

响应面分析法优化龙眼核中多酚物质提取工艺

王淑霞, 李爱梅, 张俊杰, 李存芝, 欧仕益, 张广文*

(暨南大学理工学院食品科学与工程系, 广东 广州 510632)

摘 要: 目的: 利用响应面法对龙眼核中多酚物质的提取工艺进行优化。方法: 在单因素试验基础上选取试验因素与水平, 根据 Box-Behnken Design(BBD)试验设计原理采用三因素三水平的响应面分析法, 依据回归分析确定各工艺条件的影响因素, 以龙眼核多酚物质含量为响应值作响应面和等高线图。结果: 在分析各个因素的显著性和交互作用后, 得出龙眼核多酚物质浸提的最佳工艺条件为乙醇体积分数 70%、浸提温度 77.4℃、浸提时间 4h、料水比 1:20(g/mL)、浸提 2 次, 以焦性没食子酸为标准品, 龙眼核多酚物质一次提取含量可达 21.7079mg/g。结论: 曲面回归方程与实验结果拟合性好, 此模型合理可靠, 可用于实际预测。

关键词: 龙眼核; 多酚物质; 响应面分析

Optimization of Extraction Process for Polysaccharides from Longan Seeds by Response Surface Methodology

WANG Shu-xia, LI Ai-mei, ZHANG Jun-jie, LI Cun-zhi, OU Shi-yi, ZHANG Guang-wen*

(Department of Food Science and Engineering, College of Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Objective: To optimize conditions for the extraction of polysaccharides from longan seeds. Methods: Based on single factor experiments, the optimal conditions for polysaccharide extraction were explored by Box-Behnken design (BBD) in combination with response surface methodology (RSM). Results: The optimal extraction conditions of polysaccharides were ethanol concentration of 70% (V/V), extraction temperature of 77.4 °C, extraction time of 4 h, solid-to-liquid ratio of 1:20 (g/mL) and extraction number of 2. Temperature was the most important affecting factor of polysaccharide extraction, followed by extraction time and ethanol concentration. Under such extraction conditions, the experimental yield of polysaccharides obtained after the first extraction was up to 21.7079 mg/g, which was close to the model-predicted value. Conclusion: The established regression equation for polysaccharide yield has an excellent goodness of fit. Therefore it is credible and can be used for practical prediction

Key words: longan seed; polysaccharides; response surface methodology

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)10-0035-05

中国龙眼品种资源丰富, 主要集中在广东、广西、福建、海南等几个省份, 其中广东省是我国龙眼生产和消费大省^[1], 主栽品种为石硖、储良和古山 2 号, 其中种植面积最大的石硖, 因具有高产、优质、核肉易分离等优点, 2006 年为农业部主推龙眼品种之一^[2]。近年来, 广东龙眼生产成本逐年增加, 市场价格却持续低迷, 经济效益日益下降。因此如何提高广东龙眼产业的经济效益促进龙眼产业的健康发展, 是当前广东省龙眼产业的亟待解决的问题。龙眼核系龙眼的种仁, 质量约占龙眼果实鲜质量的 17%, 由于没有进行综合利用, 每年废弃的龙眼核达几十万吨。龙眼核中含有丰

富的多酚类物质^[3-7], 酚类物质具有较活泼的羟基氢, 能提供氢与自由基反应, 生成惰性产物或较稳定的自由基, 从而中断或减慢自由基参与的连锁反应, 因此具有清除自由基的作用, 是优良的活性氧消除剂和脂质抗氧化剂, 在人体内发挥很好的生理作用, 具有抗脂质氧化、延缓机体衰老、预防心血管系统疾病、防癌、抗辐射等生物活性^[8-10]。因此开发利用龙眼核中的多酚物质是提高龙眼核经济效益的有效途径。本实验以广州本地石硖龙眼的核为原料, 对其中起主要抗氧化作用的酚类物质进行提取, 并选取乙醇体积分数、温度和时间三个因素通过响应面分析法(response surface

收稿日期: 2010-07-24

基金项目: 暨南大学引进优秀人才科研启动基金项目(51208045); 广东省科技计划项目(2007B020712005)

作者简介: 王淑霞(1983—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品添加剂。E-mail: prettysuxia2008@163.com

* 通信作者: 张广文(1975—), 男, 副教授, 博士后, 研究方向为食品添加剂。E-mail: zgwzsu@163.com

methodology, RSM)^[12-15]优化龙眼核多酚的最佳提取工艺参数, 以期在广州本地石硖龙眼核的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

石硖龙眼核购于广东省。无水乙醇(分析纯) 天津市化学试剂一厂。

粉碎机 广东省连南微型电机厂; RE-AAA 旋转蒸发仪 上海嘉鹏科技有限公司; SHZ-D(III)循环式真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司; Spectrum Lab 53 型紫外-可见分光光度计 上海棱光技术有限公司; EL-104 电子分析天平 梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司; EK-600H 电子天平 日本 AND 公司。

1.2 方法

1.2.1 龙眼多酚提取工艺流程

龙眼核→干燥粉碎→恒温振荡提取→抽滤→脱脂→浓缩→定容备用

1.2.2 测定波长的选择

取标准焦性没食子酸溶液 5mL 及空白溶液 5mL, 各加酒石酸铁液 3.0mL, 用磷酸缓冲液定容至 10mL 并摇匀, 10min 后在 200~800nm 波长范围内作光谱扫描; 取与对照品浓度相当的龙眼核样品液, 如上同样在 200~800nm 波长范围内作光谱扫描。结合焦性没食子酸和龙眼核样品液的扫描光谱图, 选择合适的测定波长。

1.2.3 标准曲线的建立

精密吸取标准溶液 0、0.7、1.4、2.1、2.8、3.5mL 分别置于编号 0、1、2、3、4、5 的 10mL 容量瓶中, 再各加酒石酸铁液 3.0mL, 磷酸缓冲液 2.0mL, 蒸馏水定容后摇匀。10min 后, 在选定的测定波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标、质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 建立线性方程。

1.2.4 多酚含量测定

分别精密量取蒸馏水、样品溶液各 1.0mL 于编号 0、1、2、3 的 10mL 容量瓶, 再各加 3mL 酒石酸铁液, 后用 pH7.5 的磷酸缓冲溶液 2.0mL, 蒸馏水定容后摇匀。10min 后在测定波长处测定吸光度。并依据线性方程求得多酚含量, 并求其平均含量。

$$\text{多酚含量}/(\text{mg/g}) = \frac{\text{多酚质量浓度} \times \text{提取液定容后体积}}{\text{龙眼核粉末干质量}} \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 测定波长的选择

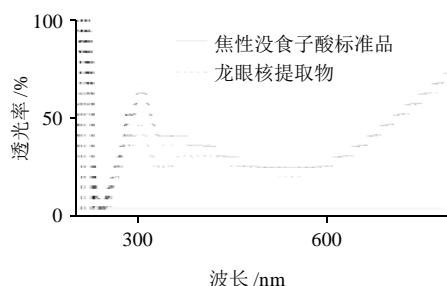


图1 焦性没食子酸溶液和龙眼核提取物 200~800nm 光谱扫描
Fig.1 Scanning spectra of pyrogalllic acid and longan seed extract

由图 1 可知, 焦性没食子酸标准溶液和龙眼核提取物在 220~260nm(240nm 处)处有最大吸收, 但其附近尖峰密集, 吸光度可能会受杂质干扰; 在波长 540nm 附近吸收峰平滑, 不会有杂质干扰, 故选 540nm 作为测定波长。

2.2 标准曲线的建立

标准曲线线性回归方程: $y = 10.402x - 0.0156$, $R^2 = 0.9993$ 。可知, 焦性没食子酸含量和吸光度在一定范围内呈线性相关, 且相关性显著。

2.3 单因素试验

2.3.1 乙醇体积分数对龙眼核多酚含量的影响

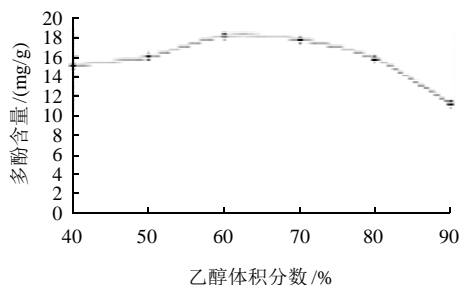


图2 乙醇体积分数对龙眼核多酚含量的影响
Fig.2 Effect of ethanol concentration on extraction rate of polysaccharides from longan seeds

如图 2 所示: 在温度 60℃、液固比 1:20(g/mL)、浸提 3h 的条件下, 随着乙醇体积分数的提高, 龙眼核多酚含量呈上升趋势, 当乙醇体积分数达到 60% 时龙眼核多酚含量最大, 之后随着体积分数的增大, 含量反而降低。这可能是因为乙醇体积分数低时, 糖类水溶性物质大量溶出; 而乙醇体积分数过高, 脂溶性物质大量溶出, 影响龙眼核多酚的溶出, 从而影响龙眼核多酚的含量。综合以上结果, 选择乙醇体积分数 60% 为佳。

2.3.2 浸提温度对龙眼核多酚含量的影响

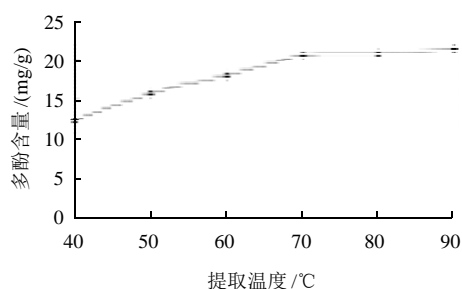


图3 浸提温度对龙眼核多酚含量的影响

Fig.3 Effect of temperature on extraction rate of polysaccharides from longan seeds

如图3所示,在乙醇体积分数60%、液固比1:20、浸提3h的条件下,浸提温度对浸提效果的影响很大,温度越高,浸提效果越好,龙眼核提取液多酚含量越高。原因是:多酚物质在乙醇水溶液中的溶解度随着温度的升高而增大,浸提液中多酚含量也随之增高;另外,温度高,则黏度减少,扩散系数增加,使浸提速度加快,浸提量也增加。但到了90℃时溶液剧烈沸腾,容易引起溶剂的损失,给操作带来不便,并且温度过高可能对多酚物质的稳定性有影响。综合以上结果,选择温度70℃为佳。

2.3.3 浸提时间对龙眼核多酚含量的影响

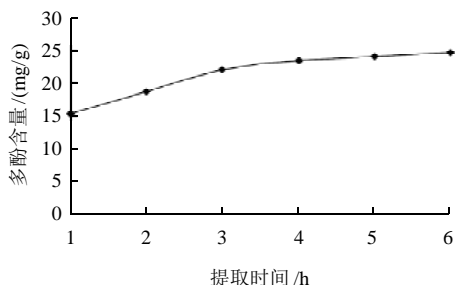


图4 浸提时间对龙眼核多酚含量的影响

Fig.4 Effect of extraction time on extraction rate of polysaccharides from longan seeds

如图4所示,在乙醇体积分数60%、温度70℃、液固比1:20的条件下,浸提1~5h内龙眼核多酚含量呈上升趋势,然后随着时间的延长多酚物质含量增加极少。由Fick扩散定律可知得率与提取时间呈正比,在一定条件下,浸提时间越长得率越高,即龙眼核多酚物质含量越高;但时间太长会使扩散次数降低,反而影响多酚物质的提取,同时可能是龙眼核经粉碎后过40目筛网,颗粒度合适,溶剂易渗入,3h后原料细胞内外浓度已接近达到平衡,3h后随着浸提时间延长,多酚物质含量增加不明显。因此,本实验选择浸提时间为3h。

2.3.4 液料比对龙眼核多酚提取的影响

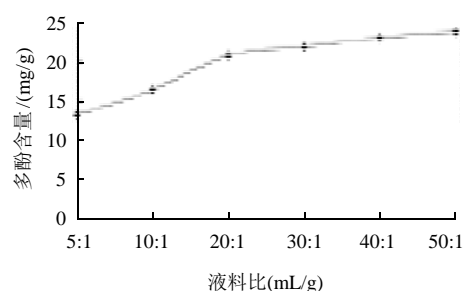


图5 液料比对龙眼核多酚含量的影响

Fig.5 Effect of material-to-liquid ratio on extraction rate of polysaccharides from longan seeds

如图5所示,在乙醇体积分数60%、温度70℃、浸提3h的条件下,龙眼核多酚物质含量随着溶剂量的增加而增加,当液料比达到1:20后,龙眼核多酚物质含量的增加不明显。为降低成本,提高效率,节约能源,本实验液料比采用20:1。

2.3.5 浸提次数对龙眼核多酚提取的影响

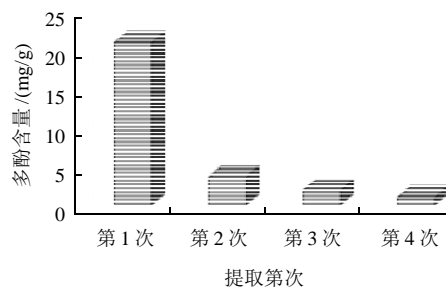


图6 浸提次数对龙眼核多酚含量的影响

Fig.6 Effect of extraction number on extraction rate of polysaccharides from longan seeds

如图6所示,在乙醇体积分数60%、温度70℃、浸提3h、液固比1:20的条件下,第1次浸提就有20.71mg/g的多酚物质溶出,并且前两次提取占4次提取总量的90%,因此从降低成本,提高效率的角度考虑提取两次为佳。

2.4 响应面法优化龙眼核多酚物质提取工艺条件

表1 响应面3因素3水平试验设计

Table 1 Factors and levels in response surface analysis

因素	水平		
	-1	0	1
A 乙醇体积分数 / %	50	60	70
B 浸提温度 / °C	60	70	80
C 浸提时间 / h	2	3	4

综合单因素试验结果,应用Design Expert 7.0.0软件,采用Box-Behnken Design建立数学模型,以乙醇体积分数(A)、浸提温度(B)、浸提时间(C)为自变量,以

多酚含量(Y)为因变量共设立了 17 个处理组。因子编码及水平见表 1, 由 Box-Behnken Design 设计方案所得的试验结果见表 2。

表 2 Box-Behnken 设计方案及响应值

Table 2 Box-Behnken experimental design and corresponding experimental polysaccharide yields

试验号	A 乙醇体积分数	B 浸提温度	C 浸提时间	多酚含量 Y /(mg/g)
1	0	0	0	20.93
2	0	-1	-1	18.69
3	-1	1	0	20.29
4	-1	0	1	20.65
5	-1	0	-1	20.17
6	1	0	-1	20.69
7	1	1	0	21.41
8	0	0	0	20.97
9	0	1	1	21.33
10	0	0	0	21.05
11	0	1	-1	20.05
12	0	0	0	21.01
13	-1	-1	0	18.73
14	0	-1	1	19.09
15	1	-1	0	18.57
16	1	0	1	21.05
17	0	0	0	20.89

2.5 数学模型的建立

按照 Design Expert 软件中的 Box-Behnken Design 模型对试验获得的多酚含量响应值进行回归, 建立二次回归模型。初步回归方程为:

$$Y = 20.97 + 0.24A + 1.00B + 0.31C + 0.32AB - 0.030AC + 0.22BC - 0.19A^2 - 1.04B^2 - 0.14C^2 \quad (2)$$

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression equation with polysaccharide yield as a function

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	14.79	9	1.64	62.37	< 0.0001	***
A	0.44	1	0.44	16.77	0.0046	**
B	8.00	1	8.00	303.69	< 0.0001	***
C	0.79	1	0.79	30.13	0.0009	**
AB	0.41	1	0.41	15.55	0.0056	**
AC	0.0036	1	0.0036	0.14	0.7226	
BC	0.19	1	0.19	7.35	0.0302	*
A ²	0.14	1	0.14	5.47	0.0519	
B ²	4.51	1	4.51	171.22	< 0.0001	***
C ²	0.089	1	0.089	3.36	0.1094	
残差	0.18	7	0.026			
失拟性	0.17	3	0.056	14.03	0.0137	*
纯误差	0.016	4	0.004			
总差	14.97	16				

注: ***.差异极度显著($P < 0.0001$); **.差异高度显著($P < 0.01$); *.差异显著($P < 0.05$)。

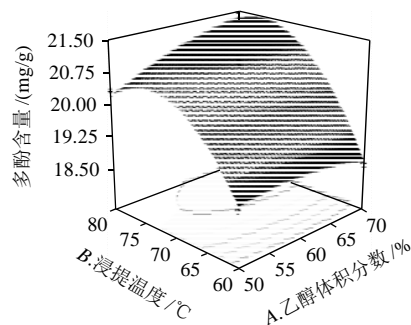
对回归方程进行检验, 相关系数 $R^2=0.9877$, $P < 0.0001$, 表明回归模型显著, 拟合程度好, 有实际应

用意义。对回归方程系数进行显著性检验(表 3), 表明浸提温度 B 及其二次项 B^2 对龙眼核浸提液多酚含量有极显著影响; 乙醇体积分数 A 、浸提时间 C 、乙醇体积分数和浸提温度的交互项 AB 对眼核浸提液多酚含量的影响高度显著; 乙醇体积分数的二次项 A^2 、浸提时间和时间的交互项 BC 对眼核浸提液多酚含量的影响显著; 其他变量的影响均不显著($P > 0.05$)。依据系数估计值 $A=0.24$ 、 $B=1.00$ 、 $C=0.31$ 可知因素的主效应关系为浸提温度 $>$ 浸提时间 $>$ 乙醇体积分数。在 $\alpha=0.05$ 显著水平下剔除不显著项后, 对模型(2)进行优化可得:

$$Y = 20.97 + 0.24A + 1.00B + 0.31C + 0.32AB + 0.22BC - 0.19A^2 - 1.04B^2 \quad (3)$$

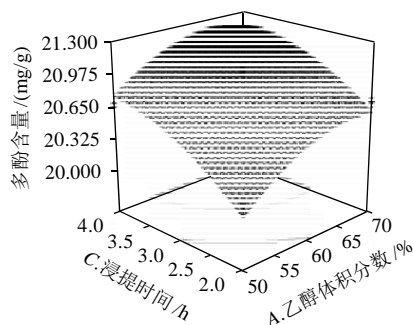
2.6 响应面分析与优化

响应面图形是响应值对各因素所构成的三维空间的曲面图, 图 7 为乙醇体积分数(A)、浸提温度(B)、浸提时间(C)在其中一个固定时, 另外两个对龙眼核浸提液多酚含量的交互影响曲面图。比较图 7 的曲面图可知, 浸提温度 B 对龙眼核浸提液多酚含量的影响最为显著, 表现为曲线较陡, 而浸提时间 C 和乙醇体积分数 A 次之, 表现为曲线较为平滑, 乙醇体积分数的影响最小, 可能是多酚物质在乙醇-水混合液中溶解性都很好, 故乙醇体积分数的变化对浸提液多酚的含量影响不显著; 比较图 7 的等高线图可以看出浸提温度和乙醇体积分数、浸提时间和时间对龙眼核浸提液多酚含量的交互影响最为显著, 表现为等高线最密集, 结果与方差分析相似。



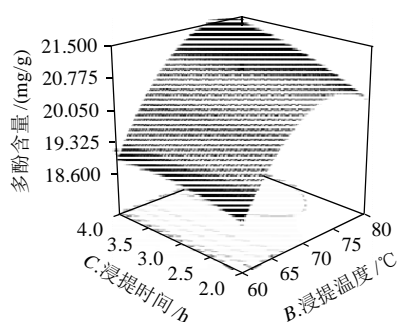
固定水平: C 提取时间 3 h。

a. 乙醇体积分数和浸提温度



固定水平: B 提取温度 70°C。

b. 乙醇体积分数和浸提时间



固定水平: A 乙醇体积分数 60%。

c. 浸提温度和浸提时间

图7 各两因素交互作用对龙眼核多酚含量的影响

Fig.7 Response surface of the effect of any two factors on extraction rate of polysaccharides from longan seeds

2.7 优化与验证

从上述回归模型中求得最优工艺条件为 $A=0.021$ 、 $B=1.329$ 、 $C=0.392$ ，即最佳浸提条件为乙醇体积分数 70.00%、浸提温度 77.43℃、浸提时间 4.00h，龙眼核浸提液多酚含量的理论值为 21.7328mg/g。由于以上最佳条件未包括在响应面优化的 17 组试验中，需进一步进行实验验证。为了操作方便，将以上条件修正为乙醇体积分数 70%、浸提温度 77.4℃、浸提时间 4h。验证实验结果表明，在最佳提取条件下，龙眼核浸提液多酚含量为 21.7079mg/g ($RSD=0.32\%$) 与预测值相差不大，说明该方程与实际情况拟合很好，充分验证了所建模型的正确性，说明响应面法适用于龙眼核多酚物质浸提工艺进行回归分析和参数优化。

3 结论

3.1 利用试验设计软件 Design Expert，采用 Box-Behnken Design 建立了乙醇体积分数 A 、浸提温度 B 和浸提时间 C 与龙眼核浸提液多酚含量之间的二次多项数学模型： $Y=20.97+0.24A+1.00B+0.31C+0.32AB+0.22BC-0.19A^2-1.04B^2$ ，回归分析表明，相关系数 $R^2=0.9877$ ， $P<0.0001$ ，表明回归模型显著，拟合程度好，有实际应用意义；通过模型系数显著性检验，得到因素的主效应关系为：浸提温度>浸提时间>乙醇体积分数。

3.2 利用模型的响应面对影响龙眼核浸提液多酚含量的

关键因子及其相互作用进行探讨，优化出龙眼核浸提液多酚浸提工艺的最佳条件为乙醇体积分数 70%、浸提温度 77.4℃、浸提时间 4h。龙眼核浸提液多酚含量的预测值为 21.7328mg/g，验证值为 21.7079mg/g。调整确定系数 $R^2=0.9718$ ，证明此模型是合理可靠的，可用于实际预测。

参考文献：

- [1] 潘学文, 曾莲, 李建光, 等. 广东省龙眼产业现状与发展对策[J]. 广东农业科学, 2009(1): 124-128.
- [2] 古小玲, 李玉萍, 梁伟红, 等. 中国龙眼产业发展概况[J]. 热带农业科学, 2008,24(9): 470-474.
- [3] 朱纯, 王海燕, 陈青. 龙眼核棕色素的提取及稳定性研究[J]. 山地农业生物学报, 2003, 22(1): 45-48.
- [4] 文良娟, 李英军, 毛慧君, 等. 龙眼核的营养成分及其活性物质的抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 243-246.
- [5] SOONG Y Y, BARLOW P J. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from Longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) seed by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1085(2): 270-277.
- [6] ZHENG Gongming, XU Liangxiong, WU Ping, et al. Polyphenols from Longan seeds and their radical-scavenging activity[J]. Food Chemistry, 2009, 116(2): 433-436.
- [7] NAGENDRA P K, YANG En, YI Chun, et al. Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of Longan fruit per carp[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2009, 10(2): 155-159.
- [8] SACHINDRA N M, AIRANTHI M K W A, HOSOKAWA M, et al. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of extracts from Indian seaweeds[J]. J Food Sci Technol, 2010, 47(1): 94-99.
- [9] ALVAREZ-SUAREZ J M, TULIPANI S, DIAZ D, et al. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(8/9): 2490-2499.
- [10] PAN Yingming, WANG Kai, HUANG Siqin, et al. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of Longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel[J]. Food Chemistry, 2008, 106(3): 1264-1270.
- [11] 展锐, 库尔班, 苟萍, 等. 火绒草提取物抗氧化火星的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(03): 153-159.
- [12] 余清, 许慧星, 肖小蓉, 等. 基于响应面分析法优化的乌饭树叶总黄酮提取条件[J]. 食品科学, 2008, 24(1): 93-98.
- [13] 肖卫华, 韩鲁佳, 杨增玲, 等. 响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究[J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(5): 52-56.
- [14] 张俊杰, 王淑霞, 张广文, 等. 响应面分析法优化米团花黄色素提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 259-262.
- [15] BENAVIDES A, BASSARELLO C, MONTORO P. Flavonoids and isoflavonoids from *Gymnasiums agittatum*[J]. Phytochemistry, 2007, 68(9): 1277-1284.