

响应面分析法优化蓝靛果花色苷纯化工艺研究

刘敬华¹,王振宇^{1,2,*},邓心蕊³

(1.东北林业大学林学院,黑龙江哈尔滨 150040;

2.哈尔滨工业大学食品科学与工程学院,黑龙江哈尔滨 150090;

3.东北林业大学林学院,黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:利用响应面法对蓝靛果花色苷的纯化工艺进行优化。在单因素实验基础上,选取上样浓度、径长比、洗脱流速为自变量,以花色苷的纯度为响应值,利用Box-Behnken中心组合设计原理和响应面分析法,研究各自变量及其交互作用对纯度的影响,获得的最佳工艺条件为:上样浓度2.5mg/mL、径长比1:25、洗脱剂浓度为70%的乙醇、洗脱流速3mL/min,获得的花色苷的纯度为19.54%。

关键词:蓝靛果,花色苷,X-5,纯化,纯度,响应面

Optimization of purification technique of anthocyanin from *Lonicera Edulis* via response surface methodology (RSM)

LIU Jing-hua¹, WANG Zhen-yu^{1,2,*}, DENG Xin-rui³

(1.School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2.School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China;

3.School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Response surface methodology (RSM) was used to optimize purification of anthocyanin from *Lonicera edulis*. Based on single factor tests, three purification parameters including sample concentration, ratio of diameter to length, elution flow rate were optimized through Box-Behnken central combination design and RSM for achieving maximum the purification of anthocyanin. The interaction of the respective variables and their influence on the purification were studied to obtain the optimum purification conditions of anthocyanin were as follows: the sample concentration 2.5mg/mL, diameter to length ratio 1:25, eluent concentration 70% ethanol, elution velocity 3mL/min. Under such conditions, the purity of anthocyanins was up to 19.54%.

Key words: *Lonicera edulis*; anthocyanin; X-5; purification; purity; response surface methodology (RSM)

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)18-0280-04

蓝靛果 (*Lonicera edulis*) 又名黑瞎子果、山茄子果等, 是一种药食同源的新兴野生浆果。蓝靛果营养价值丰富, 其中V_p、V_{pp}比一般果蔬含量高数百倍, V_c含量比苹果多数十倍, 深受国内外市场的欢迎, 具有“第三代水果”之称^[1]。蓝靛果花色苷作为一种天然无毒的食用色素被广泛应用于食品工业, 研究表明, 它还具有抗病毒、抗氧化、抗癌、保护视力等^[2-5]作用。虽然对蓝靛果花色苷纯化的研究很多, 但由于其纯化过程复杂且较难控制, 因此这些研究多停留在单因素阶段, 而对其纯化工艺采用进一步的响应面分析法的研究较少。

响应面分析法^[6-8] (response surface methodology, RSM) 是一种结合实际研究应用数学建模优化反应

条件和加工工艺参数的有效方法, 具有实验周期短, 获得的回归方程精度高, 能研究几种因素间交互作用等优点, 被广泛应用于多学科多领域。本实验拟在单因素实验的基础上, 利用响应面分析法对蓝靛果花色苷纯化工艺条件进行优化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蓝靛果 采摘于大兴安岭; 无水乙醇、乙酸钠、乙酸、氯化钾、盐酸 均为分析纯; 大孔树脂 (AB-8, X-5, D101, NKA-9, NKA) 均购自南开大学树脂厂。

HANGPING FA2004型电子分析天平 上海良平仪器仪表有限公司; RE-52A型旋转蒸发器、PB-10型精密pH计 上海亚荣生化仪器厂; TDL-5-W型离心机 上海科兴仪器公司; 722S型可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; 层析柱 (规格Φ20×600mm)。

1.2 实验方法

1.2.1 花色苷含量的测定 (pH示差法) 将样品稀释

收稿日期: 2013-02-19 * 通讯联系人

作者简介: 刘敬华 (1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品。

基金项目: 哈尔滨市科技攻关计划项目 (2011HG6AN107)。

至一定浓度,取稀释后样品1mL,加入pH为1.0、4.5的缓冲溶液9mL,缓冲液的配制方法参照文献[9],室温下,以蒸馏水为空白,于510nm下和700nm波长下测定其吸光度,计算其浓度。

稀释后样品的吸光度 ΔA 计算式为:

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{pH_{1.0}} - (A_{510} - A_{700})_{pH_{4.5}}$$

花色苷浓度计算式为:

$$C = (\Delta A \times M_w \times DF) / (\epsilon \times L)$$

式中,C-花色苷含量,mg/mL; ΔA -吸光度; M_w -矢车菊3-葡萄糖苷的相对分子质量,449.2;DF-样品总的稀释倍数; ϵ -矢车菊3-葡萄糖苷的摩尔消光系数,26900mol⁻¹;L-比色皿光程(一般为1cm)。

花色苷纯度的计算公式为:

$$\text{纯度}(\%) = [(C \times V) / m] \times 100$$

式中,C-花色苷的含量,mg/mL;V-花色苷的体积,mL;m-花色苷干物质的质量,mg。

花色苷回收率的计算公式为

$$\text{回收率}(\%) = [(C_1 V_1) / (C_0 V_0)] \times 100$$

式中,C₀-上样液浓度,mg/mL;V₀-上样液体积,mL;C₁-收集液浓度,mg/mL;V₁-收集液体积,mL。

1.2.2 蓝靛果花色苷纯化工艺流程 树脂的处理→装柱→上样→静置吸附2h→水洗→乙醇洗脱液洗脱→洗脱液旋转蒸发浓缩→40℃烘干→测量其纯度。

树脂的处理参照文献[10]中的方法进行,湿法装柱,将水面调至略高于树脂面,将自制蓝靛果提取液作为上样液,用注射器吸取并沿层析柱壁缓慢注入层析柱中进行上样,速度以不破坏树脂柱面为宜,上样完毕,静置2h,使花色苷被树脂充分吸附,用蒸馏水进行水洗至流出液澄清为止,目的是将杂质及未吸附上的花色苷冲洗去除,将蒸馏水面放至与树脂柱面相平,加入2BV乙醇洗脱液洗脱,收集洗脱液,在40℃下置于平皿中烘干,用钥匙刮下一部分,用万分之一天平取12~15mg左右测量纯度,为了更好地溶解先加入少量乙醇,然后用蒸馏水定容至50mL进行测定。

1.2.3 树脂的筛选 将处理好的五种大孔树脂AB-8、X-5、D101、NKA-9、NKA分别装入层析柱中,径长比1:20,上样浓度为1.42mg/mL,上样体积为10mL,用2BV的60%乙醇洗脱液进行洗脱,洗脱流速为1mL/min,收集洗脱液比较其纯度和回收率,筛选出最佳树脂。

1.2.4 单因素实验

1.2.4.1 上样液浓度对纯度的影响 通过上述实验,用X-5树脂进一步进行上样浓度的筛选,将花色苷粗提液浓缩至一定浓度,然后将其稀释为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5mg/mL分别上柱,径长比1:20,上样体积为10mL,用2BV的60%乙醇进行洗脱,洗脱流速为1mL/min,收集洗脱液比较其纯度,筛选出最佳上样浓度。

1.2.4.2 径长比对纯度的影响 将X-5树脂按径长比分别为1:10、1:15、1:20、1:25、1:30装入各层析柱中,将花色苷粗提液浓度调节至2.5mg/mL进行上样,上

样体积为10mL,用2BV的60%乙醇进行洗脱,洗脱流速为1mL/min,收集洗脱液比较其纯度,筛选出最佳径长比。

1.2.4.3 洗脱液乙醇浓度对纯度的影响 将X-5树脂按径长比1:25装入层析柱中,上样浓度为2.5mg/mL,上样体积为10mL,用2BV的乙醇进行洗脱,洗脱流速为1mL/min,调节乙醇浓度为别为10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,收集洗脱液比较其纯度,筛选出最佳乙醇浓度。

1.2.4.4 洗脱流速对纯度的影响 将X-5树脂按径长比1:25装入层析柱中,调节上样浓度为2.5mg/mL,上样体积为10mL,洗脱流速分别1、2、3、4mL/min,用2BV的70%乙醇进行洗脱,比较其纯度,筛选出最佳洗脱流速。

1.2.5 响应面实验设计 利用Minitab 16软件根据Box-Behnken的中心组合实验设计原理,综合单因素影响实验结果,选择影响较大的三个因素上样浓度、径长比、洗脱流速进行三因素三水平的响应面分析。实验设计中的水平及编码见表1。

表1 响应面实验因素水平编码表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

因素	编码水平		
	-1	0	1
A 上样浓度(mg/mL)	2.0	2.5	3.0
B 径长比	1:20	1:25	1:30
C 洗脱流速(mL/min)	2	3	4

2 结果与分析

2.1 最佳树脂的筛选

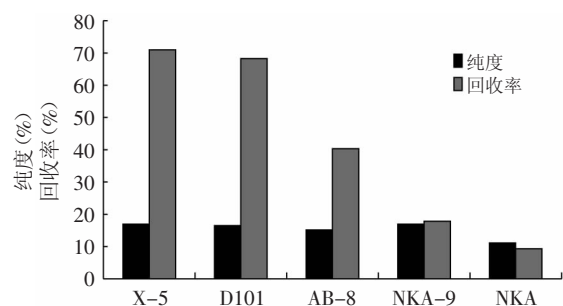


图1 不同树脂的纯度及回收率的比较

Fig.1 Comparison of purity and recovery rate for different resin

由图1可知,纯度方面,X-5、D101的纯度相当,AB-8略小,NKA-9略高,而NKA最小;回收率方面,X-5、D101较高,分别为71.03%和68.26%,AB-8次之,而NKA-9、NKA的回收率较低。这与树脂的极性有关,X-5、D101、AB-8为非极性或弱极性树脂,吸附率及解析率较高,NKA-9和NKA为强极性树脂,吸附率高,解析率低。综合考虑,选择X-5为纯化蓝靛果花色苷的最佳树脂,这和文献[10]的研究结果是一致的。

2.2 单因素实验

2.2.1 上样液浓度对纯度的影响 由图2可知,随着

上样浓度的增加,洗脱液中花色苷的纯度逐渐增加,当上样浓度为2.5mg/mL时,洗脱液中花色苷的纯度达到最大,当上样浓度继续增加,花色苷的纯度反而下降,当上样浓度较小时,洗脱时残留于树脂中的花色苷较多,因此洗脱下来的花色苷纯度不高,然而树脂的吸附能力有限,如果上样浓度过大,未吸附上的花色苷就会越多,花色苷的纯度同样会不高。

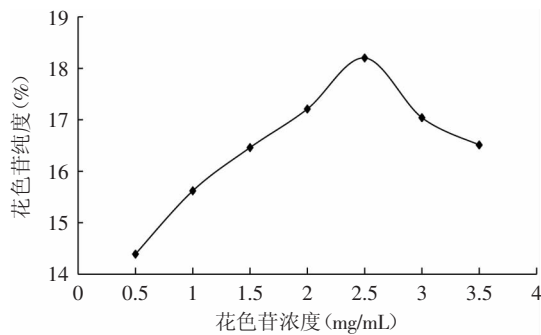


图2 不同上样液浓度对花色苷的纯度的影响

Fig.2 Effect of different sample concentration on purity of anthocyanin

2.2.2 径长比对纯度的影响 由图3可以看出,花色苷的纯度随着径长比的增加,纯度逐渐增加,当径长比达到1:25时,花色苷的纯度达到最大,径长比继续增加,花色苷纯度开始有所下降,这是因为径长比较小时,不能充分对花色苷进行吸附,导致水洗时花色苷被大量冲洗下来,因此纯度降低,当径长比较大时,花色苷不能被完全洗脱下来,部分残留于树脂中,纯度同样会下降。

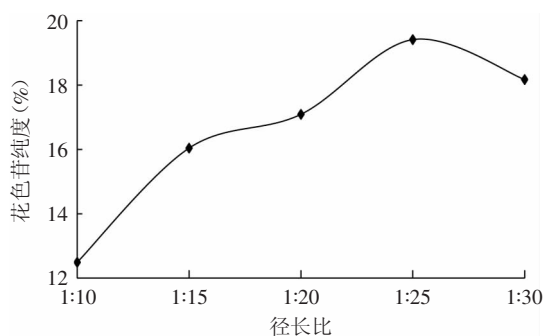


图3 不同径长比对花色苷纯度的影响

Fig.3 Effect of different diameter ratio on the purity of anthocyanin

2.2.3 洗脱液乙醇浓度对纯度的影响 由图4可知,随着乙醇浓度的增加,花色苷的纯度逐渐增加,当乙醇浓度达到70%时,花色苷的纯度达到最大,当乙醇浓度继续增加,花色苷的纯度开始下降,这是因为花色苷是部分水溶性部分醇溶性的,当乙醇与水的比例不同时,溶于其中的花色苷的量不同,且易溶于醇的部分所占比例较大,因此最适的洗脱剂的浓度偏向于乙醇比例较大的70%。

2.2.4 洗脱流速对纯度的影响 由图5可知,洗脱液中花色的纯度随洗脱流速增加呈现先增后减的趋

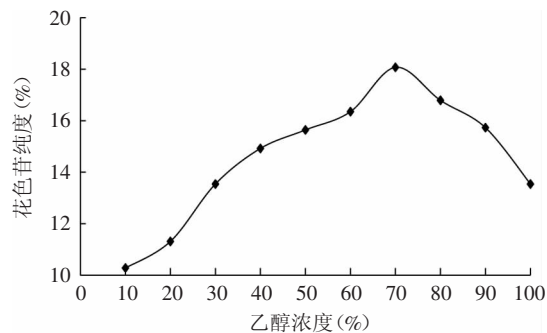


图4 不同浓度的乙醇对花色苷的纯度的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of ethanol on the purity of anthocyanin

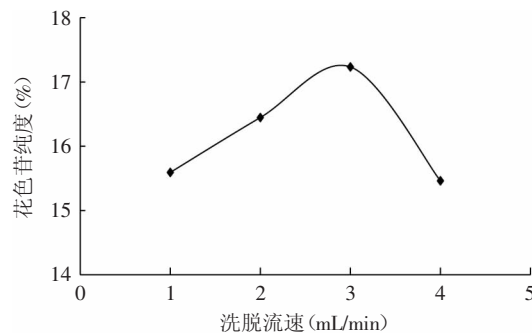


图5 不同的洗脱流速对花色苷纯度的影响

Fig.5 Effect of different elution velocity on the purity of anthocyanin

势,当流速为3mL/min时,花色苷的纯度达到最大,这可能是由于流速过慢时,解析下来的花色苷部分被树脂吸附,导致其纯度不高,但流速过快以后使部分花色苷从树脂上来不及解析下来,因此纯度同样不高。

2.3 响应面的实验设计及结果

Box-Behnken实验设计及结果见表2,由表3可知,层析柱的径长比对纯度影响不显著,上样浓度、洗脱

表2 Box-Behnken实验设计及结果

Table 2 Results of response surface experiments

实验号	A	B	C	纯度 (%)
1	-1	-1	0	16.36
2	1	-1	0	16.87
3	-1	1	0	16.40
4	1	1	0	17.57
5	-1	0	-1	16.66
6	1	0	-1	18.12
7	-1	0	1	14.13
8	1	0	1	17.07
9	0	-1	-1	18.03
10	0	1	-1	15.97
11	0	-1	1	15.18
12	0	1	1	16.75
13	0	0	0	19.29
14	0	0	0	19.63
15	0	0	0	19.34

流速对纯度的影响结果显著;上样浓度、径长比、洗脱流速三者的二次项对纯度的影响结果极显著;上样浓度与径长比、洗脱流速之间交互作用不显著,径长比与流速之间交互作用显著,由此可见,各具体实验因素对响应值的影响不是简单的线性关系。

表3 回归方程方差分析表

Table 3 Analysis results of regression and variance

项目	自由度	平方和	均方	F值	p值	显著性
回归	9	32.0157	3.55730	12.13	0.007	*
线性	3	8.6189	2.87298	9.80	0.016	*
A	1	4.6208	4.62080	15.76	0.011	*
B	1	0.0078	0.00781	0.03	0.877	
C	1	3.9903	3.99031	13.61	0.014	*
平方	3	19.4461	6.48202	22.10	0.003	**
A ²	1	4.4676	6.27605	21.40	0.006	**
B ²	1	5.2734	6.39698	21.81	0.005	**
C ²	1	9.7051	9.70505	33.09	0.002	**
交互作用	3	3.9507	1.31691	4.49	0.070	
AB	1	0.1089	0.10890	0.37	0.569	
AC	1	0.5476	0.54760	1.87	0.230	
BC	1	3.2942	3.29422	11.23	0.020	*
残差误差	5	1.4663	0.29326			
失拟	3	1.3989	0.46631	13.84	0.068	
纯误差	2	0.0674	0.03370			
合计	14	33.4820				

$R^2=95.62\%$ $R^2_{adj}=87.74\%$

注:**,表示极显著($p<0.01$);*,表示显著($0.01<p<0.05$)。

各因素的F值可以反映各因素的影响程度,F值越大,表明对实验指标的影响越大。由表3可得出各因素对花色苷纯度的影响的大小顺序为:上样浓度>洗脱流速>径长比。

模型的失拟值为0.068,不显著,方程的相关系数 R^2 为95.62%,调整后为87.74%,证明模型与实际的拟合性较好,利用软件进行非线性回归的二次多项式的拟合,得到预测模型如下:

$$Y=19.42+0.76A+0.03125B-0.70625C-1.30375A^2-1.31625B^2-1.62125C^2+0.165AB+0.37AC+0.9075BC$$

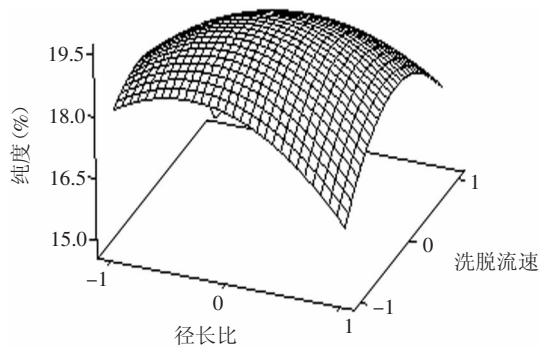


图6 径长比与洗脱流速对花色苷纯度影响的响应面图
Fig.6 Response surface of diameter ratio and flow rates of eluent on the anthocyanin purity

由回归方程,得出拟合的径长比与洗脱流速对花色苷纯度影响的响应面图见图6。

由图6可知,根据回归方程,所拟合的响应曲面的形状,抛物面开口向下,说明所拟合的回归模型有极大值点。由回归方程解得中心点的最佳解为:纯度19.40%,上样浓度2.63mg/mL,径长比为1:24.8,洗脱流速为2.8mL/min,为了方便,在进行验证性实验时我们将这一条件修正为上样浓度为2.5mg/mL时,径长比为1:25时,洗脱流速为3mL/min时,三次重复实验实际验证得花色苷的平均纯度为19.54%,与模型预测值相差0.14%,模型与实际拟合较好,能够很好地预测实际的花色苷纯度。

3 结论

AB-8、X-5、D101、NKA-9、NKA五种树脂从纯度及回收率两方面考虑,可知非极性的大孔树脂X-5对花色苷的纯化效果较好,通过单因素实验设计,以及在此基础上对上样浓度、径长比、洗脱流速进行了三因素三水平响应面法实验,建立了响应值与各因素之间的数学模型,依此模型可以预测理论提取率。根据此二次回归模型,确定纯化蓝靛果花色苷的最优工艺参数为:上样浓度为2.5mg/mL时,径长比为1:25时,洗脱剂乙醇的浓度为70%时,洗脱流速为3mL/min时。按此工艺条件实际获得的花色苷纯度可达19.54%,与模型预测值相差0.14%,模型与实际拟合较好,能够很好地预测实际的花色苷纯度。

参考文献

- [1] 向延菊,王大伟. 蓝靛果忍冬的研究利用现状及其发展前景[J]. 塔里木农垦大学学报,2004,16(4):26-29.
- [2] Zholobova z P. Basis for commercial cultivation of blue honeysuckle[J]. Sadovodstvo I Vinogradarstvo,1990(8):23-25.
- [3] 任健. 稠李属果实色素理化性质及抗氧化抗疲劳作用研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2011.
- [4] 李文星. 蓝靛果花色苷提取及其抗肿瘤功能机理的初步研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2011.
- [5] 杨玲. 蓝靛果提取物抗氧化及抗癌作用的研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2009.
- [6] Nadia A,Soliman Mahmoud M,Berekaa Yasser R. Polyglutamic acid(PGA) production by Bacillus sp. SAB-26: application of Plackett -Burman experimental design to evaluate culture requirements[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2005,69:259-267.
- [7] Chen Xiong, Chen Shouwen, Sun Ming, et al. Medium optimization by response surface methodology for poly-gammaglutamic acid production using dairy manure as the basis of a solid substrate[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2005,69:390-396.
- [8] 唐琳,李子江. 两种pH法测定玫瑰花花色苷含量的比较[J]. 食品科学,2009,30(18):310-313.
- [9] 李蕊. 野生浆果花色苷提取纯化、结构鉴定及体外抗氧化活性的分析[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2011.
- [10] 田福. 三种野生浆果花色苷的提取、纯化及抗氧化活性研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2008.