

谢宇奇, 零学仕, 周作树, 等. 枫香树叶黑色素粗产品提取工艺的优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 348–351.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.109

枫香树叶黑色素粗产品提取工艺的优化

谢宇奇¹, 零学仕², 周作树¹, 莫春风¹, 奚文权¹

(1. 百色学院化学与生命科学系, 广西百色 533000; 2. 广西南宁市环境监察支队, 广西南宁 530021)

摘要:以枫香树叶为原料提取黑色素粗产品。在单因素试验的基础上应用 Box-Behnken 中心组合设计建立数学模型, 以提取得率作为响应值, 对提取剂浓度、料液比、提取时间等 3 个主要影响因素进行响应面法分析, 得到枫香树叶黑色素提取的优化工艺条件。结果表明, 3 个因素对枫叶黑色素提取得率影响由大到小依次为料液比、乙醇浓度、提取时间, 最优提取工艺参数为乙醇浓度 40%、料液比 1 g : 40 mL、最佳提取时间 4 h, 此条件下初步干燥的枫香树叶黑色素粗产品的提取得率为 41.47%。

关键词:枫香树叶; 黑色素; 优化; 提取工艺; 工艺参数; 响应面分析法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0348-04

黑色素是广泛存在于动植物和微生物界的保护性色素^[1-2]。天然黑色素具有抗病毒、抗辐射和提高免疫力等多种功效, 能抑制艾滋病病毒复制^[3]、解蛇毒^[4], 还能治疗老年性痴呆症、帕金森症等与黑色素缺乏相关的神经系统疾病^[5]。天然黑色素虽然存在较为广泛, 但是由于染色工序相对复杂, 染色效果不稳定、生产成本高等原因, 违规添加人工合成色素, 制造有毒“黑色”食品的现象时有发生, 存在致病安全隐患。从不同来源提取天然黑色素已经成为研究热点。人们已成功从黑米^[6]、黑木耳^[7]、花椒籽^[8]等天然食品中提取出黑色素。枫香树(*Liquidambar formosana* Hance) 叶中含有丰富的花色苷类黑色素, 具有有祛风湿、行气、解毒等功效^[9], 常用于治疗疮疖肿痛及外伤出血等症^[10-11], 在药用研

究方面有重要开发价值^[12-13]。我国壮族、黎族等少数民族利用枫香树叶黑色素染制黑色糯米饭有着悠久的历史, 其安全性和药用功效得到了长期检验, 是制取天然黑色素的理想原料。目前, 枫香树叶黑色素的提取工艺鲜见报道^[14-16]。本试验以枫香树叶为原料, 采用响应面分析法优化提取工艺, 从而为枫香树叶黑色素的开发利用提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验材料和试剂 枫香树叶样品: 采集于广西壮族自治区百色市右江区, 洗净后经 60 ℃ 干燥, 粉碎备用; 无水乙醇、石油醚、盐酸、乙酸乙酯、丙酮等药品均为国产 AR 级。

1.1.2 仪器与设备 UA-2700 型分光光度计(日本岛津公司); TGL-16M 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵(河南郑州市世纪双科实验仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 枫香树叶黑色素提取工艺流程 提取工艺流程: 新鲜

收稿日期: 2014-10-24

基金项目: 广西高校科学技术研究项目(编号: LX2014441)。

作者简介: 谢宇奇(1979—), 男, 壮族, 广西靖西人, 硕士, 高级实验师, 主要从事天然产物化学及化学分析研究。E-mail: xiekey@sina.com。

参考文献:

- [1] 袁丹, 张国峰, 王瑞杰. 水飞蓟果实、果皮及其提取物质量评价法的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(2): 119–122, 131.
- [2] 陈毓荃, 王春梅. 水飞蓟综合利用基础研究 II. 果实油脂和蛋白质[J]. 西北农业学报, 1998, 7(1): 84–86.
- [3] 朱淑云, 董英, 陈晓东, 等. 水飞蓟粕蛋白氨基酸组成及加工功能特性研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(8): 71–74, 83.
- [4] Charrier C, Azerad R, Marhol P, et al. Preparation of silybin phase II metabolites; Streptomyces catalyzed glucuronidation[J]. Journal of Molecular Catalysis B – Enzymatic, 2014, 102: 167–173.
- [5] Balszuweit F, John H, Schmidt A, et al. Silibinin as a potential therapeutic for sulfur mustard injuries[J]. Chemico-Biological Interactions, 2013, 206(3): 496–504.
- [6] Sadava D, Kane Susan E. Silibinin reverses drug resistance in human small-cell lung carcinoma cells[J]. Cancer Letters, 2013, 339(1):

- 102–106.
- [7] Zhao G L, Liu Y, Zhao M M, et al. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate[J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1438–1443.
- [8] 刘远洋, 顾炜, 郭健, 等. 酶解程度对花生蛋白理化性质及功能特性的影响[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(2): 27–31.
- [9] Wang J S, Su Y J, Jia F, et al. Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis[J]. Chemistry Central Journal, 2013, 7(1): 62.
- [10] 王素雅, 刘胜, 鞠兴荣, 等. 中性蛋白酶限制性水解对高温菜籽粕蛋白功能性质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(1): 56–59.
- [11] 朱淑云, 董英, 肖香, 等. 水飞蓟蛋白组分的理化特性研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(10): 15–20.
- [12] Zambrowicz A, Timmer M, Polanowski A, et al. Manufacturing of peptides exhibiting biological activity[J]. Amino Acids, 2013, 44(2): 315–320.

叶片→洗净后干燥→粉碎→称质量→浸渍提取→分离,收集滤液→以 60 ℃烘干→黑色素粗产品。

黑色素提取得率计算:得率 $y = \text{黑色素粗产品质量} / \text{枫香树叶粉末质量} \times 100\%$ 。

1.2.2 提取剂的选择 准确称取相同质量的枫香树叶样品 5 份,按 1 g : 30 mL 的料液比分别加入蒸馏水、乙醇、乙酸乙酯、石油醚、丙酮等提取剂,调节 pH 值 < 3.5,在相同水浴中浸渍提取 1 h。以 3 000 r/min 的转速离心分离,准确移取相同体积提取液,用相应提取剂稀释定容到相同容积容量瓶,并以相应提取剂为参比,分别测 210 nm 处的吸光度。

1.2.3 测定波长的选择 取枫香树叶的乙醇提取液,稀释到适合紫外-可见分光光度计工作的浓度后,在 200 ~ 400 nm 范围内进行紫外光谱扫描,绘制吸光图,从图中选取最大吸收波长为本试验测定波长。

1.2.4 提取温度的选择 称取 5 份 1.00 g 枫香树叶样品置于 100 mL 锥形瓶中,按料液比为 1 g : 30 mL 加入提取剂,调节 pH < 3.5,密封后分别在 40、50、60、70 ℃ 的水浴中恒温浸提 1 h。离心沉淀,取上层提取液,分别准确移取 25 μL 上清液,并用相应的提取剂定容至 25.00 mL,以相应的提取剂为参比,测 210 nm 波长的吸光度。

1.2.5 枫香树叶黑色素提取的单因素研究

1.2.5.1 提取剂浓度的影响 称取 5 份枫香树叶样品 1.00 g,置于 100 mL 锥形瓶中,分别按料液比 1 g : 30 mL 加入 20%、40%、50%、60%、80% 的乙醇溶液,调节 pH 值 < 3.5,密封后在 60 ℃ 恒温水浴中提取 1 h。离心沉淀,分别移取 25 μL 上清液,并分别用相应的提取剂定容至 25.00 mL。以相应的提取剂为参比,测 210 nm 波长处的吸光度。

1.2.5.2 料液比的影响 称取 5 份枫香树叶样品 1.00 g,置于 100 mL 锥形瓶中,分别按分别按料液比为 1 : 10、1 : 20、1 : 30、1 : 40、1 : 50 (g : mL) 加入同浓度提取剂,调节 pH 值 < 3.5,密封后在 60 ℃ 恒温水浴中提取 1 h。抽滤收集滤液,在恒温干燥箱中用 60 ℃ 烘至恒重,后计算成品得率。

1.2.5.3 提取时间的影响 称取 8 份枫香树叶样品 1.00 g,置于 100 mL 锥形瓶中,按 1 g : 30 mL 的料液比加入提取剂,调节 pH 值 < 3.5,在 60 ℃ 的恒温水浴中分别浸提 0.5、1、2、3、4、5、6、7 h。离心沉淀后,分别移取 25 μL 提取液,用相应的提取剂定容至 25.00 mL。以相应的溶剂为参比,测 210 nm 波长处的吸光度。

1.2.6 响应面法优化枫叶黑色素的提取工艺 选取 3 因素 3 水平的响应面分析方法,因素水平编码见表 1。

表 1 黑色素提取响应面分析因素与水平

水平	因素		
	x_1 :乙醇浓度 (%)	x_2 :料液比 (g : mL)	x_3 :提取时间 (h)
-1	40	1 : 20	2
0	50	1 : 30	3
1	60	1 : 40	4

2 结果与分析

2.1 枫香树叶黑色素提取剂的选择

各种提取剂的试验结果如表 2 所示,由表 2 可知乙醇溶液的提取效率最高,本试验选取乙醇作为枫香树叶黑色素的

表 2 不同提取剂的吸光度

提取剂	吸光度
蒸馏水	2.530
乙醇	3.519
丙酮	2.050
石油醚	0.033
乙酸乙酯	3.386

提取剂。

2.2 枫香树叶黑色素最大吸收波长的选择

枫香树叶黑色素的乙醇提取液在 200 ~ 400 nm 范围内的光吸收情况如图 1 所示。

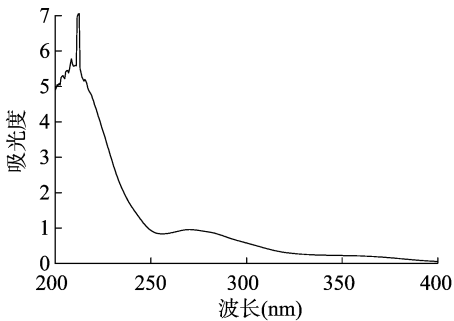


图 1 枫香树叶乙醇提取液的吸收光谱

由图 1 可知,在 200 ~ 400 nm 范围内,枫香树叶黑色素乙醇提取液的吸光度先随着波长增大而升高,在波长为 210 nm 左右时,其吸光度达到最大峰值,之后不断下降,故本试验选取 210 nm 为枫香树叶黑色素的测定波长。

2.3 枫叶黑色素提取温度的选择

如表 3 所示,在 40 ~ 70 ℃ 范围内,提取效率随着温度提高而上升。试验发现,随着提取温度增高,提取剂挥发损失也会增大,越接近乙醇沸点越明显。综合考虑提取效率和提取成本,本试验选择 60 ℃ 作为枫香树叶黑色素的提取温度。

表 3 不同提取温度的吸光度

提取温度 (℃)	吸光度
40	1.088
50	1.225
60	1.482
70	1.667

2.4 单因素试验结果

2.4.1 乙醇浓度对枫香树叶黑色素提取效率的影响 由图 2 可知,在 20% ~ 50% 的乙醇浓度范围内,枫香树叶黑色素的提取效率随浓度提升,50% 乙醇浓度时达到最大,之后再提高乙醇浓度,吸光度反而下降。因此选择 50% 左右的乙醇作为提取剂是较为适宜的。

2.4.2 料液比对枫叶黑色素提取工艺的影响 料液比直接影响黑色素在固液两相的浓度差。提高料液比,可以降低黑色素在溶剂中的浓度,进而有利于枫香树叶中尚未溶解的黑色素继续向溶剂扩散。但当料液比大到一定程度,枫香树叶中的黑色素基本溶出,再提高料液比,不仅不能提高提取得率,还会增加溶剂使用量,增加杂质溶出的概率,并增加溶剂蒸发等后续工艺的难度,进而提高提取工艺的成本。由图 3 可知,当料液比为 1 g : 30 mL ~ 1 g : 40 mL 时,黑色素的得率

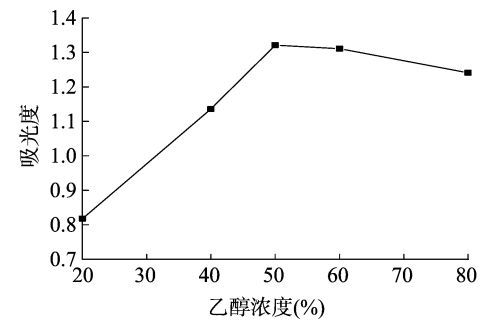


图2 乙醇浓度对黑色素提取效果的影响

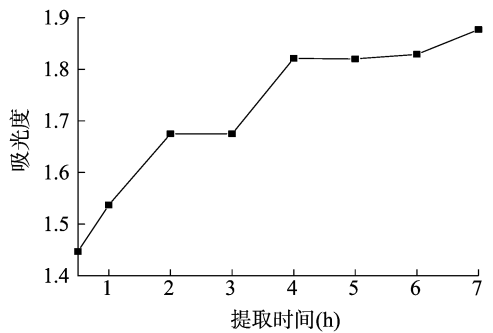


图4 提取时间对黑色素提取效果的影响

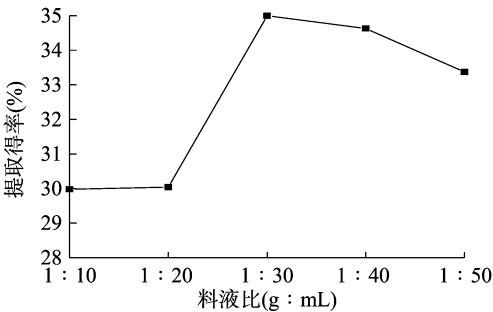


图3 料液比对黑色素提取效果的影响

处于较高水平,因此选择料液比为 1 g : 30 mL ~ 1 g : 40 mL 为宜。

2.4.3 提取时间对枫叶黑色素提取工艺的影响 由图 4 可知,在 0.5 ~ 4 h 之间时,提取液的吸光度随着提取时间的延长而增大,当达 4 h 后,吸光度进入一个平台,直到 7 h 后,才略有上升。综合考虑提取工艺能耗等成本,本试验提取时间在 4 ~ 6 h 为宜。

2.5 响应面分析结果

2.5.1 响应面分析试验设计方案 对枫香树叶黑色素的提取工艺进行响应面分析试验。以乙醇浓度 x_1 、料液比 x_2 、提取时间 x_3 为自变量,以枫香树叶黑色素粗产品提取得率 y 为响应值。Box - Behnken 分析方案及试验结果见表 3。

2.5.2 回归方程和方差分析 用 Design - Expert 8.0.5b 软件程序对试验数据进行回归分析,得出枫叶黑色素提取得率

表 3 Box - Behnken 分析方案及试验结果				
试验号	x_1	x_2	x_3	提取得率 y (%)
1	0	0	0	39.17
2	0	1	1	40.90
3	0	0	0	39.06
4	0	0	0	38.99
5	0	-1	1	37.63
6	1	0	1	40.52
7	0	0	0	39.35
8	1	1	0	41.63
9	1	-1	0	38.41
10	-1	1	0	40.45
11	-1	0	-1	37.73
12	0	1	-1	39.19
13	0	0	0	39.09
14	0	-1	-1	36.47
15	-1	-1	0	36.06
16	1	0	-1	39.83
17	-1	0	1	40.32

的回归方程如下:

$$y = 39.13 + 0.73x_1 + 1.70x_2 + 0.77x_3 - 0.29x_1x_2 - 0.47x_1x_3 + 0.14x_2x_3 + 0.53x_1^2 - 0.52x_2^2 - 0.061x_3^2$$
。式中: y 为枫叶黑色素的提取得率(%); x_1 为乙醇的浓度(%); x_2 为料液比(g : mL); x_3 为提取时间(h)。回归方程各项的方差分析见表 4。

表 4 回归方程各项的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平	显著性
模型	35.65	9	3.96	45.14	<0.0001	**
x_1	4.25	1	4.25	48.42	0.0002	*
x_2	23.12	1	23.12	263.47	<0.0001	**
x_3	4.73	1	4.72	53.88	0.0002	*
x_1x_2	0.34	1	0.34	3.90	0.0889	
x_1x_3	0.90	1	0.90	10.28	0.0149	*
x_2x_3	0.076	1	0.076	0.86	0.3841	
x_1^2	1.18	1	1.18	13.43	0.0080	*
x_2^2	1.15	1	1.15	13.15	0.0084	*
x_3^2	0.016	1	0.016	0.18	0.6853	
残差	0.61	7	0.088			
失拟项	0.54	3	0.18	9.43	0.0275	*
纯误差	0.076	4	0.019			
总离差	36.26	16				

注:“**”表示在 0.01 水平显著;“*”表示在 0.05 水平显著。

由表 4 可分析出,用以上回归方程描述枫香树叶黑色素提取工艺中各因素与响应值之间的关系时,因变量和全体自变量之间的线性关系显著,相关系数 R^2 为 98.32,模型的显著水平远远小于 0.05,此 Quadratic 回归方差模型为高度显著。

由表 4 的分析可知,枫叶黑色素提取工艺中各个因素影响得率从大到小的顺序依次为料液比(x_2)、乙醇浓度(x_1)和提取时间(x_3),其中料液比对枫叶黑色素提取得率的影响最为显著。

2.5.3 响应面图分析 由图 5、图 6、图 7 可知,枫香树叶黑色素的提取工艺中,料液比(x_2)的影响最为显著,提取时间(x_3)和提取剂乙醇浓度(x_1)次之。

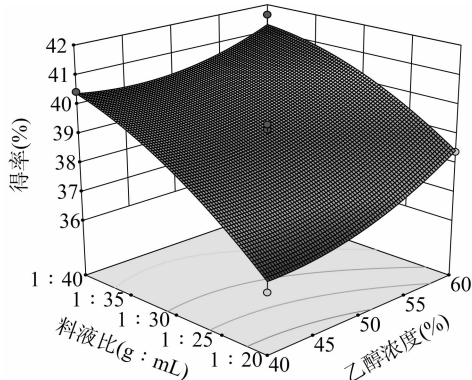


图5 料液比与乙醇浓度的交互作用对提取率的影响

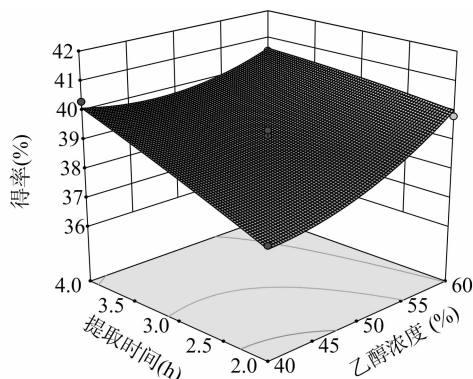


图6 提取时间与乙醇浓度的交互作用对提取率的影响

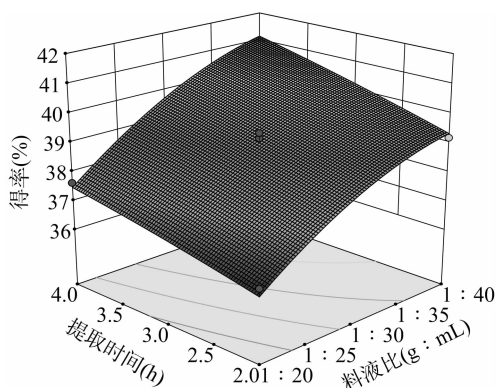


图7 提取时间与料液比的交互作用对提取率的影响

利用 Design - Expert 8.0.5b 软件程序对枫叶黑色素的提取工艺条件进行优化,可得最佳方案为乙醇浓度(x_1)40%、料液比(x_2)为 1 g : 40 mL、提取时间(x_3)4 h。在此提取工艺条件下,初步干燥的枫叶黑色素粗产品的提取得率预测值为

41.73%。

2.5.4 模型的验证性试验 固定乙醇浓度为 40%、料液比为 1 g : 40 mL、提取时间 4 h,平行提取 3 次,得到未除杂、60 ℃烘干后的枫香树叶黑色素粗产品,平均提取率为 41.47%。试验值与模型理论预测值基本一致,说明优化方案是可行的。

3 结论

经响应面法分析,影响枫香树叶黑色素粗产品提取率的主要因素的影响大小依次为料液比,乙醇浓度,提取时间。枫香树叶最优提取工艺参数为乙醇浓度为 40%,料液比 1 g : 40 mL,最佳提取时间 4 h。黑色素粗产品经 60 ℃烘干后的实际提取得率为 41.47%,形态为黑色块状固体。本研究为枫香树叶黑色素的综合开发应用提供了参考。

参考文献:

- [1] Brown D A. Skin pigmentation enhancers[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B - Biology, 2001, 63(1/2/3): 148 - 161.
- [2] Hill H Z. The function of melanin or six blind People examine an elephant[J]. BioEssays, 1992, 14(1): 49 - 56.
- [3] 胡国斌,郑从义,屈三甫,等. 黑色素抑制流感病毒诱导宿主细胞凋亡[J]. 中国病毒学, 1999, 14(2): 140 - 146.
- [4] Hung Y C, Sava V, Hong M Y, et al. Inhibitory effects on phospholipase A2 and antivenin activity of melanin extracted from *Thea sinensis* Linn[J]. Life Sciences, 2004, 74(16): 2037 - 2047.
- [5] El - Obeid A, Al - Harbi S, Al - Jomah N, et al. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF - alpha), interleukin 6 (IL - 6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production [J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2006, 13(5): 324 - 333.
- [6] 袁 博,曹熙敏. 黑米黑色素提取的多元回归统计模型[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(14): 3375 - 3377.
- [7] 邹 宇,尹冬梅,胡文忠,等. 黑木耳天然黑色素理化性质及其抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 118 - 120, 125.
- [8] 徐文秀,王晓燕,王 鹏,等. 花椒籽中黑色素提取工艺的优化研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3): 265 - 268.
- [9] 谢跃生,郑小军,郑丽蓉,等. 枫香树叶中某些水溶性微量元素的分析[J]. 广西师院学报:自然科学版, 2000, 17(3): 5 - 7.
- [10] 中国医学科学院陕西分院中医研究所. 陕西中药志:第一卷[M]. 西安:陕西人民出版社, 1962.
- [11] 国家药典委员会. 中国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社, 2005.
- [12] 贾敏如,李星炜. 中国民族药志要[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2005.
- [13] 翁琳琳,蒋家淡,张鼎华,等. 乡土树种枫香的研究现状与发展前景[J]. 福建林业科技, 2007, 34(2): 184 - 189.
- [14] 陈祖洪. 从枫香树叶中提取黑色素的探索[J]. 林产化工通讯, 1998(1): 20 - 21.
- [15] 辜燕飞,黄 澜,何猛雄,等. 海南枫香传统食用黑色素的初步研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(8): 86 - 87.
- [16] 姜平川. 枫叶黑色素理化性质研究[J]. 食品工业科技, 1998, 19(4): 8 - 10.