

响应面法优化提取菠菜中黄酮类物质的工艺研究

赵娟娟

(衡水学院 生命科学系,河北 衡水 053000)

摘要:以菠菜为试材,在单因素试验的基础上,采用响应面法的 Box-Behnken 进行试验设计,对菠菜中黄酮类物质的提取条件进行了优化。结果表明:菠菜中黄酮类物质的最佳提取条件为:提取剂 80%乙醇,料液比 1:21.1,温度 73.1℃,浸提时间 64.1 min。

关键词:响应面分析法;菠菜;黄酮类物质;提取

中图分类号:S 636.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)14-0137-03

黄酮类化合物是一类低分子量的天然植物成分,为植物多酚类的代谢物,有很高的药用价值,如防止高血压,抗炎、抗菌、抗病毒等,特别是抗自由基及抗癌防癌作用^[1]尤为突出。蔬菜中黄酮类物质的含量在 21~644 mg/100g,主要存在于叶中。叶菜中黄酮类物质含量远高于果菜,茎菜和根菜中的黄酮类物质。由于菠菜叶子厚实叶肉多,含有较多的黄酮类物质,是研究蔬菜中黄酮类物质的好材料^[2]。

目前,对菠菜的研究多在色素方面,很少涉及对菠菜中黄酮类物质提取。该试验对菠菜中黄酮类物质提取方法进行了研究,对于菠菜的深加工利用及提高其医药价值具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物材料为菠菜(市售)。乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠为分析纯。UVmini-1240 紫外可见分光光度计(日本岛津);HH-1 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市医疗仪器厂);FA1004N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菠菜中黄酮含量的测定方法 提取液 0.5 mL 加 5%亚硝酸钠 0.3 mL,混匀放置 6 min 加硝酸铝 0.3 mL,混匀放置 6 min 加 4%的氢氧化钠 4 mL,再向其中加 30%的乙醇溶液,定容到 10 mL。在 510 nm 的波长下测其吸光度,以 30%的乙醇作为标样进行吸光度的测定^[4]。

1.2.2 提取率的测定方法 准确称取处理好的菠菜多次浸提,直至提取液吸光度基本为 0,可认为黄酮类物质

全部提出。分别收集各级提取液并测定其体积(V,mL)和吸光度值(A)。提取率=(V×A)/Σ(V×A)。

1.2.3 单因素试验对黄酮类物质提取率的影响 分别以不同浓度的乙醇、料液比、提取温度、提取时间为单因素,考察各因素对黄酮类物质提取率的影响。乙醇浓度对黄酮类物质提取率的影响:在料液比为 1:20,温度为 70℃条件下,分别加入不同浓度乙醇(60%、70%、80%、90%)浸提 1.5 h,研究乙醇浓度对黄酮类物质提取率的影响。料液比对黄酮类物质提取率的影响:在乙醇浓度为 80%,提取温度 70℃条件下,以不同料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30)浸提 1.5 h,研究料液比对黄酮类物质提取率的影响。提取温度对黄酮类物质提取率的影响:在乙醇浓度为 80%,料液比为 1:20 条件下,不同温度(50、60、70、80、90℃)提取 1.5 h,研究提取温度对黄酮类物质提取率的影响。提取时间对黄酮类物质提取率的影响:在乙醇浓度为 80%,料液比为 1:20,提取温度为 70℃条件下,分别设不同时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h)研究提取时间对黄酮类物质提取率的影响。

1.2.4 响应面试验对黄酮类物质提取率的影响 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,以菠菜中黄酮类物质提取率为响应值,设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验。15 个试验点分为析因点和零点,其中析因点为自变量取值料液比(X_1)、温度(X_2)、时间(X_3)所构成的三维顶点,零点为区域的中心点,零点试验重复 3 次,用以估计试验误差。试验设计见表 1。

表 1 响应面试验设计

水平	因素		
	X_1 料液比/g·mL ⁻¹	X_2 温度/℃	X_3 时间/min
-1	1:15	65	30
0	1:20	70	60
1	1:25	75	90

作者简介:赵娟娟(1982-),女,硕士,讲师,研究方向为天然产物研究与开发。E-mail:zhaojuanjuan456@163.com。

收稿日期:2013-03-29

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇浓度对黄酮类物质提取效果的影响 由图1可以看出,当乙醇浓度在60%~80%时,其吸光度随着乙醇浓度的增加而逐渐上升,到达80%以后,其吸光度呈平缓趋势。故选择80%的乙醇浓度进行浸提。

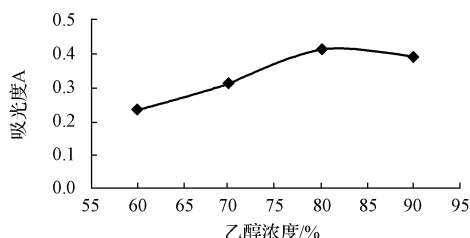


图1 乙醇浓度对提取效果的影响

2.1.2 料液比的确定对黄酮类物质提取效果的影响 由图2可知,当料液比为1:20时,随着料液比的增大吸光值呈现平缓趋势。料液比太小难以保证原料中的黄酮全部转移到液相中,提取率较低。但是由于料液比过大消耗大量溶剂,由此选择料液比为1:20。

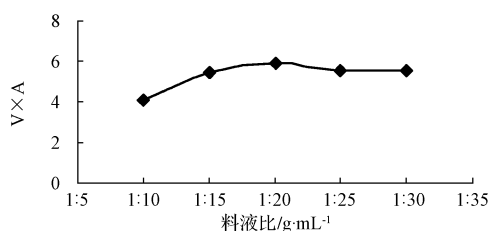


图2 料液比对提取效果的影响

2.1.3 提取温度对黄酮类物质提取效果的影响 由图3可知,温度的升高有助于传质过程,加快溶剂的渗透。当提取温度到达70℃之后吸光度呈下降趋势。所以70℃为最优的提取温度。

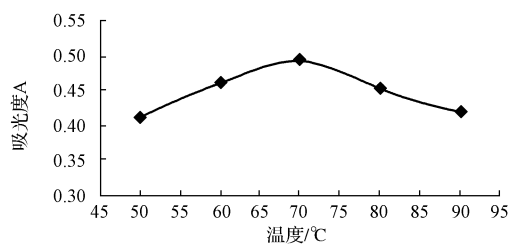


图3 提取温度对提取效果的影响

2.1.4 提取时间对黄酮类物质提取效果的影响 由图4可知,提取1.0 h之后其吸光度的变化趋势减慢,说明提取接近平衡。所以最佳提取时间选择1.0 h。

2.2 响应面试验分析结果

2.2.1 响应面试验结果 根据表2的试验结果,通过SAS软件处理将各因素回归拟和后得到回归方程。 $Y_1 = 0.673968 + 0.047814X_1 + 0.032241X_2 + 0.017207X_3 - 0.118331X_1^2 + 0.015811X_1X_2 - 0.023394X_1X_3 -$

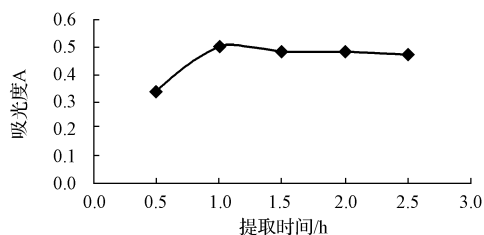


图4 提取时间对提取效果的影响

表2 响应面试验结果

RUN	X ₁	X ₂	X ₃	Y
1	15	65	60	0.44810
2	15	70	60	0.48272
3	25	65	60	0.49058
4	25	75	60	0.58845
5	20	65	30	0.51820
6	20	65	90	0.63283
7	20	75	30	0.63914
8	20	75	90	0.63735
9	15	70	30	0.45355
10	25	70	30	0.61749
11	15	70	90	0.51275
12	25	70	90	0.58311
13	20	70	60	0.68021
14	20	70	60	0.67502
15	20	70	60	0.66667

$0.053174X_2^2 - 0.029106X_2X_3 - 0.013914X_3^2$ 。

2.2.2 回归方程的方差分析 采用SAS RSREG程序对表2数据进行ANOVA分析,结果见表3。由表3可以看出,该方程回归显著,模型的 $R^2 = 97.93\%$,说明回归方程的拟合程度良好,失拟较小。由表3中的 P 值可知,方程中 X_2X_3 对 Y 值的影响达显著水平, X_1 、 X_2 、 X_1^2 、 X_2^2 对 Y 值的影响达极显著,表明试验因子对响应值对试验因子不是简单的线性关系。二次项对相应值也有很大的关系,这和模型回归中的平方项影响极显著相对应。交互项不显著,所以交互项作用的影响相对较小。

表3 回归方程各项的方差分析

Master model	DF	SS	MS	F	P
X ₁	1	0.018289	0.018289	45.84361	0.001068
X ₂	1	0.008316	0.008316	20.84402	0.006026
X ₃	1	0.002369	0.002369	5.937188	0.058897
X ₁ ²	1	0.0517	0.0517	129.5905	0.0001
X ₁ X ₂	1	0.001	0.001	2.506482	0.174228
X ₁ X ₃	1	0.002189	0.002189	5.487422	0.066172
X ₂ ²	1	0.01044	0.01044	26.16865	0.003721
X ₂ X ₃	1	0.003389	0.003389	8.493721	0.033229
X ₃ ²	1	0.000715	0.000715	1.791668	0.238359
Model	9	0.094476	0.010497	26.31247	0.001087
(Linear)	3	0.028974	0.009658	24.20827	0.002095
(Quadratic)	3	0.058925	0.019642	49.23325	0.000391
(Cross Product)	3	0.006578	0.002193	5.495875	0.048565
Total	14	0.096471			

注: $P < 0.05$ 为差异显著; $P < 0.01$ 为差异极显著。

2.2.3 响应面直观分析 从图5可看出,料液比与时间的交互作用不大,并发现时间轴向等高线变化密集。而

料液比轴向等高线的变化相对稀疏,故料液比对响应值峰值的影响较时间影响大。当温度位于中心水平时,时

间与料液比有交互作用,但是不显著。而料液比位于中心水平时,时间和温度的交互作用显著。

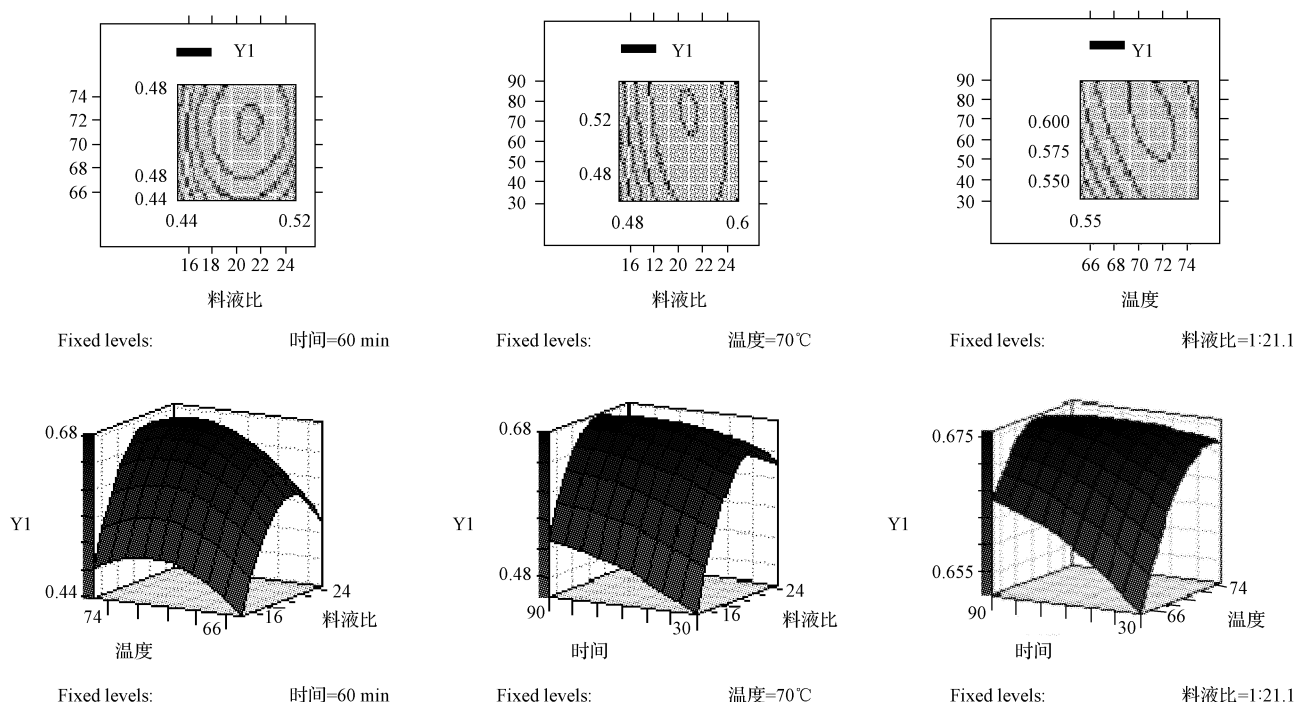


图5 各个因子交互作用的响应面的3D和等值线分析图

2.2.4 最佳提取条件的确定 由SAS分析得到,最大响应值(Y)时 $X_1=0.21322$, $X_2=0.31023$, $X_3=0.13525$ 。与其相对应的菠菜中黄酮类物质的最佳提取条件为:料液比1:21.1,温度73.1℃,时间64.1 min,理论最佳黄酮类物质1次提取率为0.68489。为了检验响应面法的可行性,采用得到的最佳提取条件进行验证试验。3次平行试验得到的实际提取率为0.680,与理论值相差0.7% $<1\%$,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。

3 结论

该试验结果表明,乙醇浸提菠菜中黄酮的最优提取条件为:乙醇浓度80%,料液比1:21.1,温度73.1℃,提

取时间64.1 min。此法安全实用且易于实现大规模生产。

参考文献

- [1] 邹浩军,明亮. 黄酮类化合物抗炎免疫及抗衰老药理研究进展[J]. 安徽卫生职业技术学院学报,2003,6(4):48-50.
- [2] 刘建涛,赵利,苏伟. 黄酮类化合物在青菜中的含量测定[C]. 第七届全国药用植物和植物药学术研讨会暨新疆第二届药用植物学国际学术研讨会论文集,2007.
- [3] 姚翔,彭程,肖泳,等. 湖南香柚皮中黄酮类物质提取工艺研究[J]. 湖南农业大学食品科学技术学院学报,2009,12(7):16-18.
- [4] 张玉梅,孙学斌,高旭年,等. 用紫外分光光度计法测定大豆异黄酮的总含量[J]. 中国食品安全卫生杂志,2000,12(4):7-9.

Study on Optimization Extraction Conditions of Flavonoid from Spinach by RSM

ZHAO Juan-juan

(Department of Life Science, Hengshui University, Hengshui, Hebei 053000)

Abstract: Taking spinach as material, the extraction of flavonoid from spinach was optimized by response surface methodology based on Box-Behnken. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: extraction solvent was 80% ethanol, ratio of material to liquid 1:21.1, extraction temperature 73.1℃, extraction time 64.1 min.

Key words: response surface methodology; spinach; flavonoid; extraction