

响应面法优化费菜多酚的提取工艺研究

周 文, 强 毅, 鲁秀兰, 王喆之*

(药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室,
陕西师范大学生命科学学院, 陕西西安 710062)

摘 要:目的:利用响应面法对费菜中多酚物质的提取条件进行优化。方法:单因素实验基础上选取实验因素与水平,根据Box-Behnken Design(BBD)实验设计原理,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,以费菜多酚物质含量为响应值作响应面分析实验。结果:在分析各个因素的显著性和交互作用后,得出费菜多酚物质浸提的最佳工艺条件为乙醇体积分数67%,浸提温度41℃,浸提时间2h,料液比1:25(g/mL),以焦性没食子酸为标准品,费菜多酚物质一次提取含量可达60.90mg/g。结论:响应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:费菜,多酚物质,响应面分析

Optimization of polyphenol extraction from *Sedum Aizoon* L. by response surface methodology

ZHOU Wen, QIANG Yi, LU Xiu-lan, WANG Zhe-zhi*

(Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: Objective: The main research object was *Sedum Aizoon* L. Besides, an optimization of extraction process for from *Sedum aizoon* L. was established. Methods: Based on the single factor analysis, a 3-factor, 3-level Box-Behnken experimental design was applied to evaluate the effect of the three factors, including ethanol concentration, ratio of material to liquid and extraction temperature. Results: The optimal extraction conditions were ethanol concentration of 67% (v/v), extraction temperature 41℃, extraction time 2h, solid-to-liquid ratio 1:25 (w/v). Under such extraction conditions, the experimental yield of polyphenols obtained after the first extraction was up to 60.90mg/g, which was close to the model-predicted value. Conclusion: The established regression equation for polyphenols yield had an excellent goodness of fit. Therefore it was credible and could be used for practical prediction.

Key words: *Sedum Aizoon* Linn; polyphenols; response surface methodology

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)22-0249-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.22.046

费菜(*Sedum aizoon* Linn.)为景天科(Crassulaceae)景天属(*Sedum*)多年生草本植物,以根及全草入药,功类三七,故称景天三七,又名六月淋、收丹皮、土三七等,是著名的秦岭“太白七药”之一,具有散瘀止血,安神,解毒之功效^[1],费菜茎叶可食,被收于明朝朱橚所著的《救荒本草》,作为野生蔬菜具有心血管保健的功效,被称为养心草广泛分布于我国陕西、四川、江苏、湖北、山东、宁夏、甘肃等地^[2]。现代药理研究和临床证明费菜具有抗衰老、抗缺氧、抗疲劳及改善心脑血管系统和免疫调节作用^[3-4]。

费菜中含有丰富的多酚类物质,植物多酚为植物体内的复杂酚类次生代谢物,主要存在于植物的皮、根、叶、果中,在植物中的含量仅次于纤维素、半纤维素和木质素^[5-7]。许多实验研究资料均显示,植物多酚具有较强的清除自由基、抗氧化活性、抗肿瘤、抗辐射以及保护心血管系统等重要的生物活性功能。因此开发研究费菜多酚,对于其资源的充分利用具有积极意义,也是费菜经济效益的有效途径^[8-9]。

本文在单因素实验的基础上,选用响应面优化法对费菜中多酚的提取进行了优化,克服了传统方法实验组数多、实验周期长的缺陷,以最经济的方式,对所选的实验参数进行全面研究,以期为费菜的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

收稿日期: 2014-03-11

作者简介: 周文(1991-),女,在读硕士研究生,研究方向:植物生物技术。

* 通讯作者: 王喆之(1958-),男,博士,教授,研究方向:植物生物技术。

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(GK201402030)。

费菜 采自陕西省西安市灞桥区,经陕西师范大学田先华教授鉴定为景天科景天属植物费菜,将其在30℃下恒温干燥至恒重,粉碎并过40目筛,密封后于常温下保存备用;没食子酸标准品,福林酚试剂,无水乙醇(分析纯),无水碳酸钠。

YB-1000A高速多功能粉碎机 天津市速峰有限公司;AT2201电子分析天平 赛多利斯科学仪器北京有限公司;101-2AB型鼓风干燥箱 天津市泰斯特仪器有限公司;MLLI-Q超纯水仪 美国Millipore公司;KH-700DB型数控超声波清洗仪 昆山和创有限公司;SHZ-D台式真空泵 郑州长城有限公司;Epoch超微量微孔板分光光度计 美国BioTek公司。

1.2 多酚的测定

1.2.1 没食子酸标准曲线的建立 总酚含量的测定采用Folin-Ciocalteu法^[10-11]。精密称取10.0mg没食子酸标准品,去离子水定容制成浓度为1.0mg/mL的标准没食子酸母液,4℃存放。将没食子酸对照品母液用水依次稀释成浓度分别为80、60、40、20、15、10、5μg/mL的梯度溶液。分别取各梯度标准品溶液100μL于1.5mL EP管中,向每支EP管中依次加入500μL Folin-Ciocalteu试剂黑暗下反应8min,再加400μL Na₂CO₃ (7.5%, W/V),混匀,40℃水浴30min。然后在765nm波长处测定反应液的吸光值。实验同时设空白对照,以去离子水代替标准品溶液。实验重复3次,以平均吸光度值为横坐标,以没食子酸浓度为纵坐标,得一元线性回归方程。

1.2.2 多酚含量的测定 精确移取1mL多酚粗提液,按照绘制标准曲线方法显色,设计三组平行实验,于最大吸收波长765nm处测吸光度并计算含量。费菜多酚的含量表示为每克干重样品中含有的多酚量(以没食子酸计,mg/g)。

1.3 单因素实验

选用乙醇溶剂浸提法作为提取方法。对可能影响费菜多酚含量的几个因素(乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取温度)分别做单因素实验,按照多酚的测定方法(Folin-Ciocalteu),移取待测提取液1mL于25mL容量瓶中,依次加入1.5mL Folin-Ciocalteu显色剂及6mL 10% Na₂CO₃溶液并定容,反应2h后,于波长765nm处测定吸光度,计算多酚含量。

1.3.1 乙醇体积分数的确定 准确称取1.00g预处理好的材料,按料液比(g/mL) 1:20分别加入体积分数为40%、50%、60%、70%、80%和90%的乙醇溶液作为提取液于50mL三角瓶中,在40℃、40kHz避光超声2h后,抽滤提取液,将滤液转至20mL容量瓶,用60%乙醇定容。混匀后取出0.1mL置于100mL容量瓶中,立即测定其多酚含量。

1.3.2 料液比的确定 准确称取1.00g预处理好的材料,按料液比(g/mL) 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30和1:35称取材料于50mL三角瓶中,用60%乙醇,在40℃、40kHz避光超声2h后,抽滤提取液,将滤液转至20mL容量瓶。混匀后取出0.1mL于100mL容量瓶中,立即测定其多酚含量。

1.3.3 提取温度的确定 准确称取1.00g预处理好的

的材料,于50mL三角瓶中,按料液比(g/mL) 1:20加入60%乙醇20mL,充分摇匀后分别在温度20、30、40、50、60、70℃下,40kHz避光超声2h后,抽滤提取液,将滤液转至20mL容量瓶。混匀后取出0.1mL于100mL容量瓶中,立即测定其多酚含量。

1.3.4 提取时间的确定 准确称取材料1.00g预处理好的材料,于50mL三角瓶中,按料液比(g/mL) 1:20加入60%乙醇20mL,充分摇匀后,在40℃、40kHz避光超声提取1、2、3、4、5h,抽滤提取液,将滤液转至20mL容量瓶。混匀后取出0.1mL于100mL容量瓶中,立即测定其多酚含量。

1.4 提取条件的优化

根据单因素实验对乙醇体积分数、料液比、提取温度、提取时间进行综合考虑,采用三因素三水平,根据Box-Behnken Design (BBD)设计法设计响应面实验,分析费菜多酚在不同提取条件下的含量,从而优化出最佳提取条件。实验因素与水平设计见表1。

表1 响应面因素水平表

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 料液比(w/v)	20	25	30
C 提取温度(℃)	30	40	50

1.5 验证实验

以费菜为材料,按照Design Expert软件中的Box-Behnken Design模型得到优化的提取条件,设计三组平行实验,立即测定提取液中的多酚含量,并计算相对标准偏差(RSD)。

2 结果与分析

2.1 没食子酸标准曲线的建立

采用Folin-Ciocalteu法绘制没食子酸标准曲线,得没食子酸含量(X)与吸光值(Y)之回归方程 $Y=0.1308X+0.013$, $R^2=0.9991$,见图1。实验结果表明,没食子酸标准品溶液浓度在(1~8)μg/mL范围内线性关系良好。

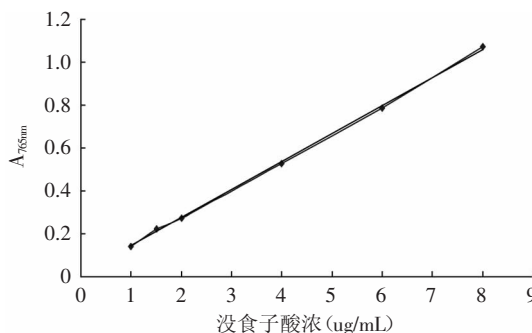


图1 没食子酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of gallic acid

2.2 单因素实验

2.2.1 乙醇体积分数对费菜多酚提取液中含量的影

响 如图2所示,在温度40℃,料液比1:20 (g/mL), 40kHz避光超声浸提2h的条件下,乙醇体积分数对费菜多酚含量的影响。随着乙醇体积分数的提高,提取液中多酚含量上升趋势明显,当乙醇体积分数为60%时,提取液中多酚含量达最大值,之后随着体积分数的增大,含量反而降低。所以最佳乙醇体积分数确定为60%。

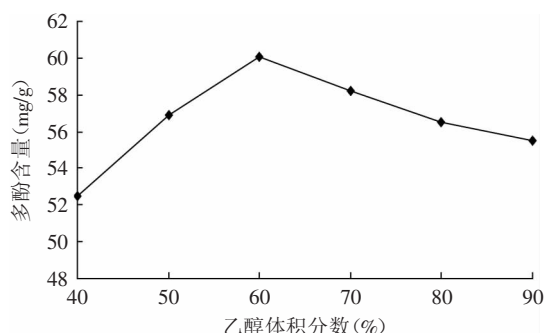


图2 乙醇体积分数对费菜多酚提取液含量的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on extraction rate of polyphenols from *Sedum Aizoon Linn*

2.2.2 液料比对费菜多酚提取液含量的影响 如图3所示,在温度40℃,乙醇体积分数60%,40kHz避光超声浸提2h的条件下,液料比对费菜多酚含量的影响。提取液中多酚物质含量随着溶剂量的增加而增加,当料液比达到1:25后,随着料液比继续增大,提取液中的多酚含量增加缓慢,且有下降趋势。根据浓度梯度是提取的动力^[13],提高料液比虽然有利于多酚的提取,但当料液比达到某一极限时,再提高料液比收效不大。由结果分析,并考虑到节约能源,所以最佳料液比确定为1:25。

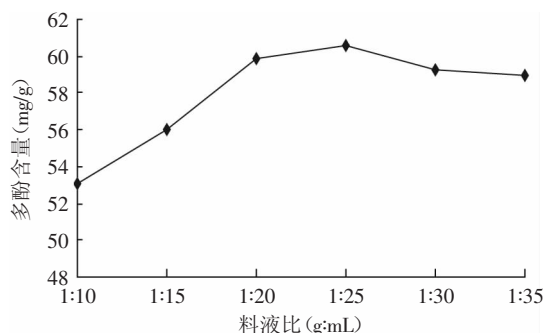


图3 液料比对费菜多酚提取液含量的影响

Fig.3 Effect of material-to-liquid ratio on extraction rate of polyphenols from *Sedum Aizoon Linn*

2.2.3 提取温度对费菜多酚提取液含量的影响 如图4所示,在乙醇体积分数60%,料液比1:20 (g/mL), 40kHz避光超声浸提2h的条件下,提取温度对费菜多酚含量的影响。当温度达到40℃时,提取液中多酚的含量达到最大,之后随着温度的升高含量反而降低。温度是影响提取的重要因素之一,在一定的温度范围,提高温度可能有利于多酚的提取;但是由于多酚中含有大量的酚羟基,其化学性质十分活泼,而某些

酚类物质在较高的温度下不稳定^[14],故当提取温度超过40℃时,费菜多酚的含量随着温度的升高反而降低。所以确定最佳提取温度确定为40℃。

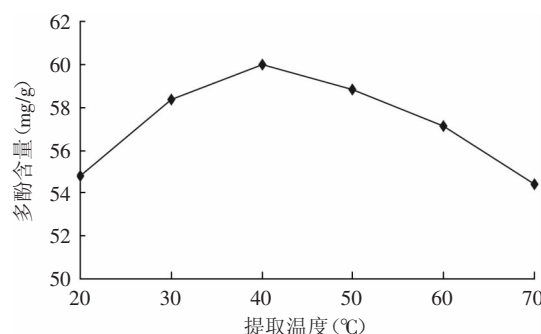


图4 提取温度对费菜多酚提取液含量的影响

Fig.4 Effect of temperature on extraction rate of polyphenols from *Sedum Aizoon Linn*

2.2.4 提取时间对费菜多酚提取液含量的影响 如图5所示,在温度为40℃,乙醇体积分数60%,料液1:20 (g/mL),40kHz避光超声浸提的条件下,提取时间对费菜多酚含量的影响。费菜提取液中多酚含量在2、3、4、5h时显著高于1h ($p < 0.05$);当提取时间超过2h后,延长提取时间,提取液中多酚含量无显著差异 ($p < 0.05$),但呈下降趋势。由于多酚易氧化^[15],提取时过长会破坏多酚类物质的酚羟基结构,导致其含量降低^[16]。所以,最佳提取时间确定为2h。

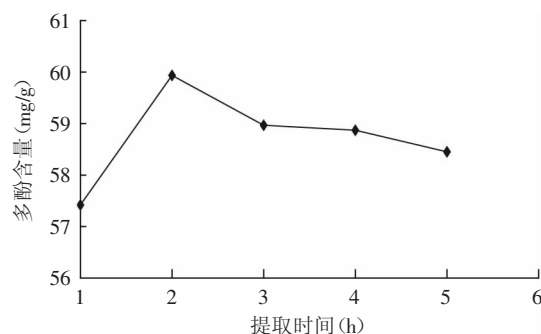


图5 提取时间对费菜多酚提取液含量的影响

Fig.5 Effect of time on extraction rate of polyphenols from *Sedum Aizoon Linn*

2.3 响应面法优化费菜多酚提取工艺

2.3.1 响应面分析因素水平的选取 根据Box-Behnken的中心组合实验设计原理^[17],并结合上述单因素影响的实验结果,选取乙醇体积分数(A)、料液比(B)和提取温度(C)3个影响因素,在单因素实验的基础上采用三因素三水平的响应曲面分析方法,共17个实验点。由Box-Behnken Design设计方案所得的实验结果见表2。

2.3.2 数学模型的建立 按照Design Expert软件中的Box-Behnken Design模型对表2的数据进行多元回归拟合,得到多酚含量对乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取温度(C)的二次多项回归模型为: $Y = 61.68 + 0.86A - 0.18B + 0.33C + 0.11AB - 0.075AC - 0.045BC -$

表2 Box-Behnken设计方案及其响应值

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

实验号	A	B	C	Y: 多酚含量(mg/g)
1	0	0	0	60.90
2	1	0	1	58.74
3	1	0	-1	57.98
4	0	-1	-1	58.32
5	0	1	1	58.85
6	0	0	0	61.88
7	0	1	-1	58.55
8	1	-1	0	58.20
9	-1	1	0	55.81
10	1	1	0	57.55
11	0	0	0	61.89
12	0	-1	1	58.80
13	-1	0	-1	55.92
14	-1	0	1	56.98
15	0	0	0	61.85
16	-1	-1	0	56.90
17	0	0	0	61.86

表3 费菜多酚提取参数数学回归分析结果

Table 3 Results of regression analysis of extraction factors for *Sedum Aizoon* Linn-polyphenols

来源	平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
模型	67.574	9	7.5083	35.6319	<0.01	**
A	5.882	1	5.8825	27.9163	0.0011	**
B	0.266	1	0.2665	1.2645	0.2979	
C	0.845	1	0.8450	4.0101	0.0853	
A ²	35.240	1	35.2398	167.2374	<0.01	**
B ²	11.715	1	11.7146	55.5941	0.0001	**
C ²	7.995	1	7.9953	37.9433	0.0005	**
AB	0.048	1	0.0484	0.2297	0.6464	
AC	0.023	1	0.0225	0.1068	0.7534	
BC	0.008	1	0.0081	0.0384	0.8501	
残差	1.475	7	0.2107			
失拟性	0.721	3	0.2404	1.2760	0.3959	
纯误差	0.754	4	0.1884			
总差	69.049	16				

注:**: 差异高度显著 ($p < 0.01$); *: 差异显著 ($p < 0.05$)。

$2.89A^2 - 1.67B^2 - 1.38C^2$, 对该回归模型进行方差分析, 结果见表3。

由表3可知, 整体模型显著性水平 $p < 0.01$, 表明二次方程模型达到极度显著水平; 同时失拟项 $p = 0.3959 > 0.05$, 表明差异不显著, 残差均由随机误差引起。综合以上所述, 说明模型拟合程度良好, 实验误差小。因此, 该模型可较好地描述各因数与相应值之间的真实关系, 可利用模型来分析和预测费菜多酚的提取工艺结果。对回归方程系数进行显著性检验, 表明乙醇体积分数(A)及其二次项(A²)、料液比二次项(B²)、浸提温度二次项(C²)对费菜提取液多酚含量

有高度显著影响; 料液比(B)、浸提温度(C)、交互项AB, AC, BC对费菜提取液多酚含量的影响均不显著 ($p > 0.05$); 依据系数估计值 $A = 0.86$ 、 $B = -0.18$ 、 $C = 0.33$ 可知因素的主效应关系为乙醇体积分数 > 浸提温度 > 料液比。

2.3.3 响应面分析与优化 利用Design Expert 7.1.6 软件, 绘制各影响因素对费菜多酚含量的响应曲面图, 考察所拟合的响应面的形状, 分析乙醇体积分数(A)、料液比(B)和浸提温度(C)对费菜多酚含量的影响。如果一个响应曲面坡度相对平缓, 表明其可以忍受处理条件的变异, 而不影响到响应值的大小, 相反, 如果一个响应曲面坡度异常陡峭, 表明响应值对于处理条件的改变非常敏感。比较图6的曲面图可知, 乙醇体积分数A对费菜提取液多酚含量的影响最为显著, 表现为曲线较陡, 而料液比B和提取温度C次之, 表现为曲线较为平滑, 料液比的影响最小, 结果与方差分析相似。

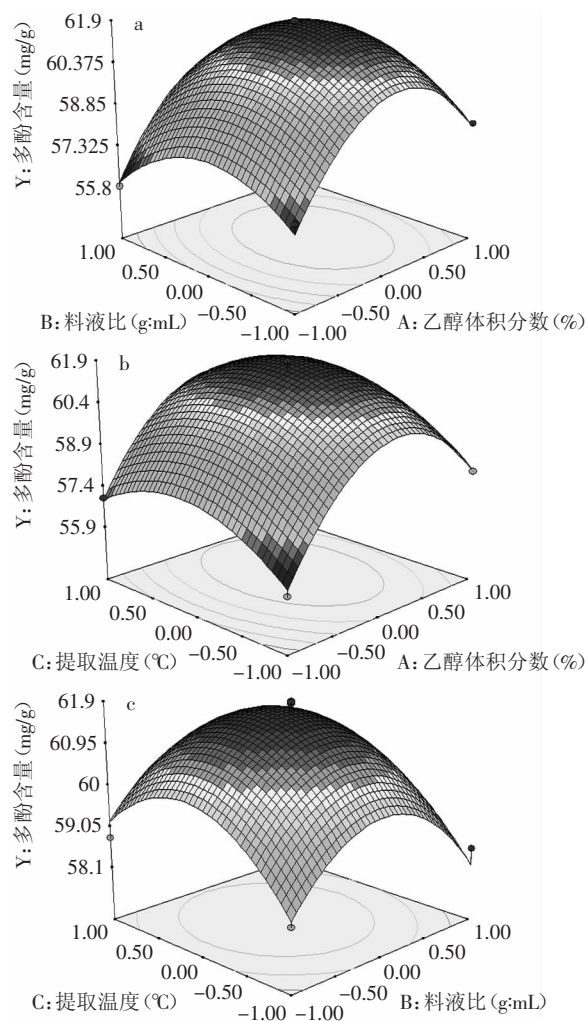


图6 各参数的响应曲面图

Fig.6 Response surface plot of all arguments

注:a: C提取温度40℃; b: B料液比1:20(w/v); c: A乙醇体积分数60%。

2.3.4 优化与验证 从上述回归模型中求得最优工艺条件为 $A = 0.68$ 、 $B = -0.03$ 、 $C = 0.10$, 即最佳浸提条件

为乙醇体积分数66.80%,料液比1:24.85,温度41℃,费菜提取液多酚含量的理论值为60.9477mg/g。

为了操作方便,将以上条件修正为乙醇体积分数67%、料液比1:25、提取温度41℃。验证实验结果表明,在最佳提取条件下,费菜提取液多酚含量为60.90mg/g (RSD=0.36%),与预测值相差不大,说明该方程与实际情况拟合很好,验证了所建模型是合理可靠的。

3 结论

建立了一个以多酚提取率为目标值,以乙醇体积分、料液比、提取温度为因子的数学模型,方差分析表明其拟合良好,通过实验得到的最优工艺参数为:浸提时间2h,乙醇体积分数67%、料液比1:25 (w/v)、提取温度41℃,在此条件下,费菜多酚提取液含量可达60.90mg/g。说明响应面法适用费菜多酚提取工艺进行回归分析和参数优化。

参考文献

- [1] 中药大辞典编委会. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:3316-3317.
- [2] 强毅,王政君,陈克克,等. 费菜多酚含量的测定及体外抗菌活性研究[J]. 食品工业科技,2004,34(5):53-56.
- [3] 中国科学院植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1984,34(1):72-74.
- [4] 李园园,王俊霞,曹乃峰,等. 河南产景天三七抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2011(23):337-340.
- [5] 车苏容,郭素华,竺叶青. 景天三七的药学研究进展[J]. 福建中医药,2004,35(3):51-53.
- [6] 王旗,刘恩岐. 植物多酚的研究现状[J]. 山西农业科学,2009,37(1):92-94.
- [7] Abram V, Donko M. Tentative identification of polyphenols in

sempervivum tectorum and assessment of the antimicrobial activity of *sempervivum* L[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(2): 485-489.

[8] Chung KT, Wong TY, Wei CI. Tannins and human health: A review[J]. Crit Rev Food Sci, 1998, 38: 421-464.

[9] 耿中华. 植物多酚的研究进展[J]. 广西轻工业, 2008(4): 4-6.

[10] 宋立江, 狄莹. 植物多酚的研究与利用的意义及发展趋势[J]. 化学进展, 2004, 5(2): 162.

[11] Zhang Y, Yan YP, Wang ZZ. The Arabidopsis PAP1 transcription factor plays an important role in the enrichment of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza*[J]. Agric Food Chem, 2010, 58(12): 12168-12175.

[12] Yan Q, Shi M, Ng J, et al. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots[J]. Plant Sci, 2006, 170: 853-858.

[13] 伍春, 徐立, 刘骏驰. 响应曲面法优化新疆药桑桑皮总多酚提取工艺[J]. 食品科学, 2011(2): 104-107.

[14] Rubilar M, Pinelo M, Ihl M. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz.) as a source of antioxidant polyphenols[J]. Agric Food Chem, 2006, 54(1): 59-64.

[15] Antolovich M, Pernzler P, Robards K, et al. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits[J]. Analyst, 2000, 125: 989-1009.

[16] Cillers JLL, Singleton VL. Characterization of the products of nonenzymic autoxidative phenolic reaction in a caffeic acid model system[J]. Agric Food Chem, 1991, 39(7): 1298-1303.

[17] 邓仕任, 夏林波. 响应面法优化芫花总黄酮的提取工艺[J]. 中国食品添加剂, 2012(2): 70-76.

[18] 陈莉, 屠康, 王海. 采用响应面法对采后红富士苹果热处理条件的优化[J]. 农业工程学报, 2006, 22(2): 159-163.

(上接第248页)

2009.

[6] 齐祖同. 中国真菌志-曲霉属及其相关有性型[M]. 北京:科学出版社, 1997: 99-101.

[7] 张东杰, 王颖, 翟爱华. 大米质量安全关键控制技术[M]. 北京:科学出版社, 2011: 62-63.

[8] Tanaka K J, Sago Y K, Zheng Y Z, et al. Mycotoxins in rice [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 119(1-2): 59-66.

[9] Terigar B G, Balasubramanian S, Boldor D, et al. Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system: Design and performance evaluation[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(7): 2466-2471.

[10] Ribeiro D G, Pavarina A C, Dovigo L N, et al. Denture disinfection by microwave irradiation: A randomized clinical study [J]. Journal of dentistry, 2009, 37(9): 666-672.

[11] Dorantes-Alvarez L, Jaramillo-Flores E, González K, et al. Blanching peppers using microwaves[J]. Procedia Food Science, 2011, 1: 178-183.

[12] Cendres A, Chemat F, Maingonnat J F, et al. An innovative

process for extraction of fruit juice using microwave heating[J]. LWT-food science and technology, 2011, 44(4): 1035-1041.

[13] Matsui K N, Granado L M, DE Oliveira P V, et al. Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions[J]. LWT-food science and technology, 2007, 40(5): 852-859.

[14] Lee K Y, Park B J, Lee D H, et al. Sterilization of *Escherichia coli* and MRSA using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure[J]. Surface and Coatings Technology, 2005, 193(1-3): 35-38.

[15] Hamoud-Agha M M, Curet S, Simonin H, et al. Microwave inactivation of *Escherichia coli* K12CIP 54.117 in a gel medium: Experimental and numerical study[J]. Journal of Food Engineering, 2013, 116(2): 315-323.

[16] Fang Y P, Hu J, Xiong S B, et al. Effect of low-dose microwave radiation on *Aspergillus parasiticus*[J]. Food Control, 2011, 22(7): 1078-1084.

[17] 张习军, 熊善柏, 赵思明. 微波处理对稻谷品质的影响[J]. 中国农业科学, 2009, 42(1): 224-229.