

RSM 与 GA-ANN 联用优化超声辅助水提取多酚工艺

王鹏旭, 成传香, 贾蒙, 马亚琴*

西南大学柑桔研究所 国家柑桔工程技术研究中心 重庆 400712

摘要: 为探究超声波细胞破碎机辅助水提取多酚的可行性,以橙皮为原料,利用响应曲面法(response surface methodology, RSM)可视化分析了温度、占空比、料液比对多酚产量的影响(显著性、交互性、主次性)。随后以 RSM 数据为样本,通过遗传算法-人工神经网络(genetic algorithms-artificial neural network, GA-ANN)对样本数据深度学习并优化。结果表明,水相体系中高温(70 °C)可有效促进多酚的释放,但是较高占空比却显著造成多酚降解。RSM 与 GA-ANN 联用具有更优的预测能力,其优化条件为:温度 67 °C,占空比 1/2,料液比 1:25 g/mL。总酚得率为 8.21 mg GAE/g,达到 80% 甲醇水提取产量的 84%。实验证明了超声辅助水提取多酚的可行性及 RSM 与 GA-ANN 联用在优化提取中的卓越性。

关键词: 响应曲面法; 遗传算法-人工神经网络; 超声波; 水提取; 多酚

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)1-0136-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.1.019

Optimization of ultrasound-assisted aqueous extraction of polyphenols using RSM and GA-ANN

WANG Peng-xu, CHENG Chuan-xiang, JIA Meng, MA Ya-qin*

Citrus Research Institute, Southwest University National Citrus Engineering Research Center, Chongqing 400712, China

Abstract: To investigate the extraction of polyphenols using water assisted by ultrasonic cell grinder, the effects of temperature, duty cycle and solid-liquid ratio on the yield of polyphenols (significance, interaction, primary and secondary) were visually analyzed using response surface methodology (RSM) with orange peel as raw material. Subsequently, the RSM data were taken as samples and deeply learned by genetic algorithm-artificial neural network (GA-ANN). The results showed that high temperature (70 °C) effectively promotes the release of polyphenols but the degradation of polyphenols was obviously induced by high duty cycle in aqueous system. The optimum conditions of GA-ANN were as follows: temperature 67 °C, duty cycle 1/2, solid-liquid ratio 1:25 g/mL. Total phenolic content was 8.21 mg GAE/g, which reached 84% of the extraction yield in 80% methanol aqueous. This study proved the feasibility of ultrasound-assisted aqueous extraction of polyphenols and the superiority of RSM and GA-ANN in optimum extraction.

Key words: RSM; GA-ANN; ultrasound; aqueous extraction; polyphenols

近年来,随着环境友好型理念的发展,食品、医药、生物、化工、化妆品等行业一直在探寻安全、高效的提取方法。在此期间,天然产物的“绿色提取”理念应运而生并逐渐走入大众视野^[1-2],其原则是通过提取过程的重新设计优化,尽可能使提取产量最大化,提取过程清洁化、单元操作最小化,提取产物优质化以及环境污染最小化^[1-3]。新兴发展起来的

提取技术包括超声波辅助提取技术^[4]、微波辅助提取技术^[5]、超临界二氧化碳提取技术^[6]、瞬时控制压差技术^[7]及这些技术的结合使用^[8],可以较好克服传统提取行业耗能高、耗时长、污染大、效率低等弊端^[9]。超声波辅助提取技术又由于操作简单、用途广泛、投资成本低等优势,不断被广泛探究优化。

目前,超声波提取设备主要以水浴式为主^[10],即超声发射器先传递能量进入溶液后再进入提取容器,此类超声波提取设备的能量耗散较为严重,而且提取效率相对较低。探头式超声设备其探头直接与物料接触,诱导的大量的空化气泡相当于无数个小

收稿日期: 2019-08-19

接受日期: 2019-12-25

基金项目: 国家现代农业柑橘产业技术体系(CARS-26-06B); 中央高校基本业务费专项(XDJK2019B048)

* 通信作者 E-mail: myaya211@163.com

型压榨机,能有效的瓦解固体物料及细胞组织,促进溶剂渗透、内容物的释放以及传质扩散过程。国内外现已有将探头式超声波与动态提取相结合,初步实现设备的中试运行^[10]。此外,传统提取行业由于有机溶剂的使用,使得提取产物中不可避免地残留有机溶剂影响其品质,尤其是在精细化工行业以及制药行业,其品质的优劣直接影响着人体健康。“绿色提取”理念则强调以水或临界水或其他安全无毒的替代溶剂包括超临界二氧化碳、甘油、柠檬烯、低共熔溶剂、离子液体等^[11-13]。

响应曲面法可以通过对多个变量进行试验、建模、验证拟合出变量与响应之间的函数,在各领域的工艺优化中得到广泛应用^[14]。由于RSM的优化结果可进行可视化分析,因此便于解读各个参数对多酚产量的影响特征。GA-ANN具有很好的自我学习能力,GA可以对测试误差计算适应度,使误差的精度控制在尽可能小的范围,使ANN的预测结果更加符合期望值,具有很强的鲁棒性及全局寻优性。因此,本文欲将RSM与GA-ANN联用,对超声波细胞粉碎机辅助水提取橙皮多酚的工艺参数进行优化,为天然产物的绿色提取提供理论依据及方案支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

橙皮、蒸馏水,来自加工中试车间;Folin-酚试剂,重庆鼎国生物技术有限责任公司;没食子酸,成都化夏化学试剂有限公司;碳酸钠,重庆川东化工集团有限公司。

1.2 仪器与设备

超声波细胞粉碎机(JY98-IIIN)、恒温水浴槽(SDC-6),宁波新芝生物科技股份有限公司;紫外可见分光光度计(TU-1901),北京普析通用仪器有限责任公司;高速冷冻离心机(TGL-20M),长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司;漩涡振荡器(XW-80A),海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 材料预处理

将来自于加工中试车间的橙皮在烘干箱中40℃恒温干燥72h,然后用粉碎机粉碎,过60目筛(微粒尺寸约0.3mm),密封包装放置于-18℃冰箱中保存。

1.3.2 提取程序

取一定量的橙皮粉于定制的夹层反应器中,反应器外接循环水以控制反应温度,将超声波细胞粉

碎机探头插入反应器内。选择适合200mL左右样品量的直径为15mm的探头。探头表面与液面之间的距离保持为20mm。反应器内部插入热电偶温度计,将实时温度传输于控制面板以检测温度的动态变化。占空比(0.1%~99.9%)可以根据需求调节,频率19.5~20.5kHz,超声功率120W。在预试验基础上,由于超声时间对提取产量的影响较为有限,因此选择超声时间为5min。超声结束后,取出反应液于4℃离心机离心,收集上清液并测定吸光度。对照组采用超声波辅助80%甲醇水溶液提取多酚,其总酚含量为9.67mg GAE/g。

1.3.3 总酚测定

总酚测定参照Singleton等^[15]并稍有改动。取处理后的提取液0.5mL于25mL比色试管中并置于暗处,待测试时用水稀释至10mL刻度线,摇晃均匀后加入Folin-酚试剂1mL,并漩涡震荡1min,放在避光处静置5min,然后再加入5mL的质量分数为5%的碳酸钠溶液并用蒸馏水定容至25mL,放在避光处反应30min,在760nm处测定其吸光度。标曲的制作:标准品为没食子酸,母液浓度为2mg/mL。分别吸取0、20、40、60、80、100、120、140μL的母液于比色试管中按上述步骤测定吸光度。总酚含量以每克干橙皮中的没食子酸当量表示(mg gallic acid equivalent/g)(mg GAE/g)。

1.3.4 工艺参数筛选

选取温度、占空比、料液比为目标参数,各个参数的考察水平分别为超声温度(25、40、55、70℃),占空比(1/3、1/2、2/2、2/1),料液比(1/100、1/50、1/33、1/25、1/20g/mL)。

1.3.5 RSM设计

在筛选后的工艺参数基础上,以总酚含量为响应值,通过Box-Behnken(BBD)并结合RSM对工艺参数进行优化。其具体因素与水平设计如下表1:

表1 BBD因素与水平编码

Table 1 Factors and levels coding of BBD

水平 Level	因素 Factor		
	温度 Temperature (℃)	占空比 Duty cycle	料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)
-1	40	1/3	1:50
0	55	1/2	1:33
1	70	2/2	1:25

1.3.6 GA-ANN 模型构建优化

本研究采用多层前馈人工神经网络,ANN 模型 3 层,以温度、占空比、料液比作为输入层神经元,隐含层神经元个数由(1)计算得出。本研究输入层神经元为 4 个,输出层神经元 1 个,因此隐含层神经元个数为 $2 + c$,构建出的神经元拓扑结构大致如下图 1。

$$h = \sqrt{i + o} + c \quad (1)$$

式中: h 表示隐含层神经元个数; i 表示输入层神经元个数; o 表示输出层神经元个数; c 表示常数,其取值范围为 $1 \leq c \leq 10$ 。

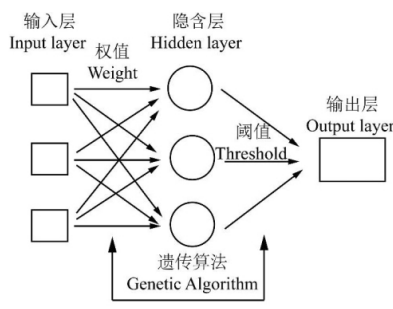


图 1 ANN 的拓扑结构

Fig. 1 Topological Structure of ANN

采用 Levenberg-Marquardt 算法作为训练函数。同时,隐含层激励函数为 tansig ,输出层激励函数为 purelin ,学习次数为 2 000,学习率为 0.1,学习目标为 0.000 1。GA 优化参数为个体数目 10,最大遗传代数 100,交叉概率 0.7,变异概率 0.05。

1.3.7 数据处理与分析

采用 SPSS 22.0 进行方差分析(ANOVA)及其显著性分析, $P < 0.05$ 表明差异显著;采用 Origin 2017 绘图;RSM 优化采用 Design-expert 8.0;ANN 模型的构建与 GA 优化采用 Matlab R2017b。模型的评价采用均方误差(root mean square error, $RMSE$)、平均绝对误差(mean absolute error, MAE)、决定系数(R^2)三个指标。 $RMSE$ 和 MAE 越小, R^2 越大,表示模型越好。

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Y_p - Y_a)^2} \quad (2)$$

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|Y_p - Y_a|}{Y_a} \quad (3)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (Y_a - Y_p)^2}{\sum_{i=1}^n |Y_a - Y_p|} \quad (4)$$

式中: Y_p 表示预测值; Y_a 表示实际值; Y_a 表示

实际值的平均值。

2 结果与分析

2.1 工艺参数筛选

超声温度会影响溶质的传质过程,同时还会影响空化气泡的数量以及崩塌强度,从而影响提取产量。在占空比 2/2,料液比 1:25 g/mL 时。由图 2 可以看到,总酚含量随着温度的增加呈先减少后增加的趋势,在 40 °C 时,其总酚含量最低。这可能是由于随着温度的增加,个别多酚类物质发生了一定程度的降解,同时由于是以水为介质,较低温度下空化气泡崩塌诱导水分子均裂产生的羟基自由基较多,攻击了溶液中的酚类化合物单体,导致其表观提取产量下降^[16]。但是随着温度的再次增加(55 和 70 °C)可能促进了传质过程,使得酚类化合物产量再次提升。因此,综合考虑,选择 40、55、70 °C 作为 RSM 的考察对象。

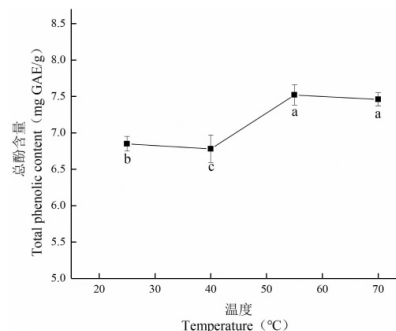


图 2 温度对总酚含量的影响

Fig. 2 The effects of temperature on total phenolic content

占空比(超声开启时间/(超声开启时间+超声停止时间))是超声波细胞破碎机的一个关键参数,可以根据物料的质地适当调节占空比以达到较好的提取效果。在温度 40 °C,料液比 1:25 g/mL 时,图 3 展示了占空比对总酚含量的影响。随着占空比(超声开启时间)的增加,总酚含量呈先增加后减少的趋势,在占空比 1/2 情况下,其提取产量达到最大值为 8.07 mg GAE/g。随着占空比继续的增加,总酚含量显著降低,在 2/1 占空比下,总酚含量为 6.69 mg GAE/g,相比占空比 1/2 时减少了 17.1%。这充分说明占空比对多酚的提取具有显著影响。占空比越高,直接作用于介质的有效时间越长,诱导的空化气泡越多,羟基自由基的产量也越高,虽然能有效瓦解物料组织,但是也容易造成多酚结构的破坏。同时,在工业上,较低占空比的使用有助于节省成本^[17]。因此,选择占空比 1/3、1/2、2/2

作为 RSM 的优化对象。

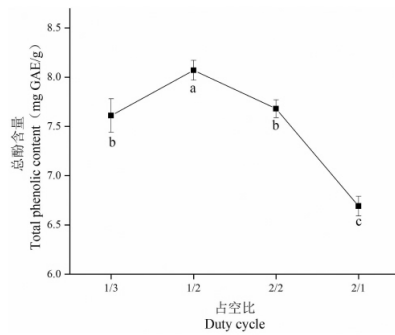


图3 占空比对总酚含量的影响

Fig. 3 The effects of duty cycle on total phenolic content

料液比的选择直接影响提取产量,同时又是工业化生产较为重视的参数之一。在超声温度 40 °C, 占空比 2/2 条件下,图 4 展示了料液比对总酚含量的影响。随着料液比的增加,总酚含量呈线性增加,料液比为 1:20 g/mL 时,总酚含量为 8.75 mg GAE/g 相比 1:100 g/mL 时的 2.46 mg GAE/g,产量增加近乎 2.6 倍。这些结果说明在超声参数固定情况下,其释放的能量较为强大,在料液比大幅度增加时,其能量还可以有效破碎物料组织结构。但是在探究中发现,料液比为 1:20 g/mL 时,由于溶液介质浓度过高,造成超声探头发热严重,释放的热量在短时间内局部积累过高,这对于多酚的提取以及探头都是不利的。因此,选择料液比 1:50、1:33、1:25 g/mL 作为 RSM 的优化对象。

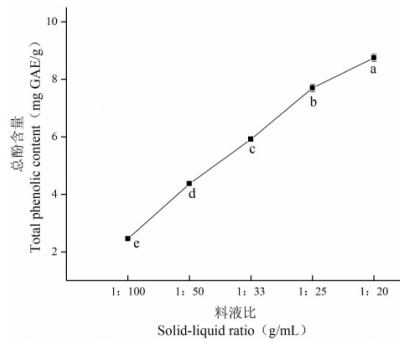


图4 料液比对总酚含量的影响

Fig. 4 The effects of solid-liquid ratio on total phenolic content

2.2 RSM 优化及分析

2.2.1 模型建立及分析

天然产物提取的一个重要目标就是尽可能使提取产量最大化并减小对目标提取物的影响,同时避免不理想的降解产物的发生^[18]。由单因素实验可以明显看出,较短时间(5 min)、较高温度、较低占空

比和较高料液比是有助于橙皮多酚的提取,这说明各工艺参数之间可能存在交互作用。寻求最优工艺参数,是工业化生产的关键。因此以温度(A)、占空比(B)、料液比(C)为自变量,以总酚含量(Y)为响应值,建立了回归模型,其方程如下: $Y = 4.88241 - 0.15031A - 5.95674B + 230.2255C + 0.10294AB + 0.16715AC + 5.77696BC + 0.0016451A^2 - 0.5285B^2 - 1.01546662C^2$ 。

通过对回归模型进行显著性分析,如表 2 所示, $P < 0.0001$ 表明拟合出的模型具有高度显著性,说明模型可以很好的预测总酚的提取产量。失拟项 = 0.0518 > 0.05,表明所选取的实验点能用拟合出的函数表示。决定系数 $R^2 = 0.9992$ 表明回归方程对结果预测的准确度很高。同时,从表 2 显著性检验一栏可以看到各因素对总酚含量的影响程度,温度(A) ($P < 0.0001$)、料液比(C) ($P < 0.0001$)、温度与占空比的交互作用(AB) ($P = 0.0002$) 对结果都有极显著的影响。温度的平方($P < 0.0001$) 对结果也有极显著影响。占空比(B)和料液比平方(C^2) ($P < 0.005$) 对结果有显著影响。各工艺参数对总酚产量的影响顺序为 $A > C > B$,即温度 > 料液比 > 占空比。

2.2.2 交互作用分析

根据表 2 以及图 5 可以看到,占空比与温度的交互作用对提取产量有显著性影响,在较低温度下(40 °C),占空比对酚类化合物的提取几乎呈负面影响,这与之前的单因素实验结果基本吻合,说明超声波细胞粉碎机在以水为介质,低温度高占空比情况下,短时间内就可以造成所提取出的酚类化合物发生降解。同时也说明以水为介质情况下,超声波的声化学效应是不能被忽略的。Patil 等^[19]用探头式超声波设备提取喜树碱时发现高占空会导致提取产量发生显著下降。但是,在较高温度下,占空比对酚类化合物的影响似乎不再显著。从图中 5(I) 可以看出,在温度(70 °C)与占空比(2/2)都较高情况下,橙皮多酚的提取产量明显增加,其曲面由平缓逐渐变得陡峭。这可能是在此过程中,虽然高占空比也造成酚类化合物的降解,但是温度的增加提升了传质过程,促进了内容物的释放。同时,温度的增加使得溶液粘度和表面张力减小,蒸汽压力升高,造成更多的蒸汽进入空化气泡,使得空化气泡的崩塌强度衰减,羟基自由基的产量降低,一定程度上限制了酚类化合物发生降解^[20]。料液比与温度(图 5 II)、

料液比与占空比(图 5 III)之间的交互作用均不显著,从图中可以看出,其曲面近乎呈平滑斜面,说明

料液比对提取产量的影响过于显著,使得温度与占空比对提取产量的影响在短时间内可以忽略不计。

表 2 RSM 优化模型的方差分析表
Table 2 Variance analysis of RSM optimization model

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	27.25	9	3.03	98.54	< 0.000 1	**
A-温度 Temperature	0.78	1	0.78	252.70	< 0.000 1	**
B-占空比 Duty cycle	0.034	1	0.034	10.92	0.013 1	*
C-料液比 Solid-liquid ratio	24.61	1	24.61	8 004.16	< 0.000 1	**
AB	0.16	1	0.16	51.60	0.000 2	**
AC	0.002 5	1	0.002 51	0.82	0.395 9	-
BC	0.000 22	1	0.000 221	0.072	0.795 9	-
A ²	0.29	1	0.29	94.01	< 0.000 1	**
B ²	0.000 20	1	0.000 203	0.066	0.804 3	-
C ²	0.043	1	0.043	14.12	0.007 1	**
残差 Residual	0.022	7	0.003 07	-	-	-
失拟项 Lack of fit	0.018	3	0.005 94	6.45	0.051 8	不显著 Not significant
纯误差 Pure error	0.003 6	4	0.000 92	-	-	-
总和 Sum	436.28	16	-	-	-	R ² = 0.999 2

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

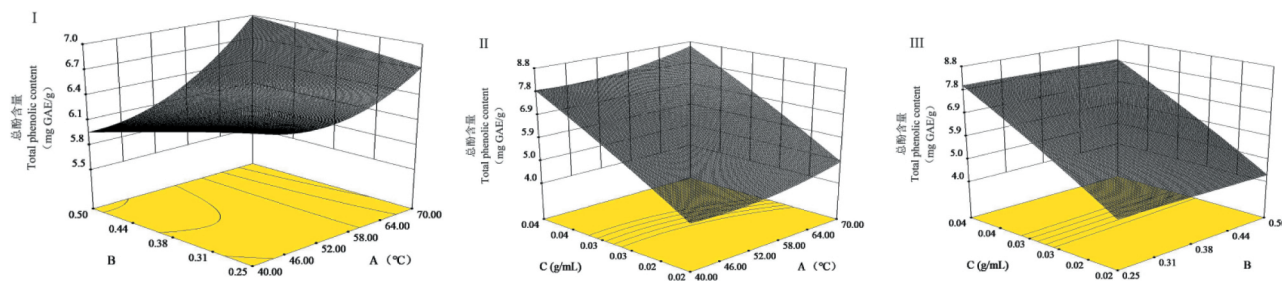


图 5 操作参数对总酚含量的交互作用

Fig. 5 Interaction of operating parameters on total phenolic content

注: A: 温度; B: 占空比; C: 料液比。Note: A: Temperature; B: Duty cycle; C: Solid-liquid ratio.

2.2.3 模型验证

通过对 RSM 优化出的工艺参数(温度 68.60 °C、占空比 2/2、料液比 1:25 g/mL)进行模型验证,结果显示,以水为溶剂并在该工艺参数下,总酚含量为 8.18 mg GAE/g,较 Khan 等^[21]用 80% 乙醇从橙皮中回收的总酚含量 2.78 mg GAE/g 相比,绝对提取量为 5.4 mg GAE/g,提取率接近其 3 倍,表明此种提取方法的高效性以及水提取的可行性。

2.3 GA-ANN 模型构建结果及与 RSM 对比分析

2.3.1 隐含层神经元个数的确定

由于隐含层神经元个数会影响输出结果的精

度,因此初步确定 3、4、5、6 为隐含层神经元个数。训练样本为 RSM 数据中的 75%,验证样本为 15%,测试样本为 15%,分别计算对比拟合精度,进一步确定隐含层神经元个数。从图 6 可以看出,隐含层神经元个数为 3 时,模型拟合效果最好。

2.3.2 RSM 与 GA-ANN 模型优化结果及其分析

从图 7 可以看出,在经过 60 代进化后,其适应度已达到最大值,此时对应的工艺参数为温度 67.546 5 °C,占空比 0.394 0,料液比 0.039 8,预测的最优产量为 8.402 0 mg GAE/g,根据实际将工艺参数调整为温度 67 °C,占空比 1/2,料液比 1:25 g/

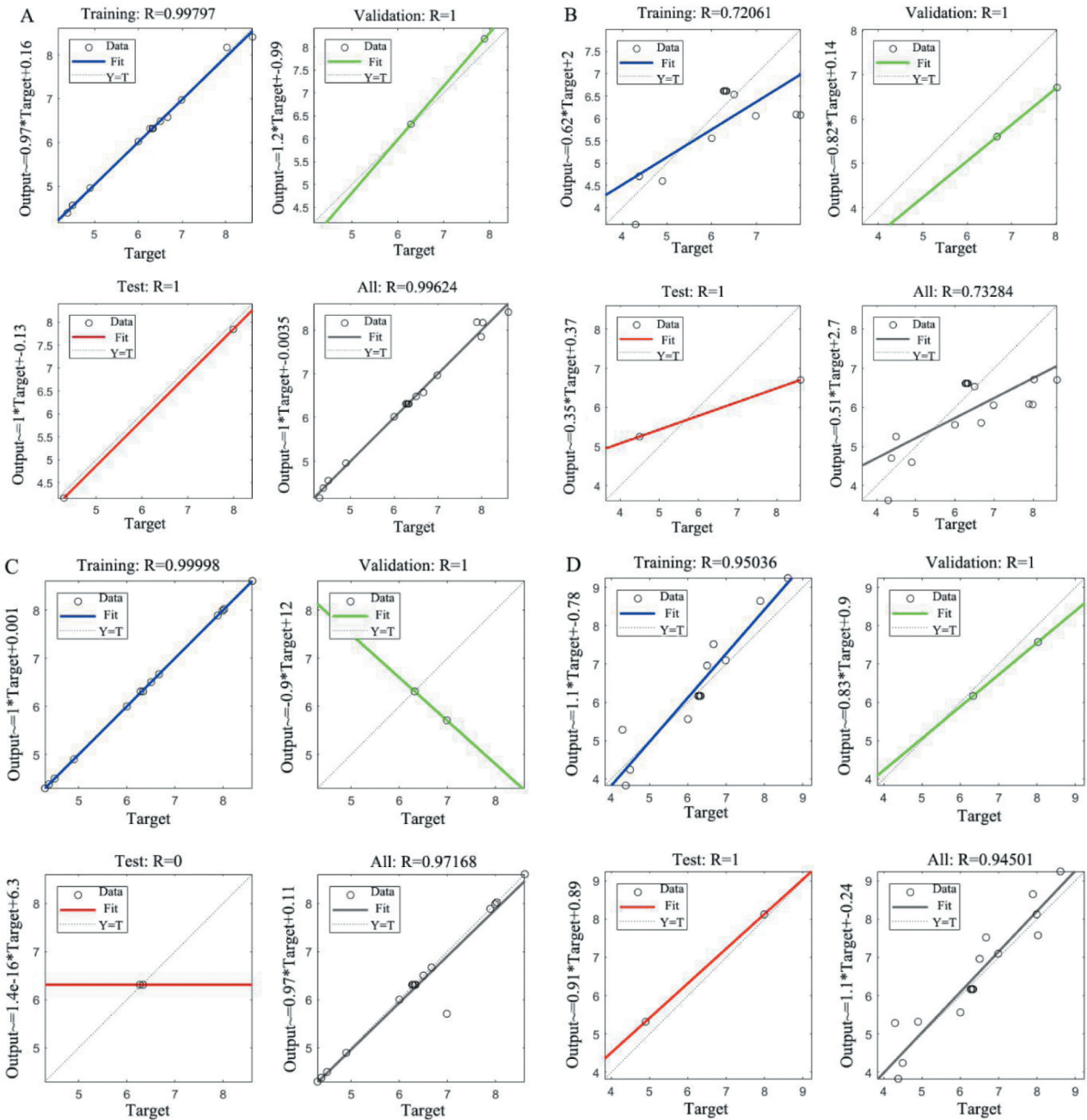


图6 不同隐含层数的回归图

Fig. 6 Regression map with different hidden layers

注: A: 隐含层 = 3; B: 隐含层 = 4; C: 隐含层 = 5; D: 隐含层 = 6; Note: A: Hidden layer = 3; B: Hidden layer = 4; C: Hidden layer = 5; D: Hidden layer = 6.

mL。从表3与表4可以看出,相较于RSM,GA-ANN的RMSE与MAE均小于RSM,但是GA-ANN(0.9979)的决定系数 R^2 要小于RSM(0.9992)。对比其预测值与真实值的相对误差,GA-ANN的准确度要高于RSM。超声辅助80%甲醇水溶液提取的总酚含量为9.67 mg GAE/g,在此优化的条件下,水提取的总酚含量为8.21 mg GAE/g,达到其84%的产量,

证明用GA-ANN优化工艺参数的可行性。

3 结论

随着绿色发展理念和可持续发展理念的贯彻以及消费者对绿色产品的需求,绿色提取技术会步入新的发展阶段,天然产物的绿色提取是基于对提取过程的重新设计,从而减少能源消耗以及有机溶剂的使用,确保提取物的品质和安全。因此,开发节能

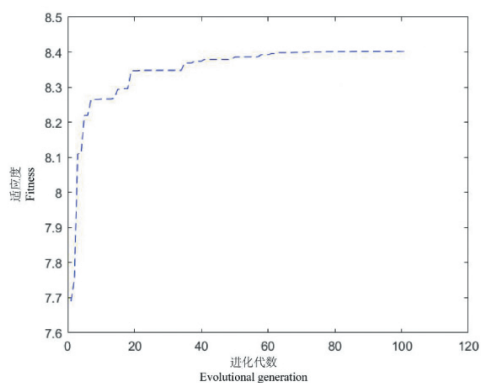


图7 适应度曲线

Fig.7 Fitness curve

表3 模型评价

Table 3 Model evaluation

参数 Parameter	RSM	GA-ANN
R^2	0.999 2	0.997 9
RMSE	6.37	0.125
MAE	0.243	0.009

高效的提取过程和安全环保的提取技术就显得尤为重要。绿色溶剂的开发选用及其配套设备的研发是实现绿色提取的重要环节。水作为最环保的溶剂,如何用水提取使天然产物的产量最大化也是重要的研究课题。本研究将超声波细胞粉碎机与水结合提

表4 RSM与GA-ANN优化结果对比及评价

Table 4 Comparison of RSM and GA-ANN optimization results

优化方法 Method	温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	占空比 Duty cycle	料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	真实值 True value (mg GAE/g)	预测值 Predicted value (mg GAE/g)	相对误差 Relative error (%)
RSM	68.60	0.50	1:25	8.18	8.60	5
GA-ANN	67.65	0.40	1:25	8.21	8.40	2

取多酚,实现了良好的结果。相较于以80%甲醇水溶液为溶剂,水提取的产量达到了84%的比例。但是,需要注意的是,在提取过程中占空比和料液比的选择至关重要。较高的占空比会造成多酚类物质发生降解,过高的料液比则会造成料液内部局部温度过高,影响探头使用寿命以及多酚稳定性。

RSM与GA-ANN联用优化的条件为:温度67 $^{\circ}\text{C}$,占空比1/2,料液比1:25 g/mL,总酚含量为8.21 mg GAE/g,显著降低了预测值与实际值间的相对误差。因此,RSM与GA-ANN联用具有更优越的全局寻优能力。同时,本研究也证明了超声波细胞粉碎机辅助水提取多酚的可行性,为天然产物绿色提取的实验室探索、中试优化提供了理论基础。

参考文献

- 1 Chemat F, Abert-vian M, Fabiano-tixier AS, et al. Green extraction of natural products: origins, current status and future challenges [J]. *TrAC Trends Anal Chem.* 2019, 118: 248-263.
- 2 Ameer K, Shahbaz HM, Kwon J H. Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2017, 16: 295-315.
- 3 Chemat F, Vian M A, Cravotto G. Green extraction of natural products: concept and principles [J]. *Int J Mol Sci.* 2012, 13: 8615-8627.
- 4 Santos MP, Souza MC, Sumere BR, et al. Extraction of bioactive compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.) with pressurized liquids assisted by ultrasound combined with an expansion gas [J]. *Ultrason Sonochem.* 2019, 54: 11-17.
- 5 Yang JD, Liu TT, Zhang SS, et al. Optimization of microwave-assisted extraction and rheological and gelling properties of polysaccharide from *Tremella fuciformis* [J]. *Food Sci (食品科学)* 2019, 40: 289-295.
- 6 Rodrigues MF, Sousa IO, Vardanega R, et al. Techno-economic evaluation of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide [J]. *Ind Crops Prod.* 2019, 132: 336-343.
- 7 Sanchez-valdepenas V, Barrajon E, Vegara S, et al. Effect of instant controlled pressure drop (DIC) pre-treatment on conventional solvent extraction of phenolic compounds from grape stalk powder [J]. *Ind Crops Prod.* 2015, 76: 545-549.
- 8 Cao RA, Li CY, Li CS, et al. Ultrasound-microwave assisted extraction, molecular properties and immunomodulatory activities of the polysaccharide from *Folium isatidis* [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)* 2019, 31: 185-190.
- 9 Redovnikovic IR, Panic M, Bubalo MC, et al. Green solvents for green technologies [J]. *J Chem Technol Biotechnol.*

- 2015 90: 1631-1639.
- 10 Wang PX ,Cheng CX ,Ma YQ ,et al. Application of ultrasonic acoustic effect in extraction of phenolic compounds from fruits and vegetables [J]. Food Sci(食品科学) 2019 40: 338-347.
- 11 Elkantar S ,Rajha HN ,Boussetta N ,et al. Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges ,deep eutectic solvents and aqueous glycerol [J]. Food Chem 2019 295: 165-171.
- 12 Choi YH ,Verpoorte R. Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents [J]. Curr Opin Food Sci , 2019 26: 87-93.
- 13 Chen R ,Li DH ,Ruan GF ,et al. Green and efficient extraction of flavonoids and saponins from *Abrus cantoniensis* Hance by deep eutectic solvents [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发) 2019 31: 1632-1640.
- 14 Zhang YB ,Lin HY ,L S ,et al. Optimization of supercritical CO₂ fluid extraction of essential from jasmine buds by response surface methodology and effect of antioxidant activity [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发) 2019 31: 1220-1229.
- 15 Singleton VL ,Orthofer R ,Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent [J]. Methods Enzymol , 1999 299: 152-178.
- 16 Zhang QA ,Shen H ,Fan XH ,et al. Changes of gallic acid mediated by ultrasound in a model extraction solution [J]. Ultrason Sonochem 2015 22: 149-154.
- 17 Pan ZL ,Qu WJ ,Ma HL ,et al. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel [J]. Ultrason Sonochem 2012 19: 365-372.
- 18 Tiwari ,Kumar B. Ultrasound: A clean ,green extraction technology [J]. TrAC Trends Anal Chem 2015 71: 100-109.
- 19 Patil DM ,Akamanchi KG. Ultrasound-assisted rapid extraction and kinetic modelling of influential factors: Extraction of camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* plant [J]. Ultrason Sonochem 2017 37: 582-591.
- 20 Ashokkumar M ,Mason TJ. Sonochemistry [J]. Kirk-Othmer Encycl Chem Technol 2000: 353-372.
- 21 Khan MK ,Abert-vian M ,Fabiano-tixier AS ,et al. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange(*Citrus sinensis* L.) peel [J]. Food Chem 2010 , 119: 851-858.