

茶籽壳原花青素提取参数优化*

董瑞霞,李立祥,邢志强,张桂敏

(安徽农业大学茶叶生物化学与生物技术教育部、农业部重点实验室,安徽合肥,230036)

摘 要 应用二次通用旋转组合设计,对茶籽壳提取原花青素的参数进行研究。结果表明:提取时间(X_1),乙醇体积分数(X_2),提取温度(X_3),料液比(X_4)对原花青素的得率均有较显著影响,且呈现 $X_1 > X_3 > X_2 > X_4$ 。模拟优化后得到提取原花青素参数优化方案为:提取时间 28 min,乙醇体积分数 60%,提取温度 55℃,料液比(g : mL)1 : 6。

关键词 茶籽壳,原花青素,超声提取,参数优化

原花青素(proanthocyanidins 简称 PC)是植物中广泛存在的一大类多酚类化合物的总称,这类化合物的基本组成单元是儿茶素基和表儿茶素基^[1]。最简单的原花青素是儿茶素基与表儿茶素基形成的二聚体,此外有三聚体,四聚体,直至十聚体。研究表明原花青素有很强的生物活性^[2],能清除人体内过剩自由基,提高人体免疫力,具有很强的抗氧化能力,可作为防癌,抗突变,防治心血管疾病药物的主要有效成分和用作安全无毒的新型抗氧化剂,在医药、保健、食品等领域具有广泛用途,近年来备受关注。

经笔者研究发现,茶籽壳是提取原花青素的很好材料(单因素实验测得最高得率为 4.46%)。本文拟在单因素提取基础上,对提取原花青素参数进行优化研究。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

材料:茶籽壳(2007 年 2 月收取于安徽农业大学教学基地)。

主要试剂:原花青素对照品(天津尖峰天然产物有限公司,纯度>95%)、香草醛(上海双香助剂厂)、甲醇、乙醇、盐酸等均为分析纯。

主要仪器:DHG—9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司),HH-6 型电热恒温水浴锅(江苏金坛市荣华仪器制造有限公司),KQ-B 玻璃仪器气流烘干机(巩义市予华仪器有限责任公司),KQ-500 DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),AB104-N 电子分析天平(梅特勒-托利多仪

器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 茶籽壳的预处理

将采回的茶籽用清水洗净,自然晾干,使籽壳分离得到茶籽壳,将壳放于烘箱中 40℃ 条件下烘 4 h,取出后用粉碎机粉碎至 50 目,后置于干燥器中备用。

1.2.2 提取方法^[3]

准确称取一定量的茶籽壳粉于平底烧瓶中,在一定乙醇体积分数、提取温度、料液比等条件下提取一定时间,并提取 1 次,取出过滤,取滤液于 3 000 r/min 离心 30 min,再取上清液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中用提取液定容至刻度,摇匀后从中取 1 mL 进行含量测定,计算提取率。

在单因素实验的基础上对提取时间、乙醇体积分数、提取温度、料液比等参数采用四因素五水平二次通用旋转组合设计(如表 1),具体实验数据如表 2 所示。采用 DPS 软件(V7.55 版)进行数据处理。

表 1 提取时间、乙醇浓度、温度、料液比水平编码值($r=2$)

X_{ij}	因 素			
	提取时间 /min (X_1)	乙醇体积分 数/% (X_2)	提取温度 /min (X_3)	料液比 (g : mL) (X_4)
r^+	34	70	55	14
1	31	60	50	12
0	28	50	45	10
-1	25	40	40	8
r^-	22	30	35	6
ΔI	3	10	5	2

1.2.3 原花青素含量的测定^[4]

取 1 mL 待测液(另取 1 mL 60% 乙醇水溶液为空白液)分别加入 6 mL 香草醛-盐酸溶液和 3 mL 的浓盐酸,摇匀,避光,在 30℃ 恒温水浴中保持 30 min 保温比色,在 500 nm 波长下测定其吸光度,通过标

第一作者:硕士研究生(通讯作者为李立祥)。

* 安徽省高等学校“十五”优秀人才培养项目资助

收稿日期:2007-10-10

准曲线计算出浓度,再转化成提取率。得率计算公式: $D=(V \times G \times n / 1\,000m) \times 100$

式中: D , 试样中原花青素的百分含量; V , 试样定容体积, mL ; C : 试样中原花青素浓度, mg/mL ; n : 稀释倍数; m : 试样质量 g 。

表 2 原花青素的二次通用旋转组合设计实验方案及结果

试验号	时间/℃ (X_1)	溶剂浓度 /min (X_2)	提取温度 /% (X_3)	料液比 (X_4)	得率 /% (Y)
1	1	1	1	1	4.23
2	1	1	1	-1	3.87
3	1	1	-1	1	3.98
4	1	1	-1	-1	3.69
5	1	-1	1	1	3.85
6	1	-1	1	-1	4.20
7	1	-1	-1	1	3.62
8	1	-1	-1	-1	3.55
9	-1	1	1	1	3.86
10	-1	1	1	-1	3.78
11	-1	1	-1	1	3.84
12	-1	1	-1	-1	3.52
13	-1	-1	1	1	3.58
14	-1	-1	1	-1	3.59
15	-1	-1	-1	1	3.53
16	-1	-1	-1	-1	3.48
17	-2	0	0	0	3.55
18	2	0	0	0	3.67
19	0	-2	0	0	3.41
20	0	2	0	0	3.60
21	0	0	-2	0	3.95
22	0	0	2	0	4.07
23	0	0	0	-2	3.68
24	0	0	0	2	3.98
25	0	0	0	0	3.86
26	0	0	0	0	3.76
27	0	0	0	0	3.94
28	0	0	0	0	3.86
29	0	0	0	0	3.78
30	0	0	0	0	3.83
31	0	0	0	0	3.90

2 结果与分析

2.1 结果与数学模型的建立

采用四因素五水平二次通用旋转试验方案对提取参数进行优化,数学模型和实验结果如表 2 所示,通过二次旋转组合模型^[5]:

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i x_i + \sum_{i < j} b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^4 b_{ii} x_i^2 + \epsilon$$
并按

多元回归加以估计,建立以提取率 \hat{y} 为目标的参数回归方程如下:

$$\hat{y} = 3.847 + 0.085X_1 + 0.073X_2 + 0.083X_3 + 0.059X_4 - 0.055X_1^2 - 0.082X_2^2 + 0.044X_3^2 - 0.000\,4X_4^2 - 0.017X_1X_2 + 0.055X_1X_3 - 0.004\,3X_1X_4 - 0.020X_2X_3 + 0.081X_2X_4 - 0.041X_3X_4$$

应用 F 检验和失拟检验的结果表明,方程的失拟项和回归项均在 0.05 水平上显著,即 $F_1 < F_{0.05}(10,6)$, $F_2 > F_{0.05}(14,16)$,故方程拟合很好,置信度大于 95%。为进一步分析方程各项系数对指标的影响程度,对回归方程的各回归系数进行 F 检验,剔除不显著项后,得标准的回归方程:

$$\hat{y} = 3.847 + 0.085X_1 + 0.073X_2 + 0.083X_3 + 0.059X_4 - 0.055X_1^2 - 0.082X_2^2 + 0.044X_3^2 + 0.081X_2X_4$$

表 3 实验结果方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	比值 F	p 值
X_1	0.1742	1	0.174 2	15.559 6	0.001 2
X_2	0.1278	1	0.127 8	11.417 8	0.003 8
X_3	0.166 9	1	0.166 9	14.913 3	0.001 4
X_4	0.082 1	1	0.082 1	7.336 2	0.015 5
X_1^2	0.085 2	1	0.085 2	7.609 1	0.014 0
X_2^2	0.190 4	1	0.190 4	17.011 2	0.000 8
X_3^2	0.055 9	1	0.055 9	4.992 2	0.040 1
X_4^2	0.000 0	1	0.000 0	0.000 4	0.985 2
X_1X_2	0.004 8	1	0.004 8	0.433 0	0.519 9
X_1X_3	0.047 9	1	0.047 9	4.281 5	0.055 1
X_1X_4	0.000 3	1	0.000 3	0.026 0	0.873 9
X_2X_3	0.006 6	1	0.006 6	0.589 0	0.454 0
X_2X_4	0.104 9	1	0.104 9	9.371 0	0.007 5
X_3X_4	0.026 4	1	0.026 4	2.354 2	0.144 5
回归	1.09 1	14	0.077 9	$F_2 = 6.960\,99$	0.000 4
剩余	0.179 1	16	0.011 2		
失拟	0.154 5	10	0.015 4	$F_1 = 3.76491$	0.0091
误差	0.024 6	6	0.004 1		
总和	1.270 1	30			

2.2 主因子及单因子效应分析

由方程分别采用降维法^[6],即将其余因子固定为零,依次得到 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 相对应 \hat{y} 的回归方程,提取时间: $Y_1 = 3.847 + 0.085X_1 - 0.055X_1^2$,乙醇体积分数: $Y_2 = 3.847 + 0.073X_2 - 0.082X_2^2$,提取温度: $Y_3 = 3.847 + 0.083X_3 + 0.044X_3^2$,料液比: $Y_4 = 3.847 + 0.059X_4 - 0.000\,4X_4^2$ 。

由各回归系数可以判断四个因素对茶籽壳提取过程中得率影响顺序为 $X_1 > X_3 > X_2 > X_4$ 。根据子模型作图 1。由图 1 可知,在设计范围内,提取时间和乙醇体积分数均在 -2 到 2 水平上得率先显著增加而后下降,且在 1 水平时达到最高值。提取温度在编码值 -2 到 2 水平范围内,产量呈较显著的增加,故温度对提取过程有明显的增加效果。料液比在编码值 -2 至 2 范围内对提取率的影响为缓慢增加,即在本试验范围内,料液比变化对其也有一定的影响,但影响较小。从图 1 可以看出,各个曲线的变化趋势

与实验所做的单因素曲线图趋势基本吻合。表明由二次通用旋转组合设计实验与单因素实验得知的影响趋势一致,可以为日后生产放大选择参数提供依据。

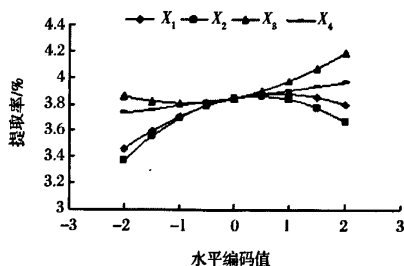


图1 单因子对原花青素提取的影响

2.3 最佳产量模拟寻优

经 DPS 软件(V7.55 版)计算机模拟,在本实验范围内,提取茶籽壳中原花青素的最高提取率为 4.49%,对应的组合方案为 $X_1 = 1, X_2 = 1, X_3 = 2, X_4 = 2$, 即提取时间为 28 min,乙醇体积分数为 60%,提取温度为 55℃,料液比为 1:14。通过对计算机模拟的最佳实验条件进行实验验证,得到原花青素得率为 4.53%,与模拟得率十分接近,故最佳产量模拟成功,符合实际。本实验范围内料液比 1:6~1:14 均可取得较好的提取效果,因此从经济出发,最佳提取料液比应在 1:6 为宜。

3 结论

本实验采用超声波提取,大大提高了从茶籽壳中

提取原花青素的提取效率。在单因素的基础上对茶籽壳中原花青素提取参数应用二次通用旋转组合设计,得出回归方程: $\hat{y} = 3.847 + 0.085X_1 + 0.073X_2 + 0.083X_3 + 0.059X_4 - 0.055X_1X_2 - 0.082X_2X_3 + 0.044X_3X_4 + 0.081X_2X_4$, 寻优取得最佳提取方案为:提取时间 28 min,乙醇体积分数 60%,提取温度 55℃,料液比 1:6。

参考文献

- 1 Daneel Ferreira, Xing Cong Li. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. Nat Prod Rep [J], 2000, 17: 193~212
- 2 Schofield P, Analysis of condensed tannins tannins: a review[J]. Animal Feed Science and Technology, 2001, 91: 21~40
- 3 李凤英,崔蕊静.植物中原花青素含量的分析测定[J].食品与发酵工业,2004,30(5):147~149
- 4 Nicolas Vivas. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/ liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 513:247~256
- 5 杨义群. 回归设计及多元分析[M]. 西安: 天则出版社, 1990. 62~91

Optimization on Extraction Parameters of Proanthocyanidins from Episperm of Tea (*Camellia sinensis*) Seed

Dong Ruixia, Li Lixiang, Xing Zhiqiang, Zhang Guimin

(Key Lab of Tea Biochemistry & Biotechnology, Ministry of Education and Ministry of Agriculture, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China)

ABSTRACT By applying the combination design of quadratic rotational regression, the synthetically effects of extraction parameters of proanthocyanidins from episperm of tea (*Camellia sinensis*) seed were studied. Results showed that the effects of extraction time(X_1), concentration of ethanol(X_2), temperature(X_3) and rate of solid to solution(X_4) on extracting rate of proanthocyanidins from episperm of tea were remarkable, as indicated by $X_1 > X_3 > X_2 > X_4$. The optimum parameters of extraction were as follows: extraction time 28 min, concentration of ethanol 60%(v/v), temperature 55℃ and rate of solid to solution 1:6.

Key words episperm of tea seed, proanthocyanidins, ultrasonic extraction, optimization of parameter