

响应面分析法优化超声波提取槟榔原花青素工艺

陈 健, 孙爱东*, 高雪娟, 潘 娜
(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘 要: 利用响应面分析法(RSM)对槟榔原花青素的提取工艺进行优化。在单因素试验基础上选取试验因素与水平, 根据中心组合(Box-Behnken)试验设计原理采用四因素三水平的响应面分析法对各个因素的显著性和交互作用进行分析, 结果表明: 槟榔干原花青素提取的最佳工艺条件为超声功率 600W、超声时间 16min、料液比 1:40(g/mL)、丙酮体积分数 81%, 在此条件下, 测定花青素提取率最高达到 3.41%。

关键词: 槟榔; 原花青素; 提取; 响应面法

Process Optimization for Ultrasonic-assisted Solvent Extraction of Proanthocyanidins from *Areca catechu* L. Fruit by Response Surface Analysis

CHEN Jian, SUN Ai-dong*, GAO Xue-juan, PAN Na
(College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The purpose of the current study was the optimization of the process for the solvent extraction of proanthocyanidins from *Areca catechu* L. fruit with ultrasonic assistance. First of all, the selection of extraction solvent was investigated. Secondly, one-factor-at-a-time (OFAT) experiments were done to figure out the effects of five process parameters for the extraction of proanthocyanidins with acetone aqueous solution, including acetone concentration in aqueous solution, extraction temperature, material-to-liquid ratio, ultrasonic power and ultrasonic treatment time on the extraction rate of proanthocyanidins. Thirdly, the relationship of the extraction rate of proanthocyanidins with the other four extraction conditions except extraction temperature was mathematically modeled on the basis of a four-variable, three-level central composite design (CCD) with 26 runs. Finally, the model established was subjected to analysis of variance to test the significance of various variables and response surface analysis to understand their pairwise interactive effects on the function. From the above investigations and analysis, we determined the optimum conditions for the extraction of proanthocyanidins from *Areca catechu* L. fruit to be: ultrasonic power of 600 W, ultrasonic treatment time of 16 min, the ratio of material to solvent of 1:40 (g/mL) and acetone concentration of 81%. Under these conditions, the maximum extraction rate of proanthocyanidins was up to 3.41%.

Key words: *Areca catechu* L.; proanthocyanidins; extraction; response surface methodology

中图分类号: Q946.49

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)04-0082-05

原花青素(proanthocyanidins, PC)是植物界中广泛存在的一大类多酚类化合物, 其基本组成单位是黄烷-3-醇和黄烷-3,4-二醇^[1]。经多年药理学研究和临床应用发现: 原花青素对自由基有很强的捕捉消除能力, 是一种很好的氧自由基清除剂, 具有抑制红细胞膜和低密度脂蛋白脂质过氧化、防止血小板凝聚、防止心脑血管疾病等功能。目前在食品、保健品、药品、化妆品等领域已有所应用, 在欧美等国家享有“皮肤维生素”和“口服化妆品”的美誉^[2]。

槟榔(*Areca catechu* L.)是棕榈科植物的成熟种子,

主产于我国海南、广东、广西、云南、福建和台湾等省区, 以及印度和马来西亚等国。槟榔是我国四大南药之一。医学家李时珍在《本草纲目》中记载, 槟榔具有“下水肿、通关节、健脾调中、治心痛积聚”等功效, 以及治疗青光眼和降血压的效果^[3]。槟榔是海南省热带作物中仅次于橡胶的第二大经济作物, 也是海南省第二大支柱产业。然而, 海南的槟榔主要被加工成槟榔干销往内地, 基本上没有对这一特色热带作物资源进行深加工。

响应面分析法(response surface methodology, RSM)是利用合理的试验设计, 采用多元二次回归方程

收稿日期: 2010-05-06

作者简介: 陈健(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物生理活性物质的开发与利用。

E-mail: chenjian19850702@163.com

* 通信作者: 孙爱东(1968—), 女, 教授, 博士, 研究方向为天然产物生理活性物质的开发与利用。

E-mail: adsun68@163.com

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佳工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法,它与过去广为使用的正交试验设计法不同,具有试验周期短,求得的回归方程精度高,能研究几种因素间交互作用等优点^[5]。

目前,槟榔的研究主要集中在槟榔碱的提取上,槟榔内的活性成分原花青素的研究未见相关报道^[4]。本研究以海南槟榔果作为原料,对其中原花青素的提取工艺进行探讨,并利用响应面分析对提取参数进行优化,为槟榔果的深度开发和综合利用提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

槟榔果采自海南省万宁市;丙酮、甲醇、乙醇、正丁醇、盐酸和硫酸亚铁铵溶液均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

SP22100UV型紫外-可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;RE252AA旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;DK29821型电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司;DF204电热鼓风干燥箱 北京西城区医疗器械二厂;JAC-600超声波中药处理机 山东济宁超声电器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 槟榔原花青素的提取

将洗净的槟榔于烘箱中60℃干燥24h,用粉碎机将干燥的槟榔干粉碎,过40目筛。精确称取1.0g槟榔干粉末于100mL容量瓶中,按要求加入一定量的溶剂,在一定温度下超声波提取一定时间,减压过滤,得到原花青素类物质提取液。

1.3.2 槟榔原花青素的测定

本实验采用正丁醇-盐酸法测定槟榔中原花青素的含量。取萃取液加入100mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度。取上述溶液1mL于具塞试管中,依次加入6mL正丁醇-盐酸(V/V=95:5)及0.2mL 2%硫酸亚铁铵溶液(24g硫酸亚铁铵溶于水,定容于1000mL),摇匀后,在95℃的水浴中加热40min,然后用自来水迅速冷却。用1mL甲醇代替提取液重复以上操作,作为参比液。在540nm波长处测定其吸光度^[6],并计算原花青素的提取率。

$$\text{提取率} \% = \frac{7.2An}{0.366m} \times 100$$

式中:A为吸光度;n为稀释倍数;m为样品质量/mg;0.366为A_{1%^{1cm}}在540nm波长处原花青素的吸光度。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

精确称取1.0g槟榔干粉末15份,分别以不同体积

分数的丙酮、乙醇、甲醇水溶液作为提取剂,室温下提取。

丙酮、甲醇、乙醇均为良好的提取溶剂,有研究表明,丙酮-水混合溶剂能显著地提取更多原花青素^[7]。丙酮、甲醇、乙醇水溶液对槟榔原花青素的提取效果见图1。由图1可知,丙酮水溶液的提取效果优于其他二者,与上述结论一致。因此,选用丙酮作为槟榔中原花青素的提取溶剂。

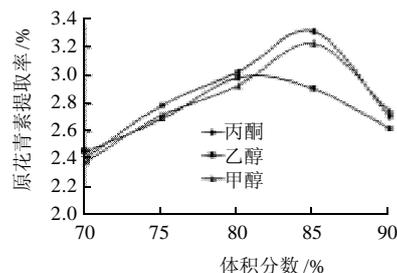


图1 不同溶剂对槟榔原花青素提取率的影响
Fig.1 Effect of different solvents on extraction rate of proanthocyanidins from betel nut

2.2 超声波提取槟榔原花青素的单因素试验

以丙酮为提取剂,在其他条件一致的情况下,分析丙酮体积分数、提取温度、料液比、超声功率及超声时间等因素对原花青素粗提液提取效果的影响。

2.2.1 丙酮体积分数的确定

精确称取1.0g槟榔干粉末5份,料液比1:40(g/mL),在同一超声功率、相同超声时间下,考察不同的丙酮体积分数对原花青素提取率的影响。

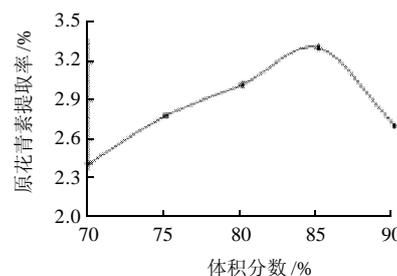


图2 丙酮不同体积分数对槟榔原花青素提取率的影响
Fig.2 Effect of acetone concentration on extraction rate of proanthocyanidins from betel nut

如图2所示,随着丙酮体积分数的增加,提取率相应增加,体积分数为85%时提取效果最好,当大于85%时,呈现下降趋势。这有可能是由于增大了提取液的体积分数,使原花青素的氧化速率加快,从而降低原花青素的提取率^[8]。

2.2.2 提取温度的确定

精确称取1.0g槟榔干粉末5份、80%丙酮作为提取剂、料液比1:40(g/mL),在同一超声功率、相同超声时间下,考察不同温度对原花青素提取率的影响。

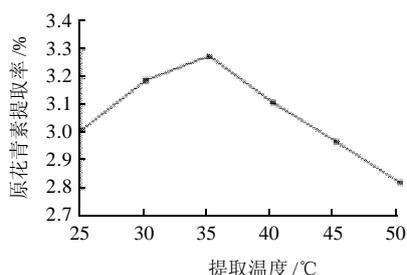


图3 不同提取温度对槟榔原花青素提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on extraction rate of proanthocyanidins from betel nut

如图3所示,当温度低于35℃,随着温度的升高,溶剂提取率增加,但趋势缓慢。当温度高于35℃,提取率反而下降。考虑到温度越高,丙酮挥发越大,影响溶剂与溶质的传质,溶剂消耗严重,故选择35℃作为提取的最适温度^[9]。

2.2.3 料液比的确定

准确称取1.0g 槟榔干粉末5份、80% 丙酮作为提取剂,在同一超声功率、相同超声时间下,考察不同的料液比对原花青素提取率的影响。

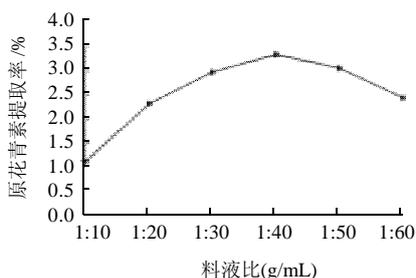


图4 不同料液比对槟榔原花青素提取率的影响

Fig.4 Effect of the ratio of material to extraction solvent on extraction rate of proanthocyanidins from betel nut

如图4所示,随溶剂用量的增加,原花青素浸提量增加,但溶剂用量达到一定程度时,槟榔中的原花青素接近全部溶出,再增加溶剂用量不仅不能增加提取量,反而会增加生产成本。当料液比为1:40时,原花青素的提取率基本达到最大值^[10]。

2.2.4 超声功率的确定

精确称取1.0g 槟榔干粉末5份、80% 丙酮作为提取剂、料液比1:40(g/mL),在相同时间下考察不同的超声功率对原花青素得率的影响。

如图5所示,随着超声功率的提高,原花青素提取率也提高,当超声功率为600W时原花青素提取率最高,但超声功率过大反而引起原花青素提取率下降,说明超声功率对原花青素提取率的影响是双向性的,既有正效应又有负效应。试验中应避免超声波功率过大而引起提取率下降,同时超声功率升高会引起温度升高。综合考虑后,选择功率600W^[11]。

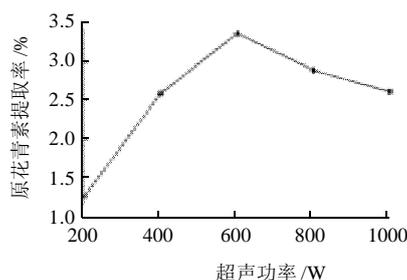


图5 不同超声功率对槟榔原花青素提取率的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic power on extraction rate of proanthocyanidins from betel nut

2.2.5 超声时间的确定

精确称取1.0g 槟榔干粉末5份、80% 丙酮作为提取剂、料液比1:40(g/mL),在相同超声功率下考察不同的超声时间对原花青素提取率的影响。

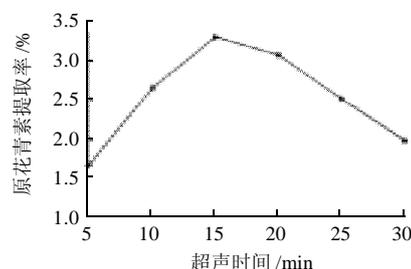


图6 不同超声时间对槟榔原花青素提取率的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic treatment time on extraction rate of proanthocyanidins from betel nut

如图6所示,随着超声时间的延长,原花青素的溶出量增加。超声时间15min时,原花青素提取率最高,但15min后,超声时间的延长反而使原花青素提取率下降,这是因为超声时间的延长增加了超声波的作用强度,破坏了原花青素母核的结构,导致原花青素提取率下降,故选择超声时间为15min^[12]。

2.3 响应面分析法优化工艺

2.3.1 响应面分析因素水平的选取

表1 超声波提取槟榔原花青素响应面分析因素与水平

Table 1 Coded values of corresponding actual values of independent variables in response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
X ₁ 超声时间/min	10	15	20
X ₂ 超声功率/W	400	600	800
X ₃ 料液比(g/mL)	1:35	1:40	1:45
X ₄ 丙酮体积分数/%	80	85	90

根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理^[13],综合单因素影响试验结果,选取丙酮体积分、料液比、超声时间、超声功率对原花青素提取影响显著的4个因素,在单因素试验基础上采用四因素三水平的响应面分析方法,因素与水平见表1。

2.3.2 响应面试验设计及结果

表2 超声波提取槟榔原花青素响应面分析试验设计及结果
Table 2 Experimental design for response surface analysis and corresponding experimental data

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y 花青素提取率/%
1	0	0	1	1	2.79
2	-1	1	0	0	2.76
3	0	0	0	0	3.41
4	-1	0	-1	0	2.53
5	1	0	-1	0	2.53
6	-1	0	0	-1	2.51
7	-1	0	1	0	3.02
8	0	-1	0	-1	1.60
9	1	0	0	-1	1.49
10	0	0	0	0	3.41
11	0	0	1	-1	3.02
12	0	0	-1	1	2.78
13	1	0	0	1	1.25
14	0	0	0	0	3.41
15	0	1	0	1	2.56
16	-1	-1	0	0	1.76
17	1	1	0	0	1.89
18	0	-1	1	0	1.87
19	0	1	1	0	2.22
20	0	1	0	-1	2.42
21	0	0	0	0	3.41
22	0	-1	-1	0	2.49
23	1	-1	0	0	1.93
24	-1	0	0	1	1.15
25	0	1	-1	0	2.31
26	0	0	-1	-1	3.15
27	0	0	0	0	3.41
28	0	-1	0	1	1.21
29	1	0	1	0	2.38

选用中心复合模型, 做四因素三水平共 29 个试验点(5 个中心点)的响应面分析试验。这 29 个试验点分为两类: 其一是析因点, 自变量取值在各因素所构成的三维顶点, 共有 24 个析因点; 其二是零点, 为区域的中心点, 零点试验重复 5 次, 用以估计试验误差。槟榔原花青素提取率为响应值(指标值)。

采用 Design Expert 7.0 软件对试验数据进行回归分析, 由此可求出影响因素的一次效应、二次效应及其交互效应的关联方程^[4], 对超声波辅助提取槟榔原花青素的影响因素进行更深入的研究和条件优化, 并做出响应面图。多元回归拟合分析得到槟榔原花青素提取率与各因素变量的二次方程模型为: $Y=2.8756 + 0.4532X_1 + 0.183X_2 + 0.1734X_3 - 0.0764X_4 + 0.2342X_1X_2 + 0.634X_1X_3 - 0.27X_1X_4 - 0.423X_2X_3 + 0.112X_2X_4 - 0.4453X_3X_4 - 0.182X_2X_4 - 0.493X_2^2$ 。

2.3.3 回归方程方差分析

从表 3 可以看出, 用上述回归方程描述各因素与响应值之间的关系时, 其因变量和全体自变量之间的线性关系显著, 模型的显著水平远远小于 0.05, 此时 Quadratic 回归方差模型极显著。从回归方程各项的方差分析结果还可以看出方程的失拟项较小, 表明该方程对试验拟合情况好、误差小, 因此可用该回归方程代替试

验真实点对试验结果进行分析和预测^[15]。从表 3 还可以看出, 对提取率影响的大小依次为超声功率(X₂)、超声时间(X₁)、料液比(X₃)、丙酮体积分数(X₄)。

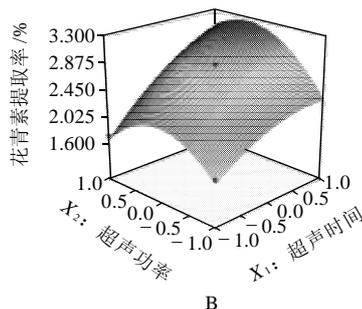
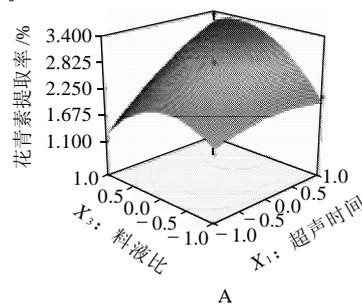
表3 方差分析表
Table 3 Analysis of variance table

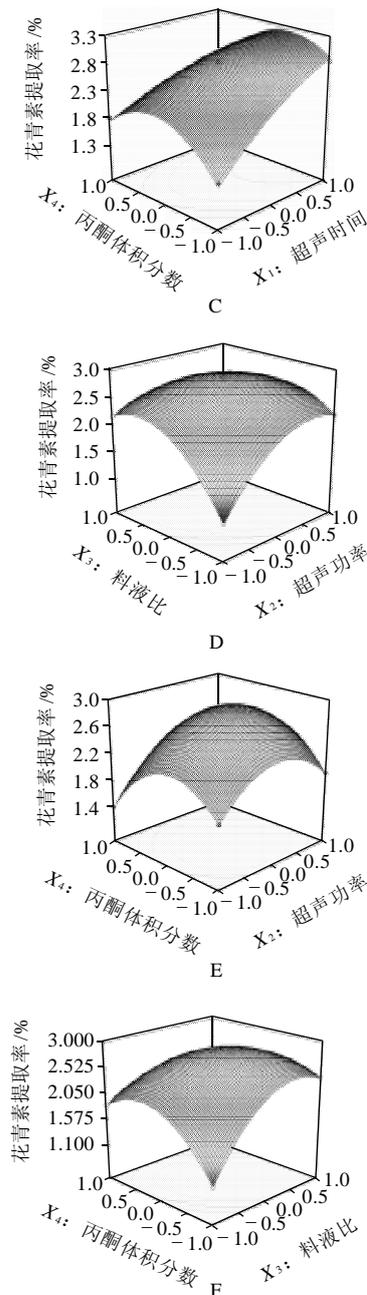
方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	14	15.443	1.113	512.04	< 0.0001	**
X ₁	1	1.913	1.913	862.15	< 0.0001	**
X ₂	1	3.082	3.082	1380.12	< 0.0001	**
X ₃	1	0.354	0.354	141.23	< 0.0001	**
X ₄	1	0.069	0.069	30.15	0.0012	**
X ₁ X ₂	1	3.243	3.243	1634.53	< 0.0001	**
X ₁ X ₃	1	0.135	0.135	56.82	0.0228	*
X ₁ X ₄	1	0.165	0.165	60.75	0.0301	*
X ₂ X ₃	1	2.668	2.668	1560.23	< 0.0001	**
X ₂ X ₄	1	2.367	2.367	1345.43	< 0.0001	**
X ₃ X ₄	1	0.0155	0.015	5.32	0.2346	
X ₁ ²	1	1.324	1.324	760.23	< 0.0001	**
X ₂ ²	1	6.326	6.326	3023.43	< 0.0001	**
X ₃ ²	1	0.543	0.543	200.65	< 0.0001	**
X ₄ ²	1	9.481 × 10 ⁻⁴	9.481 × 10 ⁻⁴	0.12	0.7435	
总残差	9	0.016	1.778 × 10 ⁻³			
失拟误差	7	0.015	2.143 × 10 ⁻³			
纯误差	2	2.600 × 10 ⁻³	1.300 × 10 ⁻³			
总和	17	15.446				

注: **.P < 0.01, 差异极显著; *.P < 0.05, 差异显著。

2.3.4 响应面曲面分析

RSM 方法的图形是特定的响应面(Y)与对应的因素 X₁、X₂、X₃、X₄ 构成的一个三维空间在二维平面上的等高图, 每个响应面对其中两个因素进行分析, 另外两个因素固定在零水平。从中可以直观地反映各因素对响应值的影响, 从试验所得的响应面分析图上可以找到它们在提取过程中的相互作用^[16]。回归优化响应面图分别见图 7。





A. 超声时间与料液比; B. 超声时间与超声功率; C. 超声时间与丙酮体积分数; D. 超声功率与料液比; E. 超声功率与丙酮体积分数; F. 料液比与丙酮体积分数。

图7 各因素交互作用等高线和响应面图

Fig.7 Response surfaces of the pairwise interactive effects of four extraction conditions on extraction rate of proanthocyanidins from betel nut

图7直观地反映了各因素对响应值的影响,比较图7中6个图可知:超声波功率(X_2)对槟榔原花青素提取率的影响最为显著,表现为曲线相对较陡;其次为超声时间(X_1),而料液比(X_3)、丙酮体积分数(X_4)表现为曲线较为平滑,随其数值的增加或减少,响应值变化较小。

根据所得到的模型,可预测在稳定状态下的最优工艺条件为在室温条件下,超声功率596W、超声时间

15.42min、料液比1:39.67(g/mL)、丙酮体积分数80.86%,此条件下,原花青素提取率理论可达3.42%。

2.3.5 验证实验

为了检验实验结果是否与真实情况相一致,根据上述结果进行近似验证实验,考虑到实际操作的便利,将最佳工艺条件修正为室温条件下,超声功率600W、超声时间16min、料液比1:40(g/mL)、丙酮体积分数81%,在此条件下进行3次平行实验,原花青素平均提取率3.41%。与理论预测值相比,其相对误差约为0.01%。而且重复性也很好,说明优化结果可靠。

3 结论

采用超声波辅助提取技术对槟榔原花青素进行提取,通过单因素试验和Box-Behnken试验设计以及响应面分析对超声波提取工艺进行优化,得出较优工艺条件为室温条件下,超声功率600W、超声时间16min、料液比1:40(g/mL)、丙酮体积分数81%,在此工艺条件下,槟榔原花青素提取率为3.41%,并得到槟榔原花青素总提取率与超声波处理各因素变量的二次方程模型,该模型回归极显著,对试验拟合较好。

参考文献:

- [1] 吕丽爽.天然抗氧化剂低聚原花青素的研究进展[J].食品科学,2002,23(2):147-150.
- [2] BAGCHI D, BAGCHI M, STOHS S J, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidins extract: important in human health and disease prevention[J]. Toxicology, 2008, 148(2/3): 187-197.
- [3] 李璐璐. 南药槟榔用处多[J]. 首都医药, 2009(5): 49-50.
- [4] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3): 91-94.
- [5] 晏小霞. 海南槟榔产业发展现状分析[J]. 中国热带农业, 2006(3): 12-13.
- [6] 傅武胜, 蔡一新, 林丽玉, 等. 铁盐催化比色法测定葡萄籽提取物中的原花青素[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(20): 57-61.
- [7] YAMAKOSHI J, SAITO M, KATAOKA S, et al. Safety evaluation of proanthocyanidinrich extract from grape seeds[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 40(5): 599-607.
- [8] 肖付才, 李华, 王华. 葡萄籽原花青素的提取和检测方法[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(20): 165-169.
- [9] 刘丽萍, 赵祥颖, 刘建军. 葡萄籽原花青素的功能及提取工艺[J]. 食品与药品, 2006, 8(12): 17-21.
- [10] 杨磊, 苏文强, 李艳杰, 等. 正交试验法优选低聚原花青素的提取工艺[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(2): 57-60.
- [11] 史振民, 张祝莲, 杨文选, 等. 超声法提取芦丁操作条件的最佳选择[J]. 延安大学学报: 自然科学版, 2005, 18(3): 46-49.
- [12] 赵兵. 循环超声提取技术在中药提取中的应用[C]. 西安: 中药提取技术(国际)研讨会会议论文, 2005: 26-29.
- [13] MURALIDHAR R V, CHIRUMAMILA R R. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources[J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 9(1): 17-23.
- [14] KALIL S J, MAUGERI F, RODRIGUES M I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization[J]. Process Biochemistry, 2000, 35(6): 539-550.
- [15] 魏安池, 代红丽. 响应面分析法优化红花黄色素提取工艺条件[J]. 食品与机械, 2006, 22(2): 11-13.
- [16] 董发明, 白喜婷. 响应面法优化超声提取杜仲雄花中黄酮类化合物的工艺参数[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 227-231.