

# 荸荠皮酚类物质超声波辅助提取工艺优化

## Optimization of ultrasonidy assisted extraction of phenolic compounds from the peel of Chinese water chestnut

詹 歌 李凯凯 孙艳辉 龙 门

ZHAN Ge LI Kai-kai SUN Yan-hui LONG Men

(滁州学院生物与食品工程学院,安徽 滁州 239000)

(School of Biological and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou, Anhui 239000, China)

**摘要:**采用超声波辅助提取荸荠皮中的酚类物质,考察溶剂种类、料液比、提取温度、超声功率及超声时间对酚类物质提取率的影响。在单因素试验的基础上,确定最佳提取溶剂,并利用响应面法优化工艺条件。结果表明,荸荠皮总酚的最佳提取工艺条件为:甲醇提取,料液比 1:15 (g/mL),提取温度 55 ℃,超声功率 270 W,超声时间 55 min,该条件下总酚含量的最大响应值为 4.42 mg/g;荸荠皮总黄酮最佳提取工艺条件为:甲醇提取,料液比 1:20 (g/mL),提取温度 60 ℃,超声功率 240 W,超声时间 55 min,该条件下总黄酮含量的最大响应值为 15.20 mg/g。

**关键词:**荸荠皮;总酚;总黄酮;超声波辅助提取

**Abstract:** The ultrasonic assisted extraction technique was employed to obtain phenolics from CWCP and different factors on the phenolics yield were considered, including the solvent type, ratio of liquid to solid, extracting temperature, ultrasonic power and ultrasonic time. Based on the single factor tests, an appropriate solvent for more consistent extraction of phenolic compounds would be defined, and response surface experiments would be used to optimize the extraction parameters. The results showed that the optimum conditions for total phenolic extraction were determined: ratio of methanol to solid 1:15 (g/mL), extracting at 55 ℃ for 55 min with, ultrasonic power 270 W. Under the control of these conditions, the yield of total phenolic content (TPC) was 4.42 mg/g. The optimum conditions for total flavonoid extraction were shown as ratio of methanol to solid 1:20 (g/mL), extracting temperature 60 ℃, ultrasonic power 240 W and ultrasonic time 55 min and the yield of total flavonoid

content (TFC) was 15.20 mg/g under these conditions.

**Keywords:** Chinese water chestnut; total phenolic content; total flavonoid content; ultrasonically assisted extraction

酚类物质是一类以苯酚为基本骨架并携有多个羟基的芳香环类有机化合物,可分为酚酸类和黄酮类<sup>[1]-3</sup>。其广泛存在于水果、蔬菜、谷物、豆类等植物体内,含量仅次于纤维素、半纤维素和木质素,是植物体内的次生代谢产物。由于酚类物质具有抗肿瘤、抗突变、抗脂质过氧化、抗变态反应、抗氧化、抗病毒及抑制 HIV 复制等多种生物活性,因此被形象地称为“一座有待开发的金矿”<sup>[2-4]</sup>。

提取是研究酚类物质的关键步骤,针对不同植物、不同部位酚类的提取采用的方法有所不同。目前酚类物质的提取物方法中,溶剂提取法和热水提取法等传统方法仍占主导地位,但其能耗大,提取时间长,所需温度高,不利于酚类活性的保护,产品得率低。超声波辅助提取是在原溶剂提取的基础上加以超声波处理的提取过程。超声波可以显著加速传质的过程,容易实现工业化应用<sup>[5-7]</sup>。与传统的提取方式相比,具有提取效率高、污染小等优势。

荸荠皮是荸荠加工及食用后的下脚料,绝大多数被用作农户肥料或以废物的形式丢弃,未能得到合理利用。因此,对荸荠皮进行开发利用,不仅能够解决环境污染问题,而且具有重要的经济意义。荸荠中富含多种酚类物质<sup>[8-9]</sup>,目前关于荸荠皮总黄酮提取的研究较少,仅罗杨合等<sup>[10]</sup>采用正交分析法研究了超声辅助提取荸荠皮总黄酮的工艺条件;高山等<sup>[11]</sup>采用响应面分析法对荸荠皮总黄酮的提取工艺进行了优化,且二者在最优条件下总黄酮提取率均不超过 1.5%,而对荸荠皮总酚提取工艺的研究尚未见报道,本研究拟采用响应面分析法对超声辅助提取荸荠皮中总酚和总黄酮的工艺条件同时进行优化,旨在为其工业化应用提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

荸荠皮:收集于南京童卫路菜市场,50 ℃热风干燥 8 h,

**基金项目:**滁州学院校级规划项目(编号:2016GH05);滁州学院生物与食品工程学院实验室开放课题(编号:SWSP201515KF, SWSP201620KF);安徽省大学生创新创业训练计划项目(编号:201710377069)

**作者简介:**詹歌,男,滁州学院讲师,博士。

**通信作者:**龙门(1987—),女,滁州学院讲师,博士。

E-mail: czxy\_lm@163.com

**收稿日期:**2018-02-07

粉碎后放于干燥的室温环境下备用；  
没食子酸、芦丁、Folin-Ciocalteu，纯度 > 98%，美国 Sigma 公司；  
无水乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯：国产分析纯。  
1.2 仪器与设备  
数显鼓风干燥箱：GZX-9240 MBE 型，上海博迅实业有限公司；  
电子天平：JA1203 型，上海良平仪器仪表有限公司；  
数控超声波清洗器：KQ-3000E 型，江苏昆山超声仪器有限公司；  
予华牌循环水式真空泵：SHZ-D（Ⅲ）型，巩义市英予华仪器厂；  
旋转蒸发器：R-201 型，上海申盛生物有限公司；  
数显恒温水浴锅：HH-L 型，国华电器有限公司；  
紫外分光光度计：UV1800 型，日本 Shimadzu 公司。

1.3 方法

1.3.1 荸荠皮酚类物质的提取 准确称取荸荠皮粉 1 g，按照设定的溶剂种类、料液比、提取温度、超声功率、超声时间提取后，真空抽滤，将滤液用 30% 乙醇定容至适宜体积，备用。  
1.3.2 总酚含量 (total phenolic content, TPC) 测定 采用 Folin-Ciocalteu 法并参考文献[12]修改如下：吸取浓度为 0.17 mg/mL 的没食子酸标准溶液 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中，各加入 0.5 mL Folin-Ciocalteu 试剂和 3 mL 去离子水，再各加 1.0 mol/L 的 NaCO<sub>3</sub> 溶液 2 mL，摇匀后静置 60 min，用去离子水稀释至刻度，于 760 nm 处测定吸光度。以没食子酸浓度为横坐标，吸光值为纵坐标绘制标准曲线(图 1)，并计算回归方程。取供试样品溶液 1 mL 同上法测定，测量结果以毫克没食子酸当量每克荸荠皮表示。

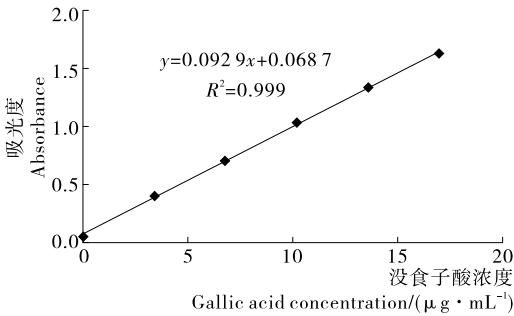


图 1 没食子酸标准曲线

Figure 1 Standard curve of gallic acid solution

1.3.3 总黄酮含量 (total flavonoid content, TFC) 的测定  
采用 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaOH 比色法并参考文献[13]修改如下：精密吸取 0.2 mg/mL 芦丁标准液 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中，各加入 50% 乙醇至 5 mL，精确加入 5% NaNO<sub>2</sub> 0.3 mL，摇匀静置 6 min，再加入 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 0.3 mL，摇匀静置 6 min，最后加入 4% NaOH 溶液 4 mL，用 50% 乙醇定容，摇匀后放置 15 min，于 510 nm 下测吸光值，以芦丁浓度为横坐标，吸光值为纵坐标绘制标准曲线(图 2)，并计算回归方程。取供试样品溶液 1 mL 同上

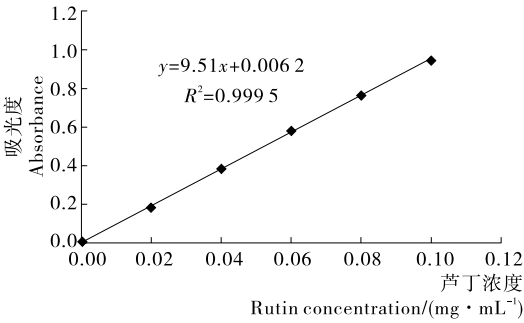


图 2 芦丁标准曲线

Figure 2 Standard curve of rutin solution

法测定，测量结果以毫克芦丁当量每克荸荠皮表示。

1.3.4 单因素试验

(1) 溶剂种类对荸荠皮总酚和总黄酮含量的影响：准确称取 1 g 荸荠皮，按料液比 1：15 (g/mL) 分别加入水、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯 5 种溶剂并在提取温度 50 ℃、超声功率 240 W 作用 40 min。将浸提液过滤定容后测定总酚和总黄酮含量，3 次平行试验取平均值。

(2) 料液比对荸荠皮总酚和总黄酮含量的影响：准确称取 1 g 荸荠皮粉，分别按料液比 1：5, 1：10, 1：15, 1：20, 1：25 (g/mL) 加入甲醇，在提取温度 50 ℃、超声功率 240 W 作用 40 min，将提取液过滤定容后测定总酚和总黄酮含量，3 次平行试验取平均值。

(3) 提取温度对荸荠皮总酚和总黄酮含量的影响：准确称取 1 g 荸荠皮，按总酚提取料液比 1：15 (g/mL)，总黄酮提取料液比 1：20 (g/mL) 加入甲醇，分别在提取温度 40, 45, 50, 55, 60 ℃，超声功率 240 W 作用 40 min，将提取液过滤定容后测定总酚和总黄酮含量，3 次平行试验取平均值。

(4) 超声功率对荸荠皮总酚和总黄酮含量的影响：准确称取 1 g 荸荠皮，按总酚提取料液比 1：15 (g/mL)，总黄酮提取料液比 1：20 (g/mL) 加入甲醇，在提取温度 55 ℃，超声功率分别为 180, 210, 240, 270, 300 W 作用 40 min，将提取液过滤定容后总酚和总黄酮含量，3 次平行试验取平均值。

(5) 超声时间对荸荠皮总酚和总黄酮含量的影响：准确称取 1 g 荸荠皮，在提取温度 55 ℃，总酚提取料液比 1：15 (g/mL)，超声功率 270 W，总黄酮提取料液比 1：20 (g/mL)，超声功率 240 W 的条件下研究超声时间分别为 20, 30, 40, 50, 60 min 对荸荠皮总酚和总黄酮提取效果的影响。最后将提取液过滤定容后测定总酚和总黄酮含量，3 次平行试验取平均值。

1.3.5 响应曲面试验设计 根据单因素试验结果，以总酚含量和总黄酮含量为响应值，以料液比、提取温度、超声功率、超声时间为考察因素进行响应面分析试验，对试验结果进行优化，并加以验证。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 溶剂种类对荸荠皮总酚和总黄酮含量的影响 植物原料组分的溶解性能与溶剂性质有密切相关性。因此选择合适的提取溶剂则更有利于荸荠皮中总酚和总黄酮的提取。

由表 1 可知,不同溶剂提取对荸荠皮总酚和总黄酮的得率有较大的影响。其中甲醇作为提取剂时总酚和总黄酮的含量显著高于其它溶剂,分别达到 $(3.13 \pm 0.09)$ , $(13.21 \pm 0.21)$  mg/g。这主要是甲醇具有较强的扩散作用和渗透功能<sup>[14]</sup>,能够逐渐透过细胞壁进入到细胞内,溶解可溶性的组分。故选用甲醇来提取荸荠皮中的酚类物质。

表 1 溶剂种类对总酚和总黄酮含量的影响<sup>†</sup>

Table 1 Effect of different solvent kinds on TPC and TFC ( $n=3$ ) mg/g

| 溶剂种类 | 总酚                | 总黄酮                |
|------|-------------------|--------------------|
| 水    | $1.83 \pm 0.02^b$ | $2.59 \pm 0.12^e$  |
| 甲醇   | $3.14 \pm 0.10^a$ | $13.54 \pm 0.17^a$ |
| 乙醇   | $1.28 \pm 0.09^c$ | $8.11 \pm 0.11^c$  |
| 丙酮   | $0.72 \pm 0.01^d$ | $8.89 \pm 0.12^b$  |
| 乙酸乙酯 | $0.34 \pm 0.03^e$ | $4.60 \pm 0.16^d$  |

† 同列不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

黄酮类化合物是种类和含量最为丰富的酚类化合物<sup>[1]15-17</sup>,然而在本试验中,分别采用 Folin-Ciocalteu 法和  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  比色法测定同一样品的总酚和总黄酮含量时发现,总酚含量明显低于总黄酮含量,一方面这是 2 种方法本身存在一定的局限性,包括不能排除杂质的干扰,容易过高或过低估计各种化合物  $\lambda_{\max}$  的不同<sup>[15]</sup>;另一方面还可能是荸荠皮中的酚类物质与总酚含量测定的标准品没食子酸的结构差异较大,而与总黄酮含量测定的标准品芦丁的结构更为相似。因此,这 2 种方法并不能对样品中的酚类物质进行精确定量,但却常被用来快速比较不同样品间的总酚和总黄酮含量差异<sup>[16]</sup>。

2.1.2 料液比对荸荠皮总酚和总黄酮含量的影响 由图 3 可知,随着溶剂用量的增大,荸荠皮总酚和总黄酮的含量也逐渐增大,当料液比分别达到 1:15,1:20 (g/mL) 时,总酚和总黄酮含量均达到最大值,分别为 $(3.14 \pm 0.10)$ , $(14.13 \pm 0.29)$  mg/g,之后随溶剂用量继续增大,总酚和总黄酮的含量基本保持不变。说明当酚类和黄酮类物质在溶剂中的溶解量达到饱和状态后,继续增加溶剂用量,并不能显著提高总酚和总黄酮的含量,考虑到溶剂用量和能量消耗等经济成本,确定总酚和总黄酮提取的料液比分别在 1:15,1:20 (g/mL) 左右比较合理。

2.1.3 提取温度对荸荠皮总酚和总黄酮含量的影响 提高

温度是增大原料成分的溶解度,加快溶出速率的有效途径,但过高的温度可能会导致预提取物质分子结构破坏,同时造成大量的溶剂挥发,增加损失。因此选择合适的提取温度能够有效地获取原料中的活性成分。

由图 4 可知,总酚和总黄酮含量随着温度的升高而稳步上升,在 60 ℃ 时均到达最大值。这主要是在提取过程中,温度的升高加快了分子的运动速度,同时也加快了渗透、扩散、溶解的速度,使酚类和黄酮类物质更容易从细胞中转移到溶剂中<sup>[17]</sup>。因此选取提取温度 55 ℃ 为中心点进行响应面试验。

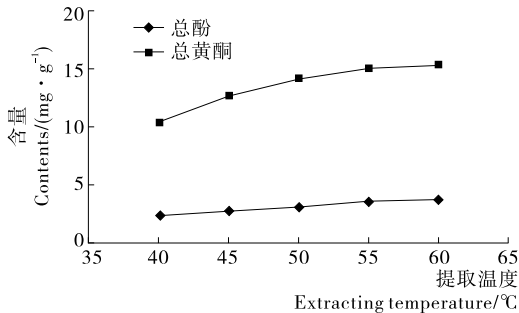


图 4 提取温度对总酚和总黄酮含量的影响

Figure 4 Effect of extracting temperature on TPC and TFC

2.1.4 超声功率对荸荠皮总酚和总黄酮含量的影响 由图 5 可知,当超声功率在 180~270 W 时,总酚含量增长幅度均比较明显。在 270 W 时总酚含量最大,为 $(4.26 \pm 0.10)$  mg/g,之后总酚含量呈下降趋势。总黄酮的提取效果与总酚的提取效果类似,当功率达 240 W 时,总黄酮含量最高达 $(15.03 \pm 0.08)$  mg/g。但随着功率的继续增大,总黄酮含量也开始降低。造成这种现象的原因一方面是高功率超声波空化作用在破坏细胞壁的同时也破坏了酚类和黄酮类物质的分子结构;另一方面是一些醇溶性杂质溶出量增加,与预提物质竞争同甲醇分子的结合。因此,分别选取 270,240 W 作为总酚、总黄酮提取的最佳超声功率。

2.1.5 超声时间对荸荠皮总酚和总黄酮含量的影响 超声时间太短影响提取效果,太长又不利于工业化生产,因此合适的提取时间既可以得到最优的提取效果也可以节约时间及节省能源<sup>[18]</sup>。由图 6 可知,随着超声时间的延长,荸荠皮总酚和总黄酮含量增加,当超声时间为 50 min 时,总酚和总黄酮的含量均达到最高,分别为 $(4.35 \pm 0.08)$ , $(15.42 \pm 0.07)$  mg/g。继续延长超声时间,总黄酮含量几乎保持恒

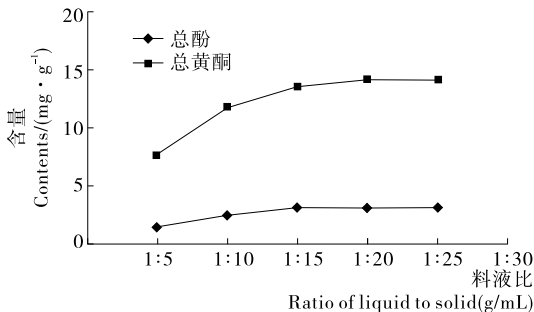


图 3 料液比对总酚和总黄酮含量的影响

Figure 3 Effect of ratio of liquid to solid on TPC and TFC

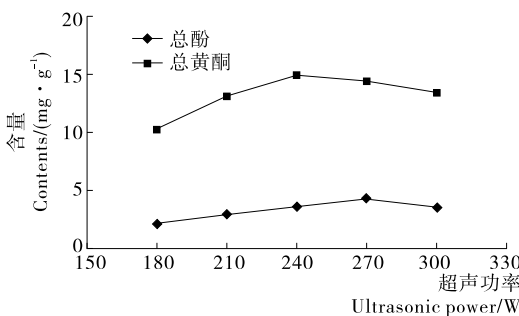


图 5 超声功率对总酚和总黄酮含量的影响

Figure 5 Effect of ultrasonic power on TPC and TFC

定,而总酚却开始下降。理论上讲,提取时间越长,酚类物质提取越充分,但由于其稳定性较差,在超声波振荡的过程中,会与氧气充分接触而被氧化、聚合,从而导致总酚提取效果的减弱。所以取 50 min 为最优的超声时间。

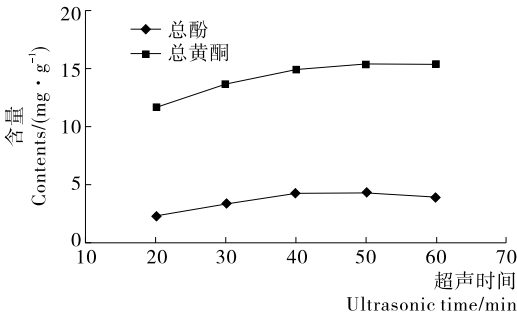


图 6 超声时间对总酚和总黄酮含量的影响

Figure 6 Effect of ultrasonic time on TPC and TFC

表 2 总酚及总黄酮试验设计因素和水平编码值

Table 2 Factors and levels of experiment design of total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC)

| 水平 | X <sub>1</sub> 料液比(g/mL) |        | X <sub>2</sub> 提取温度/℃ |     | X <sub>3</sub> 超声功率/W |     | X <sub>4</sub> 超声时间/min |     |
|----|--------------------------|--------|-----------------------|-----|-----------------------|-----|-------------------------|-----|
|    | 总酚                       | 总黄酮    | 总酚                    | 总黄酮 | 总酚                    | 总黄酮 | 总酚                      | 总黄酮 |
| −1 | 1 : 10                   | 1 : 15 | 50                    | 50  | 240                   | 210 | 40                      | 40  |
| 0  | 1 : 15                   | 1 : 20 | 55                    | 55  | 270                   | 240 | 50                      | 50  |
| 1  | 1 : 20                   | 1 : 25 | 60                    | 60  | 300                   | 270 | 60                      | 60  |

表 3 总酚及总黄酮 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 3 Design and results of Box-Behnken experiment of total phenolic and total flavonoid

| 试验号 | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>4</sub> | 总酚含量/(mg · g <sup>−1</sup> ) | 总黄酮含量/(mg · g <sup>−1</sup> ) |
|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------------------|-------------------------------|
| 1   | −1             | −1             | 0              | 0              | 2.75                         | 14.27                         |
| 2   | 1              | −1             | 0              | 0              | 3.83                         | 14.85                         |
| 3   | −1             | 1              | 0              | 0              | 3.42                         | 15.08                         |
| 4   | 1              | 1              | 0              | 0              | 3.38                         | 15.37                         |
| 5   | 0              | 0              | −1             | −1             | 3.57                         | 13.25                         |
| 6   | 0              | 0              | 1              | −1             | 3.52                         | 14.44                         |
| 7   | 0              | 0              | −1             | 1              | 4.07                         | 13.58                         |
| 8   | 0              | 0              | 1              | 1              | 3.79                         | 14.49                         |
| 9   | −1             | 0              | 0              | −1             | 3.33                         | 14.53                         |
| 10  | 1              | 0              | 0              | −1             | 3.47                         | 14.76                         |
| 11  | −1             | 0              | 0              | 1              | 3.04                         | 15.02                         |
| 12  | 1              | 0              | 0              | 1              | 4.01                         | 15.27                         |
| 13  | 0              | −1             | −1             | 0              | 3.56                         | 13.30                         |
| 14  | 0              | 1              | −1             | 0              | 3.84                         | 13.64                         |
| 15  | 0              | −1             | 1              | 0              | 3.12                         | 13.15                         |
| 16  | 0              | 1              | 1              | 0              | 3.38                         | 14.42                         |
| 17  | −1             | 0              | −1             | 0              | 3.28                         | 13.46                         |
| 18  | 1              | 0              | −1             | 0              | 3.32                         | 13.35                         |
| 19  | −1             | 0              | 1              | 0              | 2.76                         | 13.86                         |
| 20  | 1              | 0              | 1              | 0              | 3.76                         | 14.46                         |
| 21  | 0              | −1             | 0              | −1             | 3.43                         | 14.13                         |
| 22  | 0              | 1              | 0              | −1             | 3.21                         | 15.26                         |
| 23  | 0              | −1             | 0              | 1              | 3.18                         | 15.23                         |
| 24  | 0              | 1              | 0              | 1              | 4.16                         | 14.81                         |
| 25  | 0              | 0              | 0              | 0              | 4.25                         | 15.48                         |
| 26  | 0              | 0              | 0              | 0              | 4.54                         | 15.42                         |
| 27  | 0              | 0              | 0              | 0              | 4.41                         | 15.22                         |
| 28  | 0              | 0              | 0              | 0              | 4.28                         | 15.24                         |
| 29  | 0              | 0              | 0              | 0              | 4.34                         | 15.36                         |

2.2 响应面法试验分析

2.2.1 模型建立与显著性检验 在单因素试验的基础之上,采用响应面法设计优化荸荠皮总酚及总黄酮提取工艺,试验因素及水平取值见表 2,响应面试验设计与结果见表 3。

运用 Design Expert 8.0 统计软件对表 3 的试验数据进行多元回归拟合,获得 TPC(Y<sub>1</sub>)与 TFC(Y<sub>2</sub>)与 4 个因素的二次多项式回归模型分别为:

$$Y_1 = 4.36 + 0.27X_1 + 0.13X_2 - 0.11X_3 + 0.14X_4 - 0.28X_1X_2 + 0.24X_1X_3 + 0.21X_1X_4 - 5.000E-003X_2X_3 + 0.3X_2X_4 - 0.058X_3X_4 - 0.6X_1^2 - 0.49X_2^2 - 0.4X_3^2 - 0.3X_4^2, \tag{1}$$

$$Y_2 = 15.36 + 0.15X_1 + 0.31X_2 + 0.35X_3 + 0.17X_4 - 0.073X_1X_2 + 0.18X_1X_3 + 5.000E-003X_1X_4 + 0.24X_2X_3 - 0.39X_2X_4 - 0.07X_3X_4 - 0.23X_1^2 - 0.32X_2^2 - 1.33X_3^2 - 0.17X_4^2. \tag{2}$$

由总酚(表 4)和总黄酮(表 5)回归模型的方差分析可看出,2 个模型的 P 值均小于 0.000 1,说明各响应值对该模型的影响是极显著的,具有统计学意义;且失拟项均不显著( $P>0.05$ ),说明该回归方程与试验拟合程度较好,可以用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析;决定系数  $R^2$  分别为 0.952 2,0.963 6,表明 TPC 和 TFC 与 4 个自变量之间的多元回归关系显著且试验误差较小,因此可分别对总

酚和总黄酮提取工艺进行分析和预测。

由表 4 可知,一次项  $X_1$ 、 $X_4$ ,交互项  $X_1X_2$ 、 $X_1X_3$ 、 $X_2X_4$ ,二次项  $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$ 、 $X_4^2$ 对 TPC 的影响极显著,一次项  $X_2$ 、 $X_3$ ,交互项  $X_1X_4$ 对 TPC 的影响显著,表明各影响因素对 TPC 的影响不是简单的线性关系。根据  $F$  值检验和概率  $P$  值可以看出,影响因子的主效应顺序为:料液比>超声时间>提取温度>超声功率。同理由表 5 可知,一次项  $X_2$ 、 $X_3$ ,交互项  $X_2X_4$ ,二次项  $X_2^2$ 、 $X_3^2$ 对

表 4 总酚回归模型的方差分析<sup>†</sup>  
Table 4 Variance analysis of regression model of total phenolic

| 方差来源     | 平方和       | 自由度 | 均方        | $F$ 值     | P 值         |
|----------|-----------|-----|-----------|-----------|-------------|
| 模型       | 6.26      | 14  | 0.45      | 19.92     | <0.000 1 ** |
| $X_1$    | 0.85      | 1   | 0.85      | 37.79     | <0.000 1 ** |
| $X_2$    | 0.19      | 1   | 0.19      | 8.58      | 0.011 0 *   |
| $X_3$    | 0.14      | 1   | 0.14      | 6.37      | 0.024 3 *   |
| $X_4$    | 0.25      | 1   | 0.25      | 10.99     | 0.005 1 **  |
| $X_1X_2$ | 0.31      | 1   | 0.31      | 13.97     | 0.002 2 **  |
| $X_1X_3$ | 0.23      | 1   | 0.23      | 10.27     | 0.006 4 **  |
| $X_1X_4$ | 0.17      | 1   | 0.17      | 7.67      | 0.015 0 *   |
| $X_2X_3$ | 1.00E-004 | 1   | 1.00E-004 | 4.46E-003 | 0.947 7     |
| $X_2X_4$ | 0.36      | 1   | 0.36      | 16.04     | 0.001 3 **  |
| $X_3X_4$ | 0.013     | 1   | 0.013     | 0.59      | 0.455 4     |
| $X_1^2$  | 2.37      | 1   | 2.37      | 105.47    | <0.000 1 ** |
| $X_2^2$  | 1.56      | 1   | 1.56      | 69.49     | <0.000 1 ** |
| $X_3^2$  | 1.05      | 1   | 1.05      | 46.61     | <0.000 1 ** |
| $X_4^2$  | 0.59      | 1   | 0.59      | 26.07     | 0.000 2 **  |
| 残差       | 0.31      | 14  | 0.022     |           |             |
| 失拟       | 0.26      | 10  | 0.026     | 1.94      | 0.273 6     |
| 纯误差      | 0.054     | 4   | 0.013     |           |             |
| 总和       | 6.57      | 28  |           |           |             |

† \* 表示差异显著( $P<0.05$ ), \*\* 表示差异极显著( $P<0.01$ )。

表 5 总黄酮回归模型的方差分析<sup>†</sup>  
Table 5 Variance analysis of regression model of total flavonoid

| 方差来源     | 平方和       | 自由度 | 均方        | $F$ 值     | P 值         |
|----------|-----------|-----|-----------|-----------|-------------|
| 模型       | 15.91     | 14  | 1.14      | 26.48     | <0.000 1 ** |
| $X_1$    | 0.28      | 1   | 0.28      | 6.57      | 0.022 5 *   |
| $X_2$    | 1.12      | 1   | 1.12      | 26.15     | 0.000 2 **  |
| $X_3$    | 1.51      | 1   | 1.51      | 35.23     | <0.000 1 ** |
| $X_4$    | 0.34      | 1   | 0.34      | 8.00      | 0.013 4 *   |
| $X_1X_2$ | 0.021     | 1   | 0.021     | 0.49      | 0.495 5     |
| $X_1X_3$ | 0.13      | 1   | 0.13      | 2.94      | 0.108 7     |
| $X_1X_4$ | 1.00E-004 | 1   | 1.00E-004 | 2.33E-003 | 0.962 2     |
| $X_2X_3$ | 0.23      | 1   | 0.23      | 5.26      | 0.037 9 *   |
| $X_2X_4$ | 0.60      | 1   | 0.60      | 13.99     | 0.002 2 **  |
| $X_3X_4$ | 0.020     | 1   | 0.020     | 0.46      | 0.510 2     |
| $X_1^2$  | 0.34      | 1   | 0.34      | 7.81      | 0.014 3 *   |
| $X_2^2$  | 0.67      | 1   | 0.67      | 15.58     | 0.001 5 **  |
| $X_3^2$  | 11.56     | 1   | 11.56     | 269.23    | <0.000 1 ** |
| $X_4^2$  | 0.18      | 1   | 0.18      | 4.17      | 0.060 5     |
| 残差       | 0.60      | 14  | 0.043     |           |             |
| 失拟       | 0.54      | 10  | 0.054     | 3.83      | 0.103 9     |
| 纯误差      | 0.057     | 4   | 0.014     |           |             |
| 总和       | 16.51     | 28  |           |           |             |

† \* 表示差异显著( $P<0.05$ ), \*\* 表示差异极显著( $P<0.01$ )。

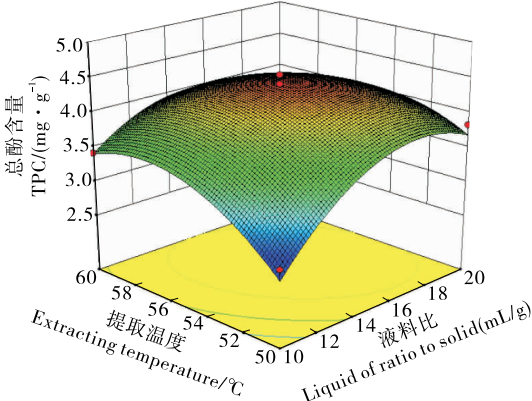
TFC 的影响极显著,一次项  $X_1$ 、 $X_4$ ,交互项  $X_2X_3$ ,二次项  $X_1^2$  对 TFC 的影响显著,在各因素所选的范围内,影响 TFC 的主要因素顺序为:超声功率>提取温度>超声时间>料液比。

2.2.2 因素交互作用 由图 7 可知,当提取温度较低时,随着溶剂用量的增大,TPC 逐渐增大并趋于平缓;而当提取温度较高时,TPC 随料液比的增大呈先增大后减小的趋势;溶剂用量较少,提取时随着提取温度的升高,TPC 逐渐增加并趋于平缓;而溶剂用量较多提取时,若提高温度,则 TPC 呈先增大后减小的趋势。由于等高线图趋近于椭圆且长轴与

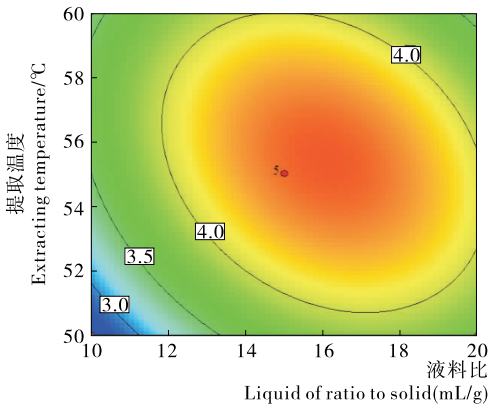
横坐标轴的顺时针夹角为钝角,同时其响应面坡度较为陡峭,说明二者之间具有较强的拮抗作用。

由图 8 的等高线图可以看出,在液料比和超声功率处于较低水平时,等高线比较平缓,2 因素的变化对增大 TPC 的作用不明显;而在较高水平时,TPC 随着 2 因素水平的提高呈先增大后减小的趋势。此外,长轴与横坐标轴夹角与图 7 相反则说明二者之间具有明显的协同作用,这与回归方程中  $X_1X_3$  的系数为正号相符合。

图 9 倾斜趋势与图 8 相似,故可知液料比与超声时间也



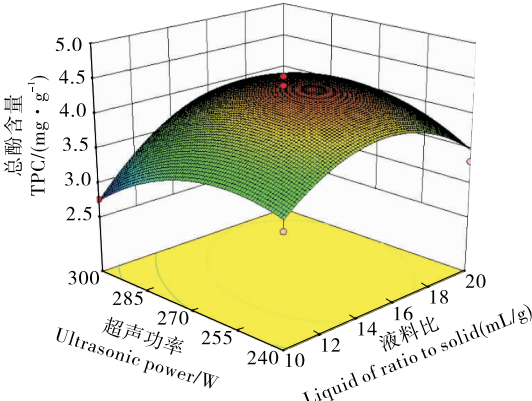
(a) 响应面图



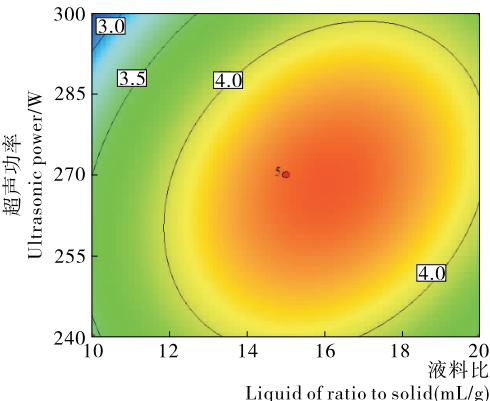
(b) 等高线图

图 7 液料比和提取温度交互作用对总酚含量的影响

Figure 7 Liquid of ratio to solid and extracting temperature on the impact of interaction on TPC



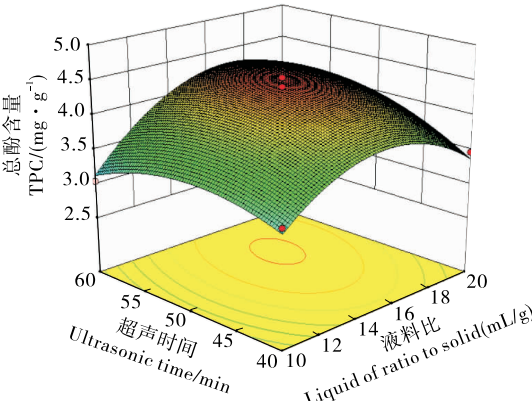
(a) 响应面图



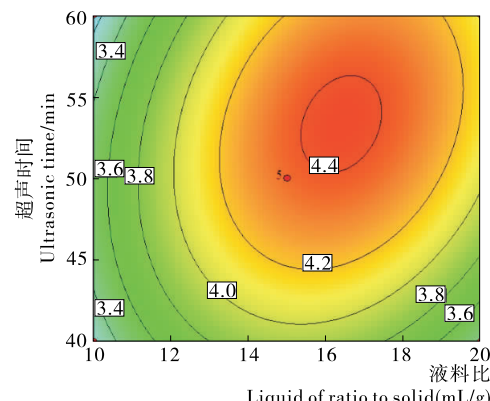
(b) 等高线图

图 8 液料比和超声功率交互作用对总酚含量的影响

Figure 8 Liquid of ratio to solid and ultrasonic power on the impact of interaction on TPC



(a) 响应面图



(b) 等高线图

图 9 液料比和超声时间交互作用对总酚含量的影响

Figure 9 Liquid of ratio to solid and ultrasonic time on the impact of interaction on TPC



具有相互促进的交互作用。但图 9 等高线图中的椭圆长轴与横坐标轴的夹角更小且椭圆长短轴比例较低,故二者交互作用显著性小于液料比与超声功率。这与表 4 中  $P_{X1X4} > P_{X1X3}$  的结论一致。

图 10 是提取温度与超声时间的交互作用图,其等高线与图 9 相似且响应曲面坡度更为陡峭,由此可得出这 2 个因素相互促进,且交互作用最强。

图 11 为提取温度与超声功率对 TFC 交互作用的响应面及等高线图,从图 11 可看出,提取温度较低时,TFC 随超声功率的增大呈先增大后减小的趋势,在较高的提取温度水平条件下,随超声功率的增大,TFC 呈先增大后减小的趋势。在超声功率所选范围内,TFC 均随着提取温度的升高逐渐增大最后趋于平缓。按照上述方法进行分析可知提取温度与超声功率具有协同作用。

从图 12 上看,当提取温度处于较低水平时,TFC 受超声时间的改变影响较大,而当提高提取温度时,超声时间的延长对 TFC 变化的影响降低,这说明二者之间具有相互抑制的作用,同时从椭圆长轴与横坐标轴的顺时针夹角  $> 90^\circ$  也印证了此结论。

2.2.3 工艺优化及验证 为确定总酚和总黄酮提取的最优工艺参数,对回归模型进行逐步回归,然后求一阶偏导,并令

其为零,得到总酚提取的最优工艺参数为:料液比 1 : 16.14 (g/mL)、提取温度 55.97  $^\circ\text{C}$ 、超声功率 267.03 W、超声时间 54.24 min,预计 TPC 为 4.44 mg/g;得到总黄酮提取的最优工艺参数为:料液比 1 : 21.45 (g/mL)、提取温度 59.29  $^\circ\text{C}$ 、超声功率 247.28 W、超声时间 54.59 min,预计 TFC 为 15.51 mg/g。为了考察预测结果的可靠性,应在最优工艺条件下进行验证实验,但考虑到仪器功能的限制及操作简便,故调整总酚提取的最优工艺参数为:料液比 1 : 15 (g/mL)、提取温度 55  $^\circ\text{C}$ 、超声功率 270 W、超声时间 55 min;调整总黄酮提取的最优工艺参数为:料液比 1 : 20 (g/mL)、提取温度 60  $^\circ\text{C}$ 、超声功率 240 W、超声时间 55 min。结果显示 TPC 和 TFC 的测定值分别为  $(4.42 \pm 0.06)$ 、 $(15.20 \pm 0.11)$  mg/g,通过方差分析表明,实测值与预测值差异不显著 ( $P < 0.05$ ),故本研究所得模型可靠有效。

3 结论

本试验采用四因素三水平响应面分析法对荸荠皮总酚和总黄酮的超声波辅助提取工艺进行优化,得到总酚提取的最优工艺参数为料液比 1 : 15 (g/mL),提取温度 55  $^\circ\text{C}$ ,超声功率 270 W,超声时间 55 min,此条件下总酚含量的最大响应值为 4.42 mg/g;得到总黄酮提取的最优工艺参数为料

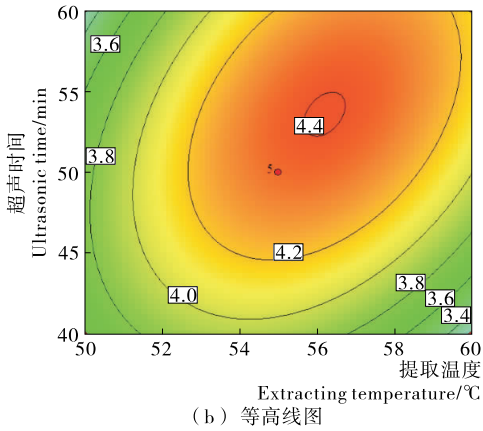
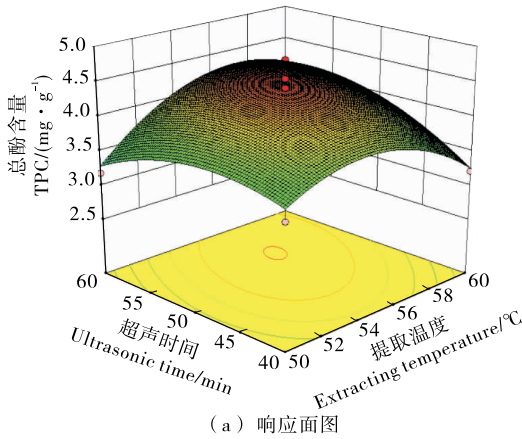


图 10 提取温度和超声时间交互作用对总酚含量的影响

Figure 10 Extracting temperature and ultrasonic time on the impact of interaction on TPC

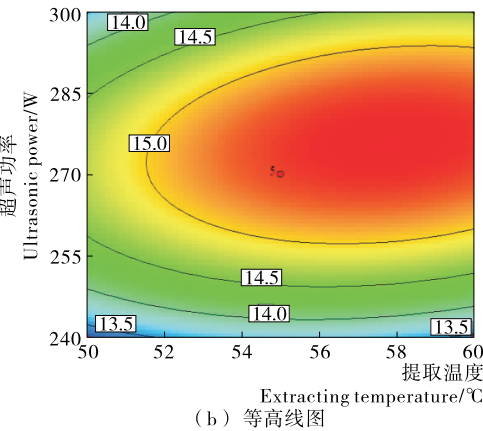
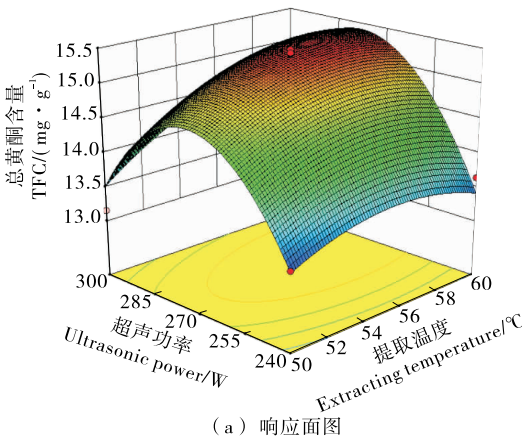


图 11 提取温度和超声功率交互作用对总黄酮含量的影响

Figure 11 Extracting temperature and ultrasonic power on the impact of interaction on TFC

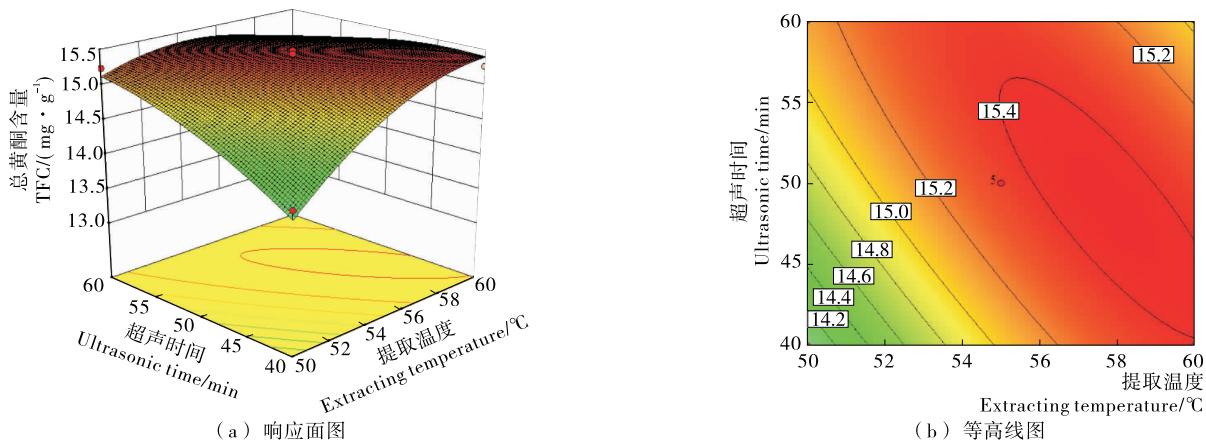


图 12 提取温度和超声时间交互作用对总黄酮含量的影响  
Figure 12 Extracting temperature and ultrasonic time on the impact of interaction on TFC

液比 1 : 20 (g/mL),提取温度 60 ℃,超声功率 240 W,超声时间 55 min,此条件下总黄酮含量的最大响应值为 15.20 mg/g,与先前的研究<sup>[10]</sup>相比,总黄酮的提取率提高了 21.6%,可能是本试验把超声功率作为影响因素进行考察,而超声功率是影响荸荠皮总黄酮超声辅助提取的最主要因素。

本试验是以废弃荸荠皮为原料,旨在变废为宝,为高效开发利用荸荠皮资源提供参考。但如何从实验室放大到工业化应用,如何在同等效率下有效降低成本将成为下一步研究的重点。

参考文献

[1] 王雪. 富含黄酮类蜂胶源植物的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2015.

[2] 张东明. 酚酸化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 1-2.

[3] MAGALHÃES S C, TAVEIRA M, CABRITA A R, et al. European marketable grain legume seeds; Further insight into phenolic compounds profiles [J]. Food Chemistry, 2017, 215: 177-184.

[4] TIAN Y, LIIMATAINEN J, ALANNE A L, et al. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants[J]. Food Chemistry, 2017, 220: 266-281.

[5] 黄大川, 华伟伟. 超声波辅助提取湘玉竹多糖工艺优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 171-175.

[6] ZUO Yue-gang, ZHANG Kai, WU Jing-ping, et al. An accurate and nondestructive GC method for determination of cocaine on US paper currency[J]. Journal of Separation Science, 2008, 31(13): 2 444-2 450.

[7] JIAO Yue, ZUO Yue-gang. Ultrasonic extraction and HPLC determination of anthraquinones, aloe-emodine, emodine, rheine, chrysophanol and physcione, in roots of polygoni multiflori[J]. Phytochemical Analysis, 2009, 20(4): 272-278.

[8] ZHAN Ge, PAN Lei-qing, TU Kang, et al. Antitumor, antioxidant, and nitrite scavenging effects of Chinese water chestnut (Eleocharis dulcis) peel flavonoids[J]. Journal of Food Science, 2016, 81(10): H2 578-H2 586.

[9] LI Yi-xiao, PAN Yong-gui, HE Feng-ping, et al. Pathway analysis and metabolites identification by metabolomics of etiolation substrate from fresh-cut chinese water chestnut (Eleocharis tuberosa)[J]. Molecules, 2016, 21(12): 1 648.

[10] 罗杨合, 韦学丰. 超声辅助提取马蹄皮总黄酮的工艺研究[J]. 广西农业科学, 2009, 40(4): 351-354.

[11] 高山, 胡平, 龙世平. 响应面法优化荸荠皮总黄酮的提取工艺[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(12): 41-44.

[12] SINGLETON V L, ROSSI J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1965, 16(3): 144-158.

[13] SAKANAKA S, TACHIBANA Y, OKADA Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha) [J]. Food Chemistry, 2005, 89(4): 569-575.

[14] KARAMAN I, ŞAHİN F, GÜLLÜCE M, et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of Juniperus oxycedrus L[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 85(2/3): 231-235.

[15] ORNELAS-PAZ J D J, YAHIA E M, RAMÍREZ-BUSTAMANTE N, et al. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (Fragaria x ananassa Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening[J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 372-381.

[16] FERREYRA R M, VIÑA S Z, MUGRIDGE A, et al. Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 112(1): 27-32.

[17] 吴兰兰, 汤凤霞, 何传波, 等. 超声波辅助提取龙眼核色素的研究[J]. 云南民族大学学报, 2009, 18(4): 336-339.

[18] 王敏, 陆兆新, 吕凤霞, 等. 响应曲面法优化酶法提取银杏叶总黄酮[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 117-121.