

文章编号:1001-6880(2014)3-0444-06

响应曲面优化枇杷叶绿原酸超声微波提取工艺

唐纯翼^{1*},吴显明²¹吉首大学城乡资源与规划学院,张家界 427000; ²吉首大学化学化工学院,吉首 416000

摘要:利用响应曲面法对枇杷叶中绿原酸的提取工艺进行优化。以单因素试验为基础,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,选取乙醇体积分数、料液比、微波功率和微波时间 4 因素和 3 水平进行响应曲面分析,建立绿原酸提取率的二次多项数学模型,分析各因素的显著性和交互作用,得到绿原酸提取工艺的最佳条件为:乙醇体积分数 70%、料液比 1:15、微波功率 400 W、微波时间 5 min,绿原酸提取率为 5.84%。

关键词:响应曲面法;枇杷叶;超声波;微波;绿原酸

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

Optimization of Ultrasonic-Microwave Extraction of Chlorogenic Acid from *Eriobotrya japonica* Leaves by Response Surface Methodology

TANG Chun-yi^{1*}, WU Xian-ming²¹College of Resources and Planning Sciences, Jishou University, Hunan Zhangjiajie 427000, China;²College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Hunan Jishou 416000, China

Abstract: In this study, response surface analysis was applied to optimize the extraction process of chlorogenic acid from *Eriobotrya japonica*. On the basis of single-factor experiments, the Box-Behnken center-composite experimental design principle was used to design the experiments and the response surface analysis with 4 factors and 3 levels was adopted. A second order quadratic equation for extraction of chlorogenic acid was created. After analyzed the significance of various factors and their interactions, the optimal extraction conditions for the extraction of chlorogenic acid from *E. japonica* leaves were determined as follows: 70% aqueous ethanol as the extraction solvent, 1:15 as sample-to-solvent ratio, 50 °C as extraction temperature, ultrasonication for 30 min and 5 min microwave with 400W as microwave power. The extraction yield of chlorogenic acid was determined to be 5.84% under the optimized extraction conditions.

Key words: response surface methodology; *Eriobotrya japonica* leaves; ultrasonic; microwave; chlorogenic acid

枇杷叶,蔷薇科植物枇杷 [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] 的干燥叶,别名巴叶、芦桔叶,传统中药,性微寒,味苦辛,归肺、胃经,具有清肺止咳,降逆止呕等功效。药理研究表明枇杷叶具有较好的抗炎和止咳作用,近年研究还发现,枇杷叶有抗肿瘤、抗病毒、降血糖、保肝利胆、清除氧自由基、增强机体免疫功能等作用^[1]。

绿原酸具有多种生物活性,如抗肿瘤、抗菌消炎、抗病毒、增高白血球、保肝利胆、降血压、延缓衰老作用及兴奋中枢神经系统等^[2,3],广泛用于食品保鲜剂、食品添加剂、植物生长激素及一些高级化妆品的添加剂等,是食品、药品、化妆品等工业的重要

原料^[4]。

响应面法 (RSM) 是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,通过对回归方程进行分析来寻求最优工艺参数,解决多变量问题的一种用于开发、改进、优化的统计和数学方法。Box-Behnken 实验设计法是响应面法的一种,它可以提供 3 到 10 个因素,进行低、中、高三水平的二阶实验设计,评价因素和指标间的非线性关系^[5,6]。

绿原酸的提取方法有水提法、醇提法、微波提取法、超声波提取法等,都是单一提取方法且提取率均偏低。本研究以枇杷叶原料,采用超声波和微波协同技术提出绿原酸,应用 Box-Behnken 实验设计法研究相关因素对提取率的影响,筛选出最佳的提取工艺参数,以期为枇杷叶中绿原酸的提取提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枇杷叶 - ,2012 年 3 月采自张家界(洗净,40 ℃ 恒温干燥至恒重,粉碎过 80 目筛);绿原酸标准品 - ,中国药品生物制品检定所;无水乙醇为分析纯;蒸馏水为自制。

1.2 仪器与设备

SK3200H 型超声波清洗器 - ,上海垒固仪器有限公司;SF8213 型医药不锈钢粉碎机 - ,上海科太粉碎设备厂;TDZ5-WS 型台式离心机 - ,赛特湘仪离心机仪器有限公司;HH-4 型数显恒温水浴锅 - ,常州国华有限公司;UV-160A 型紫外-可见分光光度计、AUY120 型电子天平 - ,日本岛津公司;改制冷兰仕微波炉 - ,格兰仕电器实业公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标准曲线绘制

称取绿原酸标准品 10 mg, 无水乙醇溶解并定容至 1000 mL。分别吸取 0.0、1.0、2.0、3.0、5.0、6.0 mL, 无水乙醇定容 25 mL。用 1 cm 比色皿, 无水乙醇为空白, 在 329 nm 处测定吸光度值。以吸光度值为纵坐标、绿原酸质量分数为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程: $y = 0.0383x + 0.123$, 相关系数 $R^2 = 0.9991$ 。

1.3.2 枇杷叶绿原酸提取及提取率计算

称取样品 2.0 g 于 250 mL 锥形瓶中, 70% 乙醇浸泡 12 h, 在 50 ℃、200 W 条件下超声 30 min, 再在 400 W 条件下微波辐射回流 5 min, 将提取物冷却、过滤, 测定提取液吸光度, 由标准曲线计算绿原酸含量, 由下式计算提取率^[7]。

$$\text{绿原酸提取率} / \% = (C \times n \times V) / (m \times 10^6) \times 100$$

式中: C 为通过标准曲线计算出的绿原酸质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); n 为稀释倍数; V 为配成溶液体积 (mL); m 为样品的质量 (g)。

1.3.3 单因素试验

在料液比 1:15 (g/mL)、超声功率 200 W、超声温度 50 ℃、超声时间 30 min、微波功率 400 W、微波时间 5 min 等基本工艺条件下, 考察乙醇体积分数、料液比、微波功率、微波时间对绿原酸提取率的影响。

1.3.4 响应曲面法试验

选取 4 因素 3 水平, 以绿原酸提取率为响应值, 运用 Design Expert 建立的中心组合试验 Box-

Behnken 设计方案进行优化。4 因素为乙醇体积分数 (X_1)、料液比 (X_2)、微波功率 (X_3)、微波时间 (X_4), 3 水平为低 (-1)、中 (0)、高 (+1)。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对绿原酸提取率的影响

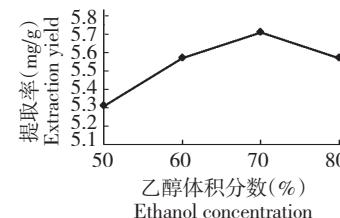


图 1 乙醇体积分数对提取率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on the extraction yield of chlorogenic acid

图 1 显示, 随着乙醇体积分数增大, 绿原酸提取率逐渐升高, 70% 乙醇时最高, 之后随乙醇体积分数增大而降低。这是因为乙醇体积分数过大时, 乙醇分子间的结合力高于乙醇分子与绿原酸分子间的结合力, 绿原酸溶出率反而下降, 故选择乙醇体积分数 70%。

2.1.2 超声温度对绿原酸提取率的影响

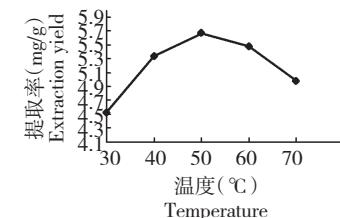


图 2 超声温度对绿原酸提取率的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic temperature on extraction yield of chlorogenic acid

图 2 显示, 温度升高, 绿原酸提取率上升, 原因是温度升高绿原酸溶解度增大。至 50 ℃ 时达最大值, 随后温度升高绿原酸的提取率开始下降, 原因是绿原酸分子的邻二酚羟基高温时易被氧化, 以及高温时不利于形成超声波微射流对细胞表面产生冲击、剪切时所需要的高密度与强压梯度气泡, 从而使绿原酸溶解度下降。因此, 选择 50 ℃ 为适宜提取温度。

2.1.3 料液比对绿原酸提取率的影响

图 3 显示, 料液比的降低, 绿原酸提取率上升,

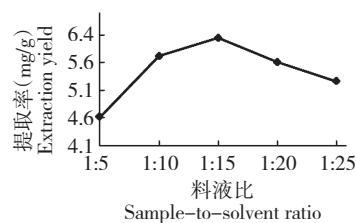


图3 料液比对绿原酸提取率的影响

Fig. 3 Effect of sample-to-solvent ratio on the extraction yield of chlorogenic acid

原因是料液比降低加大了提取过程的传质推动力。至1:15(g/mL)时,绿原酸提取率达到了最大,之后料液比降低提取率反而下降,原因是料液比过小使溶剂升高到相同的温度所需要的时间变长,从而降低了提取率。

2.1.4 微波功率对绿原酸提取率的影响

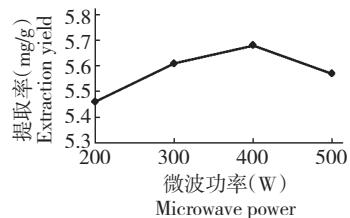


图4 微波功率对绿原酸提取率的影响

Fig. 4 Effect of microwave power on the extraction yield of chlorogenic acid

图4显示,微波功率增大,绿原酸提取率随之增大,原因是功率增大体系温度升高,绿原酸溶解度增

大。至400 W时,提取率达到最大,之后绿原酸提取率随功率加大反而下降,原因是微波功率增大导致温度升高,绿原酸分子的邻二酚羟基结构被氧化分解而使提溶解度下降。考虑到离子溶液吸收微波的能力较强,小功率即可将样品中的绿原酸萃取完全,功率过大使绿原酸降解以及成本问题,选择提取功率400W。

2.1.5 微波辐射时间对绿原酸提取率的影响

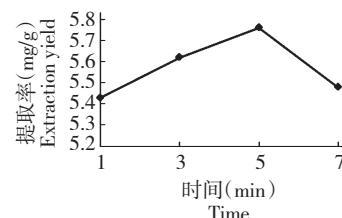


图5 微波辐射时间对绿原酸提取率的影响

Fig. 5 Effect of microwave irradiation time on the extraction yield of chlorogenic acid

图5显示,提取率随微波辐射时间延长而升高,原因是提取液温度随微波辐射时间延长而升高导致绿原酸溶解度增加。至5 min达到最大值,之后提取率随微波辐射时间延长反而下降,原因是过高的温度使提取液爆沸而与样品的有效接触时间减少,故辐射时间取5 min较适宜。

2.2 响应面分析

2.2.1 中心组合试验 Box-Behnken 方案设计的因素及水平编码

表1 中心组合试验 Box-Behnken 方案设计的因素及水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken center-composite experimental design

水平编码 Level	乙醇体积分数 X ₁ Ethanol concentration (%)	料液比 X ₂ Sample-to-solvent ratio (g/mL)	微波功率 X ₃ Microwave power (W)	微波时间 X ₄ Microwave time (min)
-1	60	1:10	300	3
0	70	1:15	400	5
+1	80	1:20	500	7

2.2.2 Box-Behnken 设计方案及试验结果

表2 Box-Behnken 设计方案及试验结果

Table 2 Box-Behnken design matrix and extraction yield of chlorogenic acid

试验组 No.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	实测提取率 Measured values (%)	预测提取率 Predictive value (%)
1	-1	-1	0	0	5.67	5.65
2	+1	-1	0	0	5.82	5.77

3	-1	+1	0	0	5.79	5.84
4	+1	+1	0	0	5.83	5.84
5	0	0	-1	-1	5.85	5.81
6	0	0	+1	-1	5.81	5.82
7	0	0	-1	+1	5.84	5.87
8	0	0	+1	+1	5.48	5.40
9	-1	0	0	-1	5.77	5.66
10	+1	0	0	-1	5.53	5.46
11	-1	0	0	+1	5.43	5.54
12	+1	0	0	+1	5.84	5.84
13	0	-1	-1	0	5.54	5.51
14	0	+1	-1	0	5.77	5.69
15	0	-1	+1	0	5.75	5.85
16	0	+1	+1	0	5.69	5.52
17	-1	0	-1	0	5.48	5.49
18	+1	0	-1	0	5.43	5.52
19	-1	0	+1	0	5.67	5.66
20	+1	0	+1	0	5.47	5.54
21	0	-1	0	-1	5.44	5.48
22	0	+1	0	-1	5.85	5.84
23	0	-1	0	+1	5.62	5.64
24	0	+1	0	+1	5.86	5.84
25	0	0	0	0	5.46	5.55
26	0	0	0	0	5.33	5.38
27	0	0	0	0	5.74	5.61
28	0	0	0	0	5.64	5.66
29	0	0	0	0	5.41	5.53

2.2.3 二次回归模型建立

利用 Design Expert7.0 软件对表 2 试验数据进行多元回归拟合,得枇杷叶绿原酸提取率(Y)对乙醇体积分数(X_1)、料液比(X_2)、微波功率(X_3)、微波时间(X_4)的二次多项回归模型方程为:

$$Y = 5.84 + 0.061X_1 + 0.04 X_2 + 0.12X_3 +$$

$0.035X_4 + 0.11 X_1 X_2 + 0.12 X_1 X_3 + 0.12X_1 X_4 + 0.12 X_2 X_3 - 0.013 X_2 X_4 + 0.02X_3 X_4 - 0.11X_1^2 - 0.11X_2^2 - 0.15X_3^2 - 0.09 X_4^2$, 相关系数 $R^2 = 0.9450$ 。

2.2.4 显著性检验

模型显著性检验结果见表 3, 回归模型系数显著性检验结果见表 4。

表 3 回归模型方差分析结果

Table 3 Analysis of variance for fitted quadratic polynomial model

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significant
模型 Model	0.67	14	0.148	4.72	0.0032	显著
残差 Residual	0.14	14	0.010			
失拟项 Lack of Fit	0.13	9	0.015	9.33	0.052	
纯误差 Pure Error	0.008	5	0.002			
总和 Total	0.81	28				

表 3 显示,该模型方程具有极显著性($P < 0.01$),失拟差不显著($P > 0.05$),表明无失拟因素

存在,对模型有利,可用于枇杷叶中绿原酸提取率的预测与分析。

表 4 回归模型系数的显著性检验结果

Table 4 Testing results of significance for regression coefficient

因素 Factor	回归系数 Coefficient Estimate	自由度 df	校准偏差 Standard Error	95% 置信		P 值 P-value
				上限 High	下限 Low	
截距	5.84	1	0.044	5.93	5.74	
X_1	0.061	1	0.029	0.12	-0.001	0.0543
X_2	0.040	1	0.032	0.11	-0.027	0.2223
X_3	0.12	1	0.033	0.19	0.049	0.0028
X_4	0.034	1	0.032	0.10	-0.033	0.2895
$X_1 X_2$	0.10	1	0.050	0.21	-0.003	0.0551
$X_1 X_3$	0.12	1	0.050	0.21	-0.010	0.0345
$X_1 X_4$	0.12	1	0.050	0.023	0.012	0.0314
$X_2 X_3$	0.12	1	0.063	0.25	-0.016	0.0802
$X_2 X_4$	-0.012	1	0.050	0.095	0.12	0.8069
$X_3 X_4$	0.020	1	0.056	0.14	-0.10	0.7272
X_1^2	-0.11	1	0.039	-0.030	-0.20	0.0116
X_2^2	-0.11	1	0.042	-0.025	-0.20	0.0161
X_3^2	-0.15	1	0.041	-0.059	-0.24	0.0030
X_4^2	-0.092	1	0.040		-0.18	0.006

表 4 显示,模型一次项 X_1 、 X_2 、 X_4 对 Y 影响显著, X_3 对 Y 影响极显著;二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 影响显著, X_4^2 不具显著性影响;交互项 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_1 X_4$ 、 $X_2 X_3$ 影响显著, $X_2 X_4$ 、 $X_3 X_4$ 不具显著性影响。

2.2.5 响应曲面分析与优化条件的确定

根据回归分析结果作出 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 及其交互作用对响应值的影响(图 6~11)。响应曲面平面投影的形状可反映出交互效应的强弱,椭圆形表示两因素交互作用显著,而圆形则与之相反。

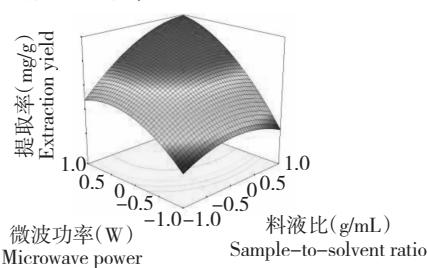


图 6 微波功率和料液比对提取率的影响

Fig. 6 Effects of microwave power and solid:sample-to-solvent ratio on the extraction yield

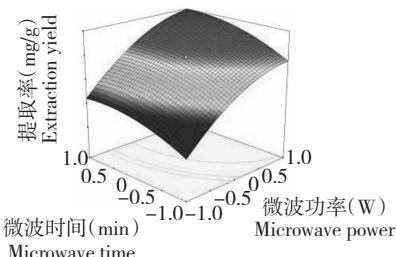


图 7 微波时间和微波功率对提取率的影响

Fig. 7 Effects of microwave power and microwavetime on the extraction yield

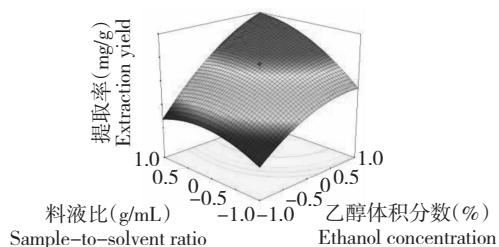


图 8 料液比和乙醇体积分数对提取率的影响

Fig. 8 Effects of ethanol concentration and sample-to-solvent ratio on the extraction yield

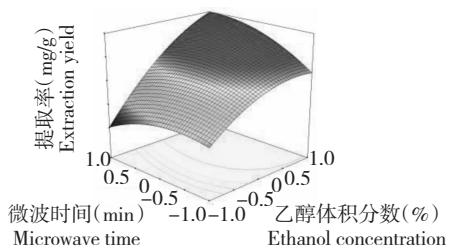


图9 微波时间和乙醇体积分数对提取率的影响

Fig. 9 Effects of ethanol concentration and microwavetime on the extraction yield

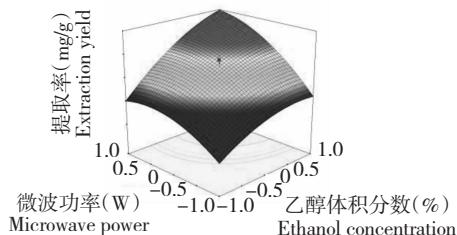


图10 微波功率和乙醇体积分数对提取率的影响

Fig. 10 Effects of microwave power and ethanol concentration on the extraction yield

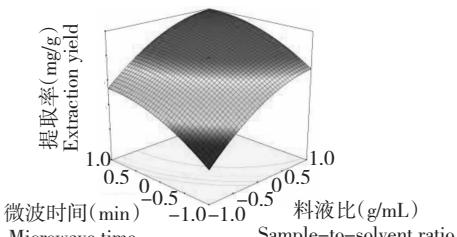


图11 微波时间和料液比对提取率的影响

Fig. 11 Effects of microwavetime and sample-to-solvent ratio on the extraction yield

由图6~11可知,4因素间均有较明显的交互作用。依据软件给出的工艺条件,考虑成本、实际操作需要等因素后修订的最佳工艺条件为:微波功率400 W、溶剂乙醇体积分数70%、料液比1:15(g/mL)、辐射时间5 min。此条件下实验得到平均提取率为5.85%,平均回收率为97.4%,RSD为4.04%,比理论平均提取率5.65%高0.20%,所以基于响应曲面法所得的优化提取工艺数据准确可靠。

3 结论

RSM法优化后的枇杷叶中绿原酸超声波微波协同提取最佳工艺为:枇杷叶粒度80目,预浸泡12 h,料液比1:15(g/mL)、乙醇体积分数70%、50℃超声30 min、微波功率400 W、微波时间5 min。本试验条件下枇杷叶绿原酸提取率达到5.84 g/mg。枇杷叶中其它活性成分如黄酮类物质对于绿原酸提取是否干扰,以及梯次提出枇杷叶中主要活性成分,还有待进一步研究。

参考文献

- Guo Y(郭宇), Wu SJ(吴松吉), Piao HS(朴惠善). Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Eriobotrya japonica* leaves. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2006, 17:928-930.
- Wang JH(王建辉), Liu YL(刘永乐), Li CX(李赤翎), et al. Effect of chlorogenicacid extracted from *Eucommia ulmoides* Oliv. on hemorheological changes of mice induced by high fat diet. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24:1186-1190.
- Tracy L, Farrell TP, Dew LP, et al. Absorption and metabolism of chlorogenic acids in cultured gastric epithelial monolayers. *Drug Metabol Dispos*, 2011, 39:2338-2346.
- Xiao HY(肖怀秋), Li YL(李玉珍), Lan LX(兰立新). Studies on extraction technology of cholorogenicacid from *FlosLonicerae* using ethyacetate assisted by ultrasonic. *Food Ferment Technol*(食品与发酵科技), 2009, 5(2):48-50.
- Zhang M(张冕), Wang DT(王德堂), Liu E(刘娥). Optimization of thymopentin liposome formulation by Box-Behnken experimental design. *Chin J Biochem Pharm*(中国生化药物杂志), 2012, 33:808-810.
- Wu GJ(吴光杰), Li YP(李玉萍), Pi XF(皮小芳), et al. Optimization of polysaccharides extraction process from *Portulaceolaceracea* L. by response surface methodology. *Food Machine*(食品与机械), 2010, 26:129-133.
- Xiao ZB(肖卓炳), Guo RK(郭瑞珂), Guo MM(郭满满), et al. Optimization of ultrasonic-microwave assisted extraction of chlorogenicacid from *FlosLonicerae*. *Food Sci*(食品科学), 2012, 33:111-114.