

超声波辅助提取野桂花蜜中多酚的工艺优化

Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from wild osmanthus-scented honey

王雨¹ 单杨² 李高阳³

WANG Yu¹ SHAN Yang² LI Gao-yang³

(1. 湖南农业大学食品科技学院, 湖南长沙 410128; 2. 湖南省农科院, 湖南长沙 410125;
3. 湖南省农产品加工研究所, 湖南长沙 410125)

(1. Hunan Agriculture University College of Food Science and Technology, Changsha, Hunan 410128, China;
2. Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410125, China;
3. Study on the Processing of Agricultural Products, Changsha, Hunan 410125, China)

摘要:为确定野桂花蜜中多酚化合物提取的最佳工艺参数,以野桂花蜜为主要原料,采用响应面优化野桂花蜜中多酚化合物的超声波辅助提取工艺。在单因素试验的基础上,以超声波时间、超声波温度、料液比、溶剂浓度为自变量,以多酚化合物得率为响应值,进行试验设计,研究自变量与响应值之间的关系。结果表明:优化得出的最佳工艺条件为溶剂浓度 62%,料液比 1:10(*m*:*V*),超声波时间 21 min,超声波温度 54℃。该工艺条件下多酚得率为 68.27 mg/10 g。

关键词:超声波辅助;野桂花蜜;多酚

Abstract: The experiment is designed to get the optimum technological extraction conditions of phenolic compounds from wild osmanthus-scented honey. Response surface methodology was employed to optimize conditions for the ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from wild osmanthus-scented honey, as main substrates. Based on the single factor experiments, the effect of solvent concentration, solid-liquid ratio, ultrasonic time and ultrasonic temperature on phenolic rate were conducted as well as their relationship by experimental design. The optimal conditions for extracting phenolic from wild osmanthus-scented honey were determined as ethyl acetate volume fraction 62%, liquid to solid ratio 10 mL/g, ultrasonic time of 20 min and ultrasonic temperature of 54℃. Under these conditions, the extraction efficiency of phenolic was 68.27 mg/10 g.

Keywords: ultrasonic-assisted; wild osmanthus honey; phenolic compounds

野桂花蜜中的酚类化合物是一种天然的抗氧化剂^[1]。天然抗氧化剂具有无毒害的特点,可以有效地抑制人体内的

自由基^[2-5]。目前对蜂蜜多酚的提取多采用传统的浸提法或是直接粗略萃取后进行纯化,存在提取时间长、提取率低的问题。

超声波辅助提取法由于操作简便,提取效率高等优点,已广泛应用于天然产物中有效成分的提取^[6-8]。超声波能产生高速、强烈的空化效应和搅拌作用,可以高效地提取天然活性成分^[9]。本研究拟以野桂花蜜为原料,采用超声波辅助提取野桂花蜜中的多酚化合物,再用响应面优化提取工艺参数,从而为获得更高得率的多酚化合物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

野桂花蜜:产自洞庭湖畔,低温保存,湖南省明园蜂业有限公司;

Folin-酚试剂:上海安谱科学仪器有限公司;

原儿茶酸标准品:美国 Sigma 公司;

乙酸乙酯、盐酸、碳酸钠:分析纯,上海试剂公司。

1.2 仪器与设备

电子天平:AUW220D 型,日本岛津有限公司;

超声波清洗机:KQ-500DTV 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

紫外-可见分光光度计:UV-1700 型,日本岛津有限公司;

旋转蒸发仪:EV311 型,上海恒钦自动化科技有限公司;

循环水真空泵:SHZ-III 型,上海亚荣生化仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 原儿茶酸标准曲线的制作 配制浓度为 0.1 mg/mL 的原儿茶酸标准溶液,分别吸取 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8,

作者简介:王雨(1989—),男,湖南农业大学在读硕士研究生。

E-mail:w116y277@163.com

通讯作者:单杨

收稿日期:2015-01-25

1.0 mL于10 mL的容量瓶中,加入福林—酚试剂1 mL,用玻璃棒搅匀,然后加入1 mol/L的碳酸钠溶液5 mL,定容摇匀,常温下避光静置1 h,于765 nm处测吸光度。以原儿茶酸浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,进行线性回归分析,得到的回归方程为 $y=150.71x+0.0043$ ($R^2=0.9998$)。

1.3.2 野桂花蜜多酚化合物的超声波辅助提取 准确称量10.0 g野桂花蜜于50 mL的锥形瓶中,将一定溶剂浓度的乙酸乙酯溶液,按照不同料液比加入锥形瓶中,磁力搅拌1 min后,将锥形瓶置于超声波发生器中一定温度下提取一段时间后,趁热分离合并上清液。然后真空浓缩至膏状物,用4 mL乙醇溶解,在765 nm下测定吸光度。

1.3.3 多酚化合物得率的测定 多酚化合物得率按式(1)计算:

$$Y = \frac{10 \times C \times V}{M_0} \quad (1)$$

式中:

Y——多酚得率,mg/10 g;

C——测得的多酚浓度,mg/mL;

V——乙醇溶液体积,mL;

M_0 ——原料的质量,g。

1.3.4 单因素试验设计

(1) 溶剂浓度对多酚得率的影响:固定料液比为1:10($m:V$),超声波时间为20 min,超声波温度为50℃,考察不同溶剂浓度(30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%)对野桂花蜜多酚得率的影响。

(2) 料液比对多酚得率的影响:固定溶剂浓度为60%,超声波时间为20 min,超声波温度为50℃,考察不同料液比(1:4,1:6,1:8,1:10,1:12,1:14, $m:V$)对野桂花蜜多酚得率的影响。

(3) 超声波时间对多酚得率的影响:固定溶剂浓度为60%,料液比为1:10($m:V$),超声波温度为50℃,考察不同超声波时间(10,15,20,25,30 min)内野桂花蜜多酚得率的变化规律。

(4) 超声波温度对多酚得率的影响:固定溶剂浓度为60%,料液比为1:10($m:V$),超声波时间为20 min,考察不同超声波温度(30,40,50,60,70℃)对野桂花蜜多酚得率的影响。

1.3.5 响应面优化试验 在单因素试验结果的基础上,根据Box-Behnken试验设计原理,以野桂花蜜多酚提取得率为响应值,选取溶剂浓度、料液比、超声波时间、超声波温度4个影响因素,设计四因素三水平的响应面优化试验。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 溶剂浓度对野桂花蜜多酚得率的影响 由图1可知,溶剂浓度在60%以前,野桂花蜜多酚的得率随着溶剂浓度的增高而增多。当溶剂浓度到达60%之后,野桂花蜜多酚的得率呈现缓慢的下降趋势。溶剂浓度到达90%时,野桂花

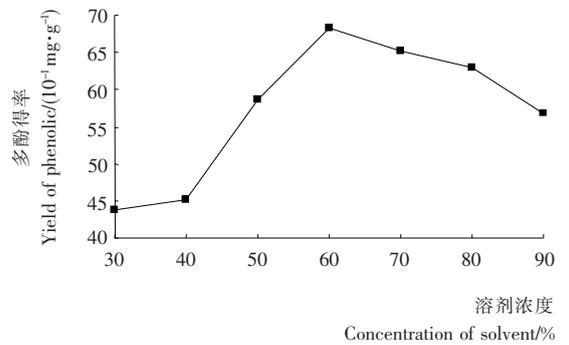


图1 溶剂浓度对多酚得率的影响

Figure 1 Effect of concentration of solvent on yield of phenolic

蜜多酚的得率降低至56.80 mg/10 g。这是因为开始时随着溶剂浓度的增高,野桂花蜜中多酚化合物与提取溶液的接触机会越来越多。当浓度到达60%之后,水分占比减少,野桂花蜜中的大分子糖类由于极性差异不能溶出,使得提取时有结晶未溶的现象。这使得其中的多酚没能充分溶解出来,提取量反而减少。所以,选择最佳的溶剂浓度为60%。

2.1.2 料液比对野桂花蜜多酚得率的影响 由图2可知,随着料液比的减少,野桂花蜜多酚的得率逐渐升高,当料液比达到1:10($m:V$)时,野桂花蜜多酚的得率不再上升。其原因是随着溶剂的增加,多酚化合物更易接触到提取溶剂,多酚得率也就越大。当料液比达到1:10($m:V$)时,多酚化合物已基本被提取出来,继续加入溶剂,起不到提高提取率的作用,高用量的溶剂反而不适于提取,同时,出于节约成本考虑,料液比选择1:10($m:V$)为宜。

2.1.3 超声波时间对野桂花蜜多酚的影响 由图3可知,在20 min内,野桂花蜜多酚得率随超声波时间的增加而增加,20 min后,野桂花蜜多酚得率随超声波时间的增加反而出现下降。0~20 min的过程中,由于超声波的空化作用,其提取速度得到提升,野桂花蜜多酚得率提升显著^[10]。在20 min后,多酚化合物基本被提取出来,同时,由于过长的超声波作用,使得多酚化合物中一些不稳定的成分被破坏^[11],

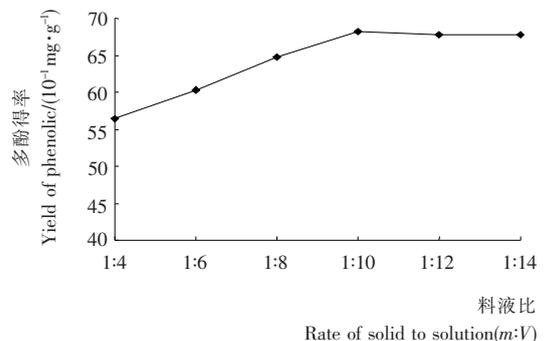


图2 料液比对多酚得率的影响

Figure 2 Effect of rate of solid to solution on yield of phenolic

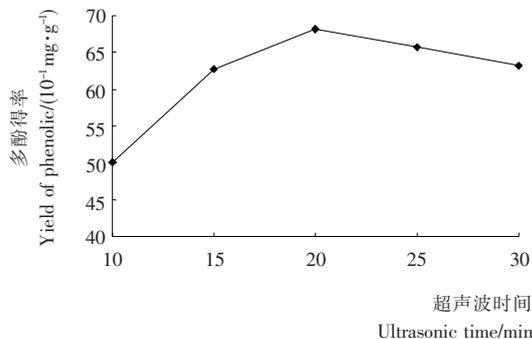


图 3 超声波时间对多酚得率的影响

Figure 3 Effect of ultrasonic time on yield of phenolic

所以出现了下降。故确定提取过程的最佳超声波时间为 20 min。

2.1.4 超声波温度对野桂花蜜多酚的影响 由图 4 可知,在温度低于 50 °C 时,随着温度的升高,分子热运动加剧,使得多酚化合物的得率迅速提升,在 50 °C 继续往上升温时,发现野桂花蜜多酚的得率随温度的上升有明显的下降。原因可能是多酚化合物中的热不稳定结构在高温作用下被破坏^[12]。而且过高的温度会促进水分和乙酸乙酯的挥发,从而影响多酚得率。故选择最佳提取温度为 50 °C。

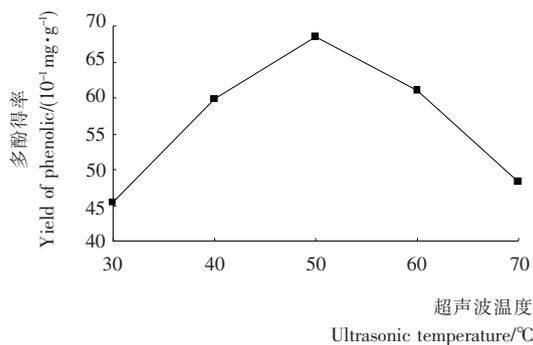


图 4 超声波温度对多酚得率的影响

Figure 4 Effect of ultrasonic temperature on yield of phenolic

2.2 响应面法优化提取条件

2.2.1 响应面试验设计及结果 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理^[13],结合单因素试验结果,设计四因素三水平的响应面分析试验,设计方案见表 1,响应面优化试验结果见表 2。

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of respnse suirface analysis

编码	X ₁ 溶剂浓度/%	X ₂ 料液比 (m : V)	X ₃ 超声波时间/min	X ₄ 超声波温度/°C
-1	50	1 : 8	15	40
0	60	1 : 10	20	50
1	70	1 : 12	25	60

表 2 Box-Behnken 设计方案及野桂花蜜多酚得率的测定结果

Table 2 Box-Behnken matrix and respnses values of phenolic compounds yield

序号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	得率 Y/ (10 ⁻¹ mg · g ⁻¹)
1	-1	-1	0	0	40.04
2	1	-1	0	0	56.82
3	-1	1	0	0	44.72
4	1	1	0	0	49.69
5	0	0	-1	-1	41.92
6	0	0	1	-1	47.94
7	0	0	-1	1	51.13
8	0	0	1	1	63.06
9	-1	0	0	-1	39.13
10	1	0	0	-1	43.59
11	-1	0	0	1	48.12
12	1	0	0	1	55.63
13	0	-1	-1	0	57.07
14	0	1	-1	0	48.70
15	0	-1	1	0	51.07
16	0	1	1	0	56.44
17	-1	0	-1	0	42.76
18	1	0	-1	0	47.04
19	-1	0	1	0	38.84
20	1	0	1	0	58.64
21	0	-1	0	-1	51.56
22	0	1	0	-1	41.77
23	0	-1	0	1	58.43
24	0	1	0	1	57.47
25	0	0	0	0	66.73
26	0	0	0	0	65.99
27	0	0	0	0	68.79
28	0	0	0	0	65.96
29	0	0	0	0	67.54

通过 Design Expert V8.0.6 软件对表 2 中的野桂花蜜多酚得率进行响应面回归分析,得到回归方程:

$$Y = 67.00 + 4.82X_1 - 1.35X_2 + 2.28X_3 + 5.66X_4 - 2.95X_1X_2 + 3.88X_1X_3 + 0.76X_1X_4 + 3.43X_2X_3 + 2.21X_2X_4 + 1.48X_3X_4 - 12.52X_1^2 - 6.43X_2^2 - 7.57X_3^2 - 8.18X_4^2 \quad (2)$$

对回归方程进行方差分析(见表 3),此回归模型显著 ($P < 0.0001$),而且上述回归方程的决定系数 $R^2 = 0.9695$, $R_{adj}^2 = 0.9391$,说明 96.95% 的数据可以用此方程模型解释,

表 3 试验结果的方差分析[†]

Table 3 Variance analysis for the experiment result

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
X ₁	278.40	1	278.40	53.10	< 0.000 1	* *
X ₂	21.87	1	21.87	4.17	0.060 4	
X ₃	62.42	1	62.42	11.90	0.003 9	* *
X ₄	384.54	1	384.54	73.35	< 0.000 1	* *
X ₁ X ₂	34.86	1	34.86	6.65	0.021 8	*
X ₁ X ₃	60.21	1	60.21	11.48	0.004 4	* *
X ₁ X ₄	2.32	1	2.32	0.44	0.516 2	
X ₂ X ₃	47.19	1	47.19	9.01	0.009 5	* *
X ₂ X ₄	19.49	1	19.49	3.71	0.074 3	
X ₃ X ₄	8.73	1	8.73	1.66	0.217 7	
X ₁ ²	1 017.19	1	1 017.19	194.04	< 0.000 1	* *
X ₂ ²	267.98	1	267.98	51.12	< 0.000 1	* *
X ₃ ²	372.09	1	372.09	70.98	< 0.000 1	* *
X ₄ ²	434.17	1	434.17	82.82	< 0.000 1	* *
模型	2 336.58	14	166.90	31.84	< 0.000 1	* *
失拟值	67.72	10	6.77	4.78	0.072 6	
纯误差	5.67	4	1.42			
总和	2 409.97	28				

[†] * *. P<0.01, 差异极显著; *. P<0.05, 差异显著; R²=0.969 5; R_{adj}²=0.939 1.

模型可以真实地反应各个因子与响应值之间的关系。与此同时,失拟项 P 值为 0.072 6>0.05,失拟项不显著说明此回归方程拟合度很好,试验误差小。因此可以用该回归方程分析和预测试验结果。由表 3 可知,一次项 X₁、X₃ 和 X₄ 均达到极显著水平,X₂ 不显著,而二次项的影响均为显著,说明各因素对野桂花蜜多酚的影响并非简单的线性关系。

2.2.2 响应面分析 通过回归方程,固定其中一个因素在 0 水平,可以得到另两个因素之间的交互作用的响应面图(见图 5)。从图 5 中可直观地看出响应面的优化区域和各个因素对野桂花蜜多酚得率的影响程度。结合回归方程以及表 3 的数据可知:超声波温度对多酚得率的影响最为显著,响应值变化最大,同时曲线较陡。而料液比对多酚得率的影响最小,响应值变化较小,同时曲面比较平滑。综合后可以得出对野桂花蜜多酚得率的影响程度从大到小的顺序依次为超声波温度>溶剂浓度>超声波时间>料液比。

2.2.3 最佳工艺条件的验证 通过 Design Expert V8.0.6 软件对响应值(多酚的得率)进行优化分析,得到最佳提取条件为 X₁(62.45)、X₂(1:9.94)、X₃(21.22)、X₄(53.75),即溶剂浓度 62.45%,料液比 1:9.94(m:V),超声波时间 21.22 min,超声波温度 53.75 °C,野桂花蜜多酚得率的理论值为 68.952 mg/10 g。为方便实际操作,取溶剂浓度 62%,料液比 1:10(m:V),超声波时间 21 min,超声波温度 54 °C,对提取野桂花蜜多酚工艺进行验证实验(n=3),得到

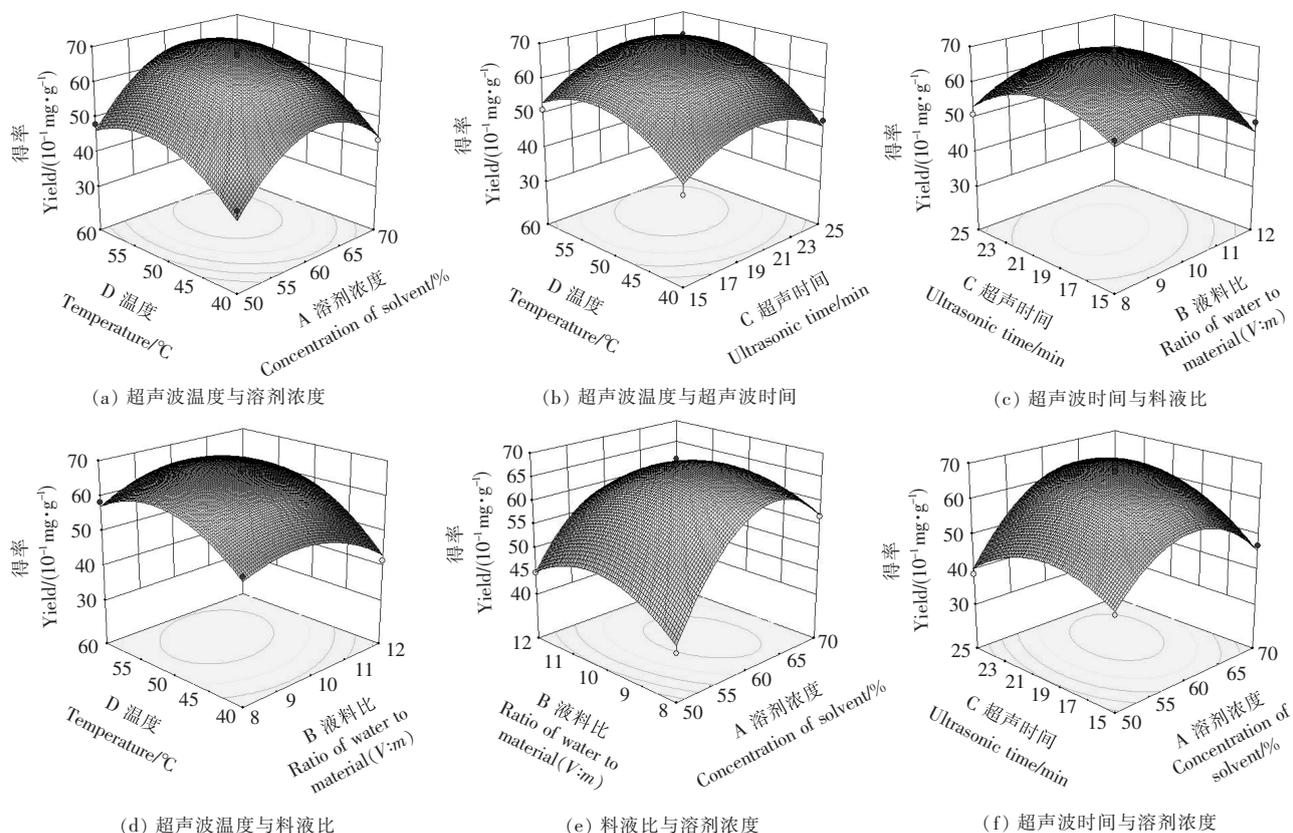


图 5 各因素交互作用对野桂花蜜多酚得率影响的响应面图

Figure 5 Response surface plots for extraction yield of phenolic compounds from wild osmanthus-scented honey in function of the factors

野桂花蜜多酚的平均得率为 68.27 mg/10 g,达到了理论值的 99%,说明采用响应面法优化提取工艺得到的条件参数可靠。

2.2.4 超声波辅助提取法与传统浸提法的比较 由表 4 可知,传统浸提法得到的野桂花蜜多酚的平均得率仅为 52.48 mg/10 g。而超声波辅助提取法提取野桂花蜜多酚的得率比传统浸提法得率高出 23%,而且大大节省了提取时间。

表 4 提取方法对野桂花蜜得率的影响

Table 4 The effects different extraction methods on the yield of wild osmanthus-scented honey ($n=3$)

方法	溶剂浓度/% ($m:V$)	料液比	提取时间/min	提取温度/°C	得率/ ($10^{-1}\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
超声波提取	62	1:10	21	54	68.27
传统浸提法	62	1:10	120	54	52.48

3 结论

通过 Design Expert V8.0.6 软件,以溶剂浓度、料液比、超声波时间、超声波温度为自变量,野桂花蜜多酚的得率为响应值,运用响应面分析法对试验结果进行分析,得到的回归模型拟合度好,误差小,能够用回归模型对试验结果进行分析,有一定的应用价值。优化验证后得到的野桂花蜜多酚提取工艺条件为:溶剂浓度 62%,料液比 1:10($m:V$),超声波时间 21 min,超声波温度 54 °C。野桂花蜜多酚的得率为 68.27 mg/10 g。超声波辅助提取法比传统浸提法的多酚得率高出 23%。野桂花蜜中的多酚化合物的得率,可能会受蜜源地环境影响,如气候和蜜源植物本身状况等,因此有待进行深入研究。

(上接第 77 页)

脂平均空隙率和平均粒径与压降呈非线性反比关系。根据流体分布与流阻的模拟分析与计算,提出了改进离子交换柱内上封头分布器结构及增设一挡板结构的进料系统流体均配优化方案,使系统内流体分布趋于均匀。结构改进后,系统实现出口整体流量标准偏差 STD 由原来的 108.332 1 降至 14.326 9,能够较好地满足生产需求。

参考文献

- 王峰,闫清东,马越,等.基于 CFD 技术的液力减速器性能预测研究[J].系统仿真学报,2007,19(3):1390~1396.
- 王福军.计算流体动力学分析—CFD 软件原理与应用[M].北京:清华大学出版社,2004.
- 高富东,姜乐华,潘存云.基于计算流体动力学的两栖车辆水动力特性数值计算[J].机械工程学报,2009,45(5):134~139.
- 张少坤,尹侠.双层桨搅拌槽内流场的数值模拟[J].食品与机械,2011,27(1):71~73.
- 蔡子金,李军庆,张庆文,等. CFD 在搅拌罐性能研究和生化过程

参考文献

- 聂乾忠,夏延斌,曾晓楠.三种天然抗氧化剂对冷鲜肉保鲜效果研究[J].食品与机械,2012,28(5):155~158.
- 凌关庭.抗氧化食品与健康[M].北京:化学工业出版社,2004:5~12.
- 李爱军,欧仕益,刘红.一种天然抗氧化剂复合物抗氧化作用的研究[J].食品与机械,2001(4):28~30.
- Hao Rui-xia, Zhou Shuai, Yang Yan, et al. Flavone content and bioactivity of aqueous-ethanolic extracts of phellinus fruit bodies [J]. Acta Edulis Fungi, 2008, 15(2): 27~30.
- Aqula S, Giner R M, Recio M C, et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids from cayaponia tayuya roots[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 121(1): 333~337.
- 赖红芳,黄秀香,陆俊宇,等.超声波辅助提取山豆根中的黄酮和多糖工艺优化[J].食品与机械,2014,30(1):196~198,223.
- 杜寅,李奇,丁辉煌.多频超声波辅助提取石榴皮中原花青素的研究[J].粮食与食品工业,2007,14(4):22~24,29.
- 曹增梅,黄和.超声波辅助提取番石榴中多酚类物质的研究[J].食品与机械,2012,28(5):123~126.
- 郭方宁.超声提取技术在现代中药中的应用[J].中草药,2007,38(2):315.
- 王静,韩涛,李丽萍.超声波的生物效应以及在食品中的应用[J].北京农学院学报,2006,21(1):67~72.
- Krystyna Pyrzynska, Magalalena Biesaga. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2009, 28(7): 900~901.
- 金莹,孙爱东.植物多酚的结构及生物学活性的研究[J].中国食物与营养,2005(9):27~29.
- Box G E P, Hunter W G. Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building[M]. New York: John Wiley & Sons, 1978.

放大中的应用[J].食品与机械,2013,29(6):108~112.

- 陈文礼,李惠.基于 RANS 的圆柱风致涡激振动的 CFD 数值模拟[J].西安建筑科技大学学报(自然科学版),2006,38(4):509~513.
- 周宛平.化学分离法[M].北京:北京大学出版社,2008:127.
- 林炳昌.模拟移动床色谱技术[M].北京:化学工业出版社,2008:37~44.
- 吴献东,金晓明,徐志成,等.微粒群算法在模拟移动床色谱分离过程优化中的应用[J].化工自动化及仪表,2006,33(4):5~8.
- 吴献东,金晓明,苏宏业.基于 NSGA-II 的模拟移动床色谱分离过程多目标操作优化[J].化工学报,2007,58(8):2038~2044.
- Kurup A S, Hidajat K, Ray A K. Optimal operation of an industrial-scale Parex process for the recovery of p-xylene from a mixture of C₈ aromatics[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2005, 44(15): 5703~5714.
- Subramani H J, Hidajat K, Ray A K. Optimization of simulated moving bed and varicol process for glucose-fructose separation[J]. Chemical Engineering Research and Design, 2003, 81(5): 549~567.