

响应面法优化微波辅助提取葵花籽粕中绿原酸

张涛¹, 邢连华², 董丹¹, 刘会平¹

(1. 食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457;
2. 天津市一轻集团(控股)有限公司, 天津 300200)

摘要: 在单因素实验的基础上, 运用 Design Expert 7.0.0 数据统计分析软件, 采用二次正交旋转组合设计分析方法, 建立以乙醇溶液为提取溶剂, 微波辅助提取葵花籽粕中绿原酸的二次回归模型. 以绿原酸得率为响应值作响应面, 得到最优工艺条件为: 液料比 (mL : g) 31, 乙醇体积分数 70%, 微波功率 495 W, 微波时间 30 s, 提取温度 60 °C. 在此条件下, 绿原酸的得率为 14.47 mg/g.

关键词: 葵花籽粕; 微波辅助提取; 绿原酸; 响应面优化

中图分类号: TS229 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2013)04-0014-05

Optimization of Chlorogenic Acid Extraction from Sunflower Seed Meal with Microwave-assisted Response Surface

ZHANG Tao¹, XING Lianhua², DONG Dan¹, LIU Huiping¹

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. Tianjin Yiqing Group (Holding Share) Co., Ltd, Tianjin 300200, China)

Abstract: On the basis of single-factor tests, Design Expert 7.0.0-statistical analysis software was adopted to build a quadratic regression equation with chlorogenic acid yield as function, and extractability of chlorogenic acid as the response value, and then the response surface and contour were plotted. According to the results from the above studies, the optimum conditions for the microwave-assisted extraction of chlorogenic acid were obtained: the solvent to material ratio (mL : g) was 31, volume fraction of the ethanol was 70%, the power of the microwave 495 W, microwave time 30 s, and the extraction temperature was 60 °C. Under these conditions, the chlorogenic acid yield was up to 14.47 mg/g.

Key words: sunflower seed meal; microwave-assisted extraction; chlorogenic acid; response surface optimization

绿原酸(chlorogenic acid, CA)又名咖啡鞣酸, 是由咖啡酸与奎尼酸生成的缩酚酸^[1], 分子式为 C₁₆H₁₈O₉, 相对分子质量为 354.30, 其半水合物为白色或微黄色针状结晶, 熔点 208 °C, 比旋光度 $[\alpha]_D$ 为 35.2°. 绿原酸在 25 °C 水中的溶解度约为 4%, 在热水中的溶解度更大. 绿原酸类化合物是含有羟基和邻二酚羟基的有机物, 为极性有机酸, 极不稳定, 易溶于极性溶剂, 微溶于乙酸乙酯, 难溶于亲脂性有机溶剂^[2], 利用这一性质, 可从植物中提取绿原酸.

绿原酸主要存在于咖啡豆、蔬菜和水果中. 许多植物中也富含绿原酸, 例如向日葵、忍冬花和杜仲叶

子^[3]. 绿原酸作为一种具有生理活性和药理活性的天然物质^[4], 其提取纯化及检测技术的研发已成为当前日益关注的焦点. 绿原酸在食品、医药和日用化妆品行业有着广泛的应用. 因此, 开发和利用绿原酸资源具有巨大的社会效益和经济效益.

微波辅助提取法是一种利用微波从辅助溶剂中提取目标物质的新技术, 原料中各物质吸收微波能的能力不同, 其产生的热能及传递给周围环境的热能也不同, 这种差异使萃取体系中的某些组分或基体物质的某些区域被选择性加热, 从而使被萃取物质从基体或体系中分离出来, 进入介电常数小、微波吸收能力

差的萃取剂中^[5]. 与传统有机溶剂提取法相比,利用微波辅助提取法在提高目标物质得率的同时,还可以起到省时省力的效果,减少了原料和资源的浪费^[6].

本实验在前期单因素实验的基础上,应用响应面法优化葵花籽粕中绿原酸的微波辅助醇提工艺,探讨了液料比、乙醇体积分数和微波功率对提取效率的影响. 通过实验建立各影响因素与绿原酸得率的数学模型,从而获得最佳的生产工艺条件,为工业化生产提供理论依据^[7].

1 材料与方法

1.1 材料

葵花籽粕,北京太阳神花公司;正己烷、乙醇,天津市北联精细化学品开发有限公司;绿原酸标准品,贵州迪大科技生物有限责任公司.

紫外分光光度计,上海新嘉电子有限公司;离心机,上海安亭科学仪器厂;电子天平,上海精科实业有限公司;微波炉,广东格兰仕集团有限公司.

1.2 提取工艺

取葵花籽粕粉碎后,浸于正己烷中 24 h 以除去脂肪,湿粕低温干燥后微波辐照 30 s,然后利用乙醇提取其中的绿原酸,4 000 r/min 离心 15 min,取上清液检测吸光度.

1.3 绿原酸得率的测定

1.3.1 最大吸收波长的选择

精密称取绿原酸标准品 1.00 mg 用无水乙醇定容至 50 mL,用无水乙醇作参比液在 250 ~ 500 nm 范围内扫描,得出绿原酸最大吸收波长.

1.3.2 绘制标准曲线

准确吸取绿原酸标准品溶液 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 mL,分别用无水乙醇定容至 10 mL,摇匀,以无水乙醇作为参比液,在 1.3.1 中确定的波长(331 nm)处测定吸光度. 以标准品的质量浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得到绿原酸标准曲线方程 $y = 0.0414x + 0.0171$, $R^2 = 0.9997$.

1.3.3 测定绿原酸得率

取绿原酸的提取液定容,通过紫外分光光度计测量吸光度并按式(1)计算绿原酸得率^[8].

$$Y = [(A - 0.0171) / 0.0414] \times N \times V \times 10^{-3} / m \quad (1)$$

式中: Y 为绿原酸得率, mg/g ; A 为吸光度; N 为稀释倍数; V 为绿原酸滤液体积, mL ; m 为原料葵花籽粕

的质量, g .

1.4 提取工艺参数的选择

1.4.1 液料比对绿原酸得率的影响

在乙醇体积分数 70%,微波功率 638 W,微波时间 30 s,提取温度为 60 °C,提取时间 30 min,液料比($\text{mL} : \text{g}$)分别为 20、25、30、35、40 的条件下考察液料比对绿原酸得率的影响.

1.4.2 乙醇体积分数对绿原酸得率的影响

在液料比($\text{mL} : \text{g}$)为 30,微波功率 638 W,微波时间 30 s,提取温度为 60 °C,提取时间为 30 min,乙醇体积分数分别为 40%、50%、60%、70%、80%的条件下考察乙醇体积分数对绿原酸得率的影响.

1.4.3 微波功率对绿原酸得率的影响

在乙醇体积分数为 70%,液料比($\text{mL} : \text{g}$)30,微波时间 30 s,提取温度为 60 °C,提取时间 30 min,微波功率分别为 278、300、495、638、750 W 的条件下考察微波功率对绿原酸得率的影响.

1.5 响应面法优化绿原酸提取工艺

根据单因素实验结果,选择液料比、乙醇体积分数、微波功率的最适值作为响应面优化的中心点进行响应面法分析,优化绿原酸提取工艺.

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 液料比对绿原酸得率的影响

液料比对绿原酸得率的影响如图 1 所示. 由图 1 可看出,随着液料比的增加,绿原酸得率升高,表明液料比的增大有利于绿原酸的浸出. 当液料比大于 30 后,绿原酸的得率不再上升,说明葵花籽粕中的绿原酸已基本浸出,故最佳液料比为 30.

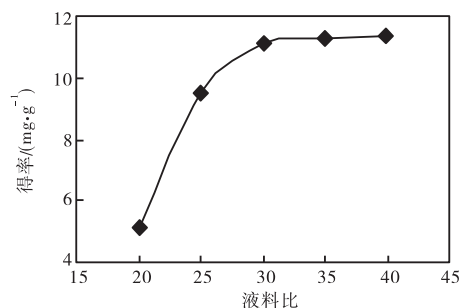


图 1 液料比对绿原酸得率的影响

Fig. 1 Effects of material to solvent ratio on the yield of chlorogenic acid

2.1.2 乙醇体积分数对绿原酸得率的影响

乙醇体积分数对绿原酸得率的影响如图 2 所

示. 由图 2 可看出, 乙醇体积分数在 40%~70%时, 绿原酸的得率随乙醇体积分数的增大而升高, 在乙醇体积分数为 70%时得率达到最高, 提取效果最佳. 当乙醇体积分数超过 70%后, 原料中其他杂质挣脱分子间束缚力而溶于乙醇, 从而导致目标物质得率下降^[9], 故最佳的乙醇体积分数为 70%.

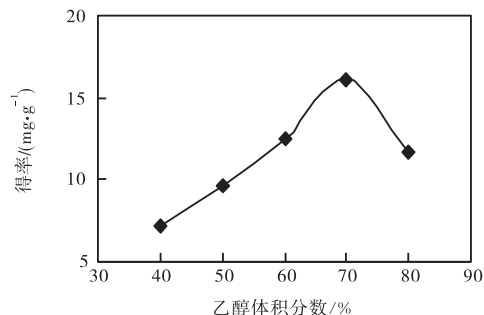


图 2 乙醇体积分数对绿原酸得率的影响

Fig. 2 Effects of ethanol concentration on the yield of chlorogenic acid

2.1.3 微波功率对绿原酸得率的影响

微波功率对绿原酸得率的影响如图 3 所示. 由图 3 可看出, 绿原酸得率随着微波功率的增加呈先升高后降低的趋势, 微波功率为 495 W 时绿原酸得率达到最高. 这是由于微波加热时可以使原料的绿原酸被选择性加热而加快分子振动, 分子能提高而挣脱分子间束缚, 溶于提取液中, 继续增加微波功率又可能会使原料中除目标物质的其他物质被加热而溶于提取液中, 导致得率再升高到一定值后开始下降. 故选 495 W 为最优微波功率.

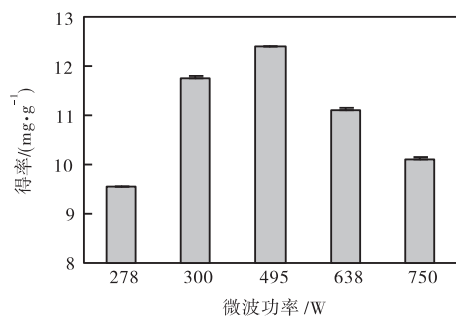


图 3 微波功率对绿原酸得率的影响

Fig. 3 Effects of microwave power on the yield of chlorogenic acid

2.2 响应面法优化绿原酸提取工艺

2.2.1 优化实验设计与结果

选择液料比(X_1)、乙醇体积分数(X_2)、微波功率(X_3)的最适值作为响应面优化的中心点, 按方程 $X_i = (x_i - x_0) / \Delta x$ 对自变量进行编码, 其中: x_i 为自变量的

编码值, x_0 为实验中心点处自变量的真实值, Δx 为自变量的步长, X_i 为自变量的真实值^[10-11]. 各因子及水平编码见表 1, 结果见表 2. 对该模型进行方差分析, 结果见表 3.

表 1 响应面分析实验水平表

Tab. 1 Analysis of factors and levels of response surface

水平	因素		
	X_1	X_2 / %	X_3 / W
+ 1	20	60	300
0	30	70	495
- 1	40	80	638

表 2 响应面设计及实验结果

Tab. 2 Tables of design and results of response surface

实验	X_1	X_2 / %	X_3 / W	Y / (mg·g ⁻¹)
1	30	70	495	14.38
2	30	70	495	14.17
3	40	80	495	12.23
4	20	70	638	12.54
5	30	70	495	14.64
6	20	60	495	11.76
7	30	80	638	12.97
8	40	70	638	12.76
9	20	80	495	11.97
10	30	60	638	12.43
11	30	80	300	12.68
12	30	60	300	11.47
13	40	70	300	12.58
14	20	70	300	11.62
15	30	70	495	14.47
16	30	70	495	14.68
17	40	60	495	12.53

表 3 回归方程方差分析

Tab. 3 Variance analysis of regression equation

方差来源	自由度	偏差平方和	平均偏差	F 值	P 值
X_1	1	0.67	0.67	8.55	0.022 2*
X_2	1	0.39	0.39	5.03	0.059 8
X_3	1	0.69	0.69	8.84	0.020 7*
$X_1 X_2$	1	0.065	0.065	0.83	0.391 9
$X_1 X_3$	1	0.14	0.14	1.79	0.223 1
$X_2 X_3$	1	0.16	0.16	2.08	0.192 1
X_1^2	1	5.85	5.85	74.93	0.000 1**
X_2^2	1	5.73	5.73	73.35	0.000 1**
X_3^2	1	3.14	3.14	40.19	0.000 4**
模型	9	18.86	2.10	26.82	0.000 1**
残差	7	0.55	0.078		
失拟项	3	0.38	0.13	2.93	0.163 1
纯误差	4	0.17	0.043		
所有项	16	19.40			

注: *表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$); $R^2 = 0.971 8$, $Adj R^2 = 0.935 6$.

利用 Design Expert 软件对表 3 数据进行多元回归拟合, 得到绿原酸提取得率(Y)对自变量液料比(X_1)、乙醇体积分数(X_2)和微波功率(X_3)的二次多项回归模型方程:

$$Y = 14.44 + 0.29 X_1 + 0.22 X_2 + 0.29 X_3 - 0.13 X_1 X_2 - 0.20 X_2 X_3 - 0.19 X_1 X_3 - 1.18 X_1^2 - 1.17 X_2^2 - 0.89 X_3^2.$$

用 F 检验判定回归方程中各变量对响应值影响的显著性, 概率 Pr 越小, 则相应变量的显著程度越高, 由相应数据的方差分析结果(表 3)可知, 回归模型的 $P = 0.000 1 < 0.01$, 表明回归模型显著. 失拟项 $P = 0.163 1 > 0.05$, 不显著, 说明该模型拟合程度好.

2.2.2 提取工艺的响应面分析与优化

图 4—图 6 的响应曲面图和等高线图直观地反

映了各实验因素与响应值之间的交互作用. 绿原酸得率随着乙醇体积分数和液料比的增加出现先升高后下降的规律(图 4), 得率对液料比的变化比对乙醇体积分数的变化要更为敏感. 从液料比和微波功率响应面和等高线图(图 5)可以明显地看出, 绿原酸得率的最优条件接近于液料比 30 和微波功率 490 W, 并在这两点交叉区域形成最大值. 并且可知, 得率随着液料比和微波功率的增加呈现先上升后下降的趋势. 从微波功率和乙醇体积分数的响应面和等高线图(图 6)可知, 虽然得率随着微波功率和乙醇体积分数的增加都出现先升高后下降的规律, 但可以看出, 绿原酸得率受微波功率的影响明显比乙醇体积分数的显著.

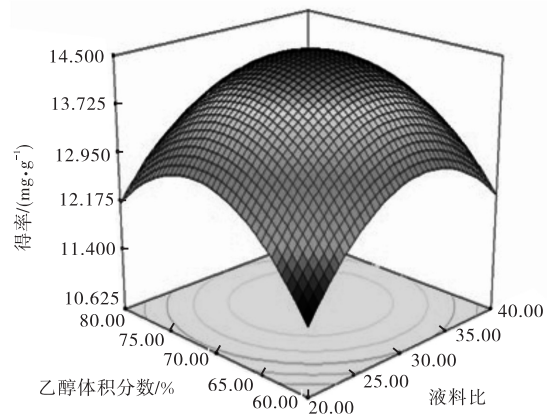
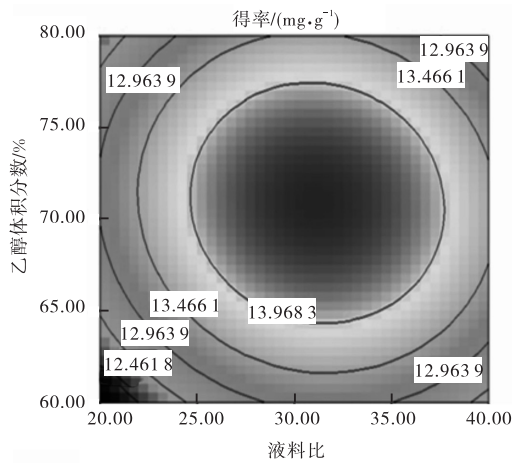


图 4 液料比与乙醇体积分数及其交互作用对绿原酸得率影响的响应曲面图和等高线图

Fig. 4 Response surface map and contour map of material to solvent ratio and ethanol concentration on the yield of chlorogenic acid

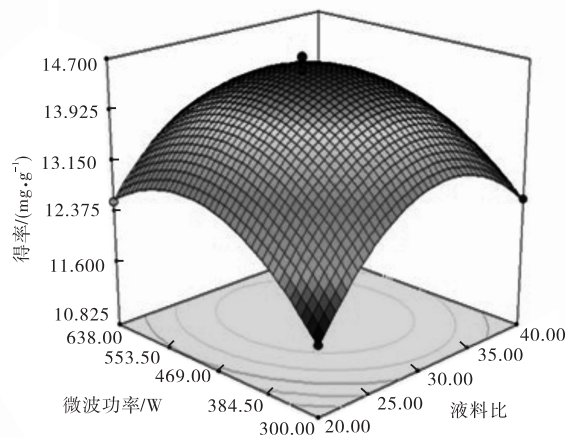
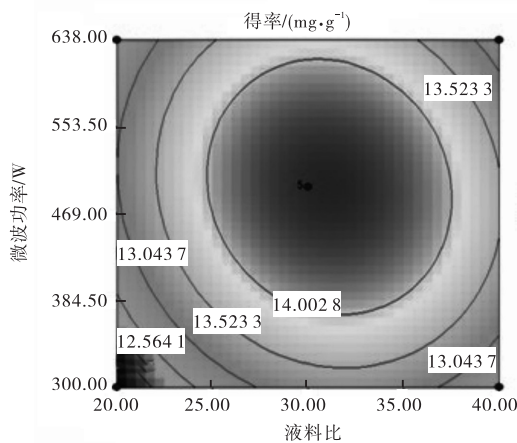


图 5 液料比与微波功率及其交互作用对绿原酸得率影响的响应曲面图和等高线图

Fig. 5 Response surface map and contour map of microwave power and material to solvent ratio on the yield of chlorogenic acid

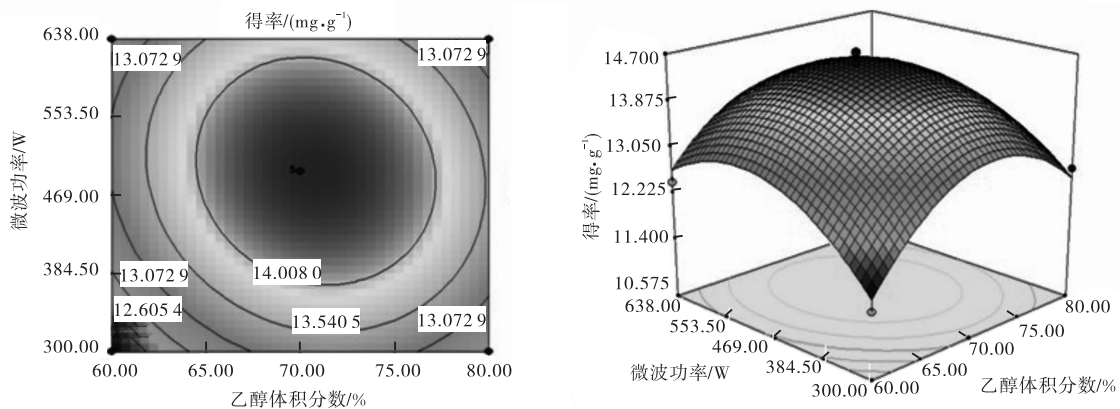


图6 微波功率与乙醇体积分数及其交互作用对绿原酸得率影响的响应曲面图和等高线图

Fig. 6 Response surface map and contour map of microwave power and ethanol concentration on the yield of chlorogenic acid

2.2.3 模型验证

通过响应面软件分析得出绿原酸最优提取工艺为:乙醇体积分数 70.77%,液料比 31.07,微波功率 493.64 W. 预测绿原酸得率 14.49 mg/g. 结合实际情况考虑验证实验工艺条件为:乙醇体积分数 70%,液料比 31,微波功率 495 W. 进行3次平行实验,测得绿原酸平均得率为 14.47 mg/g,与理论预测值基本相符. 因此,该法所得的优化工艺参数准确可靠.

3 结 语

基于 Design Expert 实验设计和数据处理软件,通过二次回归得到葵花籽粕中绿原酸微波辅助醇提工艺过程中绿原酸得率与液料比、乙醇体积分数和微波功率的回归模型. 利用模型的响应面和等高线,对影响绿原酸得率的因素及其相互作用进行了分析和讨论,得到最佳工艺参数为:液料比 (mL : g) 31,乙醇体积分数 70%,微波功率 495 W. 预测的绿原酸得率为 14.49 mg/g,验证得率为 14.47 mg/g,与预测值基本相符,说明该模型是合理准确的. 由于绿原酸热不稳定的特性,本实验加入了微波预处理,缩短了提取时间从而减少了绿原酸的分解,同时与传统的醇提方法相比提高了绿原酸的得率^[6];优化后的工艺参数为下一步的工业化生产奠定了一定的理论基础.

参考文献:

[1] Qi Wei, Zhao Ting, Yang Wen, et al. Comparative pharmacokinetics of chlorogenic acid after oral administration in rats[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2011, 1(4): 270-274.

- [2] 王志华. 葵花籽饮料的研制以及绿原酸提取工艺的研究[D]. 天津:天津科技大学,2004.
- [3] Mazvimba M T, Yu Ying, Cui Zhiqin, et al. Optimization and orthogonal design of an ultrasonic-assisted aqueous extraction process for extracting chlorogenic acid from dry tobacco leaves[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2012, 10(4): 311-320.
- [4] Liu Zhaohua, Liu Zhaoping, Shi Yanqiu, et al. Evaluation of the immunosensitizing potential of chlorogenic acid using a popliteal lymph node assay in BALB/c mice[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(4): 1059-1065.
- [5] 凌仁怡,王娟,沈平孺. 野菊花中绿原酸的微波辅助萃取研究[J]. *中草药*, 2008, 39(1): 60-62.
- [6] Upadhyay R, Ramalakshmi K, Jagan Mohan Rao L. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans[J]. *Food Chemistry*, 2012, 130(1): 184-188.
- [7] 胡鲜宝,吕加平,刘鹭,等. 响应面法优化葵花粕绿原酸醇提工艺[J]. *食品科技*, 2010, 35(9): 210-215.
- [8] 房李艳,赵亚洲,朱燕,等. 微波辅助浸提杜仲叶中绿原酸的工艺研究[J]. *江苏调味副食品*, 2010, 27(1): 39-42.
- [9] Sripad G, Prakash V, Narasinga Rao M S. Extractability of polyphenols of sunflower seed in various solvents[J]. *Journal of Biosciences*, 1982, 4(2): 145-152.
- [10] 周玲,王学魁,沙作良,等. 五味子木脂素超声循环提取工艺条件的优化[J]. *天津科技大学学报*, 2012, 27(1): 14-18.
- [11] 赵立辉. 山楂叶中黄酮类化合物提取和纯化方法研究[D]. 天津:天津科技大学,2009.

责任编辑:郎婧