

桉叶多酚连续相变提取工艺的优化

Optimizati of continuous phase transition extraction progress for eucalyptus' polyphenols

谭荣威 曹庸 利嘉城

TAN Rong-wei CAO Yong LI Jia-cheng

(华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642)

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

摘要:以桉树叶为原料,总多酚提取量为衡量指标,利用单因素试验和 Box-behnken 中心组合试验对桉叶多酚连续相变提取工艺条件进行筛选及优化,重点考察提取温度、提取时间、乙醇浓度对桉叶多酚提取量的影响。结果表明:其最佳连续相变提取工艺为提取温度 80 ℃,提取时间 120 min,乙醇浓度 78%,桉叶多酚提取量为 (11.58 ± 0.83) g/100 g,与理论预测值 12.01 g/100 g 相近,相对偏差为 3.65%。说明采用响应面分析法优化后得到桉叶多酚连续相变提取工艺参数较为可信,对实际生产具有一定指导意义。

关键词:桉树叶;多酚;连续相变提取

Abstract: Eucalyptus' leaves were studied as the main raw material. The continuous phase transition extraction progress for eucalyptus' polyphenols was optimized by single factor test and Box-behnken. The effects were discussed for extraction time, extraction temperature and extraction solvent percentage on the yield of polyphenols. The optimal extraction conditions were found as follows: extraction temperature 79.99 ℃, extraction time 119.98 min and solvent concentration 78.13%. Under the optimal conditions, the yield of polyphenols was 11.58 g/100 g. The actual polyphenols yield was 12.01 g/100 g with the relative error 3.65%. The extraction conditions parameter obtained by the Response Surface Methodology to optimize the extraction technology was credible and own application value.

Keywords: eucalyptus' leaves; polyphenol; continuous phase transition extraction progress

桉树(*Eucalyptus robusta* Smith)主要分布于亚洲、非洲和中南美洲的热带、亚热带地区,具有生长快、适应能力强等特点。于 1890 年引入中国,迄今已在广西、四川和广东等 17

个省(区)种植^[1]。2013 年,中国桉树人工林面积约 450 万 hm²,桉树叶产量超过 2 000 万 t^[2]。研究^[3-6]表明:桉树叶中含有多酚、精油等活性成分。其中,多酚是桉树叶中含量较高且抗氧化性强的一类天然活性物质,其 DPPH·清除率高于多酚含量为 50%的茶多酚,与 V_e相当^[7-10]。但目前,只有少部分桉树叶用于精油提取,资源未得到充分利用。

目前用于植物多酚提取的方法主要有溶剂浸提法、微波、超声波辅助萃取和超临界萃取等^[11]。本实验室^[7]前期研究发现,运用溶剂浸提法提取桉叶,其多酚提取量为 9.0~9.5 g/100 g,该法提取效率较低。同时,溶剂浸提法、微波和超声波辅助萃取还存在提取后过滤困难,提取溶剂回收不便等问题。超临界萃取法其设备制造成本和维护成本过高,且极高的压力限制了设备容积的放大。连续相变提取装置是一种新型高效流体提取装置^[12-14]。利用提取溶剂的反复相变,稳定、高效地连续萃取目标物。该方法较溶剂浸提法提取效率高,溶剂回收方便,损失率低,粗提取液无需过滤,本实验室利用该装置已经完成了多种天然活性物的中试提取生产,如陈皮油等^[15],已有产品在售。本试验拟用连续相变提取装置提取桉叶多酚,探究提取温度、提取时间、乙醇浓度对桉叶多酚提取量的影响,并通过响应面法优化分析,对相关工艺进行优化,从而为桉叶多酚后续的应用效果评价提供技术支持,推动桉叶废物再利用的发展。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 材料与amp;试剂

桉树叶:“广林 9 号”桉树叶,2013 年 9 月采自广东茂名;
乙醇:分析纯,天津富宇精细化工有限公司;

Na₂CO₃:化学纯,天津市福晨化学试剂厂;

福林一酚、没食子酸标准品:生化试剂,美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.1.2 主要仪器设备

连续相变提取装置:本实验室自制;

基金项目:国家林业重大公益性行业专项(编号:201104003-03)

作者简介:谭荣威(1989—),男,华南农业大学在读硕士研究生。

E-mail:272373558@qq.com

通讯作者:曹庸

收稿日期:2015-05-13

紫外可见分光光谱仪:SKFG-0型,美国 Pharmacia Biotech 公司;

旋转蒸发器:R204B3型,上海申生科技有限公司;

超声波清洗器:B1510型,美国 Branson 公司;

喷雾干燥仪器:HL-2000型,湖南海陵生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 桉叶粗提物的制备 称取自然阴干,过20~30目筛的桉叶粉末700g,装入连续相变提取装置,设定一定温度、乙醇浓度进行连续提取若干时间。取醇提液喷雾干燥(进风温度180℃,出风温度80℃,雾化器转速12000 r/min,供料泵流量4 L/h),即得桉叶粗提物。4℃,密封状态下避光保存。

1.2.2 多酚提取量的测定 参照文献[7]测定桉叶粗提物的多酚含量,并按式(1)计算多酚提取量。

$$R = \frac{m \times c \times 10}{M} \quad (1)$$

式中:

R ——桉叶多酚提取量, g/100 g;

m ——桉叶粗提物质量, g;

M ——待提取的桉叶质量, g;

C ——桉叶粗提物中多酚含量, mg/g。

1.2.3 单因素试验设计 在连续相变提取装置中,提取温度、提取时间、溶剂溶度和提取压力是影响目标物提取率的主要因素。根据前期试验探索及汤杰[16]的研究结果,本试验分别选取提取温度、提取时间、溶剂溶度为试验单因素进行研究。每个水平重复试验3次。

(1) 提取温度对多酚提取量的影响:称取自然阴干,过20~30目筛的桉叶粉末约700g,装入提取釜中,在溶剂为80%乙醇的条件下,分设30,40,50,60,70,80℃共6个温度梯度,提取时间为30 min。提取液经喷雾干燥成粉后,保存备用,待多酚含量测定,并计算桉叶多酚提取量。

(2) 乙醇浓度对多酚提取量的影响:称取自然阴干,过20~30目筛的桉叶粉末约700g,装入提取釜中,在60℃下分设40%,60%,70%,80%,95%共5个乙醇浓度梯度,提取时间为30 min。后续步骤同1.2.3(1)。

(3) 提取时间对多酚提取量的影响:称取自然阴干,过20~30目筛的桉叶粉末约700g,装入提取釜中,在60℃,80%乙醇为溶剂的条件下,分设20,30,50,70,100,120 min共6个提取时间梯度进行提取。后续步骤同1.2.3(1)。

1.2.4 响应面试验设计 根据单因素试验结果,以桉叶多酚提取量为衡量指标,通过 Box-Behnken 中心组合法来进行试验设计,寻求桉叶多酚的最佳提取条件。

1.2.5 数据处理 使用 SPSS 19.0 对数据进行统计分析,数据以平均值±标准差表示;利用 Excel 2010 作图。

2 结果与讨论

2.1 单因素对桉叶多酚提取量的影响

2.1.1 提取温度的影响 由图1可知,提取温度从40℃向70℃递变时,多酚提取量有所上升,影响趋势不明显;当温

度由70℃升高至80℃时,桉叶多酚的提取量明显升高。在溶剂浸提法中,随着提取温度的逐渐上升(30~70℃),桉叶中多酚提取量呈先上升后下降的趋势[16],这是因为溶剂浸提法中温度升高会造成多酚氧化加速,而连续相变提取装置在工作中为完全密闭且真空的状态,隔绝空气,多酚物质不易发生氧化。考虑到连续相变提取装置中,采用循环水加热,其提取温度最高为80~90℃。故选取40,60,80℃作为优化连续相变提取法的3个提取温度水平。

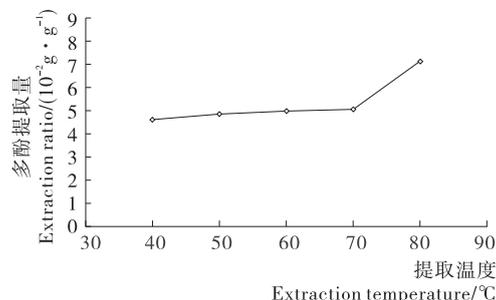


图1 提取温度对桉叶多酚提取量的影响

Figure 1 Effect of extraction temperature on the extraction yield

2.1.2 乙醇浓度的影响 由图2可知,乙醇浓度由40%向95%升高的过程中,多酚提取量先升高(6.80~7.48 g/100 g)后降低(7.48~2.73 g/100 g)。由于仪器客观条件所限,较低乙醇浓度情况下,溶剂相变速度较慢,仪器无法连续工作。综合各方面因素,选取40%,60%,80%作为优化连续相变提取法的3个乙醇浓度水平。

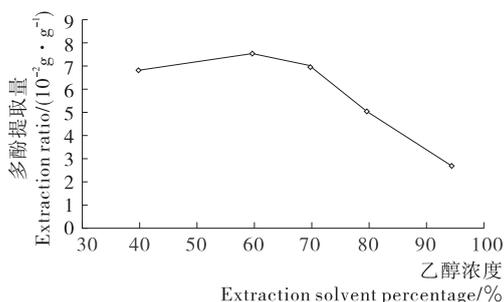


图2 乙醇浓度对桉叶多酚提取量的影响

Figure 2 Effect of extraction solvent percentage on the extraction yield

2.1.3 提取时间的影响 由图3可知,在提取时间由20 min升至70 min的过程中,桉叶多酚的提取量呈显著上升趋势(4.52~8.01 g/100 g),70~120 min过程中,桉叶多酚的提取量变化趋势不明显。这是由于多酚类物质在70 min之内基本能够溶出。在溶剂浸提法中,桉叶多酚提取量呈先上升后下降的趋势,180 min得到最高提取率[16],这是因为溶剂浸提法提取效率低,多酚提取液暴露在空气中时间长易氧化。综合考虑选取30,60,90 min作为优化连续相变提取法的3个提取时间水平。

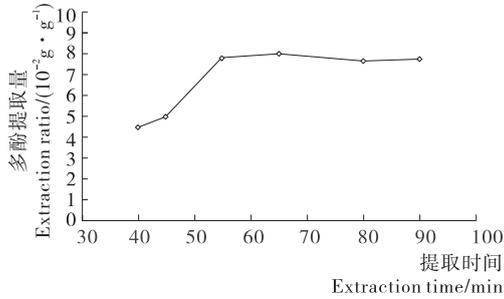


图 3 提取时间对桉叶多酚提取量的影响

Figure 3 Effect of extraction time on the extraction yield

2.2 响应面优化提取工艺条件

2.2.1 响应面试验设计与结果 根据 Box-Behnken 中心组合来进行试验设计, 结合单因素试验结果, 以提取温度、提取时间、乙醇浓度为因素, 采用三因素三水平的响应面分析方法进行试验优化, 试验因素水平设计见表 1, 试验结果见表 2。

采用 Design-Expert 8.05b 软件对表 2 数据进行处理, 得线性回归方程:

$$Y = 7.92 + 0.71X_1 + 1.11X_2 + 0.57X_3 + 1.09X_1X_2 + 0.11X_1X_3 - 0.14X_2X_3 - 0.35X_1^2 - 0.25X_2^2 - 0.06X_3^2 \quad (2)$$

2.2.2 显著性分析 由表 3 可知, 模型为极显著 ($P = 0.0078 < 0.01$), 回归决定系数 $R^2 = 0.9041$, 说明响应值的变化有 90.41% 来自所选因素, 由失拟项系数 ($P = 0.5257 > 0.05$) 不显著, 可知该回归方程拟合度较好, 可以利用该回归方程确定连续相变提取桉叶多酚的最佳工艺条件。各因素中, 一次项 X_2 影响极显著 ($P < 0.01$), X_1 、 X_3 影响显著 ($P < 0.05$)。交互项 X_1X_2 的影响也是极显著的 ($P < 0.01$), 说明各单因素对响应值的影响存在非线性的关系。

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiments

水平	X_1 提取温度/°C	X_2 提取时间/min	X_3 乙醇浓度/%
1	80	90	80
0	60	60	60
-1	40	30	40

2.2.3 响应面分析及优化 由表 3 以及图 4、5 可知, 3 个因素对于多酚提取量 (Y) 的影响皆显著, 影响强弱大小为提取时间 > 提取温度 > 乙醇浓度。提取时间与乙醇浓度、提取温度与提取时间之间交互作用等高线图呈椭圆形, 说明提取时间与乙醇浓度、提取温度与提取时间的交互作用对桉叶多酚提取量存在影响, 但前者影响极显著, 后者影响不显著。

根据 Design-Expert 8.05b 软件分析得出, 在提取温度 79.99 °C、提取时间 119.98 min、乙醇浓度 78.13% 的条件下, 桉叶多酚提取量有最大值, 其理论预测值为 12.01 g/100 g。

表 2 响应面试验结果

Table 2 The results of response surface experiments

试验号	X_1	X_2	X_3	多酚提取量 Y / ($10^{-2} \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	0	1	1	8.69 ± 0.54
2	0	1	-1	8.25 ± 0.87
3	0	-1	1	7.25 ± 0.47
4	0	-1	-1	6.26 ± 0.12
5	1	1	0	10.3 ± 0.59
6	1	0	1	9.20 ± 0.97
7	1	-1	0	5.49 ± 0.43
8	1	0	-1	7.41 ± 0.42
9	-1	0	-1	6.03 ± 0.29
10	-1	-1	0	6.44 ± 0.55
11	-1	0	1	7.38 ± 0.32
12	-1	1	0	6.97 ± 0.54
13	0	0	0	8.24 ± 0.67
14	0	0	0	7.74 ± 0.56
15	0	0	0	7.73 ± 0.91
16	0	0	0	8.73 ± 0.70
17	0	0	0	7.15 ± 0.64

表 3 回归分析结果

Table 3 Analysis results of regression and variance

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
X_1	4.00	1	4.00	11.93	0.010 6	*
X_2	9.79	1	9.79	29.18	0.001 0	**
X_3	2.61	1	2.61	7.78	0.026 9	*
X_1X_2	4.75	1	4.75	14.16	0.007 0	**
X_1X_3	0.05	1	0.05	0.14	0.715 4	
X_2X_3	0.08	1	0.08	0.23	0.649 4	
X_1^2	0.52	1	0.52	1.56	0.251 6	
X_2^2	0.25	1	0.25	0.75	0.413 8	
X_3^2	0.02	1	0.02	0.05	0.837 1	
模型	22.14	9	2.46	7.33	0.007 8	**
失拟项	0.93	3	0.31	0.87	0.525 7	
误差	1.42	4	0.35			
总和	24.49	16				

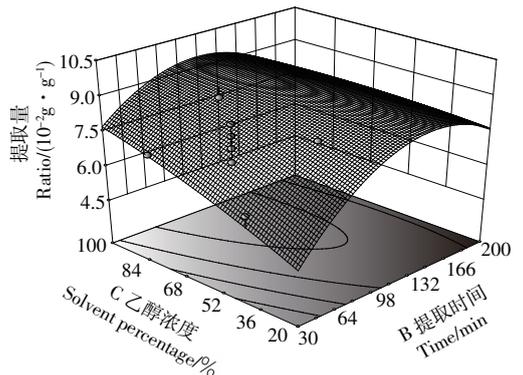


图 4 提取时间和乙醇浓度对桉叶多酚提取量的影响
Figure 4 Effect of extraction solvent percentage and extraction time on the extraction yield

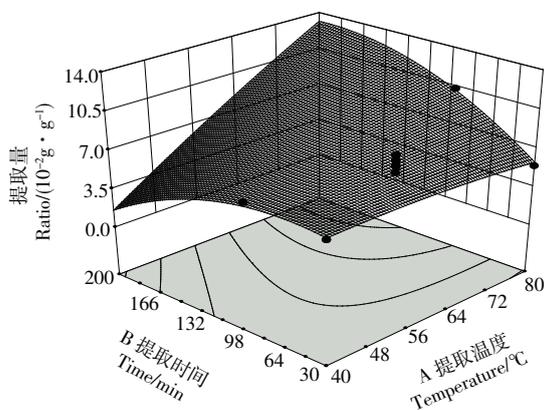


图5 提取温度和提取时间对桉叶多酚的影响

Figure 5 Effect of extraction temperature and extraction time on the extraction yield

2.2.4 验证实验 为方便操作对优化得到的工艺参数进行修整;提取温度取 80 °C,提取时间取 120 min,乙醇浓度取 78%。并按修整后的条件进行 3 次验证实验,其桉叶多酚提取量为 (11.58 ± 0.83) g/100 g,与理论预测值相近,相对偏差为 3.65%。说明采用响应面分析法优化后得到桉叶多酚连续相变提取工艺参数较为可信,对实际生产具有一定指导意义。

2.2.5 连续相变提取法与超声波辅助提取法提取桉叶多酚的对比 由表 4 可知,本方法通过优化得到的最佳提取条件,相较超声波辅助提取法有更高的提取率,更少的提取时间和提取次数,并且提取之后无需过滤、浓缩等步骤,即可通过喷雾干燥制成桉叶多酚产品,极大降低了多酚提取的成本。连续相变提取法较超声波辅助提取法(超声波辅助提取装置、过滤装置、浓缩装置等)在前期设备投入方面相差不大,但具有较大节约生产成本的优势。

表 4 连续相变提取法与超声波辅助提取法提取桉叶多酚的对比

Table 4 The comparison of continuous phase transition extraction progress and Ultrasonic assisted extraction technology on eucalyptus' polyphenols rate

提取方法	主要参数	提取率/(10^{-2} g · g)
连续相变提取法	提取时间 60 min,提取次数 1,料液比 1 : 20(m : V)	10.30
超声波辅助溶剂浸提法 ^[7]	提取 2 次,每次 60 min,料液比 1 : 20(m : V),过滤,浓缩	9.76

3 结论

(1) 本试验研究了提取温度、时间和乙醇溶度对连续相变技术提取桉叶多酚得率的影响。结果表明,最佳的提取工艺条件为:提取温度 80 °C,提取时间 120 min,乙醇浓度 78%,桉叶多酚提取量为 (11.58 ± 0.83) g/100 g。

(2) 连续相变提取法较微波辅助、超声辅助方法提取效率稍高,且省去过滤、浓缩步骤,生产成本低。由于连续相变提取装置的限制(循环水加热),提取温度有一定限度(80~90 °C),本试验在提取温度优化方面还有一定不足。

参考文献

- 1 谢耀坚. 中国桉树育种研究进展及宏观策略[J]. 世界林业研究, 2011,24(4):50~54.
- 2 陈少雄,陈小菲. 我国桉树经营的技术问题与思考[J]. 桉树科技,2013,30(3):52~59.
- 3 Chen Yun-jiao, Wang Jun-jiang, Ou Yang-wen, et al. Cellular antioxidant activities of polyphenols isolated from Eucalyptus leaves (Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla GL9) [J]. Journal of Functional Foods, 2014,7:737~745.
- 4 Amakura Y, Umino Y, Tsuji S, et al. Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive[J]. Food Chemistry, 2002,77(1):47~56.
- 5 Amakura Y, Yoshimura M, Sugimoto N, et al. Marker constituents of the natural antioxidant eucalyptus leaf extract for the evaluation of food additives[J]. Biosci., Biotechnol., Biochem., 2009,73(5):1 060~1 065.
- 6 Akin M, Aktumsek A, Nostro A. Antibacterial activity and composition of the essential oils of eucalyptus camaldulensis dehn. and myrtus communis L. Growing in northern cyprus[J]. African Journal of Biotechnology, 2010,9(4):531~535.
- 7 王俊亮. 桉叶抗氧化成分的分离纯化、结构鉴定及活性研究[D]. 广州:华南农业大学, 2011.
- 8 陈洪璋,黄景晟,陈运娇,等. 不同月份“广林 9 号”桉叶粗提物总酚含量与抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(17): 56~59.
- 9 王俊亮,肖苏尧,陈运娇,等. 广林 9 号桉叶多酚抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(1): 20~24.
- 10 肖苏尧,陈雪香,陈运娇,等. 桉叶抗氧化作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(14): 396~399.
- 11 陈亮,李医明,陈凯先,等. 植物多酚类成分提取分离研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(11): 1 501~1 507.
- 12 Miao Jian-yin, Che Ke, Xi Ru-cun, et al. Characterization and benzo[a]pyrene content analysis of Camellia seed oil extracted by a novel subcritical fluid extraction[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2013, 90(10): 1 503~1 508.
- 13 曹庸. 一种多功能连续相变提取装置:中国,10306553.5[P]. 2014-09-03.
- 14 Zhao Li-chao, Zhang Yong, He Li-ping, et al. Soysauce residue oil extracted by a novel continuous phase transition extraction under low temperature and its refining process[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(14): 3 230~3 235.
- 15 周国海,苗建银,刘飞,等. 陈皮挥发油的低温连续相变萃取及特性分析[J]. 现代食品科技, 2013, 29(12): 2 931~2 936.
- 16 汤杰. 桉多酚分离提取工艺及其抗氧化活性研究[D]. 广州:华南农业大学,2013.