

中心组合试验设计响应面分析法优化蜂胶总多酚提取工艺

丁仲鹃¹, 毕玉芬^{1,2}, 戴云^{2,*}, 雷雨²

(1.昆明医科大学口腔医院, 云南 昆明 650021; 2.云南民族大学化学与生物技术学院, 民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘要: 利用星点设计-响应面分析法(CCD-RSM)优化蜂胶总多酚的超声提取工艺。在单因素试验基础上, 选取超声时间、液料比和乙醇体积分数为影响因素, 以Folin-Ciocalteus法测定总多酚含量作为响应值进行响应面分析, 确定最佳提取条件。结果表明: 超声提取时间24.0min、乙醇体积分数77.0%、料液比1:14(g/mL)时, 在此条件蜂胶总多酚提取量为3.34mg/100mg。该提取方法简单快速有效, 提高了蜂胶中总多酚的提取率。

关键词: 蜂胶; 星点设计-响应面分析法; 总多酚; 含量; 测定

Optimization of Extraction Process for Total Polyphenols from Propolis by Central Composite Design Coupled with Response Surface Methodology

DING Zhong-juan¹, BI Yu-fen^{1,2}, DAI Yun^{2,*}, LEI Yu²

(1. School of Stomatology, Kunming Medical University, Kunming 650021, China; 2. Key Laboratory of Ethnic Medicine Resources Chemistry, State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, School of Chemistry and Biotechnology, Yunnan University of Nationalities, Kunming 650500, China)

Abstract: Central composite design coupled with response surface methodology (CCD-RSM) was employed to optimize the ultrasonic-assisted extraction of total polyphenols from propolis. By using one-factor-at-a-time method, we identified ultrasonic treatment time, solid-to-solvent ratio and ethanol concentration as main variables that influence extraction efficiency. The total polyphenol content of propolis extracts was determined by Folin-Ciocalteus method. Response surface analysis showed that the optimum extraction conditions were 24.0 min, 77.0% and 1:14 (g/mL) for ultrasonic treatment time, ethanol concentration and solid-to-solvent ratio, respectively. Under these conditions, the average extraction yield of total polyphenols from propolis was 3.34 mg/100 mg ($n = 3$). This extraction method was simple and efficient and could provide a sample preparation approach for the determination of total polyphenols in propolis.

Key words: propolis; central composite design coupled with response surface methodology (CCD-RSM); total polyphenol; content; determination

中图分类号: TS202.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)02-0017-05

蜂胶作为富含多种营养成分的天然资源, 具有抗病、抑菌、抗氧化等作用^[1-2]。近年来, 在食品保健及医药方面的功效引起人们的广泛关注, 尤其是对蜂胶中具有重要生物活性的黄酮类和多酚类化合物的研究较为深入^[3-4], 而对蜂胶中总多酚的提取工艺条件大都缺少综合性的最优选取, 从而导致蜂胶中总多酚的提取含量下降。据文献报道^[5], 中国蜂胶多酚的平均含量在3%左右。如果提取分离条件不合适, 则多酚的提取率还将下

降。因此, 有必要通过实验优化蜂胶多酚的提取工艺, 最大限度提取蜂胶多酚, 以便提高蜂胶资源的利用率。

目前, 优化中药活性成分提取工艺的常见方法有正交设计法^[6]、均匀设计法^[7]和中心组合试验设计响应面分析法(central composite design-response surface method, CCD-RSM)^[8-11], 但国内利用CCD-RSM法优化蜂胶多酚提取工艺的研究鲜见报道^[12]。通过CCD-RSM的结合, 可以在诸多试验因素中选择出最适合参数, 从而确定一组最佳的实验条件。

收稿日期: 2011-10-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30471225); “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD27B09; 2006BAD04A12); 国家高技术研究发展计划项目(2007AA10Z320)

作者简介: 丁仲鹃(1963—), 女, 教授, 博士, 研究方向为口腔医学。E-mail: dingzhongjuan@sina.com

*通信作者: 戴云(1957—), 女, 教授, 博士, 研究方向为天然产物分析。E-mail: daiy4843@sina.com

本实验采用CCD-RSM优化蜂胶总多酚的提取工艺。在常温条件下,以超声溶剂提取法^[13-14]从云南蜂胶中提取多酚类物质,初步确定了最佳工艺条件,并用该条件测定了其他产地的蜂胶样品。该方法条件温和、操作简便,绿色环保,结果可靠,为蜂胶资源的开发利用提供了更多的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

粗蜂胶原料分别购自云南临沧、草坝、罗平和宣威。没食子酸(纯度>98%)、碳酸钠(AR);福林酚(纯度>99%FC) 美国Alfa Aesar公司。
7200型分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司;
KQ-600DB型超声波清洗器 昆山超声仪器有限公司;
微型高速万能试样粉碎机 北京市永光医疗仪器厂; 电子分析天平 奥豪斯国际贸易有限公司。

1.2 方法

1.2.1 蜂胶分析样品的制备

参照文献[15]制得。

1.2.2 蜂胶总多酚提取

准确称取1.2.1节所制备的蜂胶样品1.00g于100mL具塞锥形瓶中,77%乙醇溶液提取溶剂、料液比1:14(g/mL)、超声24min,过滤,用乙醇定容置25mL容量瓶中,待测。

1.2.3 蜂胶总多酚测定

移取3.00mL样品待测液于25mL具塞比色管中,总多酚测定采用Folin-Ciocalteus分光光度法^[16],以没食子酸为标准(1.00mg/mL),在波长765nm测定吸光度。

1.2.4 标准曲线制备

参照文献[17]方法,本实验所得没食子酸的线性回归方程为 $A=0.0858c-0.0275$, $R^2=0.9987$ 。

1.3 单因素试验

研究乙醇体积分数、温度、料液比、pH值和超声时间各因素对蜂胶提取效果的影响。

1.4 CCD-RSM因素水平设计

根据前期试验筛选出对总多酚提取量影响显著的3个因素超声时间、乙醇体积分数、料液比(g/mL)作为主要影响因素,CCD-RSM试验设计因素水平分布见表1。

表1 CCD-RSM因素水平设计表					
Table 1 Factors and levels for CCD-RSM design					
因素	水平				
	-α	-1	0	1	α
A 乙醇体积分数/%	11.69	60	70	80	98.30
B 超声时间/min	42.67	20	30	40	77.32
C 料液比(g/mL)	1:2.67	1:6	1:10	1:14	1:37.32

注: α=1.732。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

在单因素试验过程中,考虑到该工艺是缓释药物制备的前期工作,温度、pH值均应在温和条件下进行,且本实验组前期工作也考察过温度和pH值对蜂胶总酚提取的影响较小^[11],故确定乙醇体积分数、料液比和超声时间做为蜂胶总多酚提取的影响因素。

2.1.1 乙醇体积分数的确定

准确称取1.2.1节制备的蜂胶样品1.00g,6份分别置于50mL锥形瓶中,料液比为1:20(g/mL),在同一超声功率、相同超声时间下,考察不同乙醇体积分数对蜂胶总多酚提取效果的影响。

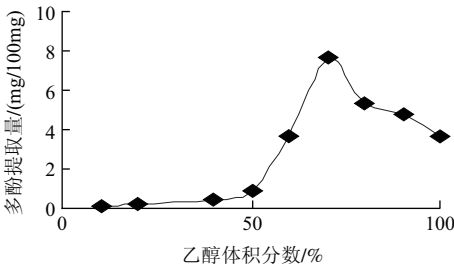


图1 乙醇体积分数对蜂胶总多酚提取量测定的影响
Fig.1 Effect of ethanol concentration on the extraction efficiency of total polyphenols

如图1所示,随着乙醇体积分数的增大,蜂胶总多酚提取量逐渐增加,当乙醇体积分数达70%时,蜂胶总多酚提取量为最大值,当大于70%时,呈现下降趋势。故选择70%乙醇溶液为提取溶剂。

2.1.2 超声时间的确定

选取70%乙醇溶液作为提取溶剂,其他条件同2.1.1节,考察不同超声时间对蜂胶总多酚提取效果的影响。

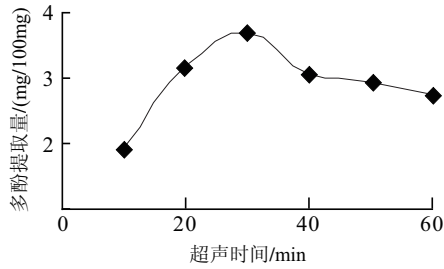


图2 超声时间对蜂胶总多酚提取量测定的影响
Fig.2 Effect of ultrasonic treatment time on the extraction efficiency of total polyphenols

如图2所示,随超声时间的延长,蜂胶总多酚提取量缓慢增加,超声时间在30min时,多酚提取量最高。但30min后,超声时间的延长反而使蜂胶多酚的提取量下降。故选择超声时间为30min。

2.1.3 料液比确定

选取超声时间30min, 其他条件同2.1.2节, 考察不同料液比对蜂胶总多酚提取效果的影响。

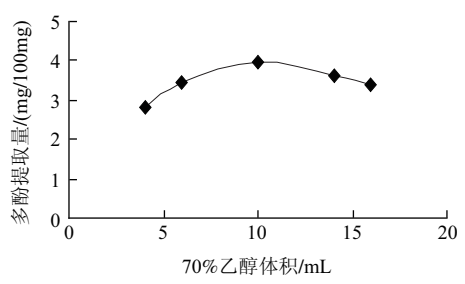


图3 不同提取溶剂体积对蜂胶多酚提取量测定的影响
Fig.3 Effect of material-liquid ratio on the extraction efficiency of total polyphenols

如图3所示, 随溶剂用量的增加, 蜂胶中总多酚提取量增加, 但溶剂用量达到一定程度时, 蜂胶中多酚接近全部溶出。当料液比为1:10时, 蜂胶中总多酚提取量基本达到最大值。

2.2 CCD-RSM试验设计及分析^[18-19]

2.2.1 试验设计结果及回归模型

表2 CCD-RSM试验设计与结果				
Table 2 CCD-RSM design matrix and results				
试验号	A	B	C	Y/(mg/100mg)
1	0	0	0	3.77
2	0	0	0	3.97
3	-1	1	-1	2.12
4	0	0	0	4.00
5	-1	1	1	2.05
6	0	0	-1.682	3.39
7	0	0	0	4.01
8	0	0	0	4.43
9	0	0	1.682	2.84
10	1.682	0	0	2.70
11	1	1	1	2.68
12	0	-1.682	0	1.99
13	-1	-1	1	1.31
14	-1.682	0	0	2.15
15	1	-1	-1	2.45
16	1	1	-1	3.04
17	-1	-1	-1	2.11
18	0	1.682	0	1.99
19	0	0	0	4.01
20	1	-1	1	1.35

综合考虑单因素试验结果, 对表2结果进行多元线性回归和二项式拟合, 蜂胶中总多酚提取含量的模拟方程如下:

$$Y=4.04+0.21A+0.20B-0.24C+0.15AB-0.074AC+0.18BC-0.63A^2-0.78B^2-0.38C^2$$

当 $P<0.05$ 时, 影响因素对响应值影响为差异显著, 小于0.001时为差异高度显著, 小于0.0001时为差异极显著。

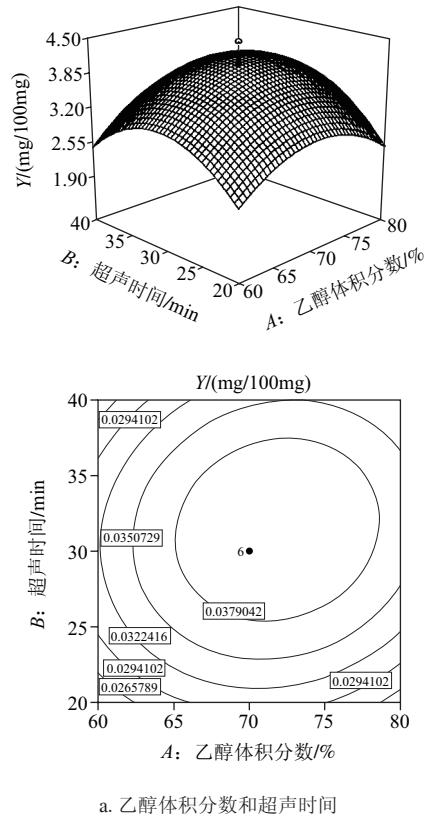
著。对该回归方程进行方差分析(表3), 可以看出模型的 $P<0.0001$, 说明该模型得到的回归方程是差异极显著的, 试验设计可靠, 模型相关系数 $r=0.9467$, 进一步说明模型具有较好的可信度。

2.2.2 方差分析

表3 响应面二次模型的方差分析结果					
Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model					
方差来源	自由度	平方和	均方差	F值	P值
总模型	9	16.50	1.833	19.72	<0.0001
A	1	0.60	0.60	6.42	0.0297
B	1	0.52	0.52	5.61	<0.05
C	1	0.76	0.76	8.17	<0.05
AB	1	0.17	0.17	1.84	0.2047
AC	1	0.044	0.044	0.47	0.5095
BC	1	0.27	0.27	2.91	0.1191
A ²	1	5.66	5.66	60.92	<0.0001
B ²	1	8.78	8.78	94.47	<0.0001
C ²	1	2.11	2.11	22.73	<0.0001
残差	10	0.93	0.093		
失拟项	5	0.70	0.14	2.99	0.1271
纯误差	5	0.23	0.047		
总变异	19	17.43			

表3表明, 失拟项F值为2.99, 即方程模型失拟不显著, 方差分析的结果表明方程的总模型及三因素二次项对总多酚提取量的影响极其显著, 一次项中超声时间B和料液比C表现为差异显著, 而交互项对多酚提取量的影响不显著。

2.2.3 响应面分析



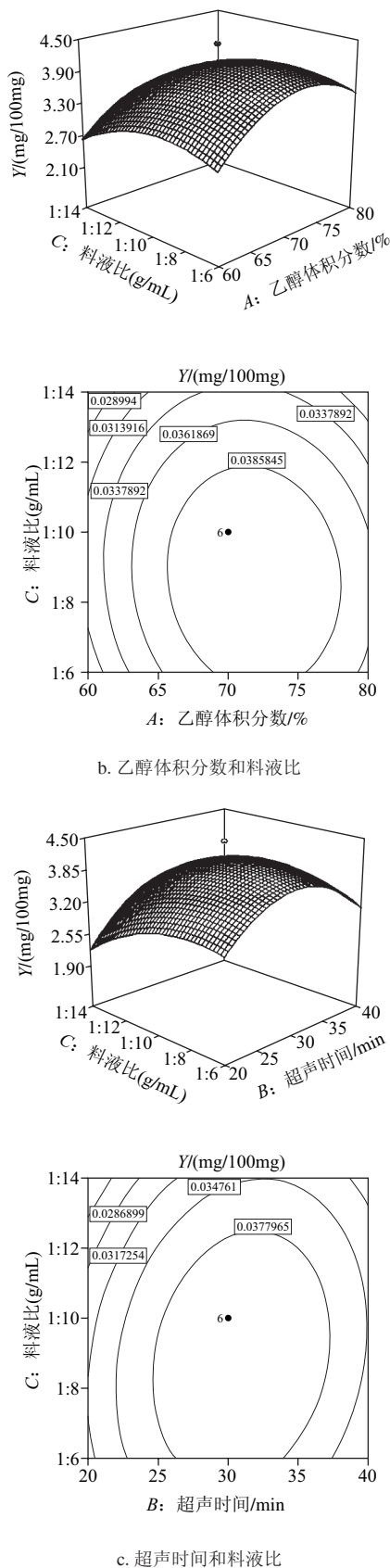


图 4 各因素交互作用对总多酚提取量的响应面及等高线图
Fig.4 Response surface and contour plots for the effects of operating parameters on the extraction efficiency of total polyphenols

响应面优化法, 将试验中多因素影响得出的数据结果, 进行响应面分析, 得到的预测模型, 一般是个曲面, 即所获得的预测模型是连续的。其优势是在试验条件寻优过程中, 可以连续的对实验的各个水平进行分析。响应面曲面比较陡, 说明此时各因素对响应值的影响较为明显, 反之, 则各因素对响应值的影响较小。而等高线密度大, 影响因素对响应值贡献就大, 反之亦然。

图4a可看出, 沿A因素(乙醇体积分数)和B因素(超声时间)向峰值移动时, A因素在取较小值时响应曲面变陡, 等高线密度变大, 当A因素为70%左右时, 曲面变缓, 等高线密度变疏, 表明A在取较小值时对响应值Y的影响显著; B因素也是在取较小值时曲面较陡, 等高线密度较大, 超声时间30min左右是对响应值Y的影响显著。从图4b看出, A因素(乙醇体积分数)和C因素(料液比)向峰值方向移动时, C因素等高线密度明显变小, 取料液比小时等高线密度较稀疏, 当料液比达到1:10以上时, 响应面变陡, 等高线密度变密, 表明较高料液比对响应值的影响显著; A因素则取较小值时曲面较陡, 等高线密度较密, 表明乙醇体积分数取较小值时对蜂胶总多酚提取含量影响显著。从图4c看出, B因素(超声时间)和C因素(料液比)向峰值方向移动时, 超声时间在较小值时响应曲面较陡, 超声时间超过30min曲面变缓, 等高线密度变疏, 表明超声时间取较小值时对响应值影响显著; 料液比大于1:10时, 响应曲面明显变陡, 等高线密度变大, 表明取较高料液比对响应值的影响显著。

对比图4中响应面图和等高线图, 可知3个因素对蜂胶总多酚提取含量Y影响顺序为: 料液比C>乙醇体积分数A>超声时间B, 这与方差分析结果相符合。

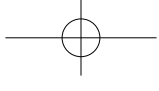
2.2.4 试验优化及验证

Design Expert软件为响应面分析提供了最佳条件化优化模块, 由软件分析得到最佳提取工艺为: 超声提取时间23.17min、乙醇体积分数76.90%、料液比1:13.89(g/mL), 考虑实际情况, 将各因素条件取整, 从而确定蜂胶总多酚的最佳提取工艺: 超声提取时间24.0min、乙醇体积分数77.0%、料液比1:14(g/mL)。

按照响应面法优化出的总多酚最佳提取条件进行验证实验, 在此条件下, 提取量平均值Y=3.34mg/100mg (n=3), 与预测实验提取量接近。

2.2.5 样品含量测定

表 4 不同产地蜂胶中总多酚含量				
Table 4 Results of determination of total polyphenols in propolis samples from different areas based on optimum extraction conditions				
产地	临沧	草坝	罗平	宣威
外观特征	褐色	深棕色	浅黄棕色	深褐色
总酚含量/(mg/100mg)	4.98	5.21	3.62	4.83



选择优化后的工艺分别测定了4个云南不同产地蜂胶样品总多酚含量见表4。

由表4可知：采用优化后工艺测定不同产地蜂胶总多酚含量草坝地区最高，临沧和宣威总酚含量接近，罗平地区含量较低，符合本实验室用精蜂胶所测定的含量规律^[13]。

3 结 论

通过利用响应面法优化云南蜂胶中多酚提取含量的测定，结果表明：CCD-RSM能获得更加优化的预测提取条件，并且能有效提高多酚提取含量，在此条件下蜂胶总多酚的最佳提取工艺为超声提取时间24.0min、乙醇体积分数77.0%、料液比1:14(g/mL)。CCD-RSM应用于中药活性成分的提取分离研究，有较好的应用前景价值。

参考文献：

- [1] 胡福良. 蜂胶药理作用研究[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2005.
- [2] 兰桃芳, 孟良玉, 白凤翎, 等. 蜂胶提取液的抑菌作用研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 224-226.
- [3] 索志荣, 曹炜, 秦海燕, 等. 蜂胶浸膏中7种多酚化合物的高效液相色谱法分析[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 496-498.
- [4] 盛文胜, 杜青桃, 李树岚, 等. 蜂胶与杨树胶中八种黄酮与肉桂酸含量的测定[J]. 中国蜂业, 2008, 59(3): 7-8.
- [5] 董捷, 张红城, 尹策, 等. 蜂胶研究的最新进展[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 637-641.
- [6] 高秋涛, 毕开顺. 正交试验设计优化甘草附子汤的提取工艺[J]. 中

- 国中药杂志, 2004, 29(12): 82-83.
- [7] 黄春青, 林亚平, 靳风云, 等. 均匀设计法结合药效学指标优选金铁锁提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15): 1817-1820.
- [8] WSÓL V, FELL A F. Central composite design as a powerful optimisation technique for enantioresolution of the rac-11-dihydrooracin-the principal metabolite of the potential cytostatic drug oracin[J]. Biochem Biophys Methods, 2002, 54(1/3): 377-390.
- [9] 陆刚, 杜国栋, 王俊儒, 等. 星点设计-响应面法优化丹参须根有效成分的酶法提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16): 1976-1981.
- [10] 王国华, 张保献. 星点设计-响应面法优选荷叶中荷叶碱与荷叶黄酮的提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(17): 2332-2335.
- [11] 肖卫华, 韩鲁佳, 杨增玲, 等. 响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究[J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(5): 52-56.
- [12] 李彦杰, 杨勇. 蜂胶化学成分及生物活性[J]. 粮食与油脂, 2003(12): 43-45.
- [13] 吴兰兰, 汤凤霞, 何传波, 等. 超声波辅助提取龙眼核棕色素的研究[J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2009, 18(4): 336-339.
- [14] 刘清, 姚慧源. 大麦多酚类活性物质超声提取的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 172-175.
- [15] 赵娜, 毕玉芬, 李园, 等. 云南蜂胶中多酚化合物的HPLC分析研究[J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2011, 20(3): 209-212.
- [16] 何志勇, 夏文水. Folin-Ciocalteu比色法测定橄榄中多酚含量的测定[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(4): 15-18.
- [17] 刘丽香, LAURA T, 梁兴非, 等. Folin-Ciocalteu 比色法测定苦丁茶中多酚含量[J]. 茶叶科学, 2008, 28(2): 101-106.
- [18] 高云涛, 李干鹏, 李正全, 等. 超声集成丙醇-硫酸铵双水相体系从苦荞麦苗中提取总黄酮及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 110-113.
- [19] 吴冬青, 徐新建, 张丽, 等. 响应面分析法优化竹节草黄酮提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 126-128.