

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201409030

咎丽霞. 香樟果皮花色苷提取工艺优化及抗氧化研究[J]. 广西植物, 2015, 35(4):603–608

Zan LX. Optimization of the extraction technology of camphor pericarp anthocyanins by response surface method[J]. Guihaia, 2015, 35(4):603–608

香樟果皮花色苷提取工艺优化及抗氧化研究

咎丽霞

(陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000)

摘 要: 为了优化香樟果皮花色苷的最佳提取工艺条件,用乙醇作为提取溶剂,选取提取时间、提取温度、提取剂浓度、料液比、pH 五因素,采用 Box-Behnken 建立三因素三水平模型,用响应面法优化各因素及其相互作用的最佳组合,用 Design-Expert 8.0 设计回归正交实验;同时用水杨酸比色法和 DPPH 法,测定了香樟果皮花色苷的抗氧化能力,并比较了不同放置时间对香樟果花色苷稳定性的影响。结果表明:香樟果花色苷最佳提取工艺的回归方程为 $Y=58.64+2.27A+12.78B+10.18C-14.01A^2-11.00B^2-7.56C^2$, $R^2=0.9796$,模型拟合程度良好,在该试验范围内,模型能够准确反映花色苷的提取结果;最佳工艺参数分别为 pH1.0、料液比 1:15、乙醇浓度 78.59%、提取温度 77.14 °C、提取时间 42.48 min,在此条件下香樟果花色苷的得率为 67.99 mg · 100 g⁻¹;在一定浓度范围内,香樟果皮花色苷清除羟自由基率和总抗氧化能力均与浓度成正线性相关,回归方程分别为 $y=0.3388x+13.485$ ($R^2=0.9856$), $y=0.0275x+0.0221$, ($R^2=0.9966$)。利用响应面法确定的最佳工艺条件合理,可用于香樟果皮花色苷的提取,同时香樟果花色苷具有良好的抗氧化活性,为天然色素的开发利用提供一定指导意义。

关键词: 香樟果皮; 花色苷; 提取; 响应面法; 抗氧化

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)04-0603-06

Optimization of the extraction technology of camphor pericarp anthocyanins by response surface method

ZAN Li-Xia

(College of Biological Science & Engineering , Shaanxi University of Technology , Hanzhong 723000 , China)

Abstract: The extraction technology of camphor pericarp anthocyanins was optimized preferably. The alcohol was used as the extracting solvent. Extracting time and temperature, solvent concentrations, proportion of material and solution and pH were discussed. The model of three factors and three levels was established through box-Behnken. The design of experiment was made by Design-Expert 8.0 software and optimization of various factors and their interaction effects were analyzed by response surface method. The ability of antioxidant was determined with colorimetric method using salicylic acid and DPPH method, and comparison of time to influence the stability of the anthocyanins. The regression equation of the best extraction of anthocyanins was $Y=58.64+2.27A+12.78B+10.18C-14.01A^2-11.00B^2-7.56C^2$, $R^2=0.9796$, and the fitting degree of model was good. Within the range of the test, the model reflected the extraction results. The results showed that the best extraction parameters were pH 1.0, material-solvent ratio 1 g : 15 mL, ethanol content 78.59%, extraction temperature 77.14 °C, extraction time 42.48 min. On this extraction condition, the content of the camphor pericarp anthocyanins was 67.99 mg · 100 g⁻¹. In a certain concentration, the ability of scavenging hydroxyl free radical and the total antioxidant capability were all

收稿日期: 2014-12-15 修回日期: 2015-03-31

基金项目: 陕西省科研计划项目(KJT06119-04);陕西理工学院科研项目(SLGKY14-17)。

作者简介: 咎丽霞(1977-),女,陕西韩城市人,硕士,副教授,主要从事药用植物资源开发利用研究。(E-mail)zanlx@126.com。

positive linear correlation with the concentration of anthocyanins. The regression equation respectively were $y = 0.3388x + 13.485 (R^2 = 0.9856)$, $y = 0.0275x + 0.0221, (R^2 = 0.9966)$. To determine the optimum technological conditions by using the response surface method were reasonable, it would provide certain guiding significance for the development and ntilization of natural pigment.

Key words: camphor pericarp; anthocyanins; extraction; response surface method; antioxidant

香樟(*Cinnamomun camphora*)也称樟树,为樟属常绿乔木植物。樟树因果皮中富含丰富的花色素,果实呈现紫黑色,在植物体中花色素常与糖结合形成苷类化合物,称为花色素(Anthocyanin)(辛秀兰等,2008)。花色素是一类以黄酮母核为基础的化合物,具有促进视红素再合成、清除人体自由基、抗肿瘤、抗炎症、提高免疫力、抗癌,抑制脂质过氧化和血小板凝集等多种生理活性功能(李颖畅等,2009)。同时花色素有很强的抗氧化活性,具有花色素作为一种天然色素,具有较好的着色力,在功能性食品和医药保健品领域得到了广泛的应用。近年来,国内学者对各类食用、药用植物花色素进行了广泛研究(李颖畅等,2013;赵昶灵等,2008),但从所查阅文献来看,在香樟花色素的研究方面较少涉及。该研究采用响应面法对香樟果皮花色素的提取工艺进行优化,以期获得最优的工艺参数,为香樟果皮中花色素的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

无水乙醇、浓盐酸、氯化钾、醋酸钠、水杨酸、无水乙酸钠、硫酸亚铁、H₂O₂均为分析纯。DPPH(批号 STBD4145V,美国 SIGMA 公司)。香樟果采自陕西省汉中市,由陕西理工学院王勇博士鉴定。FA2104 型电子天平(上海恒平仪器有限公司),PHSJ-4F 型酸度计(上海雷磁有限公司),FA2104 型电子天平(上海恒平有限公司),101-2AB 型干燥箱(天津泰斯特仪器公司),LC-800 型低速离心机(安徽中科中佳仪器有限公司),U-3900H 紫外可见分光光度计(日本 HITACHI 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 花色素含量的测定 精密称取 2 g 香樟果皮,咎丽霞(2013)的方法,选择 pH 为 1.0 和 4.5 两个值对花色素进行测定,溶液 pH=1.0,花色素 λ_{max}=510 nm 处有最大吸收,而当溶液 pH=4.5 时,花色素会转变为无色查尔酮,在 λ_{max} 处无吸收。用 A₇₀₀用来消除样品溶液浑浊的影响,通过示差法测

量计算总花色素的吸光度:

$$A = (A_{\lambda_{max}} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{\lambda_{max}} - A_{700})_{pH4.5}$$

花色素总含量的计算公式:

$$C(mg/g) = [(A \times V \times n \times M) / (\epsilon \times m)] \times 100$$

式中,A—示差法得到花色素的吸光度;V—提取液总体积(mL);n—稀释倍数;M—样品质量(g);ε—(矢车菊色素-3-葡萄糖苷)摩尔消光系数 26900;m—(矢车菊色素-3-葡萄糖苷)摩尔分子质量 449.2。

1.2.2 花色素提取工艺优化 通过选取提取时间、料液比、提取剂浓度、pH、提取温度等 5 个因素,用 Box-Behnken 建立三因素三水平模型(表 1)(王文君等,2011)。用 Design-Expert 8.0 软件设计实验,得到方差分析表和响应面分析网(孟宪军等,2010)。

表 1 因素水平表
Table 1 Table of factors and levels

水平 Level	因 素 Factor		
	A 提取时间 Extracting time (min)	B 提取温度 Extracting temperature (℃)	C 乙醇浓度 Alcohol concentration (%)
-1	20	60	60
0	40	70	70
1	60	80	80

1.2.3 清除羟自由基能力测定 精密量取 2 mL 6 mol · mL⁻¹ FeSO₄溶液,2 mL 花色素提取液(0.2、0.4、0.5、0.6、0.8 mg · mL⁻¹),2 mL 6 mol · mL⁻¹ H₂O₂溶液,依次加入试管中,摇匀,静置 10 min,再加入 2 mL 6 mol · mL⁻¹水杨酸溶液,摇匀,静置 30 min 后,于最大波长为 510 nm 处测定样品的吸光度 A_{样品};再用蒸馏水取代水杨酸溶液,用相同方法测定出对照样品的吸光度 A_{对照};最后用蒸馏水取代花色素提取液,用相同方法测定空白样品吸光度 A_{空白}(李南薇,2012)。按下式计算 ·OH 自由基清除率,比较花色素提取液对 DPPH 的清除效果。

·OH 自由基清除率%=[1-(A_{样品}-A_{对照})/A_{空白}]
×100%

1.2.4 总抗氧化能力测定 取 2.0 mL 不同浓度的花色素溶液(2、4、6、8、10 mg · mL⁻¹),加入 2.0 mL

DPPH($2\times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)溶液,混匀,25℃避光静置 30 min 后,用 95%乙醇调零,于 517 nm 处测定样品溶液的吸光度 $A_{\text{样品}}$;同法测定 2.0 mL DPPH 溶液与 2.0 mL 95%乙醇的吸光值作为 $A_{\text{空白}}$ 。计算 DPPH 自由基清除率(曾维才等,2013)。

$\text{DPPH 自由基清除率}(\%)=(1-A_{\text{样品}}/A_{\text{空白}})\times 100\%$

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 提取温度对提取结果的影响 设定提取时间 40 min、料液比 1 : 20、70%乙醇为提取溶剂、pH1.5 的条件,提取温度为 30、40、50、60、70、80℃时,考察花色苷的提取结果。根据 pH 示差法测得吸光度并计算花色苷总含量。由图 1 可知,提取温度作为提取因素之一,对花色苷的提取有明显影响。随着温度从 30~70℃的上升,花色苷提取量逐渐增加,在 70℃时提取结果最佳,当温度继续升高,提取率开始下降。原因是因为花色苷的稳定性较差,遇高温后结构发生变化,致使吸光度值降低。因此,选择 60、70、80℃作为响应面中花色苷提取温度。

2.1.2 提取时间对提取结果的影响 设定提取温度 70℃,料液比 1 : 20, 70%乙醇, pH=1.5 的条件,当提取时间分别为 20、40、60、80、100、120 min 时,考察花色苷提取结果的变化。图 2 显示,在 20~40 min 内,花色苷的提取量逐渐增大,达到最高,之后随着提取时间的延长,提取量逐渐下降。这可能是由于花色苷的稳定性差,长时间的高温提取逐渐破坏了花色苷的结构,因此,选择 20~60 min 作为提取时间的 3 个水平。

2.1.3 乙醇体积分数对提取结果的影响 设定提取温度 70℃、提取时间 40 min、料液比 1 : 20, pH=1.5 的条件,考察乙醇体积分数分别为 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%时,对提取结果的影响。由图 3 可知,乙醇浓度对提取效果的影响显著,70%乙醇提取效果最佳;乙醇浓度为 80%提取效果下降,和 60%乙醇相比花色苷提取量略低。这可能是因为当乙醇浓度相对较低时,糖类、果胶和其它一些水溶性杂质的溶出性较好,从而干扰影响了花色苷的溶出,致使提取效果较差;而当乙醇浓度相对较高时,提取溶剂的极性降低,则不利于花色苷的溶出。

2.1.4 料液比对花色苷提取的影响 设定提取时间 40 min、提取温度 70℃、70%乙醇、pH 1.5 条件下,

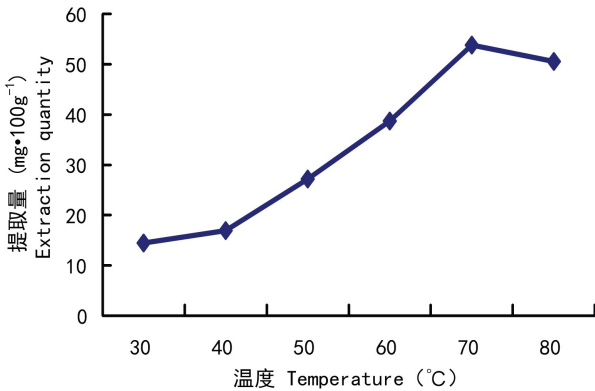


图 1 提取温度对结果的影响

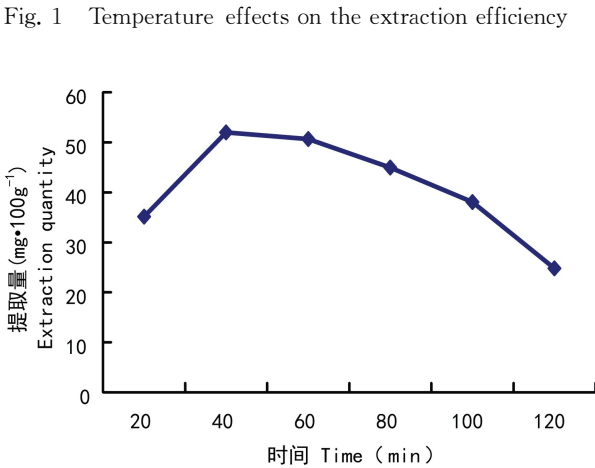


图 2 提取时间对结果的影响

Fig. 2 Time effects on the extraction efficiency

当料液比分别为 10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1、35 : 1、40 : 1 (g : mL)时,测量总花色苷的提取结果。由图 4 可知,料液比为 1 : 15、1 : 20、1 : 25 (g : mL)时花色苷的提取结果差异不显著,而之后随着料液比增大,提取效率呈下降趋势。从经济节能的角度来看,提取剂用量过大会造成溶剂的浪费,因此料液比适宜为 1 g : 15 mL。

2.1.5 pH 对花色苷提取的影响 设定提取时间 40 min、提取温度 70℃、料液比 1 : 20、70%乙醇条件下, pH 分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 时,考察花色苷的提取结果。由图 5 可知, pH 1.0 时提取效果最佳,随着 pH 增大,提取结果逐渐下降。这可能是因为随着 pH 值上升,花色苷水溶液的动态平衡从花色苷离子向查尔酮形式转化,由红色转变为无色。因此,提取液的适宜 pH 选为 1.0。

2.2 响应面分析

根据单因素试验结果,选择三因素提取时间、提

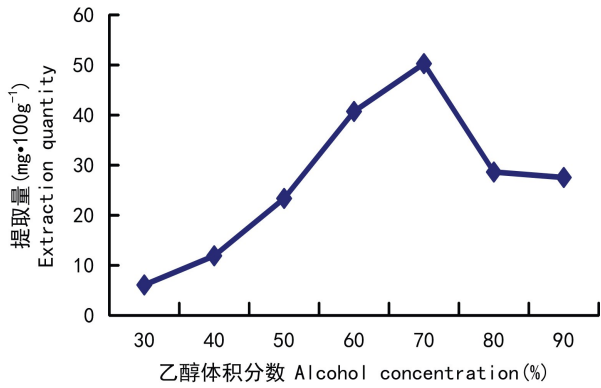


图 3 乙醇体积分数对结果的影响

Fig. 3 Extracted alcohol concentrations effects on absorbency

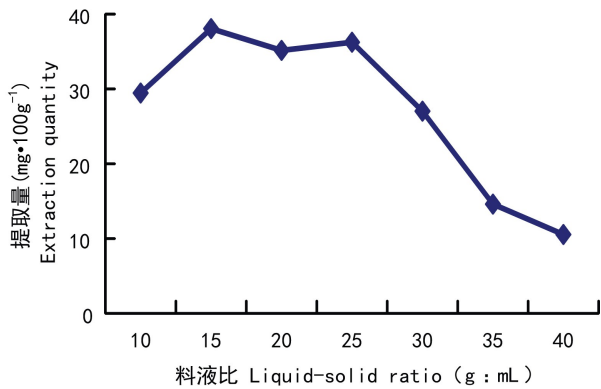


图 4 料液比对结果的影响

Fig. 4 Liquid-solid ratio effects on the extraction efficiency

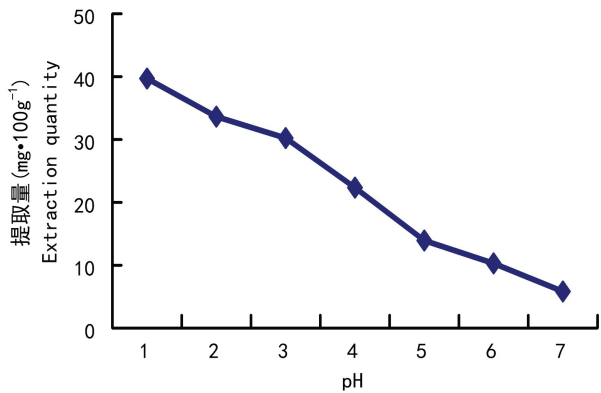


图 5 pH 对提取结果的影响

Fig. 5 Effects of pH on extraction efficiency

取温度、乙醇浓度为自变量(X),总花色苷提取量为响应值(Y),根据中心组合原理,对总花色苷提取工艺进行响应面分析。结果见表 2。

2.2.2.1 二次回归方程模型及方差分析 使用软件对表 3 中的数据结果展开二次多项回归拟合,得到回

表 2 响应面设计及结果

Table 2 Response surface experiment design and result

实验号 Test No.	A	B	C	吸光度 Y Absorbance	提取量 Extraction quantity (mg · g ⁻¹)
1	1	0	1	0.063 89	0.53
2	0	1	1	0.076 44	0.64
3	-1	1	0	0.049 67	0.41
4	0	-1	1	0.030 22	0.31
5	1	1	0	0.060 11	0.50
6	0	0	0	0.070 24	0.59
7	-1	0	-1	0.016 89	0.20
8	0	0	0	0.070 23	0.59
9	1	-1	0	0.018 00	0.22
10	-1	0	1	0.059 22	0.50
11	0	1	-1	0.051 60	0.43
12	1	0	-1	0.024 67	0.25
13	-1	-1	0	0.017 33	0.21
14	0	0	0	0.070 21	0.59
15	0	-1	-1	0.024 22	0.23
16	0	0	0	0.070 24	0.59
17	0	0	0	0.070 23	0.59

归方程: $Y = 58.64 + 2.27A + 12.78B + 10.18C - 14.01A^2 - 11.00B^2 - 7.56C^2$ 。

模型 $P < 0.001$,说明回归模型极其显著;复相关系数 $R^2 = 0.9796$,说明模型拟合程度良好,误差小。自变量(提取温度、乙醇浓度及提取时间)与响应值(花色苷提取量)之间具有显著的线性关系,可用于实验的理论预测。

从表 3 看出,模型的一次项中 B (温度)和 C (乙醇体积分数)($P < 0.0001$)对提取结果的线性效应影响极其明显, A 因素(时间)不显著;而交互项的影响均不显著,说明其他影响因素对总皂苷的提取影响不属于简单的线性关系。

2.2.2 响应面分析 把其中一因素设置在零水平,求另两因素的交互关系,使用 Design-Expert 8.0 软件,由回归方程得到其响应曲面(图 6-8)。

由图 6 可知,乙醇浓度为 70%、提取时间 40 min、提取温度 70 ℃时提取量达最大;由图 7 可知,提取温度 70 ℃、提取时间 40 min、乙醇浓度 70%时提取量达最大;由图 8 可知,提取时间 40 min、乙醇浓度 70%、提取温度 70 ℃时提取量达最大。

2.2.3 花色苷对羟自由基的清除作用 图 9 表明,随着花色苷浓度的增加,对 $\cdot OH$ 自由基的清除效果增强,通过对数据进行统计分析得花色苷浓度与清除率的回归方程为 $y = 0.3388x + 13.485$, $R^2 = 0.9856$ 。因此,香樟果花色苷具有良好的清除 $\cdot OH$

表 3 二次回归模型的显著性验证及方差分析表
Table 3 Analysis of variance in two regression models

方差来源 Source of variation	平方和 Quadratic sum	自由度 Free degree	均方 Mean square	F 值 F value	大于 F 值的概率 P Probability of greater than F value
Model	4 086.46	9	454.04	31.16	<0.000 1
A	41.36	1	41.36	2.84	0.135 9
B	1 307.39	1	1 307.39	89.72	<0.000 1
C	934.85	1	934.85	64.15	<0.000 1
AA	826.62	1	826.62	56.72	0.000 1
BB	509.15	1	509.15	34.94	0.000 6
CC	240.58	1	240.58	16.51	0.004 8
AB	16.65	1	16.65	1.14	0.320 6
AC	0.31	1	0.31	0.021	0.888 5
BC	38.75	1	38.75	2.66	0.147
残差	102.01	7	14.57		
Resident error					
拟合不足	102.01	3	34	2.83E+0.05	<0.000 1
Fitting problem					
纯误差	4.800E-0.04	4	1.200E-0.04		
Pure error					
总回归	4 188.4	16			
Total regression					

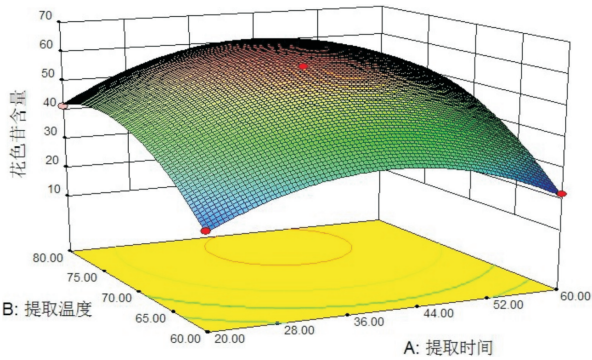


图 6 温度和时间交互影响花色苷提取的响应曲面
Fig. 6 Response surface diagram of effect between extraction temperature and time

的作用,随着多糖浓度的增加,对·OH 的清除能力也在逐渐增大。

2.2.4 花色苷的抗氧化能力 由图 10 可知,香樟果花色苷具有清除 DPPH 自由基的作用,对数据进行统计分析得花色苷质量浓度与清除率的回归方程为 $y=0.0275x+0.0221$, $R^2=0.9966$ 。

2.2.5 花色苷的稳定性研究 在自然光下香樟果花色苷放置不同时间,考察其对稳定性的影响。

图 11 表明,自然光下放置时间对香樟果花色苷

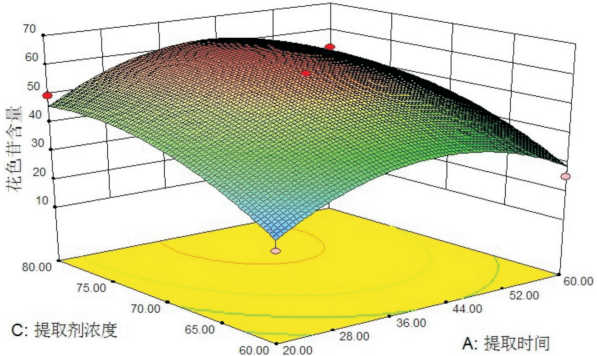


图 7 乙醇浓度和时间交互影响花色苷提取的响应曲面
Fig. 7 Response surface diagram of effect between alcohol concentration and extraction time

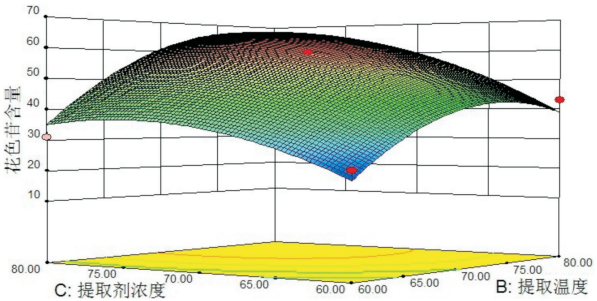


图 8 温度和乙醇浓度交互影响花色苷提取的响应曲面
Fig. 8 Response surface diagram of effects between extraction temperature and alcohol concentration

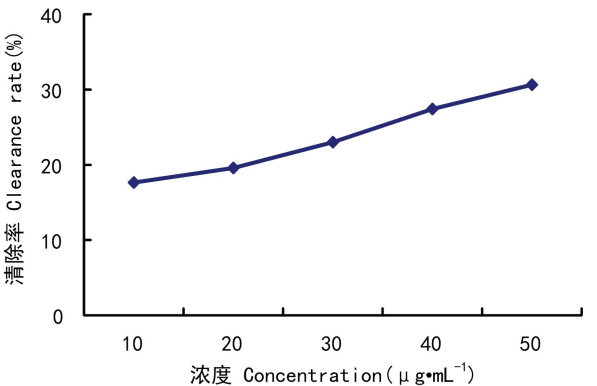


图 9 花色苷清除羟基自由基能力
Fig. 9 Hydroxyl radical scavenging ability of anthocyanins

稳定性有显著影响。在 36 h 内花色苷的降解较为缓慢,之后随自然光照时间的延长,吸光度出现明显的下降。因此,在操作过程中避免提取液的放置,保证试验结果的准确性。

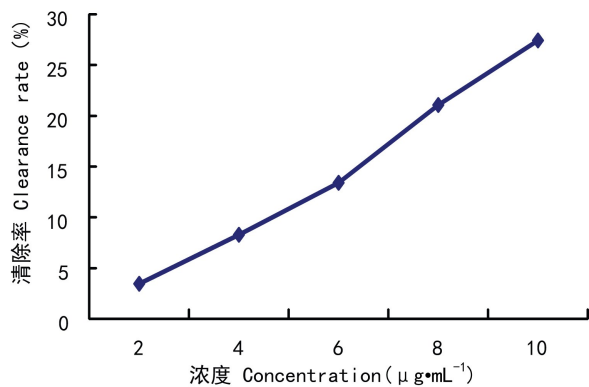


图 10 花色苷对 DPPH· 的清除作用

Fig. 10 DPPH scavenging ability of anthocyanins

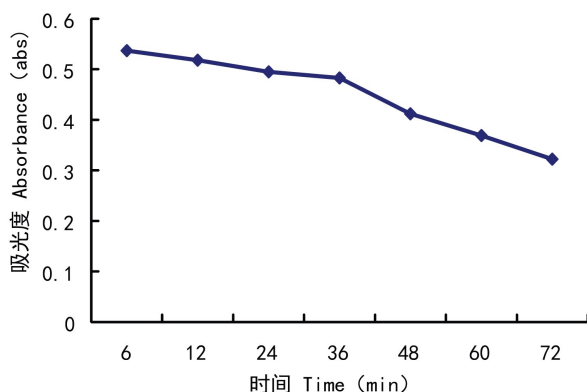


图 11 自然光下时间对花色苷稳定性的影响

Fig. 11 Effects of time on the anthocyanins stability in the natural light

3 结论

花色苷是极具潜力的功能性天然色素,从清除羟自由基和 DPPH 试验来看,在一定浓度范围内,随着浓度的增大,清除羟自由基和 DPPH 的能力均表现为线性增强,说明香樟果皮花色苷具有良好的抗氧化作用。但由于自身结构的原因,表现出较明显的不稳定性,易受 pH、温度、糖及黄酮类物质等多种因素的影响,储存过程中出现降解,色素损失严重。试验中香樟果皮花色苷的光稳定性较差,光照对香樟果皮花色苷具有较强烈的降解作用,因此对于花色苷应避光储存。pH 环境对花色苷的稳定性也有较显著的影响,在酸性条件下花色苷的吸光度值较大,较灵敏。

香樟果皮花色苷最佳提取工艺的回归方程为 $Y = 58.64 + 2.27A + 12.78B + 10.18C - 14.01A^2 - 11.00B^2 - 7.56C^2$,在试验范围内,该模型能准确反映花

色苷的提取结果。

通过 Design-Expert 8.0 软件对回归方程进行计算分析,得出香樟果皮花色苷的最佳提取工艺条件为提取时间 42.48 min,提取温度 77.14 °C,提取剂浓度 78.59 %,此条件下香樟果皮花色苷得率为 67.99 mg · 100g⁻¹。

采用试验所得最优条件进行验证后,与理论值比较得到相对误差为 9.1%。因此,可以认为采用响应面法,通过二次回归组合设计优化得到的花色苷最佳提取条件参数可靠,有一定的实用价值。

参考文献:

- Li YC(李颖畅), Wang YL(王亚丽). 2013. Research progress of the polyphenols from blueberry leaves and its application in food (蓝莓叶多酚研究进展及其在食品中的应用)[J]. *Food & Ferm Technol* (食品与发酵科技), **49**(6): 100-103
- Li YC(李颖畅), Qi FY(齐凤元), Feng YB(冯彦博). 2009. Effects of metal ions on the blueberry anthocyanins(金属离子对蓝莓花色苷的影响)[J]. *Food & Mach* (食品与机械), **29**(4): 52-54
- Li NW(李南薇), Yang ZL(杨振立). 2012. Extraction and antioxidant activity of polysaccharides from papaya leaf(木瓜叶多糖的提取及抗氧化活性研究)[J]. *Food Sci & Technol* (食品科技), **37**(11): 177-179
- Meng XJ(孟宪军), Wang GQ(王冠群), Song DQ(宋德群), et al. 2010. Optimization of the extraction technology of blueberry anthocyanins by response surface method(响应面法优化蓝莓花色苷提取工艺的研究)[J]. *Sci & Technol Food Ind* (食品工业科技), **31**(7): 226-229
- Shi G(石光). 2008. Research of extraction, purification and stability on anthocyanin in blueberry(蓝莓花色苷的提取、纯化、稳定性研究)[D]. Dalian(大连): Dalian Polytechnic University(大连工业大学)
- Wang WJ(王文君), Li ZS(李宗圣), Deng ZT(邓镇涛), et al. 2011. Comparison extraction of proanthocyanidins from purple sweet potatoes by three kind of extraction method(三种方法对比研究紫薯原花青素的最佳提取工艺)[J]. *J Nat Sci Heilongjiang Univ* (黑龙江大学自然科学学报), **28**(1): 90-95
- Wang CC(王朝臣). 2009. Research of extracting technology of anthocyanin in grape(葡萄花色苷提取技术的研究)[J]. *Agric Technol Equip* (农业技术与装备), **25**(2): 8-10
- Xin XL(辛秀兰), Wang YH(王彦辉). A preparation method of natural red pigment of raspberry (一种树莓天然红色素的制备方法) [P]. CN101253987B, 2008-09-03
- Zhao CL(赵昶灵), Wang Y(王颖), Duan CL(段承俐), et al. 2008. Anthocyanin essence of the Purple pigment and positive correlation of the anthocyanin content and the total ginsenoside content of the root tuber of *Panax notoginseng* (三七块根紫色素的花色苷本质及其含量和总皂苷含量的正相关性)[J]. *Guihaia* (广西植物), **28**(5): 661-670
- Zan LX(竺丽霞). 2013. Study on the extraction technology and stability of anthocyanin from *cayratia japonica* (乌莓花色苷的提取工艺及稳定性研究)[J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), **34**(10): 251-253
- Zeng WC(曾维才), Shi B(石碧). 2013. Common methods of antioxidant activity evaluation for natural products: a review(天然产物抗氧化活性的常见评价方法)[J]. *Chem Ind Eng Progr* (化工进展), **32**(6): 1 205-1 212