

# 响应面法优化蜂胶超临界二氧化碳萃取工艺的研究

徐响<sup>1,2</sup>, 孙丽萍<sup>1,2</sup>, 董捷<sup>1,2</sup>

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2. 农业部国家蜂产品加工专业分中心, 北京 100093)

**摘要:** 采用响应面法优化蜂胶超临界二氧化碳萃取工艺, 根据中心旋转试验设计, 研究萃取压力、萃取温度和二氧化碳流速等工艺条件对萃取率的影响。结果表明, 蜂胶萃取物的萃取率随温度的升高而降低; 随压力和二氧化碳流速的增加萃取率不断增大, 而在高压和高流速下又呈现下降趋势。分析所得的回归方程确定最佳工艺条件为: 萃取压力 33.4 MPa, 温度 45.4℃, 二氧化碳流速 16.8 L/h。在此条件下萃取蜂胶 120 min 时萃取物的萃取率达 19.62 g/100 g 蜂胶。GC-MS 分析表明萃取物中含有较高含量的烷烃类物质和烷醇类物质, 以及肉桂酸肉桂酯、柯因、5-甲基柯因等。

**关键词:** 蜂胶; 超临界二氧化碳; 响应面

## Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Effective Components from Propolis Using Response Surface Methodology

XU Xiang<sup>1,2</sup>, SUN Li-ping<sup>1,2</sup>, DONG Jie<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China; 2. National Research Center of Bee Product Processing, Ministry of Agriculture, Beijing 100093, China)

**Abstract:** Response surface methodology (RSM) was employed to optimize the supercritical CO<sub>2</sub> extraction conditions of effective components from propolis. The effects of pressure, temperature and CO<sub>2</sub> flow rate on the yield were investigated. Results showed that the yield decreases with the rise of extraction temperature, while it firstly increases with the increase of pressure and CO<sub>2</sub> flow rate until certain high levels of pressure and CO<sub>2</sub> flow rate and then begins to decrease. Moreover, the optimum pressure, temperature and CO<sub>2</sub> flow rate are 33.4 MPa, 45.4℃ and 16.8 L/h, respectively. Under such conditions, the yield reaches 19.62 g/100 g propolis after extraction for 120 min. The GC-MS analysis indicated that the main components in the extract are alkanes, cosanols, cinamyl cinnamate, chrysin and chrysin 5-methyl ester.

**Key words:** propolis; supercritical carbon dioxide; response surface methodology

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)08-0086-04

蜂胶是蜜蜂从植物芽孢和树干处采集树脂并混入蜜蜂上颚腺分泌物和蜂蜡等形成的一种具有芳香味的黏性胶状固形物。作为一种极为稀少的天然资源, 蜂胶具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、降血脂、降血压作用<sup>[1-2]</sup>。超临界流体技术在近几十年来发展迅速, 在食品、医药、化工、材料科学、环境科学、分析技术等领域已经得到广泛的应用。因二氧化碳临界温度和临界压力低(31.06℃, 7.39 MPa), 对中、低分子量和非极性的天然产物有较强的亲和力, 而且具有环境友好的特点, 超临界二氧化碳技术广泛用于功能性油脂、挥发性油、生

物碱、苷类、香豆素类、萜类的提取<sup>[3-6]</sup>。超临界二氧化碳萃取蜂胶制成保健食品的生产过程无污染, 能有效地脱除重金属, 产品已被越来越多的消费者接受和喜爱。

响应面法(response surface methodology, RSM)采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数, 解决多变量问题, 在食品工业中得到了广泛应用<sup>[7]</sup>, 但其应用于超临界二氧化碳萃取蜂胶的工艺条件优化尚未见报道。本研究将响应面法应用于蜂胶超临界二氧化碳萃

收稿日期: 2008-06-04

基金项目: 中国农业科学院院本级基本科研项目(0032007222)

作者简介: 徐响(1983-), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为功能食品开发。E-mail: xuxiang5000@yahoo.com.cn

取工艺优化中,为蜂胶功能食品的开发和利用提供理论基础和实验依据。

## 1 材料与方法

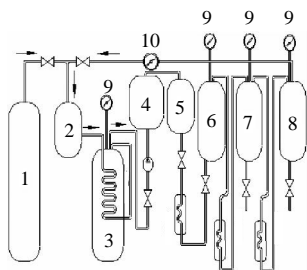
### 1.1 材料与仪器

蜂胶 北京中蜜科技发展有限公司。

HA220-50-06型超临界流体装置 江苏省南通华安超临界萃取公司;7890/5975 气相质谱仪 Agilent 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 超临界二氧化碳萃取工艺流程



1.二氧化碳钢瓶;2、5.净化器;3.冷箱;4.混合器;6.萃取器;7、8.分离器I和II;9.压力表;10.流量计。

图1 超临界二氧化碳萃取装置图

Fig.1 Schematic diagram of SC-CO<sub>2</sub> extraction apparatus

精确称取粉碎的蜂胶 125g(W<sub>1</sub>)及 20% 乙醇装于萃取釜中,设定萃取温度、分离温度。从钢瓶中流出的二氧化碳经净化后进入冷箱即液化器冷凝至流体,经高压计量泵加压至设定压力,经加热器加热至预定温度后进入萃取釜进行动态萃取,经过 120min 后,蜂胶提取物于分离釜底部经放油阀放出收集,除去乙醇,精确称量萃取物重 W<sub>2</sub>,计算萃取率:

$$\text{萃取率}(\%) = \frac{W_2}{W_1} \times 100$$

#### 1.2.2 响应面试验方案

表1 响应面试验设计因素水平表

Table 1 Uncoded and coded levels of independent factors in central composite design for optimizing supercritical CO<sub>2</sub> extraction conditions

因素		水平				
		- 1.68	- 1	0	1	1.68
X <sub>1</sub>	压力 (MPa)	13.2	20	30	40	46.8
X <sub>2</sub>	温度 (°C)	37.4	42.5	50	57.5	62.6
X <sub>3</sub>	二氧化碳流速 (L/h)	6.6	10	15	20	23.4

在单因素试验基础上选取萃取压力、温度和二氧化碳流速三个因素(表1),采用中心旋转设计(central

composite design, CCD)优化超临界二氧化碳萃取蜂胶工艺参数,试验方案见表2。

表2 RSM 试验方案及结果

Table 2 Test design and results for response surface analysis

试验号	压力(MPa)	温度(°C)	二氧化碳流速(L/h)	萃取率(g/100g 蜂胶)	
				试验值	预测值
1	30	50	23.4	12.66	12.92
2	13.2	50	15	5.20	3.88
3	30	50	15	18.22	17.88
4	30	50	15	18.13	17.88
5	40	42.5	10	9.36	12.20
6	40	57.5	10	2.26	3.62
7	20	57.5	20	2.15	1.64
8	40	57.5	20	3.88	5.15
9	30	50	6.6	14.01	10.47
10	40	42.5	20	17.55	17.28
11	20	42.5	20	9.10	10.08
12	46.8	50	15	11.74	9.78
13	30	62.6	15	1.1	0.52
14	20	57.5	10	1.22	3.81
15	20	42.5	10	7.63	8.69
16	30	50	15	16.72	17.88
17	30	37.4	15	15.40	13.79

#### 1.3 GC-MS 分析

将 30MPa、50 °C、15L/h 条件下得到的萃取物 0.5g 完全溶于三氯甲烷中,定容至 10ml,过 0.45 μm 滤膜,采用 GC-MS 进行分析。GC 条件:色谱柱为 DB-5MS (30m × 0.32mm, 0.25 μm);载气:氦气,1ml/min;进样口温度 280 °C;分流进样量:1 μl,分流比:1:20;柱温升温程序:初始 75 °C,保持 1min,以 10 °C/min 速度升温至 180 °C,保持 10min;以 2.5 °C/min 速度升温至 320 °C,保持 20min。

MS 条件:电离方式为 EI 源;离子源温度 180 °C;四极杆温度 150 °C;接口温度 280 °C;电子能量 70eV;质量扫描范围为 35 ~ 450amu。

## 2 结果与分析

### 2.1 回归方程及 ANOVA 分析

采用 Statgraphics Centurion XV 软件对所得数据进行回归分析,分析结果见表3。萃取压力的平方项,温度的一次项和平方项对萃取率的影响极显著(p<0.01),压力的一次项、二氧化碳流速的平方项对萃取率的影响显著(p<0.05)。数据经回归拟合后得到的回归方程如下。其 R<sup>2</sup> = 0.927773, R<sup>2</sup><sub>Adj</sub> 为 0.83909,表明回归方程与实验值具有高度拟合性。

$$Y = -220.763 + 2.85891X_1 + 7.22821X_2 + 3.40131X_3 - 0.0390801X_1^2 - 0.0123296X_1X_2 + 0.0185137X_1X_3 - 0.0706965X_2^2 - 0.0237213X_2X_3 - 0.0874972X_3^2$$

表3 回归方程的ANOVA分析

Table 3 Variance analysis of the regression model with yield (Y) as function

数据源	平方和	df	均方	F 值	p 值
X <sub>1</sub>	41.9855	1	41.9855	6.41	0.0391
X <sub>2</sub>	247.1	1	247.1	37.73	0.0005
X <sub>3</sub>	7.25181	1	7.25181	1.11	0.3276
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	172.173	1	172.173	26.29	0.0014
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	6.84081	1	6.84081	1.04	0.3408
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	6.85512	1	6.85512	1.05	0.3403
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	178.276	1	178.276	27.22	0.0012
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	6.33039	1	6.33039	0.97	0.3583
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	53.942	1	53.942	8.24	0.0240
总误差	45.8448	7	6.54926		
R <sup>2</sup>	0.927773				

## 2.2 超临界二氧化碳萃取蜂胶的响应面分析

响应面图直观地反映了各自变量对响应值的影响,并且从图上可形象地看出最佳参数以及各参数之间的相互作用。图2是在二氧化碳流速15L/h时压力和温度的响应曲面图,在较低的压力范围内,方程中一次项系数为正,蜂胶萃取物的萃取率随着压力的增加而增大,因为压力的升高使密度增加从而提高弱极性化合物在超临界二氧化碳中的溶解度<sup>[8]</sup>。当压力大于33MPa左右时,萃取率增加变得平缓,在高压时甚至出现下降趋势,这可能是由于二氧化碳在高压下使溶质与二氧化碳的排斥作用增强<sup>[9]</sup>。

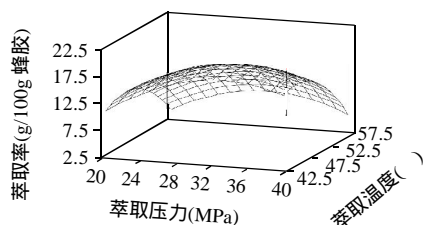


图2 萃取压力和温度对萃取率影响的响应曲面图

Fig.2 Response surface plot for yield as a function of pressure and temperature at 15 L/h of CO<sub>2</sub> flow rate

萃取温度对蜂胶萃取物萃取率的影响显著( $p < 0.05$ ),其一次项系数为正,二次项系数均为负,在实验的温度范围内对萃取率呈现出明显的降低作用。如图2和图4所示,随着萃取温度的增加,萃取率呈下降趋势,这主要与温度对二氧化碳流体的密度和蜂胶原料的影响有关。随着温度的升高,二氧化碳流体的密度降低,导致物质在二氧化碳中的溶解度下降<sup>[10]</sup>;并且高温易使粉碎的蜂胶发生黏合,降低溶质在二氧化碳中的传质速

率,从而使萃取率随着温度的升高而降低。

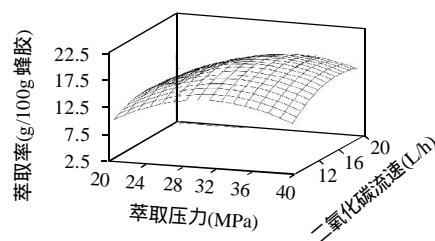


图3 50 °C下萃取压力和二氧化碳流速对萃取率影响的响应曲面图

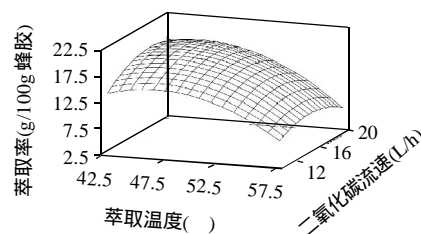
Fig.3 Response surface plot for yield as a function of pressure and CO<sub>2</sub> flow rate at 50 °C

图4 30MPa下萃取温度和二氧化碳流速对萃取率影响的响应曲面图

Fig.4 Response surface plot for yield as a function of temperature and CO<sub>2</sub> flow rate at 30 MPa

在萃取压力30MPa、温度50 °C下二氧化碳流速对萃取率的影响见图3和图4。二氧化碳流速的平方项对萃取率影响显著( $p < 0.05$ ),而二氧化碳流速与萃取温度和压力的交互作用不显著( $p > 0.05$ )。随着二氧化碳流速的增加,萃取率随之增高,当流速大于17L/h时,萃取率又呈下降趋势。二氧化碳流速对萃取过程同时存在着两方面的影响。一方面,流速的增加使单位时间里二氧化碳对蜂胶原料的萃取次数增加,提高了传质速率;另一方面,当二氧化碳流速较大时,溶质与超临界流体来不及充分作用即到达分离釜中,使得萃取率下降<sup>[11]</sup>。

## 2.3 最佳工艺条件的优化

对回归方程取一阶偏导数等于零,求解方程组得 $X_1=33.4012$ , $X_2=45.387$ , $X_3=16.8192$ ,即蜂胶超临界二氧化碳萃取工艺的最佳条件为:萃取压力33.4MPa,温度45.4 °C,二氧化碳流速16.8L/h。在该条件下蜂胶萃取物萃取率可达19.62g/100g。

## 2.4 萃取物组成

采用GC-MS对超临界萃取得到的蜂胶萃取物进行定性分析,总离子流图如图5。GC-MS检出组分经NIST/WILEY检索数据库进行检索并根据文献进行谱图解析,采用峰面积归一化法计算解析组分的百分含量,结果见表4。

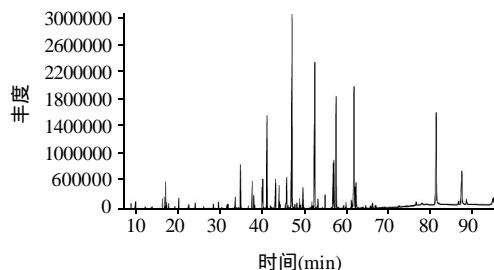
表4 蜂胶萃取物化学组成及百分含量

Table 4 Chemical compositions of extract obtained by supercritical CO<sub>2</sub> extraction

序号	保留时间(min)	化合物名称	匹配度	超临界萃取率(%)
1	8.300	1,2,3- 丙三醇单乙酸酯	866	0.14
2	8.768	苯乙醇	934	0.19
3	9.720	苯甲酸	970	0.35
4	10.512	癸醛	984	0.17
5	11.407	乙酸苯乙酯	903	0.07
6	11.493	丙酸	827	0.05
7	11.644	肉桂醛	880	0.08
8	12.169	肉桂醇	902	0.05
9	12.302	2- 羟基-5- 苯甲基- 吡咯酮	856	0.02
10	12.521	苯丙酸	918	0.04
11	12.810	苯丙酸乙酯	900	0.42
12	13.047	2- 羟基-4', 5'- 二甲基苯乙酮	749	0.03
13	13.532	香兰素	940	0.03
14	13.798	肉桂酸	926	0.09
15	14.133	乙酸苯丙酯	817	0.02
16	14.658	桉醇	717	0.05
(2R,2alpha,4a alpha,8a beta-)				
17	15.219	-decahydro-1,2,4a-trimethyl-8-methylene-2-naphthalene	745	0.02
18	16.170	愈疮木醇	955	0.23
19	16.989	奥甲醇乙酸酯	801	1.35
20	17.731	萘甲酸	860	0.21
21	18.937	苯甲酸苄酯	904	0.11
(2R,2alpha,4a alpha,8a beta-)-decahydro-				
22	20.145	alpha,alpha,4a-trimethyl-8-methylene-2-naphthalenemethanol	818	0.50
23	22.178	十九烷	882	0.05
24	22.478	3,4- 二甲氧基肉桂酸	935	0.38
25	24.005	棕榈酸	917	0.35
26	30.552	油酸乙酯	750	0.07
27	31.580	二十烷	927	0.25
3-[4-hydroxy-3-methoxyphenyl]-2-propenoic acid				
28	31.826		759	0.32
29	33.544	3- 羟基-4- 甲氧基肉桂酸	786	0.67
30	33.873	二十二烯	906	0.12
31	34.803	二十一烷	99	2.76
1-[2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl]-2-propenoic acid				
32	37.488		911	1.85
33	37.967	肉桂酸肉桂酯	904	1.26
34	39.931	柯因	730	1.26
35	41.062	二十二烷	912	6.91
36	43.928	5- 甲基柯因	816	1.43
37	45.724	柚皮素	629	3.07
38	46.919	二十六烷	929	24.13
39	54.849	二十七烷	900	0.88
40	56.737	二十八烷醇	856	0.33
41	61.710	二十九烷	924	13.35
42	66.070	三十烷	905	3.76
43	81.173	棕榈酸十六醇酯	753	15.23
44	87.300	棕榈酸十八醇酯	769	3.66

超临界 CO<sub>2</sub> 萃取蜂胶得到的样品除含有较高含量的烷烃类物质和烷醇类物质外, 还含有苯甲酸、苯乙醇、肉桂醇、肉桂醛、愈疮木醇类物质等, 这与其杨树型植物来源和混入的蜂蜡有关。从表 4 还可以看出, 在超

临界 CO<sub>2</sub> 萃取物中, 3- 羟基-4- 甲氧基肉桂酸、肉桂酸肉桂酯、柯因、5- 甲基柯因等含量较高, 表明超临界 CO<sub>2</sub> 萃取能够将蜂胶中黄酮类化合物进行萃取, 其功效有待于进一步研究。

图5 蜂胶超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物总离子流图Fig.5 Total ion current chromatogram of extract obtained by supercritical CO<sub>2</sub> extraction

### 3 结 论

响应面法优化蜂胶超临界二氧化碳萃取工艺试验结果表明, 萃取压力、温度和二氧化碳流速显著影响萃取率( $p < 0.05$ )。综合分析回归模型确定最佳的工艺条件为: 萃取压力 33.4 MPa, 温度 45.4 °C, 二氧化碳流速 16.8 L/h。在此条件下萃取蜂胶 120 min, 萃取物的萃取率为 19.62 g/100 g 蜂胶。萃取物中含有较高含量的烷烃类物质和烷醇类物质, 以及苯甲酸、苯乙醇、肉桂醇、肉桂醛、愈疮木醇类物质、肉桂酸肉桂酯、柯因、5- 甲基柯因等。

### 参考文献:

- [1] 刘青云, 徐先祥. 蜂胶的药理作用研究进展[J]. 安徽医药, 2007, 11 (1): 1-3.
- [2] 徐响, 董捷, 李洁. 固相微萃取与 GC-MS 法分析蜂胶中挥发性成分[J]. 食品工业科技, 2008, 29(5): 57-60.
- [3] HERRERO M, CIFUENTES A, IBANEZ E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: a review[J]. Food Chemistry, 2006, 98: 136-148.
- [4] REVERCHON E, MARCO I D. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2006, 38: 146-166.
- [5] 曾志将, 樊兆斌, 谢国秀, 等. 蜂胶 CO<sub>2</sub> 超临界萃取研究[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(5): 769-771.
- [6] 韩玉谦, 隋晓, 冯晓梅, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取蜂胶有效成分的研究[J]. 精细化工, 2003, 20(7): 422-424.
- [7] 杨文雄, 高彦祥. 响应面法及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2005(2): 68-71.
- [8] XU X, GAO Y, LIU G, et al. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) oil using response surface methodology[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(7): 1223-1231.
- [9] CLIFFORD T. Fundamentals of supercritical fluids[M]. New York: Oxford University Press, 1999: 51.
- [10] BERNARDO-GIL G, ONETO C, ANTUNES P, et al. Extraction of lipids from cherry seed oil using supercritical carbon dioxide[J]. European Food Research and Technology, 2001, 212 (2): 170-174.
- [11] LEE W Y, CHO Y J, OH S L, et al. Extraction of grape seed oil by supercritical CO<sub>2</sub> and ethanol modifier[J]. Food Science and Biotechnology, 2000(9): 174-178.