

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.06.022

任雪峰,王永生,丁秀丽,等. 响应面法优化黑土豆色素提取工艺研究[J]. 广西植物, 2014, 34(6):859—864

Ren XF, Wang YS, Ding XL, *et al.* Optimization of extraction technique of pigment from Black Potato by response surface methodology[J]. *Guihaia*, 2014, 34(6):859—864

响应面法优化黑土豆色素提取工艺研究

任雪峰^{1,2}, 王永生^{1,2}, 丁秀丽¹, 安红钢^{1,2}, 吴冬青^{1,2}

(1. 河西学院 化学化工学院, 甘肃 张掖 734000; 2. 甘肃省高校河西走廊特色资源利用省级重点实验室, 甘肃 张掖 734000)

摘 要: 以黑土豆为原料提取色素, 在乙醇浓度、回流温度、回流时间和料液比四个单因素实验基础上, 通过响应面法优化提取条件, 利用 Box-Behnken 设计模型, 研究四个自变量之间的影响。结果表明, 得到最佳提取工艺为回流温度 47 ℃, 回流时间 47.5 min, 料液比 1 : 90, 乙醇浓度 42.5%。在此条件下, 理论上测得黑土豆中色素的吸光度值为 0.413, 实验测得黑土豆中色素的吸光度值为 0.416, 理论值与实验值的相对误差为 0.726%。该提取工艺简便、具有较高的重现性和可行性。

关键词: 响应面法; 黑土豆; 色素; 提取工艺

中图分类号: Q946; TS201.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)06-0859-06

Optimization of extraction technique of pigment from Black Potato by response surface methodology

REN Xue-Feng^{1,2}, WANG Yong-Sheng^{1,2}, DING Xiu-Li¹,
AN Hong-Gang^{1,2}, WU Dong-Qing^{1,2}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hexi University, Zhangye 734000, China; 2. Key Laboratory Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu Provincial University, Zhangye 734000, China)

Abstract: The optimum conditions for extraction pigment from Black Potato were determined by using response surface method on the basis of ethanol concentration, reflux temperature, reflux time and ratio of solid to liquid four single factor tests. The results showed that the optimal extraction condition was as follows: ethanol concentration 42.5%, reflux temperature 47 ℃, reflux time 47.5 min, and ratio of solid to liquid 1 : 90. Under these conditions, the measured absorbance of pigment was 0.413, compared with the predictive value of 0.416, the relative error was 0.726%. The result also indicated it was feasible to adopt response surface methodology to optimize the extraction condition.

Key words: response surface methodology; Black Potato; pigment; extraction process

黑土豆是一种具有保健性能的药用兼食用的特殊马铃薯稀有品种, 其呈现黑紫色的原因是富含 Delphindin (紫色) 花青素。花青素是目前发现的防治疾病, 维护人类健康最直接、最有效、最安全的自由基清除剂之一, 其黑色素具有抗癌 (Reddivari *et al.*, 2007)、防治高血压、心脑血管疾病、抗衰老、养

颜美容和提高人体免疫力等多种保健功能 (张静等, 2009)。“黑美人”是兰州陇神航天育种研究所选育而成的黑土豆, 皮肉皆为黑紫色, 因其蒸、煮后其肉质部分呈现出宝兰石般晶体亮丽兰紫色泽而得名。其黑色素纯含量之高让一般黑色食品无与相比, 它作为一种天然食用色素安全、无毒、资源丰富 (赵宇

收稿日期: 2013-11-05 修回日期: 2014-01-14

基金项目: 甘肃省教育厅研究生导师项目 (1210-01)

作者简介: 任雪峰 (1976-), 男, 甘肃张掖人, 硕士, 副教授, 研究方向为天然产物有效成分提取及分析, (E-mail) rxfwy@sina.com。

瑛等,2005)。所以黑土豆天然色素的提取、应用对于食品加工和医疗保健行业来说,具有十分重要的意义。

响应面分析法(Response Surface Methodology,RSM)是近几年发展起来的一种分析法,其原理是通过一系列确定性实验拟合一个响应面来模拟真实的极限状态曲面,从而很容易地进行可靠性分析。响应面分析法采用多元二次回归方法作为函数估计工具,将多因子实验中因子与指标的相互关系用多项式拟合,精确表述因素与响应值之间的关系,并依此从响应面的形状上找到最佳控制点,可用于确定各因素及其交互作用在工艺过程中对指标的影响,在实验设计与结果表达方面更加优良。采用回流法进行黑土豆中色素的提取,利用 Box-Behnken 实验设计及 Design-expert 7.1.6 软件进行工艺优化,确定黑土豆色素的最佳提取工艺,使其提取率达到最大。

1 材料、试剂与方法

1.1 原料及处理方法

黑土豆:2011 年 12 月购于定西。将黑土豆经自来水、蒸馏水清洗干净,切片,置于 60 ℃ 的烘箱中烘干至恒重,粉碎,过 60 目筛,备用。

1.2 主要试剂及仪器

无水甲醇,无水乙醇,丙醇,盐酸等试剂均为分析纯,实验用水为蒸馏水。实验仪器均经自来水、蒸馏水清洗。721G 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);HH-4 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);智能型电热恒温鼓风干燥箱(上海琅环实验设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 测定波长的选择 准确称取黑土豆 1.0000 g,以 35%乙醇为提取剂,在 40 ℃ 的恒温水浴中回流 50 min,冷却后抽滤,测定波长 250~720 nm 区域的吸光度,确定色素的最大吸收波长在 550 nm,因此分光光度计选测定波长为 550 nm。

1.3.2 提取溶剂的选择 分别称取 4 份黑土豆各 1.0000 g 于 100 mL 圆底烧瓶中,分别加入无水甲醇,无水乙醇,丙醇和蒸馏水 50 mL,在 40 ℃ 的恒温水浴中回流 50 min,冷却后抽滤,用溶剂定容于 100 mL 容量瓶中,在 550 nm 处测定溶液吸光度值,寻

找最佳提取溶剂。

1.3.3 提取溶剂酸度的影响 准确称取 6 份黑土豆各 0.2000 g 于 100 mL 圆底烧瓶中,分别加入 pH=1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 及未酸化的 35%乙醇溶液 50 mL,在 40 ℃ 的恒温水浴中回流 50 min,冷却后抽滤,用 35%乙醇溶液定容于 100 mL 容量瓶中,在 550 nm 处测定溶液吸光度值,确定溶剂酸度对黑土豆色素提取效果的影响。

1.3.4 单因素实验 在保持其他条件不变的情况下,探究乙醇浓度、回流温度、回流时间和料液比对黑土豆色素提取率的影响。

1.3.5 响应面法优化提取工艺 在单因素实验的基础上,采用 Box-Behnken 实验方案设计,选择回流时间、回流温度、乙醇浓度及料液比为影响因素,以黑土豆色素提取液吸光度为响应值,采用四因素三水平的响应面法进行实验。响应面因素水平表见表 1。

表 1 响应面因素水平表
Table 1 Factors and levels of RSM

编号 Code	X ₁ 回流温度 Reflux temperature (℃)	X ₂ 回流时间 Reflux time (min)	X ₃ 料液比 Solid to liquid ratio (g·mL ⁻¹)	X ₄ 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)
-1	40	40	1:80	30
0	50	50	1:90	40
1	60	60	1:100	50

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

按照实验方法测定溶液吸光度值。由表 2 可知,用乙醇溶液提取率高于其他三者。因此,选择乙醇作提取溶剂。

表 2 溶剂对提取效果的影响
Table 2 Effects of solvent on extraction result

溶剂 Solvent	甲醇 Methanol	乙醇 Ethanol	丙醇 Propanol	蒸馏水 Distilled water
吸光度 Absorbance	1.437	1.474	0.576	1.402

2.2 提取溶剂酸度的确定

由表 3 可知,在所选取的酸度范围内,提取溶剂的酸度对黑土豆色素的提取没有影响。因此,选择未酸化的乙醇作提取剂。

2.3 单因素实验

2.3.1 乙醇浓度对提取率的影响 准确称取 0.1500 g

黑土豆粉 6 份于 50 mL 圆底烧瓶中,分别加入 25.00 mL 的 10、20、30、40、50、60% 的乙醇溶液,置于 45 ℃ 的水浴中回流 40 min,冷却后过滤,将滤液转移至 50 mL 容量瓶内,用同浓度的乙醇溶液定容至刻度。测定溶液吸光度值,其结果如图 1 所示。

表 3 溶剂酸度的影响
Table 3 Effects of solvent acidity

pH	未酸化 Not-acidification	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
吸光度 A Absorbance	0.284	0.282	0.283	0.281	0.283	0.284

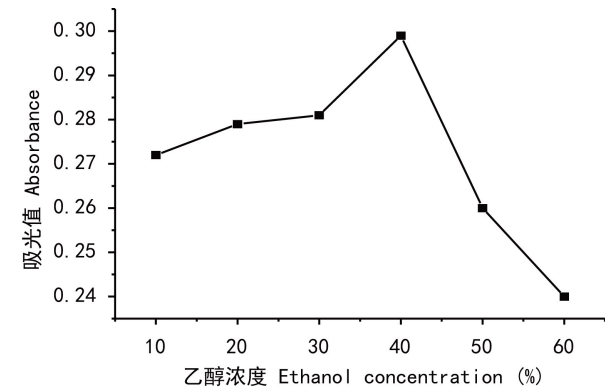


图 1 乙醇浓度对提取率的影响

Fig. 1 Effects of ethanol concentration on extraction

由图 1 可知,提取率随乙醇浓度的增大而提高,当乙醇浓度增大到一定值后又随浓度的增大而降低。这可能是因为随乙醇浓度的增大,提取出的色素逐渐增多,使溶液吸光度值提高,当浓度增大至 40% 时吸光度达到最大值;随着乙醇浓度的继续增大,溶剂中醇溶性的色素达到最大而水溶性的色素由于水的减少而降低。从而使提取出的总色素含量降低,导致溶液的吸光度值减小。所以黑土豆色素提取的最佳乙醇浓度为 40%。

2.3.2 回流温度对提取率的影响 准确称取 0.1500 g 黑土豆粉 5 份于 50 mL 圆底烧瓶中,分别加入 25.00 mL 40% 乙醇溶液,并分别置于 30、40、50、60、70 ℃ 的水浴中回流 40 min,冷却后抽滤,将滤液转移至 50 mL 容量瓶内,用 40% 乙醇溶液定容至刻度。测定溶液的吸光度,其结果如图 2 所示。

由图 2 可知:随回流温度的升高,溶液吸光度逐渐增大,当温度升高到一定值后又随温度的升高而降低。这是因为温度升高,分子运动速度加快,渗透,扩散,溶解速度加快,有效成分更易转移到溶剂

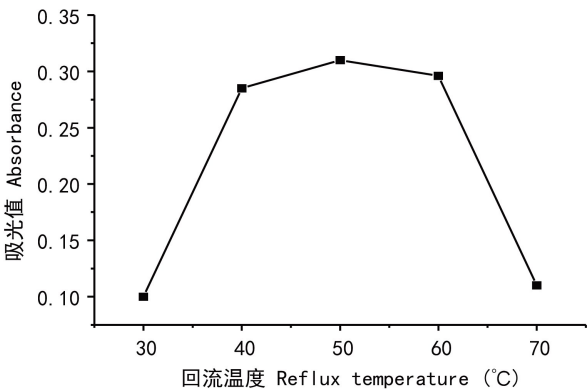


图 2 回流温度对提取率的影响

Fig. 2 Reflux temperature on extraction

中。温度高于 50 ℃ 后,黑土豆色素提取率随温度的增加而降低,这是因为温度过高,花色苷的热稳定性变差,导致其结构发生变化所致(房岩强等,2009)。所以黑土豆色素提取的最佳的回流温度为 50 ℃。

2.3.3 回流时间对提取率的影响 准确称取 0.1500 g 黑土豆粉 8 份于 50 mL 圆底烧瓶中,分别加入 25.00 mL 40% 乙醇溶液,于 50 ℃ 的水浴中分别回流 20、30、40、50、60、70、80、90 min,控制其他条件不变,冷却后抽滤,将滤液转移至 50 mL 容量瓶内,40% 乙醇定容至刻度。测定溶液的吸光度,其结果如图 3 所示。

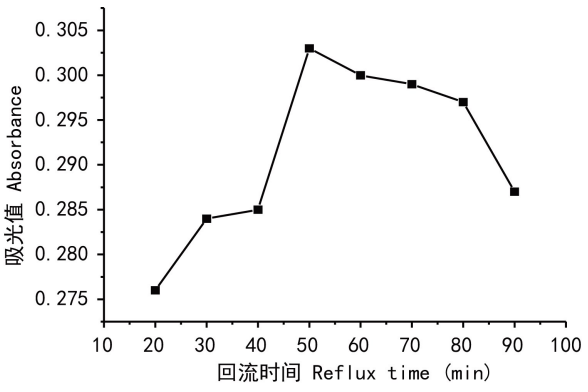


图 3 回流时间对提取率的影响

Fig. 3 Effects of reflux time on extraction

由图 3 可知,随着回流时间延长,溶液吸光度值逐渐升高,当回流到一定时间后又随回流时间的增长而降低。因为随着时间增长,黑土豆中的色素充分溶解,使溶液吸光度值增大,当回流 50 min 时达最大值,其后随时间延长,溶液的吸光度值减小,说明提取时间过长,对黑土豆色素的提取不利。所以黑土豆色

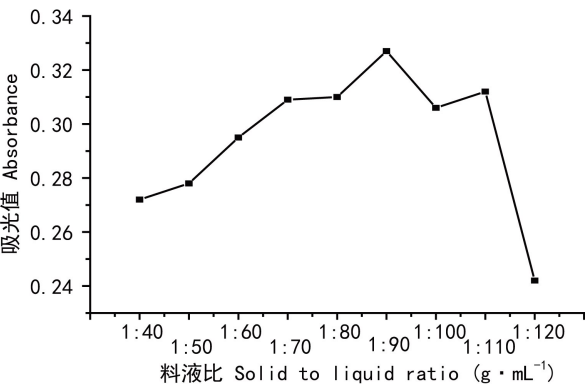


图 4 料液比对色素提取率的影响

Fig. 4 Effects of solid to liquid ratio on extraction

表 4 Box-behnken 实验设计及响应面法实验结果

Table 4 Design of Box-behnken experiment and response surface methodology

编号 Code	X ₁ 回流温度 Reflux temperature (℃)	X ₂ 回流时间 Reflux time (min)	X ₃ 料液比 Solid to liquid ratio (g · mL ⁻¹)	X ₄ 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	A 吸光度
1	0	-1	1	0	0.334
2	0	0	-1	1	0.371
3	-1	0	0	-1	0.325
4	-1	0	-1	0	0.353
5	0	1	1	0	0.291
6	0	1	-1	0	0.271
7	-1	0	0	1	0.373
8	0	0	0	0	0.414
9	1	0	0	1	0.335
10	0	-1	0	-1	0.395
11	1	0	-1	0	0.181
12	-1	0	1	0	0.359
13	0	-1	0	1	0.371
14	-1	-1	0	0	0.369
15	0	0	0	0	0.416
16	0	1	0	1	0.361
17	0	1	0	-1	0.329
18	0	0	1	1	0.359
19	1	-1	0	0	0.226
20	0	0	1	-1	0.355
21	0	0	-1	-1	0.315
22	1	1	0	0	0.163
23	1	0	1	0	0.201
24	0	-1	-1	0	0.398
25	0	0	0	0	0.414
26	1	0	0	-1	0.278
27	-1	1	0	0	0.361
28	0	0	0	0	0.414
29	0	0	0	0	0.417

素提取的最佳回流时间为 50 min。

2.3.4 料液比对提取率的影响 准确称取 0.1500 g 黑土豆粉 5 份于 50 mL 圆底烧瓶中,分别加入按

1 : 40、1 : 50、1 : 60、1 : 70、1 : 80、1 : 90、1 : 100、1 : 110、1 : 120 移取 40% 的乙醇溶液,控制其他条件不变,冷却后抽滤,将滤液转移至 50 mL 容量瓶内,40% 的甲醇定容至刻线。测定溶液吸光度,其结果如图 4 所示。

由图 4 可知,随着料液比增大,溶液吸光度值逐渐升高,当料液比增大到一定比例时又随料液比的增大而降低。因为随料液比的增大,色素充分溶解在溶剂中,当料液比达 1 : 90 时,溶液吸光度值出现最大值,随料液比的继续增大,传质推动力增大,溶剂与色素的接触作用减小,使溶液的吸光度值降低。所以黑土豆色素提取的最佳的料液比为 1 : 90。

2.4 响应面优化设计与结果

按照 Box-behnken 中心组合实验方案进行四因素 3 水平实验,以吸光度值为指标,研究各因素间相互作用下的吸光度值(表 4)。表 4 中 1~24 为析因实验,25~29 为中心实验。29 个实验点为析因点和零点,其中析因点为自变量取值在 X₁、X₂、X₃、X₄ 所构成的三维顶点,零点为区域的中心点,零点实验重复 5 次,用来估计实验误差(伍时华等,2006;刘明绶等,2010;游庆红等,2010)。

表 5 方差分析表

Table 5 Analysis of variance table

来源 Source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F	P>F	显著性 Significance
Model	0.126 382	14	0.009 027	8.698 18	<0.000 1	significant
X ₁	0.047 628	1	0.047 628	45.891 5	<0.000 1	significant
X ₂	0.008 374	1	0.008 374	8.068 767	0.013 1	
X ₃	8.33E-06	1	8.33E-06	0.008 03	0.929 9	
X ₄	0.002 494	1	0.002 494	2.403 15	0.143 4	
X ₁ X ₂	0.000 756	1	0.000 756	0.728 677	0.407 7	
X ₁ X ₃	4.9E-05	1	4.9E-05	0.047 213	0.831 1	
X ₁ X ₄	2.02E-05	1	2.02E-05	0.019 512	0.890 9	
X ₂ X ₃	0.001 764	1	0.001 764	1.699 685	0.213 4	
X ₂ X ₄	0.000 784	1	0.000 784	0.755 416	0.399 4	
X ₃ X ₄	0.000 676	1	0.000 676	0.651 353	0.433 1	
X ₁ ²	0.048 814	1	0.048 814	47.034 7	< 0.000 1	significant
X ₂ ²	0.012 345	1	0.012 345	11.894 61	0.003 9	
X ₃ ²	0.018 74	1	0.018 74	18.056 62	0.000 8	
X ₄ ²	0.000 264	1	0.000 264	0.2540 04	0.622 1	
残差 Residual	0.014 53	14	0.001 038			
失拟项 Lack of fit	0.014 522	10	0.001 452	726.0875	< 0.0001	significant
纯误差 Pure error	8E-06	4	0.000 002			
总和 Total	0.140 912	28				

2.5 响应面分析与优化

用 Design-expert 7.1.6 软件对表 4 数据进行多项式拟合回归,建立多元二次响应面回归方程: $Y=0.415-0.063X_1-0.02642X_2+0.000833X_3+0.014417X_4-0.01375X_1X_2+0.0035X_1X_3+0.00225X_1X_4+0.021X_2X_3+0.014X_2X_4-0.013X_3X_4-0.08675X_1^2-0.04363X_2^2-0.05375X_3^2-0.00638X_4^2$

由表 5 看出,模型的“Prob>F”值小于0.0001,表明二次方程拟合极显著,决定系数 $R^2=0.8969$,

说明回归方程的拟合度很好,失拟较小,实验操作可信,可用此模型来提取黑土豆色素。从表 5 中的 P 值可知,方程中 X_1 、 X_1^2 对 Y 值的影响极显著($P<0.0001$), X_2^2 、 X_3^2 对 Y 值的影响比较显著($P<0.01$), X_2 对 Y 值的影响显著($P<0.05$),与模型回归拟合预测吻合(余安等,2010)。

各因素对色素提取率的影响程度各异,回流温度的影响最大,其次依次是回流时间和乙醇浓度,料液比对其影响度不大。各交互因素对黑土豆色素提取率的三维响应面图如图 5。

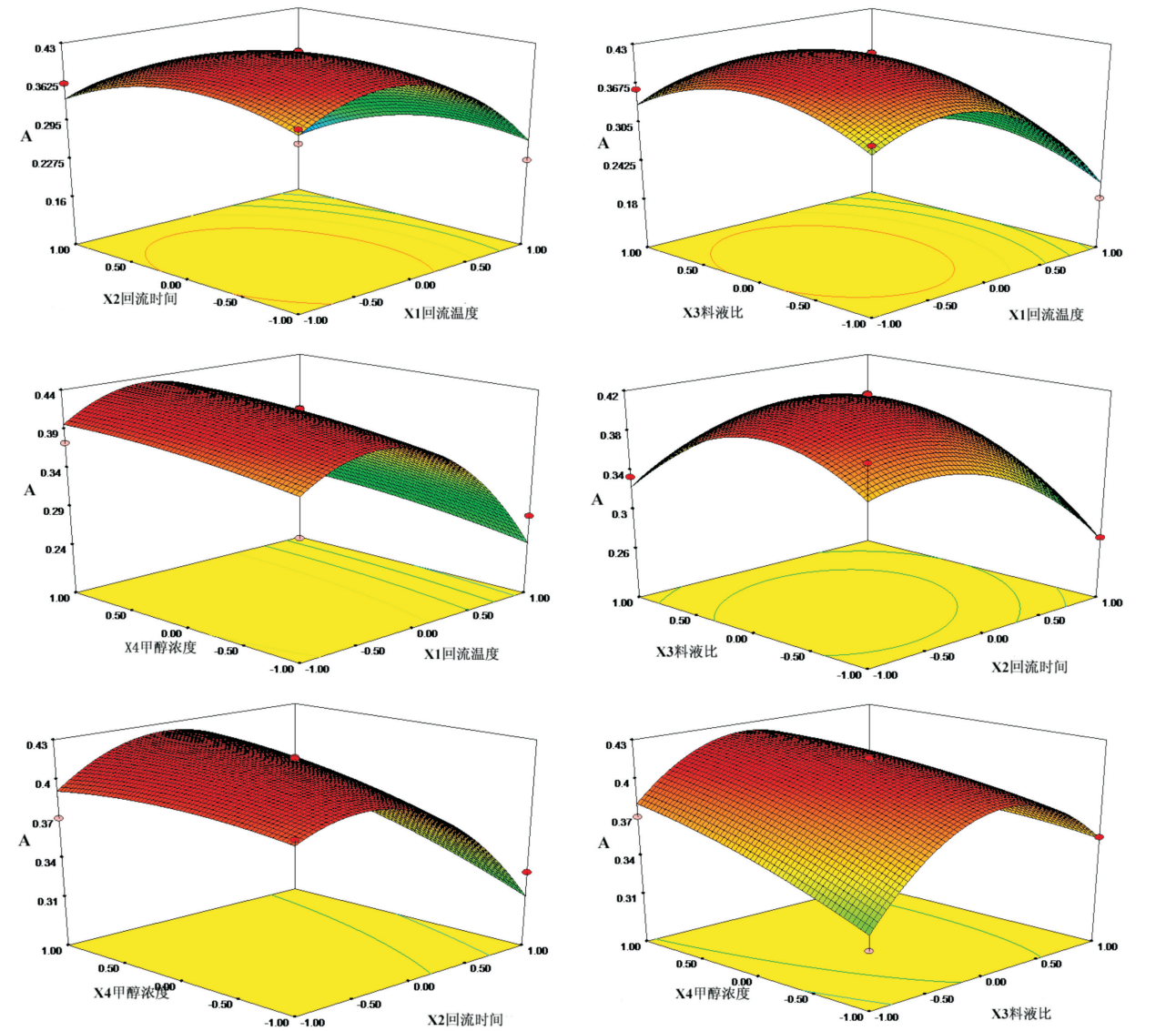


图 5 各因素对黑土豆色素提取的三维响应面曲线图
Fig. 5 Various factors on the Black Potato pigment extracting 3 d response surface plot

2.6 验证实验

通过回归模型预测的黑土豆色素提取的最佳条

件:回流时间 47.5 min,回流温度 47 ℃,料液比 1 : 90,乙醇浓度 42.5%,在此条件下吸光度值理论上可

达到 0.413。在预测的最佳条件下进行 3 组平行实验,实验测得溶液吸光度值如表 6 所示。

表 6 验证实验结果

Table 6 Result of verify experiment

测定次数 Testing times	1	2	3	RSD (%)
吸光度 Absorbance	0.416	0.417	0.415	0.24

由表 6 可知, $RSD=0.24\%$,实际值与理论值的误差为 0.726% ,两者吻合较好,此方法合理可行。

3 结论

为了最大限度地提取黑土豆中的色素,实验以乙醇作为溶剂,分析比较不同回流温度、回流时间、乙醇浓度和料液比对色素提取率的影响。结果表明,各因素对色素提取影响次序依次为回流温度>回流时间>乙醇浓度>料液比,优化提取工艺为回流温度 47℃,回流时间 47.5 min,料液比 1:90,乙醇浓度 42.5%,利用响应面法分析黑土豆中色素的提取工艺,科学合理,而且方便高效,减小了提取的盲目性,为今后进一步地研究打下了一定的基础。

参考文献:

Fang YQ(房岩强),Liu JL(刘建奎),Zhao L(赵丽),et al. 2009.

Optimizing conditions for anthocyan extraction from purple potato(紫色马铃薯花色苷的浸提工艺研究)[J]. *J Chin Cer Oils Ass*(中国粮油学报),**24**(8):143—146

Liu MS(刘明绶),Chen FH(陈发河),Wu GB(吴广斌). 2010. Optimization of extraction technology of Pineapple Peel Pigment by response surface methodology(响应面法优化菠萝皮色素提取工艺研究)[J]. *Food Res Dev*(食品研究与开发),**31**(9):222—227

Yu A(余安),Wang CM(王承明). 2010. Optimizing extraction technique of phytic acid from peanut meal by response surface methodology(响应面优化花生粕中植酸的提取工艺研究)[J]. *J Chin Cer Oils Ass*(中国粮油学报),**25**(4):80—84

Reddivari L,Vanamala J,Chintharlapalli S,et al. 2007. Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways[J]. *Carcinogenesis*,**28**(10):2 227—2 235

Wu SH(伍时华),Xu YF(徐雅飞),Zhang J(张健),et al. 2006. Study on medium optimization of L-leucine fermentation(L-亮氨酸发酵培养基优化试验)[J]. *Guihaia*(广西植物),**26**(6):692—696

You QH(游庆红),Yin XL(尹秀莲). 2010. Optimization of extraction of phellinus igniarius polysaccharides using response surface methodology(响应面优化桑黄多糖提取工艺研究)[J]. *Chin Brew*(中国酿造),**(5)**:67—69

Zhang J(张静),Zhao CL(赵昶灵),Guo HC(郭华春). 2009. Research advances in the molecular structures of the stem tuber anthocyanins of “colored potatoes”(“彩色马铃薯”块茎花色苷分子结构研究进展)[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),**21**(4):719—725

Zhao YY(赵宇瑛),Zhang HF(张汉锋). 2005. Current situation and investigation of anthocyanidin and its progressive trend(花青素的研究现状及发展趋势)[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学),**33**(5):904—905,907

(上接第 798 页 Continue from page 798)

Piao HC(朴河春),Liu CQ(刘丛强),Zhu SF(朱书法),et al. 2005. Variations of C₄ and C₃ plant N:P ratios influenced by nutrient stoichiometry in limestone and sandstone areas of guizhou(贵州石灰岩和砂岩地区 C₄ 和 C₃ 植物营养元素的化学计量对 N/P 比值波动的影响)[J]. *Quat Sci*(第四纪研究),**25**(5):552—560

Pugnaire FI, Chapin III FS. 1993. Controls over nutrient resorption from leaves of evergreen mediterranean species[J]. *Ecol*,**74**:124—129

Van Heerwaarden LM, Toet S, Aerts R. 2003. Nitrogen and phosphorus resorption efficiency and proficiency in six sub-arctic bog species after 4 years of nitrogen fertilization[J]. *J Ecol*,**91**:1 060—1 070

Wang GG,Klinka K. 1997. White spruce foliar nutrient concentrations in relation to tree growth and soil nutrient amounts[J]. *For Ecol Manag*,**98**:89—99

Yang F(杨芳),Wu JS(吴家森),Qian XB(钱新标),et al. 2006. Dynamic changes of soil microbial carbon in *Phyllostachys Proecox* stand with different fertilizers(不同施肥雷竹林土壤微生物量碳的动态变化)[J]. *J Zhengjiang For Coll*(浙江林学院学报),**23**(1):70—74

Zeng DH(曾德慧),Chen GS(陈广生). 2005. Ecological stoichiometry;a science to explore the complexity of living systems(生态化学计量学:复杂生命系统奥秘的探索)[J]. *Acta Phytocol Sin*(植物生态学报),**29**:1 007—1 019