

朱兴一, 彭章芯, 谢捷, 等. 响应面法优化 β -环糊精辅助提取茶多酚的工艺[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 221-223.

响应面法优化 β -环糊精辅助提取茶多酚的工艺

朱兴一, 彭章芯, 谢捷, 王平

(浙江工业大学药学院/绿色制药技术与装备教育部重点实验室, 浙江杭州 310014)

摘要:以绿茶为原料, β -环糊精为辅料, 在单因素试验的基础上, 利用 Box-Behnken 中心组合设计和响应面分析法对绿茶茶多酚的水提取工艺参数进行优化研究。试验结果表明, 所得最佳工艺条件为: β -环糊精与茶叶质量比 0.4 : 1、液料比 26 : 1、提取温度 75 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 30 min、提取次数 1 次, 在此条件下茶多酚提取率达到 81.15%。与直接水提取法相比较, β -环糊精辅助提取的茶多酚提取率提高 11.93 百分点, 并减少了提取次数。

关键词: β -环糊精; 茶多酚; 提取; 响应面法

中图分类号: TS272 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0221-03

茶多酚(tea polyphenol, 简称 TP), 又名茶单宁、儿茶酸, 属多酚类物质, 是一种新型的天然抗氧化剂, 是从茶叶中提取的多羟基酚类衍生物的混合物, 占茶叶干重的 13%~30%, 鲜叶的 2%~5%。其中以儿茶素为主体成分, 占总酚含量的 60%~80%。茶多酚是一种高效、天然安全的抗氧化剂, 目前在油脂、食品、医药、日化、轻化、化妆品、保健等诸多方面已有广泛应用^[1], 它具有清除自由基、防癌治癌、抗疲劳、抗辐射等功能^[2], 被专家誉为 21 世纪将对人类健康产生巨大影响的化合物。我国是茶叶生产大国, 从茶叶中有效提取茶多酚并研发相应保健食品、药品, 不仅能增强人类身体健康, 而且能创造出良好的经济效益。目前茶多酚粗品常用的提取方法是水提取法和乙醇溶液提取法。水提取法虽然成本低, 但是提取率低, 产物中水溶性杂质多; 乙醇溶液提取法需要大量的乙醇, 且成本高、耗时长、有效成分损失大。 β -环糊精(β -CD)是由 7 个葡萄糖残基以 α -1,4-糖苷键连接而成的环状化合物, 具有“内疏水, 外亲水”的“超微囊”筒式结构, 在水溶液中, 它的疏水空腔可以选择饱和大小和形状合适的分子形成超分子复合物^[3]。药物分子经 β -环糊精包合后, 多种药学性质可以得到改善, 如改变药物的溶解度和溶出速率, 提高药物的稳定性等。近年来, 国内有学者采用 β -CD 作为辅助性材料, 提取丹参、虎杖、银杏黄酮和沙棘总黄酮中有效成分, 取得了较理想的结果^[4-7]。考虑到 β -CD 可能会与茶多酚形成包合物, 本研究将 β -CD 应用于水提茶多酚的工艺中, 以茶多酚的提取率为评价指标, 在 β -CD 添加量、液料比、提取温度、提取时间、提取次数等单因素试验基础上, 利用响应面分析法优化 β -CD 辅助提取茶多酚的工艺条件, 希望为开发利用茶多酚资源及工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

绿茶原料采自四川, 粉碎后备用, 茶叶原料中茶多酚的含量为 23.4%; β -环糊精(化学纯, 国药集团化学试剂有限公司); 其他试剂均为国产分析纯。732PC 型紫外可见分光光度计(上海普光仪器公司); HX-200 高速中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金药具厂); HHS 型恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 茶多酚提取率的计算 茶多酚含量测定参照 GB/T 8313—2002《茶 茶多酚测定》, 然后按下式计算茶多酚提取率:

$$\text{茶多酚提取率} = [(C \times V) / (m \times 23.4\%)] \times 100\%$$

式中: C 为提取液中茶多酚的含量(g/mL); V 为提取液的体积(mL); m 为供试茶叶的质量(g); 23.4% 为茶叶原料中茶多酚的含量。

1.2.2 茶多酚的提取及工艺优化 考察 β -CD 与茶叶质量比(0.2 : 1、0.4 : 1、0.6 : 1、0.8 : 1、1 : 1)、液料比(10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1)、提取温度(25、40、60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$)、提取时间(10、20、30、40、50 min)、提取次数(1、2、3 次)5 个因素对茶多酚提取率的影响。称取一定量的绿茶原料和 β -CD, 按一定的液料比加水溶解, 然后放入一定温度的恒温水浴锅中加热搅拌提取一定时间。提取结束后, 趁热抽滤, 用分光光度计于 540 nm 处测定滤液的吸光度, 并计算出茶多酚的含量和提取率。确定单因素水平后, 利用 Box-Behnken 中心组合设计和响应面分析法对茶多酚的提取条件进行优化。

2 结果和分析

2.1 单因素试验结果

经单因素试验得出 β -CD 辅助提取绿茶茶多酚的适宜条件为: β -CD 与茶叶质量比 0.4 : 1、液料比 25 : 1、提取温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 30 min、提取次数 1 次。

2.2 响应面分析法优化茶多酚提取参数

2.2.1 响应面分析因素水平的选取 根据 Box-Behnken

收稿日期: 2013-01-18

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 21006097); 国家自然科学基金(编号: 21076191)。

作者简介: 朱兴一(1977—), 男, 湖北黄冈人, 博士, 副教授, 主要从事天然药物研究。E-mail: zxy@zjut.edu.cn。

通信作者: 王平, 博士, 教授, 主要从事天然药物研究。E-mail: wangping45@zjut.edu.cn。

的中心组合试验设计原理^[8-10],综合单因素影响试验结果,选取 β -CD 与茶叶质量比(A)、液料比(B)、提取温度(C)、提取时间(D)4 个因素为自变量,茶多酚的提取率为响应值,在单因素试验的基础上采用 4 因素 3 水平的响应面分析方法,试验因素与水平设计见表 1。

表 1 茶多酚提取响应面分析因素与水平

试验因素	代码	编码水平		
		-1	0	1
β -CD 与茶叶质量比	A	0.2 : 1	0.4 : 1	0.6 : 1
液料比	B	20 : 1	25 : 1	30 : 1
提取温度(℃)	C	60	70	80
提取时间(min)	D	20	30	40

注:编码值与真实值之间的关系为 A=(β -CD 与茶叶质量比-0.4)/0.2;B=(液料比-25)/5;C=(提取温度-70)/10;D=(提取时间-30)/10。

2.2.2 响应面分析方案及结果 如表 2 所示,本试验共 29 个试验点,其中 24 个为分析因点,5 个为零点,析因点为变量取值在 A、B、C、D 所构成的三维顶点;零点为区域的中心点,其中零点试验重复 5 次,用以估算试验误差。

表 2 茶多酚提取响应面设计方案和试验结果

试验 编号	因素				提取率 (%)
	A: β -CD 与 茶叶质量比	B:液料 比	C:提取 温度	D:提取 时间	
1	0	-1	1	0	80.36
2	-1	-1	0	0	79.64
3	-1	1	0	0	80.84
4	0	-1	-1	0	79.60
5	1	0	1	0	80.96
6	0	0	1	1	81.12
7	0	0	0	0	81.48
8	1	1	0	0	80.96
9	0	-1	0	-1	80.20
10	0	1	1	0	81.04
11	0	0	-1	1	79.84
12	1	0	-1	0	79.96
13	-1	0	1	0	80.36
14	0	1	0	1	81.28
15	0	-1	0	1	80.92
16	0	1	0	-1	80.88
17	-1	0	0	1	80.28
18	0	1	-1	0	79.84
19	1	0	0	-1	81.04
20	0	0	0	0	81.44
21	1	-1	0	0	80.72
22	0	0	0	0	81.56
23	-1	0	-1	0	79.12
24	-1	0	0	-1	79.24
25	0	0	0	0	81.48
26	0	0	0	0	81.20
27	1	0	0	1	81.12
28	0	0	1	-1	81.04
29	0	0	-1	-1	79.44

利用 Design Expert 8.0.6 对表 2 的结果进行方差分析后,得到二次回归方程: $Y = 81.43 + 0.44 \times A + 0.28 \times B + 0.59 \times C + 0.23 \times D - 0.24 \times A \times B - 0.060 \times A \times C - 0.24 \times$

$$A \times D - 0.11 \times B \times C - 0.080 \times B \times D - 0.080 \times C \times D - 0.59 \times A^2 - 0.34 \times B^2 - 0.79 \times C^2 - 0.32 \times D^2。$$

由表 3 回归方差分析显著性检验表明,该回归模型 $P < 0.0001$,方程模型达到极显著,失拟项 $P = 0.1302 > 0.05$,不显著,表明该模型方程显著,不同条件处理间的差异高度显著,说明这种试验方法是准确可靠的,使用该方程模拟真实的 4 因素 3 水平的分析是可行的。该回归模型的总决定系数 $R^2 = 0.9533$,调整决定系数 $\text{Adj } R^2 = 0.9067$,说明该模型的拟合程度较好,试验误差小。因此该回归方程模型成立,可以用此模型对 β -CD 辅助提取茶多酚进行分析及预测。

表 3 茶多酚提取参数数学回归分析结果

来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
回归模型	14	14.18	14.18	20.44	<0.0001**
A	1	2.32	2.32	46.87	<0.0001**
B	1	0.96	0.96	19.43	0.0006**
C	1	4.18	4.18	84.27	<0.0001**
D	1	0.62	0.62	12.44	0.0034**
AB	1	0.23	0.23	4.65	0.0490*
AC	1	0.014	0.014	0.29	0.5984
AD	1	0.23	0.23	4.65	0.049*
BC	1	0.048	0.048	0.98	0.3398
BD	1	0.026	0.026	0.52	0.4842
CD	1	0.026	0.026	0.52	0.4842
A ²	1	2.29	2.29	46.22	<0.0001**
B ²	1	0.75	0.75	15.07	0.0017**
C ²	1	4.04	4.04	81.53	<0.0001**
D ²	1	0.68	0.68	13.77	0.0023**
残差	14	0.69	0.050		
失拟项	10	0.62	0.062	3.31	0.1302
净误差	4	0.075	0.019		
总误差	28	14.87			

注: * 表示显著水平 ($0.01 \leq P < 0.05$), ** 表示极显著水平 ($P < 0.01$), $R^2 = 0.9533$, $\text{Adj } R^2 = 0.9067$ 。

由表 3 可知,在 β -CD 辅助提取茶多酚的工艺参数中,在所选的各因素水平范围内,影响茶多酚提取率的因素按主次顺序排列为:提取温度> β -CD 添加量>液料比>提取时间。从各因素对茶多酚提取率的影响来看,一次项和二次项对茶多酚的提取率都有极为显著的影响($P < 0.01$),交互项中 AD 和 AB 对茶多酚有显著的影响($P < 0.05$),这同样也说明了 β -CD 添加量和液料比、 β -CD 添加量和提取时间对响应值的影响不是简单的线性关系。

响应面图形是响应值与各试验因子所构成的三维空间的曲面图,从响应面分析图上可形象地看出最佳参数及各参数之间的相互作用。通过响应面三维图,可直观地反映各因素的交互作用对响应值的影响,从而确定最佳工艺参数范围。图 1 是 4 个影响因素之间的交互作用对茶多酚提取率的影响,比较响应面三维图可知,在所选范围内存在极值,即响应面最高点;三维空间的曲面图形中曲线较陡,说明交互作用显著。比较 6 组响应面图可以看出 β -CD 添加量与液料比、 β -CD 添加量和提取时间的交互作用对提取率的影响最大,其次是液料比与温度,而液料比与时间、温度与时间、 β -CD 的添加量与温度对提取率的影响较小。

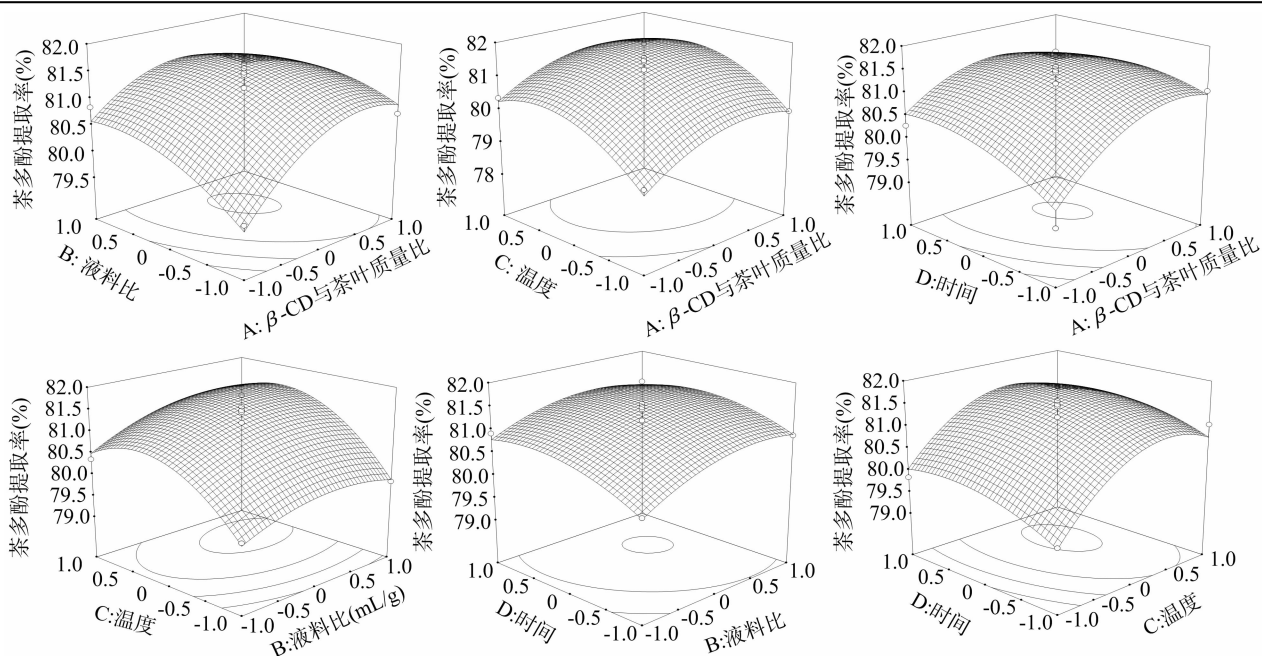


图1 茶多酚提取影响因素交互作用的响应面和等高线

2.3 茶多酚最佳提取工艺条件的确定及检验

通过软件 Design - Expert 求解回归方程,最后可以得到 β -CD 辅助提取茶多酚的最佳工艺条件: β -CD 与茶叶质量比为 0.42 : 1、液料比为 25.86 : 1、提取温度为 75.41 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间为 29.93 min。在此条件下,茶多酚的提取率为 81.60%。根据实际操作的需要,选取最佳工艺条件: β -CD 与茶叶质量比为 0.4 : 1、液料比为 26 : 1、提取温度为 75 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间为 30 min。在此条件下进行 3 次平行试验,实际测得茶多酚的平均提取率为 81.15%,与预测值 81.60% 非常接近。因此,基于响应面法所得的优化提取工艺参数准确可靠,具有实用价值。

2.4 β -CD 辅助提取与直接水提取结果的比较

对直接水提取茶多酚的工艺进行了响应面分析,得到该方法的最佳工艺条件:液料比 25 : 1、提取温度 80 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 40 min、提取次数 2 次,在此条件下进行 3 次平行试验,将结果与 β -CD 辅助提取法相比较,结果见表 4。由表 4 可知, β -CD 辅助提取的茶多酚提取率比直接水提取高 11.93 百分点。说明在茶多酚的水提工艺中添加 β -CD 作辅料,可以提高茶多酚的提取率。 β -CD 的辅助作用主要是由于茶多酚溶出后立刻被 β -CD 包合,增加了茶多酚在组织细胞和水溶液中(游离态)的浓度差,从而提高了茶多酚的溶出速率,同时, β -CD 包合后的茶多酚在水中的溶解度也会有所提高。

表4 β -环糊精辅助提取与直接水提取茶多酚比较

提取方式	β -CD 与茶叶 质量比	液料比 (mL : g)	提取 温度 ($^{\circ}\text{C}$)	提取 时间 (min)	提取 次数 (次)	茶多酚 提取率 (%)
β -CD 辅助提	0.4 : 1	26 : 1	75	30	1	81.15
直接水提		25 : 1	80	40	2	69.22

3 结论

利用 Design Expert 8.0.6 软件,采用 Box - Behnken 建立

β -CD 辅助提取茶多酚的回归模型,方程拟合良好。在 β -CD 辅助提取茶多酚的过程中,各提取因素对茶多酚提取率的影响顺序为:提取温度 > β -CD 添加量 > 液料比 > 提取时间。茶多酚提取的最佳工艺条件是: β -CD 与茶叶质量比 0.4 : 1、液料比 26 : 1、提取温度 75 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 30 min、提取次数 1 次。在此条件下茶多酚提取率为 81.15%。与水直接提取茶多酚的方法相比, β -环糊精辅助提取的茶多酚提取率提高 11.93 百分点,并减少了提取次数。

参考文献:

- [1] 朱桂勤,李建科. 茶多酚的功能研究进展[J]. 食品研究与开发, 2005,26(1):33-35.
- [2] 李淑娟. 茶多酚的保健和药理作用研究进展[J]. 西北药学杂志,2010,15(1):68-70.
- [3] 雍国平,李光水,郑飞,等. β -环糊精包合物的结构研究[J]. 高等学校化学学报,2000,21(7):1124-1126.
- [4] 张振海,刘力,徐德生,等. 环糊精辅助提取丹参工艺的研究[J]. 中成药,2005,27(3):264-266.
- [5] 马坤芳,王德旺,任勇,等. β -环糊精选择性提取虎杖化学成分及体外抗内毒素活性研究[J]. 上海中医药杂志,2008,42(8):81-82.
- [6] 徐志红,李磊,武法文,等. 环糊精对黄酮的包合作用及其在银杏黄酮提取中的应用[J]. 精细化工,2005,22(10):762-765.
- [7] 吴春芝,谷福根,师帅,等. β -环糊精辅助提取沙棘总黄酮工艺研究[J]. 中国药业,2012,21(14):65-67.
- [8] 张寒俊,刘大川,李永明. 响应面分析法在菜籽浓缩蛋白制备工艺中的应用[J]. 中国油脂,2004,29(8):41-44.
- [9] 吴晖,赖富饶,胡筱波,等. 响应面分析法优化油菜花粉多糖提取工艺的研究[J]. 食品与机械,2007,23(5):66-69,73.
- [10] 孙延芳,陈强,葛福富,等. 响应面法优化微波辅助提取火龙果多酚[J]. 广东农业科学,2011,38(22):83-86.