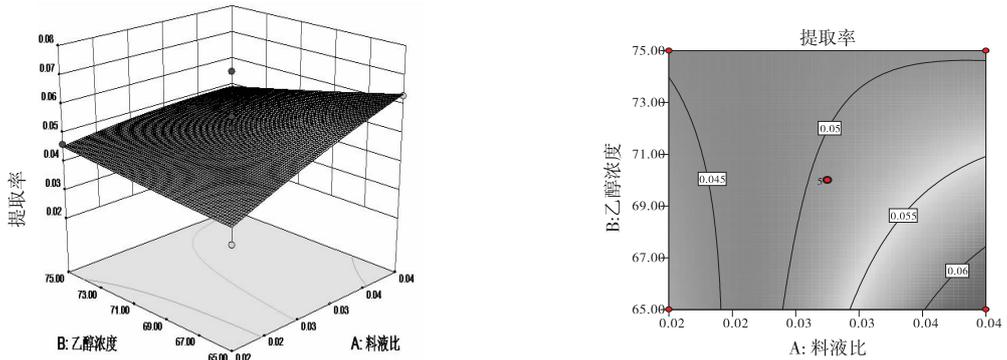
注: ** 差异极显著, $P < 0.01$; * 差异显著, $0.05 < P < 0.1$ 。

由表 3 中方差分析结果可知,各因素对柚皮苷提取率的影响由大到小依次为提取时间 > 料液比 > 乙醇浓度,其中,提取时间的影响极显著,料液比的影响显著。

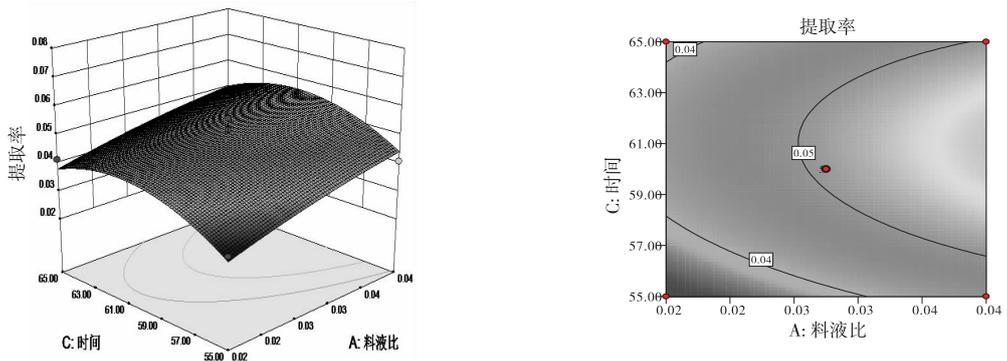
由图 1a 可以直观的看出,柚皮苷的得率会随着乙醇浓度的增高和料液比的增加而增大,说明乙醇浓度和料液比之间的交互作用较显著;图 1b,柚皮苷的得率随提取时间的延长和料液比的增加而显著性增大,说明柚皮苷随着提取时间的延长充分地扩散到浸提液中,而料液比在一定范围内增加也提高了柚皮苷的得率,提取时间和料液比表现出极显著性;图 1c 显示柚皮苷得率随乙醇浓度的升高和提取时间的延长而增大,响应面法实

验设计中柚皮苷的最佳提取乙醇浓度为 65.21% ,与单因素 70% 的乙醇浓度吻合较好,而随提取时间的延长会

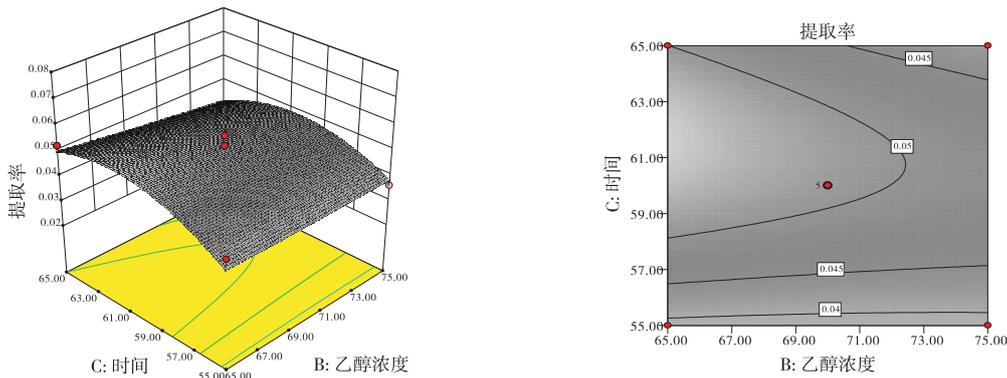
增加柚皮苷的得率,乙醇浓度和提取时间也呈现出良好的相互作用。



a乙醇浓度和料液比对提取率影响的响应面图和等高线图



b提取时间和料液比对提取率影响的响应面图和等高线图



c乙醇浓度和提取时间对提取率影响的响应面图和等高线图

图1 不同因素组合影响柚皮苷提取率的曲面图及其等高线

响应面法优化柚皮苷提取条件为:料液比 1:35,乙醇浓度 65.21% ,提取时间 60.62 min,提取率为 6.32%。

根据实际生产中提取条件可控精度,将柚皮苷的提取工艺条件选为料液比 1:35,乙醇浓度 65% ,提取时间 60 min。验证实验结果显示提取率为 6.26%。

3 结束语

响应曲面设计方法(Response Surface Methodology,

RSM)是通过合理的实验设计方法制定出实验方案,再通过具体实验得到相关数据,利用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系,经过对回归方程的分析以找到柚皮苷提取的最优工艺参数,在响应曲线设计方法中图形技术将相关的函数关系显示出来,实验者可以直观地观察并选择实验设计中的最优化条件。响应曲面设计方法有可以减少实验次数、缩短实验周期、节约试验成本和精度高等特点,得到了越来越广泛的应

用^[11]。本研究中响应面法确定的柚皮苷提取的最优条件为料液比 1:35,乙醇浓度 65%,提取时间 60 min。此工艺条件下的柚皮苷的得率为 6.26%。

参 考 文 献:

- [1] Saurabh B, Neha R, Bhaskar K, et al. Preclinical Evidence for the Pharmacological Actions of Naringin: A Review [J]. *Planta Med*, 2014, 80(6):437-451.
- [2] Rouseff R L, Martin S F, Youtsey C O. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in citrus [J]. *J Agric Food Chem*, 1987, 35:1027-1030.
- [3] 吴厚玖, 汪晓红, 王红, 等. 柚和普通柚果实发育过程中果皮柚苷的消长规律研究 [J]. *中国农业科学*, 1995, 28(5):73-77.
- [4] 贾冬英, 姚开, 谭敏, 等. 柚果皮中生理活性成分研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2001, 27(11):74-77.
- [5] Kanno S. Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells [J]. *Life Sciences*, 2004, 75:353-365.
- [6] Osama A B. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats [J]. *Life Sciences*, 2005, 76:2125-2135.
- [7] Ortuno A. Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum* [J]. *Food Chemistry*, 2006, 98:351-358.
- [8] 李秀娟, 周志钦, 胡柚皮中柚皮苷的超声提取工艺研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2011(2):142-146.
- [9] Biesaga M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(18):2505-2512.
- [10] 钟世安, 李维, 乔蓉, 等. 分光光度法测定柚皮中黄酮类化合物 [J]. *光谱实验室*, 2007, 24(4):597-600.
- [11] 张艳, 李永哲. 响应面法及其在药学领域中的应用 [J]. *吉林化工学院学报*, 2012, 29(7):20-24.

Optimization of Extraction Condition of Naringin Using Response Surface Methodology

CHEN Yuyun^a, YANG Yaohuan^b, ZENG Yan^c, CAI Zhonghui^a, MA Qingping^a

(a. School of Chemical and Pharmaceutical Engineering; b. School of Biotechnology Engineering; c. School of Computer Science, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: The naringin is extracted from mature grapefruit with the method of ultrasonic extraction, the extraction condition of naringin is optimized by the Response Surface Methodology. The effects of material liquid ratio, extraction time, ethanol concentration on the extraction rate of naringin are investigated. The response surface experimental results show that the optimum conditions of ultrasonic extraction of naringin are at a material liquid ratio of 1:35, 65% ethanol concentration and the extraction time of 60min, under such process conditions, the naringin yield is 6.26%.

Key words: naringin; the response surface methodology; extraction process