

## 响应面优化化香树果序中鞣花酸超声波提取的研究



ZHANG Liang-liang

张亮亮<sup>1,2</sup>, 徐曼<sup>1</sup>, 汪咏梅<sup>1,2</sup>, 吴冬梅<sup>1,2</sup>, 陈笏鸿<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院林产化学工业研究所; 生物质化学利用国家工程实验室; 国家林业局林产化学工程重点开放性实验室; 江苏省生物质能源与材料重点实验室, 江苏南京 210042;  
2. 中国林业科学研究院林业新技术研究所, 北京 100091)

**摘要:** 在单因素试验的基础上, 利用响应面分析方法优化了化香树果序中鞣花酸的超声波提取条件。利用中心组合设计研究液固比、超声波作用时间、超声波提取温度 3 个自变量对响应值鞣花酸得率的影响。用 Design-Expert 7.0 软件进行结果分析, 鞣花酸最佳超声波提取工艺条件为: 液固比 22.5:1 (mL:g), 超声波提取时间 40 min, 超声波提取温度 70 ℃, 浸提次数 2 次, 在此条件下鞣花酸得率为 1.961 %。

**关键词:** 化香树; 鞣花酸; 响应面法; 提取; 超声波

中图分类号: TQ351

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2011)02-0019-06

## Optimization of Ultrasonic Extraction Conditions of Ellagic Acid from Inflorescence of *Platycarya strobilacea* Using Response Surface Method

ZHANG Liang-liang<sup>1,2</sup>, XU Man<sup>1</sup>, WANG Yong-mei<sup>1,2</sup>, WU Dong-mei<sup>1,2</sup>, CHEN Jia-hong<sup>1</sup>

(1. Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass Chemical Utilization; Key and Open Lab. on Forest Chemical Engineering, SFA; Key Lab. of Biomass Energy and Material, Jiangsu Province, Nanjing 210042, China; 2. Institute of New Technology of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

**Abstract:** On the basis of the single factor experiments, the optimum conditions for the ultrasonic extraction of ellagic acid from inflorescence of *Platycarya strobilacea* were determined using response surface method (RSM). A central composite design was used to investigate the effects of three independent variables on the yield of ellagic acid, namely liquid to solid ratio, ultrasonic extraction time and ultrasonic extraction temperature on the response. Data were analyzed using Design-Expert 7.0 software. The optimum ultrasonic extraction conditions were: liquid to solid ratio 22.5:1 (mL:g), ultrasonic extraction time 40 min, ultrasonic extraction temperature 70 ℃, extracting twice. Under the optimum conditions, the extraction yield of ellagic acid was 1.961 %.

**Key words:** *Platycarya strobilacea*; ellagic acid; response surface method; extraction; ultrasonic

化香树 (*Platycarya strobilacea* Sieb. et Zucc.) 属于胡桃科化香树属。化香树果序是化香树的干燥果序, 具有清热解毒、活血化瘀、消肿排脓、通窍止痛的功效<sup>[1]</sup>。鞣花酸是一种植物多酚类化合物, 为化香树果序中主要活性成分之一, 广泛存在于自然界的果实中。它对化学物质诱导癌变及其他多种癌变有明显的抑制作用, 它能与人体内有害自由基结合, 具有强力抗癌变功效, 可以抗衰老、增加机体免疫力, 还具有降压、镇静作用, 对多种细菌、病毒有很好的抑制作用<sup>[2-3]</sup>。因此鞣花酸有“克癌之星”、“致癌物清除剂”之美称。从机理上讲, 鞣花酸是一种抗氧化剂<sup>[4]</sup>, 它可作为保健食品添加剂, 研究开发本品具

收稿日期: 2010-08-11

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2010127); 中国林科院林业新技术所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (CAFINT2009C04)

作者简介: 张亮亮 (1981-), 男, 江苏沐阳人, 助理研究员, 博士, 主要从事植物化学研究; E-mail: zhll20086@gmail.com

\* 通讯作者: 陈笏鸿, 研究员, 主要从事植物资源化学利用研究; E-mail: chen-jiahong@163.com。

有较高的经济价值和广泛的应用范围。目前未见有关化香树果序中鞣花酸物质提取的报道。近年来,超声波提取方法由于操作简单快捷、提取温度低、提取得率高、提取物的结构不被破坏等特点,尤其在热敏性成分的提取中更显出明显的优势,已广泛用于天然植物的有效成分提取<sup>[5-7]</sup>。对化香树果序中鞣花酸物质的超声波提取工艺进行研究受到许多因素的影响,各因素还存在着交互作用。因此,为了考察各因素对鞣花酸提取影响的变化规律及交互作用,得出最大的鞣花酸浸提率,采用超声波提取方法通过单因素试验和响应面分析优化(response surface methodology, RSM)试验对液固比、超声波作用时间和超声波提取温度进行研究,并对其含量进行测定。以期获得化香树果序中鞣花酸超声波提取的优化工艺,并分析各因素的变化规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

原料:化香树果序,采集于安徽六安,阴干粉碎后过0.25 mm筛置于恒温干燥皿中备用。

试剂:鞣花酸标准样品,购于中国药品生物制品鉴定所;无水乙醇、三氟乙酸(TFA)为分析纯;乙腈为色谱纯。

仪器:KH-200DB型数控超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司;岛津20AB高效液相色谱仪,日本岛津;Inertex C18色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Sciencelab, 中国)。

### 1.2 鞣花酸的提取及测定

称取0.5 g化香树果序粉末样品放入具塞三角瓶中按照一定的液固比加入甲醇溶液,超声波提取一段时间后,趁热过滤。重复提取后合并滤液,用甲醇溶液定容至100 mL。取1.0 mL提取液经微孔滤膜过滤后进行HPLC分析,以鞣花酸对照品作为外标测定提取液中鞣花酸含量。

### 1.3 色谱条件

流动相为水(A,含0.1% TFA)和乙腈(B)。采用梯度洗脱:0~8 min 7% B, 8~25 min 7%~32% B, 25~30 min 32%~35% B, 30~35 min 35% B。流动速率1 mL/min,进样量20 μL,检测波长357 nm。

### 1.4 试验设计

**1.4.1 单因素试验** 试验对提取次数、液固比、超声波作用时间、超声波温度进行单因素探索试验,分别考察这4个因素对鞣花酸得率的影响。

**1.4.2 响应面法中心组合设计** 为了分析各因素之间的交互作用对结果的影响,分析参数影响因素,得到最佳的提取工艺,在单因素试验结果的基础上,提取次数确定为2次,采用中心组合设计,以化香树果序中鞣花酸的提取得率为考察目标,分别以液固比、超声波作用时间、提取温度对应3个独立变量 $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$ ,中心点处处理6次,其他处理1次。试验因素水平编码见表1。

表1 中心组合设计因素水平表

Table 1 Central composite design factors levels table

水平 levels	$x_1$ 液固比(mL:g) liquid to solid ratio	$x_2$ 超声波作用时间/min ultrasonic extraction time	$x_3$ 提取温度/℃ extraction temp.
-1.682	11.59:1	13.18	43.18
-1	15:1	20	50
0	20:1	30	60
1	25:1	40	70
1.682	28.41:1	46.82	76.82

## 2 结果与讨论

### 2.1 化香树果序提取液的HPLC色谱分析

化香树果序甲醇提取液的HPLC色谱图见图1。经鞣花酸标准品对照分析,鉴定出甲醇提取液色

谱图中色谱峰 A 为鞣花酸化合物。将该色谱峰面积数值代入事先由鞣花酸标准品制作的标准曲线中可得到提取液中鞣花酸的含量。

## 2.2 单因素试验

**2.2.1 提取次数的影响** 在液固比为 25:1 (mL:g), 超声波作用时间为 30 min, 超声波提取温度为 60 °C 的情况下。共提取 4 次, 提取次数对提取得率的影响见表 2。

试验结果表明:化香树果序中鞣花酸的提取得率随着提取次数的增加而增大, 提取 2 次后变化较缓慢。这说明当提取次数达到一定程度, 有效成分基本提取完全, 此时继续增加提取次数已无明显效果。所以, 以后的提取试验均采用 2 次提取。

**2.2.2 液固比的影响** 超声波作用时间 30 min, 超声波温度为 60 °C, 液固比对得率的影响亦见表 2。由表 2 可知:液固比在 10:1~25:1 范围内, 随着液固比的加大, 提取液中鞣花酸的得率也随着增大。而液固比在 25:1 后提取液中鞣花酸的得率却大幅降低。这可能是物料与溶剂之间扩散已经达到平衡, 再继续增加溶剂量已不能提取出更多的鞣花酸。所以液固比考察范围定为 15:1~25:1。

**2.2.3 超声波作用时间的影响** 液固比为 25:1, 超声波温度为 60 °C, 超声波作用时间对得率的影响同样见表 2。

由表 2 可知:10~30 min 内随着超声波作用时间的延长提取物中鞣花酸的得率增加, 但继续延长提取时间到 50 min 提取物中鞣花酸的得率不升反降, 原因可能是延长提取时间的同时也延长了鞣花酸在空气中的氧化时间, 两者作用的最终结果使鞣花酸得率减少。综合考虑超声波作用时间考察范围定为 20~40 min。

**2.2.4 超声波温度的影响** 液固比为 25:1, 超声波作用时间为 30 min, 超声波提取温度对得率的影响也列入表 2。

由表 2 可知:随着提取温度的增加, 提取液中鞣花酸在 60 °C 以前的提取得率一直处于上升阶段, 60 °C 以后提取得率逐渐下降。提取温度在 60 °C 左右时接近鞣花酸得率最大。综合考虑超声波提取温度考察范围定为 50~70 °C。

## 2.3 响应面试验方案及结果

**2.3.1 试验方案及结果分析** 试验方案及结果分析见表 3。

**2.3.2 鞣花酸得率的方差分析** 通过 Design-Expert 7.0 数据分析软件对试验结果进行分析, 方差分析见表 4。

由表 4 可知:在一次项中, 液固比、超声波作用时间及超声波温度对鞣花酸提取得率影响均达到显著性水平 ( $p < 0.05$ ), 其中液固比和超声波温度对鞣花酸提取得率影响最大 ( $p < 0.001$ ), 达到极其显著

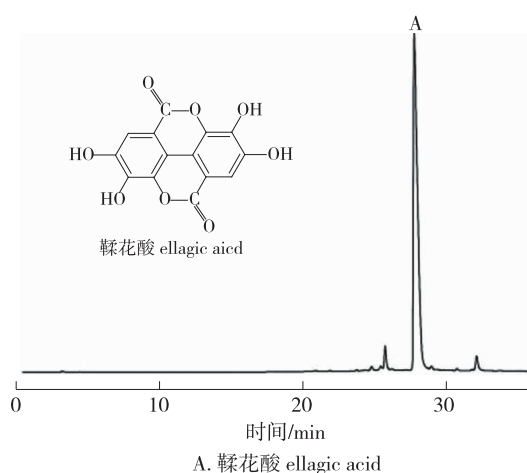


图 1 化香树果序甲醇提取液的 HPLC 色谱图  
Fig. 1 HPLC chromatogram of methanol extract of the infructescence of *P. strobilacea*

表 2 提取条件对化香树果序中鞣花酸提取得率的影响

Table 2 Effects of extraction conditions on extraction yield of ellagic acid from infructescence of *P. strobilacea*

提取条件 extraction conditions		提取得率/% extraction yield
提取次数 extraction times	1	1.52
	2	2.04
	3	2.11
	4	2.17
液固比 (mL:g) liquid to solid ratio	10:1	1.47
	15:1	1.69
	20:1	1.52
	25:1	1.86
	30:1	1.35
	35:1	1.52
提取时间/min extraction time	10	1.46
	20	1.88
	30	1.92
	40	1.90
	50	1.71
	60	1.38
提取温度/°C extraction temp.	50	1.76
	60	1.86
	70	1.83
	80	1.75

水平。在二次项中,液固比和超声波温度达到了显著性水平( $p < 0.05$ ),其中液固比达到了极显著水平( $p < 0.001$ )。在交互项中,没有发现显著性水平。由于各因素对化香树果序中鞣花酸提取率的影响不是简单的线性关系,为了更明确各因子的影响,采用 Design-Expert 7.0 软件对鞣花酸提取率进行多元回归分析,得到如下回归方程:

$$Y = 1.61 + 0.27x_1 + 0.095x_2 + 0.40x_3 + 0.073x_1x_2 + 0.061x_1x_3 - 0.065x_2x_3 - 0.27x_1^2 - 0.046x_2^2 - 0.11x_3^2$$

表3 试验方案及结果分析

Table 3 Analysis and results of tests

试验号 No.	$x_1$ 液固比(mL:g) liquid to solid ratio	$x_2$ 超声波作用时间/min ultrasonic extraction time	$x_3$ 超声波温度/°C ultrasonic extraction temp.	鞣花酸得率/% ellagic acid yield
1	15:1	20	50	0.476
2	25:1	20	50	0.883
3	15:1	40	50	0.614
4	25:1	40	50	1.081
5	15:1	20	70	1.456
6	25:1	20	70	1.877
7	15:1	40	70	1.104
8	25:1	40	70	2.046
9	11.59:1	30	60	0.415
10	28.41:1	30	60	1.252
11	20:1	13.18	60	1.125
12	20:1	46.82	60	1.803
13	20:1	30	43.18	0.695
14	20:1	30	76.82	1.896
15	20:1	30	60	1.635
16	20:1	30	60	1.599
17	20:1	30	60	1.580
18	20:1	30	60	1.590
19	20:1	30	60	1.612
20	20:1	30	60	1.625

表4 回归模型的方差分析

Table 4 Variance analysis of items in regression equation

方差分析 variance analysis	自由度 df	回归系数 regression coefficient	总偏差平方和 sum of squares	平均偏差平方和 mean square	F 值 F value	p 值 p value
$x_1$	1	0.27	0.97	0.97	60.65	0.0000
$x_2$	1	0.095	0.12	0.12	7.64	0.0200
$x_3$	1	0.40	2.17	2.17	135.55	0.0000
$x_1x_2$	1	0.073	0.042	0.042	2.63	0.1359
$x_1x_3$	1	0.061	0.03	0.03	1.86	0.2021
$x_2x_3$	1	-0.065	0.034	0.034	2.10	0.1780
$x_1^2$	1	-0.27	1.05	1.05	65.19	0.0000
$x_2^2$	1	-0.046	0.031	0.031	1.94	0.1942
$x_3^2$	1	-0.11	0.16	0.16	10.10	0.0099
模型 model	9		4.51	0.50	31.27	0.0000
误差项 residual	10		0.16	0.016		
失拟项 lack of fit	5		0.16	0.032	71.41	0.0001
纯误差 pure error	5		0.0022	0.00044		
所有项 total	19		4.67			

由方程的显著性分析得  $F = 31.27$ , 相应的概率值  $p < 0.001$ , 由方程的显著性检验可知, 该方程模型达到极显著。方程的失拟性检验分析得  $F = 71.41$ , 相应的概率值  $p < 0.001$ , 表明方程失拟严重。故需要对方程进行优化处理, 利用 Design-Expert 7.0 分析软件中的“后退法”程序将方程中不显著的项( $p > 0.05$ )去除, 得到优化的方程式。表5列出了经 ANOVA 统计分析得到的优化方程的各种参数。在优化

后的方程中,各项因素对鞣花酸的提取得率均达到了显著性( $p < 0.05$ ),表明该方程模型是显著的。“充分精确值”表示预测模型的“信噪比”,即预测准确值和偏离值之间的差异。一般认为“信噪比”大于4是可以接受的<sup>[8-9]</sup>。本研究中“信噪比”为19.949,表明预测鞣花酸提取得率的方程模型是可靠的。由表5可以看出:并未观察到因素间的交互作用对鞣花酸提取有显著性影响。

表5 优化响应面模型及其 ANOVA 统计分析参数(经后退法去除不显著项)

Table 5 Reduced response models and statistical parameters obtained from ANOVA (after backward elimination)

响应值 response	优化响应面模型 reduced response models	校正确定系数 $R^2$ adjusted $R^2$	模型 $p$ 值 model $p$ value	变异系数/% CV	精确度 adequate precision
$Y$	$1.57 + 0.27x_1 + 0.095x_2 + 0.40x_3 - 0.26x_1^2 - 0.10x_3^2$	0.9137	$< 0.0001$	11.05	19.949

**2.3.3 响应曲面图分析** 为了更直观的表现2个因素同时对鞣花酸提取得率的影响,可以令其他因素水平值为零,仅考虑这2个因素对提取得率的影响,即进行降维分析。得到的二元二次方程可以绘出相应的响应面图,见图2。图2(a)表示:当超声波提取温度设定在0水平时,液固比和超声波作用时间对鞣花酸提取得率的影响方式。鞣花酸的提取得率随着超声波作用时间的延长而增大,液固比在11:1~22:1变化范围内,液固比增加会导致鞣花酸提取得率明显增加。而液固比在22:1~28:1变化范围内,随着液固比的增加,鞣花酸提取得率反而出现降低的趋势。图2(b)表示:当超声波作用时间设定在0水平时,液固比和超声波提取温度对鞣花酸提取得率的影响。当超声波提取温度为70℃,液固比为22:1时得到最大鞣花酸提取得率。图2(c)表示:当液固比设定在0水平时,超声波作用时间和超声波提取温度对鞣花酸提取得率的影响。随着超声波作用时间的延长和超声波提取温度的增加鞣花酸提取得率也逐渐增加,当超声波作用时间为40 min时鞣花酸提取得率得到最大值。

通过 Design-Expert 7.0 软件的优化功能,可进一步得到化香树果序中鞣花酸成分的最优提取工艺条件:液固比 22.52:1,超声波作用时间 40 min,超声波温度 70℃,优化条件下化香树果序中鞣花酸的提取得率为 2.028%,满意度为 0.989。对该优化条件进行试验验证,重复 3 次,其鞣花酸提取得率为 1.961%,与预测值的相对误差为 3.3%。结果证明试验优化得到的工艺参数基本是可靠的,可为化香树果序中鞣花酸物质的工业化生产提供技术依据。

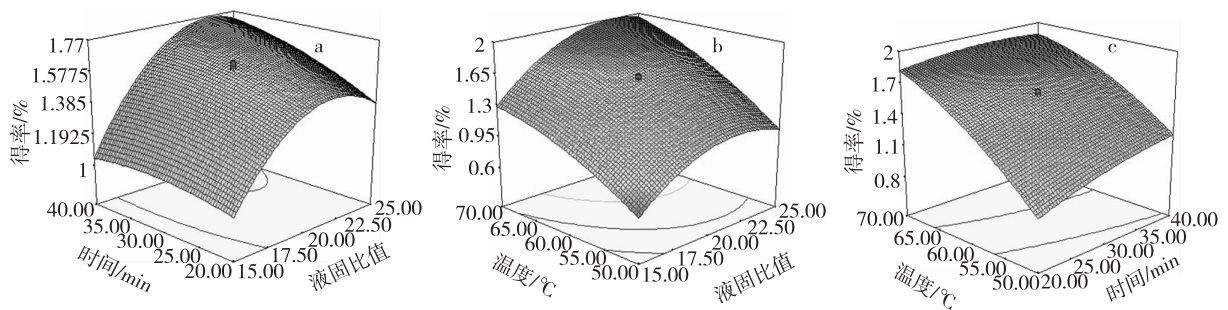


图2 响应曲面图  $Y=f(x_1, x_2)$  (a),  $Y=f(x_1, x_3)$  (b),  $Y=f(x_2, x_3)$  (c)

Fig. 2 Responsive surface plot,  $Y=f(x_1, x_2)$  (a),  $Y=f(x_1, x_3)$  (b),  $Y=f(x_2, x_3)$  (c)

### 3 结论

**3.1** 通过单因素试验研究了提取次数、液固比、超声波作用时间、超声波提取温度对化香树果序中鞣花酸提取得率的影响。在单因素试验基础上通过响应面法分析,建立了超声波辅助提取化香树果序中鞣花酸得率的数学模型,回归方程显著,可以进行实际预测。其优化响应面模型为  $Y = 1.57 + 0.27x_1 + 0.095x_2 + 0.40x_3 - 0.26x_1^2 - 0.10x_3^2$ 。

**3.2** 应用响应面设计法优化出其最佳超声波提取条件为:液固比 22.5:1 (mL:g),超声波作用时间 40 min,超声波提取温度 70℃,2次提取,最高提取得率为 1.961%,为工业化利用化香树果序资源,提取鞣花酸提供了生产数据。同时,采用超声波法从化香树果序中提取鞣花酸成分与冷浸法相比,该方法提取速度快,容易实现产业化。

## 参考文献:

- [1] ANGELONE M, ATZENI S, ROLLET S. Conceptual study of a compact accelerator-driven neutron source for radioisotope production, boron neutron capture therapy and fast neutron therapy[J]. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A, 2002, 387(3): 585-594.
- [2] ANGELIKA R, RONALD E W. Ellagic acid content of red rasp-berry juice as influenced by cultivar, processing, and environmental factors[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41: 1951.
- [3] FERESIN G E, TAPIA A, GUTIERREZ R A, et al. Free radical scavengers, anti-inflammatory and analgesic activity of *Acaena magellanica*[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2002, 54(6): 835.
- [4] 李庆, 姚开, 谭敏. 新型天然抗氧化剂——鞣花酸[J]. 四川食品与发酵, 2001, 37(4): 10.
- [5] 靳素荣, 姚礼峰, 卢威, 等. 超声波法提取荷叶多酚工艺研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(3): 20-22.
- [6] 王迪, 王伟, 牟洪举, 等. 响应面法优化松茸菌丝体多糖超声波提取工艺及其抗氧化研究[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(5): 109-114.
- [7] 孟庆繁, 高璇, 司鹏, 等. 响应面法优化超声波法提取补骨脂中活性成分的工艺研究[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(4): 87-91.
- [8] MONTGOMERY D C. Design and Analysis of Experiments[M]. 2nd ed. Wiley: New York, 1997: 43-80.
- [9] MYERS R H, MONTGOMERY C. Response Surface Methodology[M]. Wiley: New York, 1995: 134-174.

## 大型精密仪器

## 准确分析结果

## 中国林业科学研究院林产化学工业研究所仪器分析中心

中国林业科学研究院林产化学工业研究所仪器分析中心是大型分析仪器科学研究的平台,江苏省大型仪器协作共用及维修网成员单位。以开展分析测试服务、分析测试技术与方法研究为主要任务。提供无机化合物分析、有机化合物的定性和结构分析、有机化合物组成定量分析、固体粉末或乳液中颗粒的粒度分布测定、微孔物质的比表面积和孔隙度测定等分析测试服务,承接所内外的样品测试任务。中心现有仪器均为世界著名品牌,性能可靠,技术先进。

- 美国 Nicolet 公司 MAGNA-IR550 气相色谱-傅立叶红外联用仪
- 美国 Agilent 公司 6890N/5973N 气相色谱-质谱联用仪
- 美国 PE 公司 PE-AA 300 原子吸收光谱仪
- 英国 Malvern 公司 Mastersizer 2000 激光粒度仪
- 日本 Shimadzu 公司 LC-20A 液相色谱仪
- 日本 Shimadzu 公司 LC-8A 制备液相色谱仪
- 美国 Waters 公司 1515 凝胶色谱仪
- 美国麦克仪器公司 ASAP 2020M 全自动比表面积及物理吸附分析仪
- 美国 Agilent 公司 LC/MSD Trap SL 液相色谱离子阱质谱联用仪
- 美国 PE 公司 Diamond DSC 差示扫描量热仪
- 德国耐驰公司 STA 409 综合热分析仪
- 日本日立公司 S3400N-I 型扫描电子显微镜

## 法定检验机构 第三方公正评价

## 国家林业局林化产品质量监督检验站

该检验站是国家林业局授权的法定检测机构,具有第三方公正地位,挂靠在中国林业科学研究院林产化学工业研究所。可对下列产品进行质量监督和产品质量检验:

- 脂松香及再加工产品
- 松节油及再加工产品
- 栲胶原料、栲胶产品
- 单宁酸原料、工业单宁酸、工业没食酸、络合剂等
- 活性炭产品
- 其他归口的林化产品

## 欢迎来人来函联系产品分析和产品质量检验

联系电话: 025-85482448 85482449  
传真: 025-85413445

联系地址: 210042 南京市锁金五村 16 号 林化所内  
联系人: 谭卫红