

响应面联合因子设计优化提取紫薯花色苷

Optimization of processing parameters for the extraction of anthocyanin from purple sweet potato by response surface method associated with factorial design

李小艳¹ 李高阳² 任国谱¹

LI Xiao-yan¹ LI Gao-yang² REN Guo-pu¹

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004;
2. 湖南省农业科学院农产品加工研究所, 湖南 长沙 410125)

(1. Central South University of Forestry and Technology College of Food Science and Engineering, Changsha, Hunan 410004, China; 2. Hunan Agricultural Product Processing Institute, Changsha, Hunan 410125, China)

摘要:从提取溶剂及提取条件等方面对紫薯花色苷提取进行工艺优化,以花色苷提取率为考察指标,用单因子试验对提取溶剂进行筛选并确定提取溶剂 pH,再利用析因试验对提取条件进行分析,通过最速上升试验和中心组合试验,优化提取工艺。结果表明,盐酸乙醇溶液的提取效果最佳;时间和温度对提取效果影响更显著,优化后条件为:时间 84 min、温度 74 ℃;该条件下花色苷提取率为 419.529 mg/100 g。
关键词:紫薯;花色苷;因子设计

Abstract: The influence of extraction solvent, pH and the extraction conditions on the extraction ratio of anthocyanin from purple sweet potato was optimized by single experiment and 2-level factorial design. By using 2⁴ factorial design, the extraction time and temperature were identified as main factors, and the selected variables were further investigated by steepest ascent analysis and optimized by central composite design. The results indicated that hydrochloric acid with ethanol solution was the best solvent, meanwhile, the extraction temperature and time showed a higher influence to the extracting ratio. The optimized extraction ratio was obtained after 74 ℃ and 84 min, leading to the extraction ratio of 419.529 mg/100 g.
Keywords: purple sweet potato; anthocyanin; factorial design

花色苷广泛分布于自然界中,属类黄酮类,是天然的水溶性色素。植物的花、叶、果实及根、茎等均富含花色苷。紫薯即是一种含有大量花色苷的变态根。近年来,国内外研究表明,紫薯花色苷具有抗氧化及清除自由基的功能^[1-3],还有抗突变^[4]、减轻肝功能障碍^[5]、降血糖^[6]以及减少心血管疾病等作用,是一种极具开发潜力的功能因子,可应用于保

健食品、医药、化妆品等领域^[7]。紫薯在中国种植的范围广泛,南起海南省,北到黑龙江,西至四川西部山区和云贵高原,均有种植^[8]。这为紫薯花色苷提取提供了原料保障。

目前中国关于紫薯花色苷提取方面报道仍以溶剂提取法^[9-13]居多,通过多重试验设计优化溶剂提取的工艺参数^[14],可以使提取率大幅上升同时节省成本。本研究在预试验基础上采用 2⁴ 因子设计筛选影响紫薯花色苷提取得率的主要因素,之后利用最速上升试验以及响应面优化,确定其最佳提取工艺,旨在建立多重组合试验模型,优化提取工艺,从而减少操作的盲目性,为紫薯花色苷大规模生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

紫薯:紫薯王,湖南誉湘农业科技开发有限公司;
柠檬酸、95%乙醇、冰醋酸、盐酸、氯化钾、三水合乙酸钠等:分析纯,国药集团化学试剂公司;
电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9070A 型,上海一恒科技有限公司;
高速万能粉碎机:QE-300 克型,浙江屹立工贸有限公司;
电子天平:FA1104 型,上海精科天美科学仪器有限公司;
电子恒温不锈钢水浴锅:HHS-4S 型,上海虞龙仪器设备有限公司;
台式高速冷冻离心机:TGL-16M 型,长沙平凡仪器仪表有限公司;
紫外可见分光光度计:UV1700 型,岛津制作所分析计测事业部。

基金项目:湘莲星火计划项目(编号:2013GA770001)
作者简介:李小艳(1989—),女,中南林业科技大学在读硕士研究生。
E-mail:578726477@qq.com
通讯作者:李高阳
收稿日期:2015-02-18

1.2 试验方法

1.2.1 原料预处理 新鲜紫薯，去除虫病块，自来水冲洗干净，切成 0.5 cm 左右薯片，迅速放入 60 ℃鼓风干燥箱，干燥 12 h，冷却后用粉碎机粉碎，过 100 目筛，自封袋装好，做好标签后，贮藏于 4 ℃冰箱备用。

1.2.2 紫薯花色苷提取过程优化 紫薯花色苷提取过程中，多种因素如液料比、温度、时间、溶剂种类和浓度以及溶剂 pH 值等都会对紫薯花色苷提取率产生影响。参考文献[12]，本研究以液料比 50 : 1($V : m$)，提取温度 60 ℃，提取时间 60 min 为基础条件，进行优化提取试验。

(1) 提取溶剂的选择:称取 1.0 g 紫薯粉于 100 mL 锥形瓶中，加入盐酸水溶液、柠檬酸水溶液、乙酸水溶液、60%乙醇溶液、60%乙醇+盐酸溶液、60%乙醇+柠檬酸溶液、60%乙醇+乙酸溶液 7 种提取剂(pH 均调至 3.0)以及去离子水各 50 mL 于 60 ℃水浴下提取 60 min，研究各提取溶剂对紫薯花色苷提取效果的影响。

(2) 提取溶剂 pH 的确定:称取 1.0 g 紫薯粉于 100 mL 锥形瓶中，液料比 50 : 1($V : m$)，提取温度 60 ℃，提取时间 60 min，60%乙醇，盐酸调 pH 为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0，研究提取溶剂 pH 对紫薯花色苷提取效果的影响。

(3) 2⁴ 因子设计:通过预试验确定选择液料比、时间、温度、提取溶剂浓度作为考察因素，基础条件为液料比 40 : 1($V : m$)、时间 60 min、温度 60 ℃、60%乙醇+盐酸溶液(pH 调至 2.0)，以紫薯花色苷得率作响应值，采用 Design-expert 8.0.6 软件设计 2⁴ 因子设计试验方案，确定影响提取效果的主要因素。

(4) 最速上升试验:将因子设计中非主效因素取中心水平点，以紫薯花色苷提取率为考察指标，针对主效因素进行爬坡处理，找到稳定区域。

(5) 中心组合试验:在最速上升试验基础上，选用中心组合试验拟合稳定点附近的相应模型，以紫薯花色苷提取率为考察指标。

1.2.3 紫薯干粉水分含量的测定 按 GB 5009.3—2010 执行。

1.2.4 紫薯花色苷含量的测定 称取 1 g 紫薯粉(干重)，加入一定体积盐酸酸化乙醇溶液，一定温度水浴加热浸取一定时间，于 4 ℃，12 000 r/min 下离心 10 min，抽滤，将所得滤液用去离子水定容至 100 mL，取定容后溶液分别用 pH 1.0(盐酸—氯化钾缓冲溶液)和 pH 4.5(盐酸—乙酸钠缓冲溶液)的缓冲溶液稀释一定倍数，静置 30 min，扫描可见光谱，即得最大吸收峰处吸光度 $A_{\lambda \text{ vis-max}}$ 及 700 nm 处吸光度 A_{700} 。采用 pH 示差法^[12]。紫薯花色苷得率 P 按式(1)计算：

$$P=\frac{A\times MW\times DF\times V\times 100}{\epsilon\times L\times M}$$
 (1)

$$A=(A_{\lambda \text{ vis-max}}-A_{700})_{\text{pH } 1.0}-(A_{\lambda \text{ vis-max}}-A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$
 (2)

式中：

P ——花色苷得率，mg/100 g；
 A ——吸光度；
 MW ——花色苷分子量，449.2 Da；
 DF ——稀释倍数；
 V ——定容后的体积，mL；
 ϵ ——摩尔吸光系数，26 900；
 L ——光程长，1 cm；
 M ——样品质量，g；
 $A_{\lambda \text{ vis-max}}$ ——最大吸收峰处的吸光度；
 A_{700} ——700 nm 处的吸光度。

1.2.5 数据处理 试验数据采用 Design-expert 8.0.6 分析处理。每组试验重复 3 次，结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 紫薯干粉水分含量测定

60 ℃干燥 12 h，紫薯干粉水分含量降至 9.82%。

2.2 提取溶剂对紫薯花色苷提取效果的影响

由表 1 可知，60%乙醇+盐酸溶液作提取剂，其吸光度 A 值为 0.483，远高于其他 7 种提取溶剂提取所得 A 值。可见，60%乙醇+盐酸溶液提取效果最佳，而且操作简便，安全性高，可用作优化试验的提取溶剂。

表 1 提取溶剂对紫薯花色苷提取效果的影响[†]
Table 1 The effect of different solvents on the extraction of anthocyanin from purple sweet potato

提取溶剂	吸光度	提取溶剂	吸光度
盐酸水溶液	0.386	60%乙醇+盐酸溶液	0.483
柠檬酸水溶液	0.295	60%乙醇+柠檬酸溶液	0.221
乙酸水溶液	0.212	60%乙醇+乙酸溶液	0.222
60%乙醇	0.264	去离子水	0.127

† 除去离子水，其他溶剂 pH 值均调至 3.0。

2.3 提取溶剂 pH 对紫薯花色苷提取效果的影响

由图 1 可知，提取溶剂 pH 在 1~2 时，吸光度随 pH 升高而提高，之后，随 pH 增大而下降；提取溶剂 pH 在 3~5

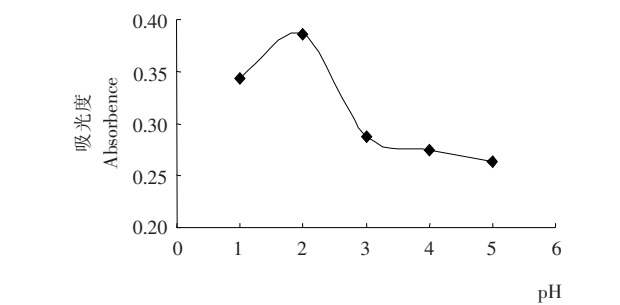


图 1 提取溶剂 pH 对紫薯花色苷提取效果的影响
Figure 1 The effect of pH value on extraction of anthocyanin from purple sweet potato

时,花色苷吸光度差异不显著。这主要是因为花色苷在酸性条件比较稳定且在 pH 0.5~5.0 范围内,其在最大吸收波长处的吸光度随 pH 的升高而减少^[15]。因此,提取溶剂 pH 选用 1~2 为宜,但考虑 pH 过低可能使花色苷的糖基水解,而导致花色苷稳定性下降,所以本试验选定提取溶剂的 pH 为 2。

2.4 2⁴ 因子设计和结果

采用 2⁴ 因子设计,对影响紫薯花色苷提取的液料比、时间、温度、提取溶剂浓度 4 个主要影响因素进行研究(提取液均用盐酸调 pH 为 2.0)。各因子编码值及试验结果分别见表 2、3。

表 2 2⁴ 因子设计因子及编码值

Table 2 2⁴-Factorial Design and its code

水平	X ₁ 时间/min	X ₂ 乙醇 浓度/%	X ₃ 提取 温度/℃	X ₄ 液料比 (V : m)
—1	40	40	50	30 : 1
0	60	60	60	40 : 1
1	80	80	70	50 : 1

表 3 2⁴ 因子试验设计及结果[†]

Table 3 2⁴-Factorial Design experiment and its result

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	花色苷得率/ (10 ⁻² mg · g ⁻¹)
1	—1	—1	1	1	413.339
2	1	—1	—1	1	384.074
3	—1	—1	—1	—1	315.880
4	1	1	1	1	432.011
5	—1	1	1	1	423.703
6	1	1	—1	1	372.005
7	—1	1	—1	—1	337.284
8	1	—1	1	—1	423.703
9	1	—1	1	1	438.139
10	—1	—1	1	—1	423.703
11	—1	—1	—1	1	322.404
12	1	—1	—1	—1	342.244
13	—1	1	—1	1	337.268
14	1	1	1	—1	419.529
15	—1	1	1	—1	411.685
16	1	1	—1	—1	358.901
F 值	13.41	0.33	147.98	3.16	
Prob>F	0.003 7	0.579 5	<0.000 1	0.102 9	
重要性	2	4	1	3	

[†] 模型 F 值为 41.22, Prob>F 为 0.000 1, R² 为 0.937 5。

由表 3 可知,各处理间的差异显著。总体模型 P 值小于 0.000 1,意味着该模型显著,且模型的拟合性良好(R² = 0.937 5),可以进行优化。对各因素进行回归分析得出,X₃ (P<0.000 1)对试验结果影响最显著,其次是 X₁;X₂ 和 X₄ 对试验结果影响不显著,据此,可以设计接下来的关于 X₁ 和 X₃ 的最速上升试验,寻找最优点所在区域,X₂ 和 X₄ 固定在中心点水平,即乙醇浓度为 60%,液料比 40 : 1(V : m)。通过逐步分析获得的最优多元一次回归方程为:

Y=384.74+11.58X₁+1.81X₂+38.48X₃+5.63X₄

(3)

2.5 最速上升试验及结果

针对主效因素 X₁(时间)、X₃(温度)设计最速上升试验,试验设计及结果见表 4。由表 4 可知,第 3 组试验中花色苷得率最高,可推断试验最优点应在第 3 组附近,因此,选择该组(时间 80 min、温度 70 ℃)作为中心组合(CCD)设计的原则。

表 4 最速上升试验设计及结果

Table 4 Design and responses of steepest ascent analysis

试验号	X ₁ /min	X ₃ /℃	花色苷得率/(10 ⁻² mg · g ⁻¹)
1	60	60	342.20
2	70	65	350.51
3	80	70	423.26
4	90	75	381.69
5	100	80	405.43

2.6 CCD 试验结果

对 X₃、X₁ 进行试验设计,结果见表 5、6。对表 6 试验数据进行多元回归拟合,可得出花色苷得率(Y)对温度(X₃)和时间(X₁)的二次多项回归模型:

Y=423.34+10.02X₃+11.69X₁+5.37X₁X₃-29.15X₃²-19.53X₁²

(4)

该模型的显著性检验结果见表 7。由表 7 可知,模型 P<0.000 1,说明该模型极显著。由失拟项 P=0.312 0>0.05 可知,失拟项不显著,试验数据与模型相符。说明模型选择正确。而方差分析的结果显示,R²=0.972 8,说明真实

表 5 中心组合试验设计方案

Table 5 Design of the CCD experiment

编码值	X ₁ /min	X ₃ /℃
—α	65.86	62.93
—1	70	65
0	80	70
1	90	75
α	94.14	77.07

表 6 中心组合设计试验结果

Table 6 The results of CCD design

试验号	X_3	X_1	花色苷得率/($10^{-2}\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	
			实测值	预测值
1	0	0	423.256	423.34
2	0	α	407.564	400.82
3	1	1	395.433	401.74
4	0	0	417.789	423.34
5	0	0	430.002	423.34
6	-1	-1	357.125	358.33
7	1	-1	365.548	367.63
8	$-\alpha$	0	354.016	350.88
9	0	$-\alpha$	368.527	367.76
10	0	0	427.587	423.34
11	-1	1	365.548	370.98
12	0	0	418.085	423.34
13	α	0	383.587	379.21

表 7 回归模型方差分析结果[†]

Table 7 Analysis of variance for the fitted regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	9 671.27	5	1 934.25	49.98	<0.000 1	极显著
X_3	802.56	1	802.56	20.74	0.002 6	
X_1	1 093.12	1	1 093.12	28.25	0.001 1	
X_1X_3	115.15	1	115.15	2.98	0.128 2	
X_3^2	5 910.57	1	5 910.57	152.73	<0.000 1	
X_1^2	2 652.45	1	2 652.45	68.54	<0.000 1	
残差	270.89	7	38.70			
失拟项	150.04	3	50.01	1.66	0.312 0	不显著
纯误差	120.85	4	30.21			
总和	9 942.17	12				

[†] 模型 R^2 为 0.972 8, R^2_{adj} 为 0.953 3, 信噪比为 17.146。

值与预测值之间有良好的相关性。同时,模型信噪比为 17.146,说明该模型能获得很强的响应信号,可以判定该回归模型能用来预测和分析试验结果。

提取条件的响应面分析与优化见图 2。依此模型可预测在稳定状态下的最大值为 $Y=415.973$,以及与之相对应的编码水平为 $X_3=0.800$ 和 $X_1=0.410$,对应的实际值分别为 74.00,84.10。以温度 74℃,时间 84 min 进行验证实验,重复 3 次,该条件下花色苷含量为 419.529 mg/100 g,与预测的最大值接近。由此证明,试验模式合理,结果理想。

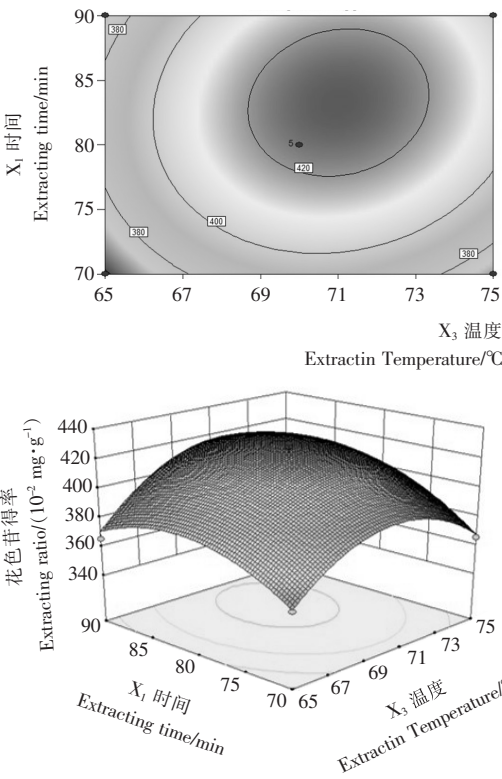


图 2 X_3 和 X_1 值等高线和预测响应面图

Figure 2 Contour plot and response surface of $Y=(X_3, X_1)$

3 结论

本试验选取 pH 为 2.0 的盐酸化乙醇溶液作为提取剂,通过因子设计筛选出了对紫薯花色苷提取影响最大的 2 个主效应因素:提取温度和提取时间。结合 CCD 中心组合试验进一步优化,得优化的提取条件为:pH=2.0 的 60%乙醇,液料比 40 : 1(V : m),时间 84 min,温度 74℃;在此条件下,花色苷得率为 419.529 mg/100 g,与预测最大值接近。由此证明,该试验模式合理,可获得最优工艺参数,从而减少操作的盲目性。

今后研究可考虑将更多因子如溶剂 pH 值、原料粒径等纳入因子分析范围,也可考察场外辅助(如超声波、微波等)条件下,该模型的合理性及稳定性。

参考文献

1 薛红玮,牟德华.不同品种紫甘薯体外抗氧化活性的比较[J].食品与机械,2011,27(1):36~39.

2 Choi S W, Chang E J, Ha T Y, et al. Antioxidative activity of acylate anthoeyani isolated from fruit and vegetables[J]. J. Food Sci. Nutr, 1997, 2(3): 191~196.

3 Furuta S, Suda L, Nishiba Y, et al. High terbutylper xyl radical seavenging activity of sweet potato cultivars with purple flesh[J]. Food Sci. Technol Int, 1998, 4(1): 33~35.

(下转第 201 页)

2

王洪伟,徐雅琴. 南瓜功能成分研究进展[J]. 食品与机械,2004,20(4): 55~57.

3

贺小琼. 南瓜的营养与保健[J]. 中国食物与营养,2003(8): 43~46.

4

彭红,黄小茉,欧阳友生,等. 南瓜多糖的提取工艺及其降糖作用的研究[J]. 食品科学,2002,23(8): 260~263.

5

Akwaowo E U, Ndon B A, Etuk E U. Minerals and antinutrients in fluted pumpkin (Telfairia occidentalis Hook f.)[J]. Food Chemistry,2000,70(2): 235~240.

6

赵凯,许鹏举,谷广烨. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学,2008,29(8): 534~536.

7

王君福,吴丁丁,刘倩倩,等. 间苯三酚法测定玉米芯水解液中木糖含量[J]. 安徽农业科学,2011,39(22): 13 542~13 544.

8

姜元欣. 微波真空干燥南瓜渣和南瓜粉[D]. 无锡:江南大学,2005.

9

Hsu Chin-Lin, Chen Wenlung, Weng Yih-Ming, et al. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods[J]. Food Chemistry,2003,83(1): 85~92.

10

方雪花. 鲜切南瓜生理特性与南瓜粉抗氧化活性[D]. 杭州:浙江大学,2005.

11

Subba R M, Muralikrishna G. Isolation and purification of all alkali extractable arabinoxylan from native and malted hemicellulose[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2006,54(6):2 342~2 349.

12

帅希祥,梁瑞红,张红卫,等. 水分含量对南酸枣糕质构和色泽的影响[J]. 食品与机械,2012,28(6): 12~15.

13

李高阳,丁霄霖. 双液相技术对亚麻蛋白氨基酸组成及其疏水性的影响[J]. 食品工业科技,2006,27(1): 57~60.

14

杨冬梅,金月亭,柯乐芹,等. 12种常见蔬菜抗氧化活性的比较研究[J]. 中国食品学报,2007,7(5): 24~29.

(上接第 197 页)

4

Yoshimoto M, Okuno S, Yoshinaga M, et al. Antimutagenicity of sweet potato roots[J]. Biosci. Biotechnol Biochem. , 1999, 63(3): 537~541.

5

Suda I,Furuta S, Nishiba Y, et al. Reduction of liver induced by carbon tetrachloride in rats administered purple ceolored sweet potato juice[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 1997, 44(4): 315~318.

6

Matsui Y, Ebuchi S, Fukui K, et al. Anti2-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas L. cultivarAyamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action [J]. Agric. Food Chem. , 2002, 50(25): 7 244~7 248.

7

吕昱,严敏. 紫薯花色苷的生理功能及分离纯化研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(4): 250~253.

8

陈伟莉,杨北平,张晨. 紫色甘薯在高寒地区种植表现与栽培管理技术[J]. 江苏农业科学, 2012(1): 95~97.

9

吕跃东,王勇,张文革,等. 响应面法优化紫甘薯花青素的提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2012, 18(4):72~75.

10

陈丽,王晨静,王倩娟,等. 紫藤甘薯茎叶花色苷的提取及其副产物的综合利用[J]. 食品工业科技, 2013, 34(8): 123~126.

11

Truong V D, Deighton N, Thompson T R, et al.Characterization of anthocyanins and anthocyanidins in purple-fleshed sweetpotatoes by HPLC—DAD/ESI—MS/MS[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(1): 404~410.

12

李杰. 紫甘薯花色素苷的提取、组分分析及热稳定性研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2012.

13

施鹏飞,肖海峻,罗红霞,等. 响应面分析法优化紫薯花青素提取工艺[J]. 食品工业科技, 2014, 35(20): 322~326.

14

苏东林,单杨,李高阳. 超声波强化响应面法优化提取桔皮黄酮[J]. 光谱实验室, 2009(6): 1 391~1 397.

15

李颖畅. 蓝莓花色苷提取纯化及生理功能研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2008.

信息窗

最新研究进一步证明均衡饮食可降低痴呆风险

据台湾“中央社”5月7日报道,最新医学研究发现,健康均衡饮食很可能降低大脑退化及记忆力减退的风险。

据报道,研究人员所定义的“均衡饮食”,包含大量蔬果、坚果、鱼、适量的酒和少量的红肉。

据美国有线电视新闻网 (CNN)7日报道,《神经学》月刊(Neurology)本周发表的一篇研究让人们更加了解了饮食健康与降低记忆力率退的相关性。

美国阿兹海默症协会专家史奈德博士(Heather Snyder)指出:“一般观念认为均衡饮食或许有助减少认知能力衰

退,这项研究更加支持以上论点。”报道称,过去研究多强调特定饮食与提升认知功能的关系,这篇研究则建议加强整体饮食健康,指出这对保养大脑、降低记忆力衰退和认知障碍的风险很重要。

报道称,研究主要作者、加拿大麦马斯特大学(McMaster University)肾脏学研究员史密斯博士(Andrew Smyth)表示:“我们的研究不同之处在于,并未提出特定饮食或探讨特定一套饮食模式。”

(来源:www.foodmate.net)