

响应面法优化薏米中 结合型多酚的提取工艺

姚轶俊^{1,2}, 鞠兴荣^{1,2,*}, 张怡一², 王立峰², 陈正行¹

(1.江南大学食品学院, 江苏无锡 214122;

2.南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏南京 210023)

摘要:本研究以薏米为原料,在单因素实验的基础上应用响应面法对其结合型多酚提取条件进行优化。以 NaOH 的消化浓度、消化时间以及乙酸乙酯浸提温度为单因素,以结合型多酚提取得率为指标,研究各因素交互作用对薏米结合型多酚提取得率的影响。实验结果显示该方法提取的最佳条件为 NaOH 浓度为 3.26 mol/L,消化时间为 4.6 h,浸提温度为 53 ℃。此条件下得到结合型多酚的提取得率为 (30.16 ± 1.08) mgGAE/100 g,与模型预测值 29.3237 mgGAE/100 g 相近,说明该方法得到的薏米结合型多酚提取条件真实可靠,并具有较高的提取得率。

关键词:薏米,结合型多酚,提取工艺,响应面法

Optimization of Extraction Process of Bond Polyphenols Compounds from Adlay Seed (*Coix lacryma-jobi* L.var.ma-yuen Stapf) by Response Surface Methodology

YAO Yi-jun^{1,2}, JU Xing-rong^{1,2,*}, ZHANG Yi-yi², WANG Li-feng², CHEN Zheng-xing¹

(1.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2.College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China)

Abstract: In this study, adlay seed was used as the raw materials, and based on the single factor experiments, the response surface method (RSM) was employed to optimize the extraction conditions of bond polyphenols. The degrading concentrations of NaOH, time, and extracting temperature on ethyl acetate extraction were taken as single factors, and combined with bond polyphenols extraction rate as index, to research the influence between the interaction of various factors and the extraction rate of bond polyphenols in adlay. The results showed that the optimum conditions for extraction NaOH concentration was 3.26 mol/L, the degradation time was 4.6 h, and the extraction temperature of ethyl acetate was 53 ℃. Under this condition, the bond polyphenols extraction rate was (30.16 ± 1.08) mgGAE/100 g, similar to the model predicted value 29.3237 mgGAE/100 g. It showed that the method of bound polyphenol extraction condition of coix seed was reliable, and had a high extraction efficiency.

Key words: adlay seed; bond phenolic compounds; extraction process; response surface

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2018)23-0164-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.23.029

引文格式: 姚轶俊, 鞠兴荣, 张怡一, 等. 响应面法优化薏米中结合型多酚的提取工艺[J]. 食品工业科技, 2018, 39(23): 164-168.

薏米(*Coix lacryma-jobi*), 属于禾本科薏米属草本植物, 主要分布在亚洲热带太平洋岛屿附近, 中国、印度、越南、缅甸、巴西、日本等许多国家都有种植^[1]。薏米是一种药食两相宜的农作物, 作为药, 薏米可入脾肺, 有利于清热排脓。作为食品, 薏米营养丰富, 薏米中含有丰富的膳食纤维、维生素、脂肪、碳水化合物、蛋白质及矿物质; 其中含油脂类占 7.2%。

薏米中含有 8 种人体必需氨基酸, 薏米仁中支链氨基酸含量为 17.5%, 抗氧化作用的氨基酸占 10.8%^[2]。并且氨基酸的比例与人体需要的比例十分接近, 比其他全谷物食品更易被人体吸收, 薏米也被誉为“世界禾本科植物之王”。

薏米可以分为薏米壳、薏米麸皮、薏米仁。薏米壳中含有丰富的膳食纤维及 α -生育酚^[3], Kuo 等^[4]

收稿日期: 2017-12-22

作者简介: 姚轶俊(1989-), 女, 博士研究生, 研究方向: 植物活性成分与功能研究, E-mail: qin_5277@hotmail.com。

* 通讯作者: 鞠兴荣(1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与营养, E-mail: xingrongju@163.com。

基金项目: 国家重点研发项目(2017YFD0401202); 国家自然科学基金面上项目(31571766); 江苏省高校自然科学重大项目(15KJA550002); 江苏省高校自然科学面上项目(15KJB550006)。

鉴定出薏米壳中含有丁香酸、木酚素、4-酮松脂酚、松柏醇、阿魏酸、丁香脂素 6 种抗氧化物质,除此以外,还含有圣草素、神经酰胺、对-香豆素^[5]。薏米麸皮中含有内酰胺类化合物、黄烷酮类化合物、黄酮类化合物、多酚类化合物、木质素等^[1,6-7],其对癌细胞具有很强的抗增殖作用并且具有免疫反应的调制作用^[8]。阿魏酸是薏米麸皮中的主要酚类化合物,并且该物质可以抑制结肠肿瘤的癌变以及阻止心肌抑制因子(MDF)的形成^[9]。

薏米仁中含有丰富的脂肪酸、多酚类、甾醇类化合物等物质,研究发现薏米经脱脂后的丙酮提取物具有明显的抗肿瘤、抗氧化、降血脂的作用^[10]。有学者另将薏米中游离型多酚经过葡聚糖 LH-20 凝胶及半制备液相分离纯化后,得到四种薏米多酚纯化物,分别为 N1、N5-双(对香豆酰)亚精胺、阿魏酸、芦丁和对香豆酸,后证实其具有很强的抗氧化活性^[11]和抗肿瘤活性^[12]。但是,薏米中另一类多酚,结合型多酚的活性物质的研究很少,而且与游离型多酚相比,提取方法较为复杂,导致其在谷物中的作用经常被忽视,之前有研究表明橙皮中结合型多酚比游离态多酚的抗氧化能力更好。

因此,本实验在前期研究的基础上,采用有机溶剂结合 NaOH 消化法提取薏米中的结合型多酚,有机溶剂可以使多酚与蛋白质或多糖之间形成的氢键断裂,NaOH 的加入可有效的破坏细胞壁,使结合型多酚更利于提取。通过福林-酚比色法,在不同条件下测定所提薏米结合型多酚的含量,并运用 Box-Behnken 的中心组合实验分析薏米结合型多酚的最优提取条件,为后续对薏米中结合型多酚的相关性质及功能的进一步研究提供了技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

薏米 品种为贵州小薏米,贵州黔西南农贸市场;石油醚、福林酚、碳酸钠(Na_2CO_3) 分析纯,国药集团化学试剂有限公司;没食子酸 色谱纯,美国 Sigma 公司。

FW100 型高速粉碎机 天津泰斯特仪器有限公司;TP-214 型电子分析天平 丹佛仪器北京有限公司;THZ-D 型台式恒温振荡器 江苏太仓市强乐实验设备有限公司;pHS-3C 型精密数显 pH 计 上海精密科学仪器厂;Beckman Coulter J6 型高速冷冻离心机 美国 Beckman Coulter 公司;SpectraMax M2 型酶标仪 美国 Molecular Devices 公司;ALpHA2-4 型真空冷冻干燥机 德国 Christ 公司;RE52CS 型旋转蒸发仪 上海亚荣化学仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 薏米结合型多酚的提取工艺 根据文献[10-12]方法稍作修改,薏米经高速粉碎机得到薏米粉末,过 60 目筛,混入石油醚震荡脱脂,反复 3 次,烘干,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。脱脂薏米粉末先使用丙酮萃取出游离多酚,剩余薏米残渣采用 NaOH 消化法。首先将残渣与 NaOH 溶液混匀,震荡进行消化处理,加入浓盐酸调节 pH 为 2,加入乙酸乙酯以一定温度浸提

20 min 后,于冷冻离心机 3500 r/min 离心 10 min,得上清液即结合型多酚,重复 5 次,于旋转蒸发仪旋干,溶于去离子水,并置于冷冻干燥机冻干至粉末状,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,即薏米结合型多酚粗品。

1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 NaOH 消化浓度对结合型多酚提取的影响 取 10 g 薏米残渣,用 20 mL 0.5、1.5、2.5、3.5、4.5 mol/L 不同浓度 NaOH 溶液 20 mL 消化处理后,于室温下震荡消化 4 h,按料液比 1:3 (m/v) 加入乙酸乙酯在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下浸提 20 min 后,于冷冻离心机 3500 r/min 离心 10 min,得上清液,重复 5 次,最后于旋转蒸发仪脱去有机溶剂,溶于去离子水,冷冻干燥至白色粉末,研究 NaOH 消化浓度对薏米结合型多酚提取的影响。

1.2.2.2 消化时间对结合型多酚提取的影响 取 10 g 薏米残渣,用 20 mL 2.5 mol/L NaOH 溶液消化后,震荡消化 2、3、4、5、6 h,按料液比 1:3 (m/v) 加入乙酸乙酯在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下浸提 20 min 后,于冷冻离心机 3500 r/min 离心 10 min,得上清液,重复 5 次,最后于旋转蒸发仪脱去有机溶剂,溶于去离子水,冷冻干燥至白色粉末,研究碱消化时间对薏米结合型多酚提取的影响。

1.2.2.3 乙酸乙酯浸提温度结合型多酚提取的影响 取 10 g 薏米残渣,用 20 mL 2.5 mol/L NaOH 溶液消化后,于室温下震荡 4 h,按料液比 1:3 (m/v) 加入乙酸乙酯在 20、30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 下浸提 20 min 后,于冷冻离心机 3500 r/min 离心 10 min,得上清液,重复 5 次,最后于旋转蒸发仪脱去有机溶剂,溶于去离子水,冷冻干燥至白色粉末,研究乙酸乙酯浸提时间对薏米结合型多酚提取的影响。

1.2.3 Box-Behnken 中心组合试验设计 以单因素实验为参考,采用 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,选取 NaOH 消化浓度、消化时间以及乙酸乙酯浸提温度 3 个因素,分别以 A、B、C 为代表,每一个自变量的低中高实验水平分别以-1、0、1 进行编码,采用 3 因素 3 水平的实验设计,优化薏米中结合多酚的提取工艺。响应面设计试验因素及水平见表 1^[13-15]。

表 1 响应面实验因素与水平表

Table 1 Variables and levels of response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
A 消化浓度(mol/L)	0.5	2.5	4.5
B 消化时间(h)	2	4	6
C 浸提温度($^{\circ}\text{C}$)	20	40	60

1.2.4 薏米结合型多酚含量的测定 薏米结合型多酚总酚含量测定选用 Singleton 所描述的福林-酚比色法^[16],并根据文献[17]方法进行改动。具体步骤如下:经葡聚糖凝胶分离后的所有组分冻干成粉末后,取一定量溶于去离子水中,以 0.0~600.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的没食子酸为标准溶液并以此作标准曲线,多酚混合物与 Folin-Ciocalteu 试剂反应后,加入碳酸钠终止该反应,并在室温下静置 90 min 后,于 760 nm 吸光度下用酶标仪进行测定,总酚提取得率公式为:

$$\text{提取得率}(\text{mg}/100\text{ g}) = \frac{C \times V \times N}{W}$$

式中,C:总酚浓度(μg 没食子酸/ mL);V:测量液体积(mL);N 为稀释倍数;W 为原料重量(100 g)。提取得率表示为每 100 g 薏米粉末 mg 没食子酸等量。每个样品至少重复 3 次实验,取平均值。

1.3 数据分析

实验重复 3 次,结果采用平均值 $\pm$ 标准差形式表示,单因素实验采用 SPSS version 17.0 和 Excel 进行数据处理。响应面实验采用 Design Expert 8.0.6 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 NaOH 消化浓度对薏米结合型多酚提取得率的影响 由图 1 可知,在该条件下,薏米结合型多酚的提取得率随着 NaOH 消化浓度的升高而增大,当 NaOH 浓度增大到 2.5 mol/L 时,提取得率最大,并且当浓度大于 2.5 mol/L 后,其提取得率基本稳定在 $24\sim 25\text{ mg}/100\text{ g}$ 左右,在 NaOH 浓度为 2.5 mol/L 时,薏米中的结合型多酚释放的较为完全。并且考虑到之后所用浓盐酸调节 pH 时的用量,适宜选取的 NaOH 浓度在 2.5 mol/L ,提取得率为 $(24.95 \pm 0.78)\text{ mgGAE}/100\text{ g}$ 。

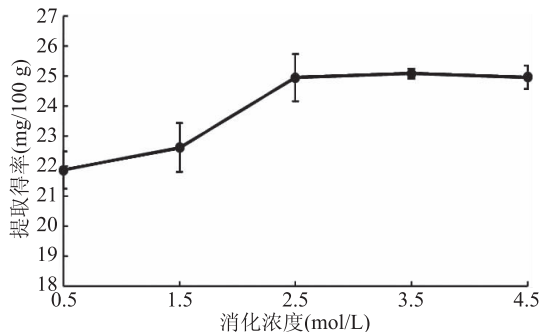


图 1 消化浓度对薏米结合型多酚提取得率的影响

Fig.1 Effect of degrading concentrations

on extraction rate of bond polyphenols in adlay

2.1.2 NaOH 消化时间对薏米结合型多酚提取得率的影响 由图 2 可知,在该条件下,薏米结合型多酚的提取得率随着 NaOH 消化时间的延长而增大,于 4 h 时达到最高值,当消化时间不足 4 h 时,薏米结合型多酚提取得率的增长趋势较大,而当消化时间超过 4 h ,提取得率基本保持稳定,甚至有略微下降,但趋势并不明显。这可能是由于 NaOH 处理过程中,在 4 h 左右细胞壁才能破碎完全,结合型多酚的提取得率也在此时达到最大。消化时间 4 h 时薏米结合型多酚提取为 $(24.95 \pm 0.78)\text{ mgGAE}/100\text{ g}$ 。

2.1.3 浸提温度对薏米结合型多酚提取得率的影响 由图 3 可知,选取乙酸乙酯提取薏米结合型多酚时,浸提温度对提取得率的影响较大。当浸提温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,提取得率为最高,为 $(29.28 \pm 1.65)\text{ mgGAE}/100\text{ g}$ 。当浸提温度小于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,提取得率随着浸提温度的升高而上升,当浸提温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,提取得率下降,这是因为随着温度的上升,

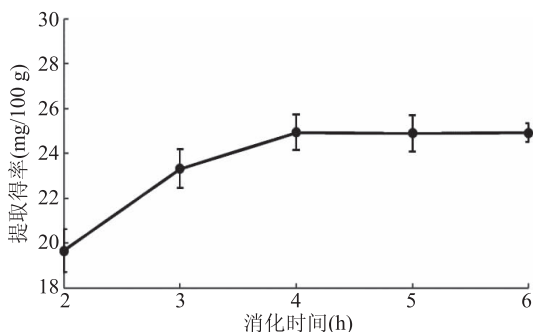


图 2 消化时间对薏米结合型多酚提取得率的影响

Fig.2 Effect of degrading time on extraction

rate of bond polyphenols in adlay

薏米结合型多酚溶解度增加,但温度过高时,薏米结合型多酚易被破坏^[18]。因此,响应面设计实验中薏米结合多酚浸提温度不易超过 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

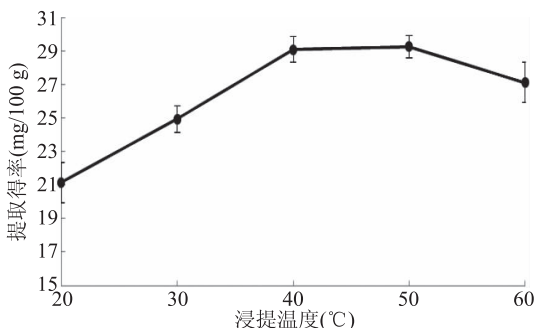


图 3 浸提温度对薏米结合型多酚提取得率的影响

Fig.3 Effect of extracting temperature

on extraction rate of bond polyphenols in adlay

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面试验结果 在单因素实验的基础上,利用 Box-Behnken 模型,采用 NaOH 消化浓度、消化时间、乙酸乙酯浸提温度进行 3 因素 3 水平响应面优化实验,分析提取薏米中结合型多酚的最佳工艺条件。得到的试验设计结果见表 2。

表 2 响应面优化试验设计及试验结果

Table 2 Experimental design and results of optimizing test with response surface method

实验号	A	B	C	提取得率 ($\text{mgGAE}/100\text{ g}$)	预测值 ($\text{mgGAE}/100\text{ g}$)
1	0	-1	1	24.95	24.85
2	-1	-1	0	20.13	20
3	-1	0	-1	18.72	18.52
4	1	0	-1	24.37	24.14
5	0	1	-1	22.37	22.48
6	0	0	0	29.11	27.86
7	0	-1	-1	18.93	19.55
8	0	1	1	28.09	27.77
9	1	-1	0	23.92	23.83
10	1	1	0	26.82	26.95
11	0	1	1	28.09	27.77
12	1	0	1	27.32	27.64
13	-1	0	1	24.85	25.08

表3 提取得率回归分析结果
Table 3 Regression analysis results of extracting rate

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	p 值	显著性
模型	168.69	9	18.74	11.77	0.0019	*
A	35.03	1	35.03	22.00	0.0022	*
B	15.24	1	15.24	9.57	0.0075	*
C	52.63	1	52.63	33.06	0.0007	*
AB	0.13	1	0.13	0.081	0.7837	
AC	2.04	1	2.04	1.28	0.2944	
BC	0.026	1	0.026	0.016	0.9027	
A ²	20.49	1	20.49	12.87	0.0089	*
B ²	13.06	1	13.06	8.20	0.0242	*
C ²	48.57	1	48.57	19.85	0.0019	*
残差	11.44	7	1.59			
失拟项	0.47	3	0.16	0.059	0.9790	
纯误差	10.68	4	2.67			
总和	179.83	16				
R ²	0.9814					

注：* $p < 0.05$, 差异性显著。

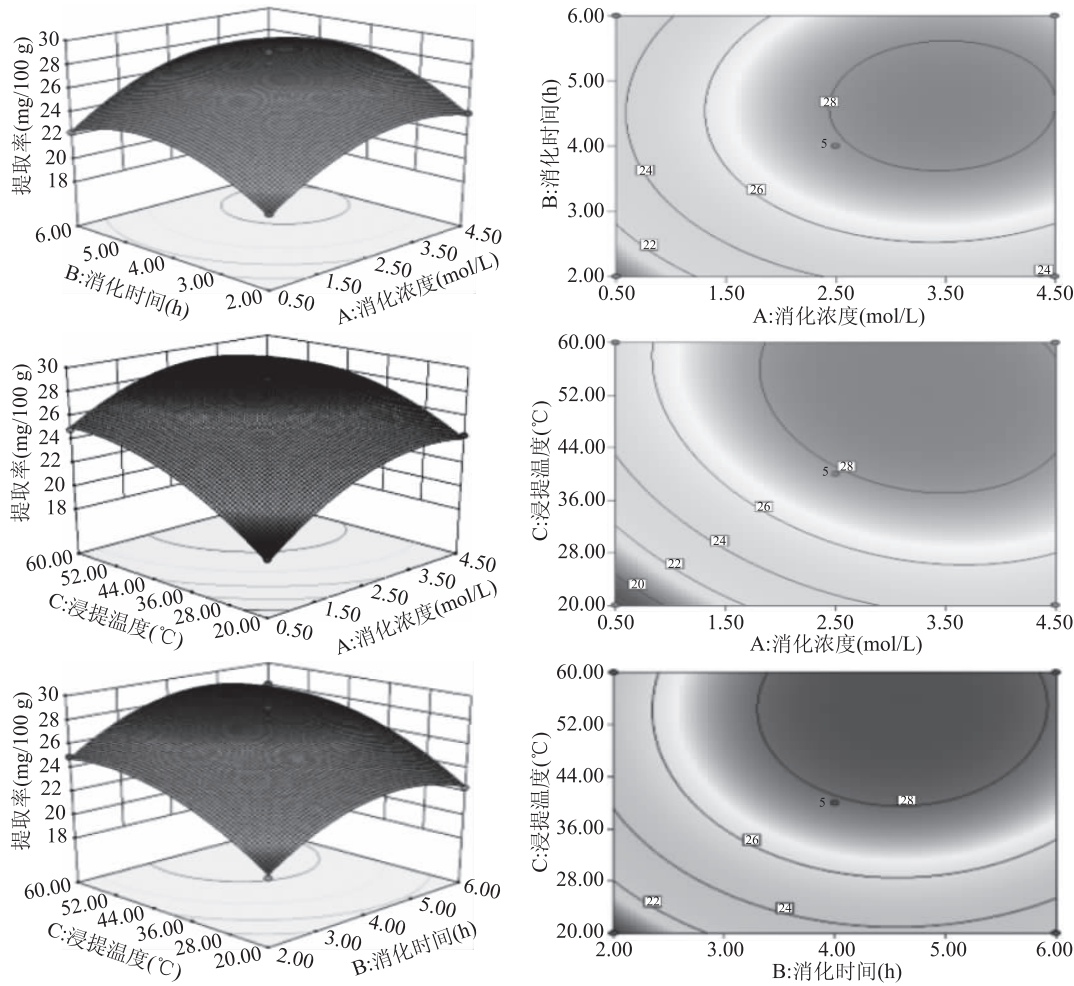


图4 两因素交互作用对总酚提取得率影响的响应曲面图(左)及等高线图(右)

Fig.4 Response surface(left) and counter(right) plots of two variables on extraction rate of total polyphenols

2.2.2 回归方程拟合及方差分析 运用 Design-Expert 软件对数据进行拟合,得到薏米结合型多酚提取得率(Y)的多元二次回归模型:

$$Y = 27.67 + 2.09A + 1.38B + 2.57C + 0.18AB - 0.72AC + 0.080BC - 2.21A^2 - 2.36B^2 - 1.76C^2$$

对该模型的方差分析见表3,方程决定系数为

0.9814,说明实测值与预测值之间相关性较高,模型对实验有较好的拟合性;同时模型 $p < 0.05$,显著,失拟项 p 值为 $0.9790 > 0.05$,不显著,表明所建立的二次回归模型能有效的对响应值进行预测。方程一次项 A、B、C 对 Y 值的影响显著($p < 0.05$),交互作用对 Y 值影响不显著,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对 Y 值的影响显著($p < 0.05$)。由 3 个独立变量的 F 值可知, $C > A > B$,即对薏米结合多酚提取得率影响因素的主次顺序为乙酸乙酯浸提温度 $>$ NaOH 消化浓度 $>$ NaOH 消化时间。

2.2.3 响应面图分析 图 4 为由回归方程所作的等高线及相应曲面。该图直观显示了当 NaOH 消化浓度、消化时间及乙酸乙酯浸提温度 3 个因素两两交互作用对薏米结合型多酚提取得率的影响。根据回归方程得出不同因子的响应面和等高线结果见图 4。在响应面图中,曲面越陡峭,等高线越密集,则两因素的交互作用对响应值的影响越显著,其曲线越接近中心,则对应的响应值也就越大^[19]。从图 4 可以看出,NaOH 消化浓度(A)与消化时间(B)、NaOH 消化浓度(A)与乙酸乙酯浸提温度(C)以及消化时间(B)与乙酸乙酯浸提温度(C)3 组交互作用的等高线分化不密集,接近圆形,因此,交互作用 AB、AC、BC 对薏米结合型多酚提取得率无显著影响。

2.2.5 验证实验 根据所建立的模型通过软件进行最优分析,在条件为:NaOH 浓度为 3.26 mol/L ,消化时间为 4.63 h ,温度为 $53.18 \text{ }^\circ\text{C}$ 时可得到薏米结合型多酚最高提取得率,为 $29.3237 \text{ mgGAE/100}$ 。为了实际操作方便,将上述条件简化为 NaOH 浓度为 3.26 mol/L ,消化时间为 4.6 h ,温度为 $53 \text{ }^\circ\text{C}$,实测薏米结合型多酚提取得率为 $(30.16 \pm 1.08) \text{ mgGAE/100 g}$,误差率为 2.83% ,因此确定上述模型可靠具有参考性。

3 结论

提取薏米结合型多酚的最优条件为 NaOH 浓度为 3.26 mol/L ,消化时间为 4.6 h ,温度为 $53 \text{ }^\circ\text{C}$ 。此条件下得到模型中结合型多酚的提取得率预测值为 29.3237 mgGAE/10 ,实测结果为 $(30.16 \pm 1.08) \text{ mgGAE/100 g}$,说明该方法得到的薏米结合型多酚提取条件真实可靠,并具有较高的提取得率。因此,利用 NaOH 消化结合乙酸乙酯浸提是一种有效提取薏米中结合多酚的方法,对植物多酚的开发与利用具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] Lee M Y, Lin H Y, Cheng F, et al. Isolation and characterization of new lactam compounds that inhibit lung and colon cancer cells from adlay (*Coix lachryma-jobi* L.var.ma-yuen Stapf) bran[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46 (6): 1933-1939.
- [2] 吴红静,章英.薏苡仁营养成分及功能食品研究概况[J].雅安职业技术学院学报,2009(4):8-9.
- [3] 孙建华,齐凤元,杨利.薏米壳食品的开发[J].粮油加工与

食品机械,2005(10):76-77.

- [4] Kuo C C, Chiang W, Liu GP, et al. 2', 2'- Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from adlay (*Coix lachryma-jobi* L.var.ma-yuen Stapf) hulls[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2002, 50(21):5850-5855.
- [5] Huang D W, Chung C P, Kuo Y H, et al. Identification of compounds in adlay (*Coix lachryma-jobi* L.var.ma-yuen Stapf) seed hull extracts that inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 Macrophages[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(22):10651-10657.
- [6] Chen H J. Anti-inflammatory effects and chemical study of a flavonoid-enriched fraction from adlay bran[J]. Food Chemistry, 2011, 126:1741-1748.
- [7] 路遥,魏贤勇.木质素的结构研究与应用[J].化学进展,2013(5):838-858.
- [8] Chen H J. Mast cell-dependent allergic responses are inhibited by ethanolic extract of adlay (*Coix lachryma-jobi* L.var.ma-yuen Stapf) testa[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58:2596-2601.
- [9] Chung C P, Hsu C Y, Lin J H, et al. Antiproliferative lactams and spiroenone from adlay bran in human breast cancer cell lines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(4):1185-1194.
- [10] 王立峰,鞠兴荣.3 种薏米的多酚提取物清除过氧化氢自由基抗氧化能力评价[J].食品科学,2012(19):39-44.
- [11] Wang L F, Chen C, Su A X, et al. Structural characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of the phenolic-rich fraction from defatted adlay (*Coix lachryma-jobi* L.var.ma-yuen Stapf) seed meal[J]. Food Chemistry, 2016, 196:509-517.
- [12] Chen C, Zhang Y Y, Gao Y L, et al. Identification and anti-tumor activities of phenolic compounds isolated from defatted adlay (*Coix lachryma-jobi* L.Var.Ma-yuen Stapf) seed meal[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 26:394-405.
- [13] 郭娇娇,方敏,林利美,等.苹果多酚的提取及抗氧化活性研究[J].食品科学,2011(20):95-98.
- [14] 刘益红,周建军,徐顶巧.响应面分析法优化艾叶中绿原酸提取工艺[J].食品工业科技,2012(9):263-267.
- [15] 李珍,哈益明,李安,等.响应面优化苹果皮渣多酚超声提取工艺研究[J].中国农业科学,2013(21):4569-4577.
- [16] Singleton V L, Orthofer R, Lamuela-Raventós R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent[J]. Methods in Enzymology, 1999, 299:152-178.
- [17] 王立峰,何荣,袁建,等.薏米中酚类提取物测定及抗氧化能力指数分析[J].食品科学,2012,33(1):72-76.
- [18] 谭畅.紫薯多酚的提取、纯化、组成分析和体外模拟消化的研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2017.
- [19] 张黎明,李瑞超,郝利民,等.响应面优化玛咖叶总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2014(4):233-239.