

Box-Behnken 设计-效应面法优化离子液体提取废次茶叶中咖啡因工艺

黄飞^{1*}, 徐慧敏¹, 王杰¹, 黄涛¹, 黄成相¹, 吴孔林²

¹黄山学院化学化工学院, 黄山 245041;

²安徽师范大学化学与材料科学学院 功能性分子固体材料教育部重点实验室, 芜湖 241000

摘要:以咖啡因的提取率为评价指标,在单因素实验基础上,通过 Box-Behnken 设计-效应面法考察料液比、浸提时间、浸提温度、离子液体[HSO₃-pmim]⁺[HSO₄]⁻浓度 4 个因素对咖啡因提取率的影响。实验结果表明,离子液体[HSO₃-pmim]⁺[HSO₄]⁻提取咖啡因的最优提取工艺为:料液比为 0.05 g/mL,浸提时间为 160 min,浸提温度为 90 °C,离子液体浓度为 70%,咖啡因的提取率为 95.1 mg/5 g 茶样。Box-Behnken 设计-效应面法优化离子液体[HSO₃-pmim]⁺[HSO₄]⁻提取废次茶叶中咖啡因,提取工艺合理,方法简便,精确度高,可预测性好。

关键词: Box-Behnken 设计-效应面法;离子液体[HSO₃-pmim]⁺[HSO₄]⁻;废次茶叶;咖啡因

中图分类号: TQ914.4

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.3.023

Optimization of Ionic Liquids Extraction of Caffeine from the Discarding Tea by Box-Behnken Design and Response Surface Analysis

HUANG Fei^{1*}, XU Hui-min¹, WANG Jie¹, HUANG Tao¹, HUANG Cheng-xiang¹, WU Kong-lin²

¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Huangshan University, Huangshan 245041, China;

²College of Chemistry and Materials Science, The Key Laboratory of Functional Molecular Solids, Ministry of Education, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China

Abstract: With extraction yield of caffeine as evaluation index, the effects of liquid-solid ratio, extraction temperature, extraction time, concentration of ionic liquids [HSO₃-pmim]⁺[HSO₄]⁻ were investigated through Box-Behnken design and response surface methodology based on single factor experiment. The results suggested that the optimal conditions of extraction technology were as follows: liquid-solid ratio was 0.05 g/mL, extraction time was 160 min, extraction temperature was 90 °C, ionic liquids [HSO₃-pmim]⁺[HSO₄]⁻ concentration was 70%. Under these conditions the extraction yield of caffeine was 95.1 mg/5g tea sample. The optimized extraction technology was reasonable, simple, precise and with good predictability.

Key words: Box-Behnken design and response surface methodology; ionic liquids [HSO₃-pmim]⁺[HSO₄]⁻; discarding tea; caffeine

咖啡因又称为咖啡碱,广泛存在于茶叶、咖啡、可可等植物中,易溶于水、乙醇、乙醚、二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯、丙酮等溶剂。咖啡因是一种重要的医药原料,它具有促进新陈代谢和血液循环,消除肌体疲劳,增强识别能力,缩短选择反应时间,提高感知力和记忆力^[1,2];咖啡因可以缓解老年健忘症^[3]、老年痴呆症^[4],降低罹患阿尔茨海默病^[5]、帕金森氏

病^[6],具有防治糖尿病性膀胱病^[7],降低鼻咽癌、皮肤癌、肺癌、胰腺癌、肾癌、肠癌^[8]、子宫内膜癌^[9]发生的风险,抑制恶性肿瘤细胞转移,提高乳腺癌化疗效果^[10];咖啡碱还具有利尿作用,可以减轻对 DNA、蛋白和其他分子的氧化损伤,达到较好的抗癌效果^[11,12];咖啡因能够抑制食欲,减少脂肪积累,具有抗肥胖作用^[13],提高运动员在极限强度下的能力和耐力;咖啡因还是一种精子活性物质,可以作为体外精子促活剂^[14]。

我国是茶叶生产大国,资源十分丰富,在茶叶的加工过程中产生大量茶梗、茶末、茶灰等,茶叶滞销

收稿日期: 2016-9-2 接受日期: 2016-10-25

基金项目: 安徽省大学生创新创业训练计划(201610375059, 201510375017); 安徽省高校自然科学研究一般项目(KJH S2016B06)

* 通讯作者 Tel: 86-013855965166; E-mail: huangfei@hsu.edu.cn

时,低档茶叶大量积压,因此合理有效的利用这些废次茶料和低档茶叶,从中提取市场紧缺的天然咖啡因,具有重要意义。从茶叶中提取咖啡的传统实验方法主要以水、乙醇和其他有机溶剂作为提取剂,采用单因素实验法和正交试验法进行线性数学模型拟合,考虑到传统有机提取剂毒性强、污染大、提取效果不理想、无法循环再利用以及单因素实验和正交试验设计无法精确找到咖啡因提取条件最佳点的局限性,因此本研究以新型绿色介质离子液体 $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 作为提取剂,它对茶叶中的咖啡因具有较好的富集能力和萃取能力,且可以循环再利用^[15,16],同时在单因素实验的基础上采用 Box-Behnken 设计-效应面法,充分考虑了各因素之间的交互作用,将各个因素与效应值之间的函数关系用二项式方程进行拟合和多元线性回归,通过对回归方程及效应面分析求得了离子液体提取废次茶叶中咖啡因的最佳工艺条件。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

茶叶购自黄山市茶叶市场,99% 咖啡因标准品购于北京北纳创联生物技术研究院,批号:GBW(E)100174,氯仿、乙醇、生石灰、过氧化氢、浓硫酸均为分析纯购于国药集团化学试剂有限公司;1,3-丙磺酸内酯(99%),N-甲基咪唑(99%),乙酸乙酯(AR)购于合肥博美生物科技有限公司。

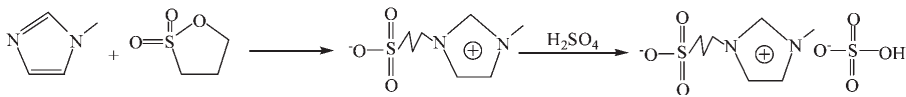


图1 $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 合成路线

Fig. 1 The synthetic route of $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$

2.2 咖啡因标准曲线的绘制

准确称取咖啡因标准品 100 mg,用新蒸馏的氯仿配成质量浓度为 0.1 mg/mL 的标准液。分别吸取 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 的咖啡因标准液,置于 25 mL 容量瓶中,定容至刻度,使之混合均匀;以试剂空白为参比,在波长 276.5 nm 处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,以咖啡因浓度为横坐标,绘制咖啡因标准曲线,所得标准曲线回归方程为 $y = 0.0516x + 0.0106$ ($R^2 = 0.9996$),其中 y 代表吸光度, x 代表咖啡因溶液浓度^[14,18]。

1.2 仪器与设备

FZ102 型微量植物粉碎机(上海申光仪器仪表有限公司);DF-101D 恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司),RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),SHB-III A 循环水式多用真空泵(郑州长城仪器厂),UV-2100 紫外可见分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司),Nicolet380 红外光谱仪(美国尼高力公司),WRS-1B 数字熔点仪(上海精密科学仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 离子液体 $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 的合成

在圆底烧瓶中加入一定量的 1,3-丙磺酸内酯和乙酸乙酯,将其置于恒温加热磁力搅拌器中加热至 50 °C,逐滴加入与 1,3-丙磺酸内酯相同物质的量的 N-甲基咪唑,加热回流 70 ~ 80 °C,使其充分反应 2 h,进行减压抽滤,用乙酸乙酯洗涤产物,干燥后得到白色固体 1-(3-磺酸基)丙基-3-甲基咪唑盐(MIM-PS)。

将一定量的 MIM-PS 和蒸馏水加入到圆底烧瓶中,磁力搅拌至完全溶解,然后将一定量的浓硫酸缓慢加至混合溶液中,加热回流 90 °C,使其充分反应 2 h 后,用旋转蒸发仪除去产物中少量水分,得到浅黄色黏稠状液体,即为离子液体 1-(3-磺酸)丙基-3-甲基咪唑硫酸氢盐($[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$)^[17],其合成路线如图 1。

2.3 咖啡因样品的提取

准确称取 5.0 g 废次茶叶,以一定浓度的离子液体 $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 作为提取溶剂,在不同的料(茶叶)液(离子液体 $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$)比和不同的温度下提取不同时间后,进行减压过滤,向滤液中加入适量过氧化氢,60 °C 下脱色 10 min,在蒸馏装置中把提取液中的离子液体 $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 蒸出回收,蒸发浓缩液倒入蒸发皿中,加入适量的生石灰粉,在恒温水浴锅中蒸干,除去其中的水分。在蒸发皿上盖一张刺有许多小孔且孔刺向上的圆形滤纸,取口径合适的玻璃

漏斗罩在滤纸上,漏斗颈部塞一小团疏松的棉花,控制加热温度,使咖啡因升华速度放慢,当滤纸上出现许多白色毛状结晶时,停止加热,自然冷却后,小心取下漏斗,揭开滤纸,将滤纸上下两面和器皿周围的咖啡因刮下,收集样品,并将所得样品进行重结晶纯化、称重^[18-20]。

2.4 提取液中咖啡因的测定

将纯化后的咖啡因溶于新蒸馏氯仿溶液中,精密量取 1.0 mL 该样品溶液,按照 2.2 项咖啡因标准曲线测定方法,在波长 276.5 nm 处测定其吸光度值,根据标准曲线回归方程得到样品溶液中咖啡因溶液的浓度,计算样品溶液中咖啡因的含量,得出 5 g 茶叶样品中咖啡因的提取率。

提取率 = $\{[(A-0.0106)/0.0516] \text{ mg/mL}^{-1} \times 1.0 \text{ mL}\} / 5 \text{ g}$, 其中 A 为提取液中咖啡因的吸光度值。

2.5 单因素实验

称取 5.0 g 废次茶叶样品,以离子液体 $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 作为提取剂,固定浸提时间为 180

min,浸提温度为 90 °C,离子液体浓度为 70%,选择料液比分别为 0.1、0.07、0.05、0.04、0.03 g/mL,根据实验方法“2.3 和 2.4”提取废次茶叶中咖啡因,计算咖啡因的提取率,考察料液比对咖啡因提取率的影响;同时按照上述方法固定其他实验因素最佳条件,分别选择浸提时间为 120、140、160、180、200 min,浸提温度为 80、85、90、95、100 °C,离子液体浓度为 50%、60%、70%、80%、90% 时,考察浸提时间、浸提温度、离子液体浓度对咖啡因提取率的影响。

2.6 效应面实验

根据单因素实验结果,选取料液比、浸提时间、浸提温度、离子液体 $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 浓度为考察因素。根据 Design-Expert 8.0.6 软件,采用 Box-Behnken 进行实验设计料液比 (X_1)、浸提时间 (X_2)、浸提温度 (X_3)、离子液体 (X_4) 浓度 4 因素 3 水平效应面实验,考察各因素及因素间交互作用对咖啡因提取率的影响,建立预测模型,并进行最佳工艺条件验证,其实验因素与水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 实验因素与水平

Table 1 Factors and levels used in Box-Behnken experimental design

水平 Levels	实验因素 Factors			
	X_1 料液比 Solid-liquid ratio(g/mL)	X_2 浸提时间 Extraction time(min)	X_3 浸提温度 Extraction temperature(°C)	X_4 离子液体浓度 Ionic liquid concentration(%)
-1	0.10	120	80	50
0	0.05	160	90	70
1	0.03	180	100	90

3 结果与分析

3.1 单因素实验结果与分析

3.1.1 料液比对咖啡因提取率的影响

从图 2A 可以看出,在料液比为 0.1 ~ 0.04 g/mL 时,随着料液比的增加,咖啡因提取率逐渐增大,当料液比达到 0.04 g/mL 时,咖啡因提取率最高为 95.1 mg/5 g。继续增加料液比时,咖啡因提取率稍有下降趋势,这可能是由于离子液体 $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 过量, $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 分子中的氢键与咖啡因的六元杂环发生了反应^[21],造成咖啡因提取率下降。因此选择料液比为 0.04 g/mL。

3.1.2 浸提时间对咖啡因提取率的影响

从图 2B 可以看出,在浸提时间为 120 ~ 180 min 时,随着浸提时间的增加,咖啡因的提取率逐渐增大,当浸提时间为 180 min 时,咖啡因的提取率最高为 95.3 mg/5 g。但继续增加浸提时间,咖啡因的提取率变化不大,这是因为茶叶中咖啡因基本被提取出来,使其提取率增加较少。因此选择提取时间为 180 min。

3.1.3 浸提温度对咖啡因提取率的影响

从图 2C 可以看出,在浸提温度为 80 ~ 95 °C 时,随着浸提温度的升高,咖啡因的提取率逐渐增大,当浸提温度上升到 95 °C 时,咖啡因的提取率最高为 95.6 mg/5 g。继续升高浸提温度,咖啡因的提取率稍有降低,这可能是由于温度过高导致离子液体

$[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 部分损失,使料液比降低,造成咖啡因的提取率降低。因此选择浸提温度为 95°C 。

3.1.4 离子液体 $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 浓度对咖啡因提取率的影响

从图 2D 可以看出,在离子液体浓度 $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 为 50% ~ 80% 时,随着离子液体浓度的升高,咖啡因的提取率也随之增大,当离子液

体浓度为 80% 时,咖啡因的提取率最高为 $96.2 \text{ mg}/5 \text{ g}$ 。继续升高离子液体浓度时,咖啡因的提取率基本保持不变。这是因为离子液体对咖啡因的提取能力是由离子液体与咖啡因之间形成缔合氢键的强弱决定的^[21],离子液体 $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 浓度越大,它们之间形成缔合氢键越强,咖啡因的提取率越高。因此选择离子液体 $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ 浓度为 80%。

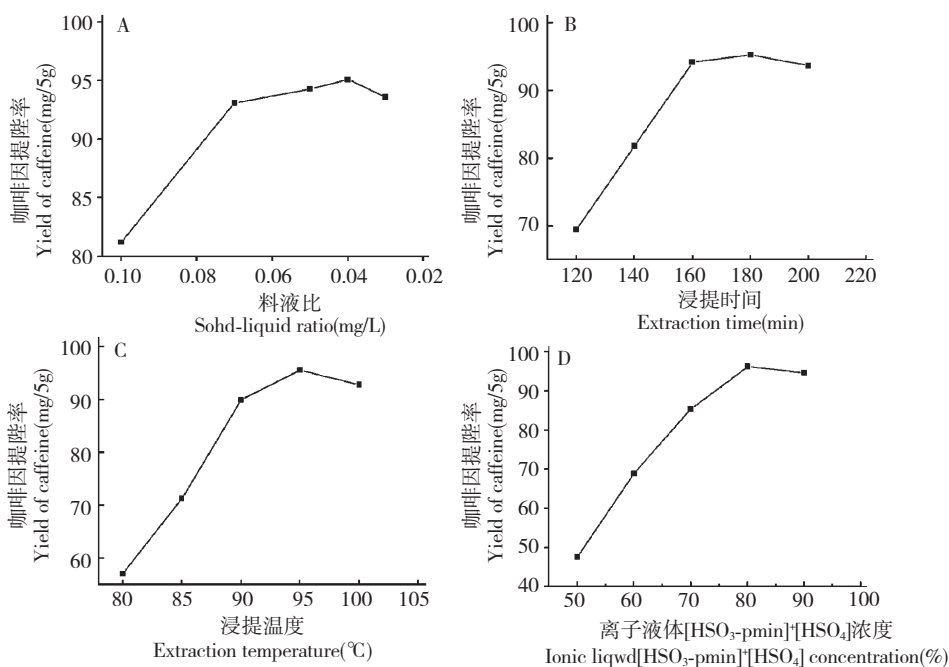


图 2 料液比 (A)、浸提时间 (B)、浸提温度 (C)、离子液体浓度 (D) 对咖啡因提取率的影响

Fig. 2 Effects of solid-liquid ratio (A), extraction time (B), extraction temperature (C), ionic liquid $[\text{HSO}_3\text{-pmim}]^+ [\text{HSO}_4]^-$ concentration (D) on extraction yield of caffeine

3.2 效应面实验结果与分析

3.2.1 Box-Behnken 设计-效应面实验结果

根据 Box-Behnken 实验设计原理,设计 4 因素 3 水平共 29 个实验,选取料液比 (X_1)、浸提时间

(X_2)、浸提温度 (X_3)、离子液体 (X_4) 浓度进行优化离子液体提取咖啡因工艺条件实验,其实验设计与结果见表 2。

表 2 Box-Behnken 实验设计与结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

实验号 No.	X_1 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	X_2 浸提时间 Extraction time (min)	X_3 浸提温度 Extraction temperature ($^\circ\text{C}$)	X_4 离子液体浓度 Ionic liquid concentration (%)	咖啡因 提取率 Yield (mg/5g)
1	1	-1	0	0	89.3
2	1	1	0	0	93.5
3	0	1	1	0	93.8
4	-1	-1	0	0	81.5
5	0	-1	-1	0	77.3

实验号 No.	X_1 料液比 Solid-liquid ratio(g/mL)	X_2 浸提时间 Extraction time(min)	X_3 浸提温度 Extraction temperature(℃)	X_4 离子液体浓度 Ionic liquid concentration(%)	咖啡因 提取率 Yield(mg/5g)
6	-1	0	0	1	87.8
7	0	0	-1	1	83.8
8	0	1	0	1	93.6
9	0	-1	0	1	85.5
10	1	0	-1	0	79.5
11	1	0	0	1	92.2
12	-1	-1	0	0	84.3
13	0	0	0	0	91.3
14	0	0	-1	-1	73.8
15	0	1	-1	0	83.6
16	0	0	1	-1	83.9
17	0	-1	1	0	84.8
18	0	0	0	0	92.4
19	0	1	0	-1	83.7
20	0	0	1	1	91.5
21	0	0	0	0	94.3
22	-1	0	0	-1	77.8
23	0	-1	0	-1	75.5
24	1	0	1	0	91.2
25	0	0	0	0	95.6
26	-1	0	1	0	79.3
27	0	0	0	0	91.8
28	-1	0	-1	0	79.3
29	1	0	0	-1	82.3

3.2.2 回归模型的建立和方差分析

将实验所得数据,利用 Design-Expert 8.0.6 软件,进行效应面实验分析,以咖啡因的提取率(Y)为效应值,对各因素(X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4)分别进行二项式方程拟合和多元线性回归,得回归方程如下 $Y = 93.08 + 3.17X_1 + 3.22X_2 + 3.93X_3 + 4.78X_4 + 0.35X_1X_2 + 2.93X_1X_3 - 0.025X_1X_4 + 0.68X_2X_3 - 0.025X_2X_4 - 0.6X_3X_4 - 3.82X_1^2 - 2.77X_2^2 - 5.85X_3^2 - 4.65X_4^2$ ($R^2 = 0.9511$)。

由表 3 回归方程的方差分析结果可知,实验模型的 F 值为 19.46, P 值 < 0.0001 ,该实验模型达到极显著水平,说明该二项式方程与实际提取情况拟合很好,较好地反映了咖啡因的提取率与料液比、浸提温度、浸提时间、离子液体浓度的关系;该二项式

方程决定系数 $R^2 = 0.9511$,与校正决定系数 $Adj. R^2 = 0.9023$ 相近,表明离子液体提取茶叶中咖啡因的预测值与实测值有较好的拟合度,该回归模型可靠性高;次变异系数 $C. V. = 2.32\%$,说明该回归模型的置信度较高,实验的可靠性和精确度较好;方程的失拟项 F 值为 1.30, $P = 0.4301 > 0.05$,表示该回归模型的失拟度不显著,表明影响离子液体提取咖啡因的未知因素对试验结果干扰较小,说明该回归模型的预测值与实验值能有较好的吻合度,可用模型来分析和预测离子液体提取咖啡因的工艺条件。

由表 3 的 F 值大小可知,料液比(X_1)、浸提时间(X_2)、浸提温度(X_3)、离子液体浓度(X_4)对咖啡因的提取率具极显著影响,料液比(X_1)和浸提温度(X_3)的相互作用具有显著影响。料液比(X_1)和浸

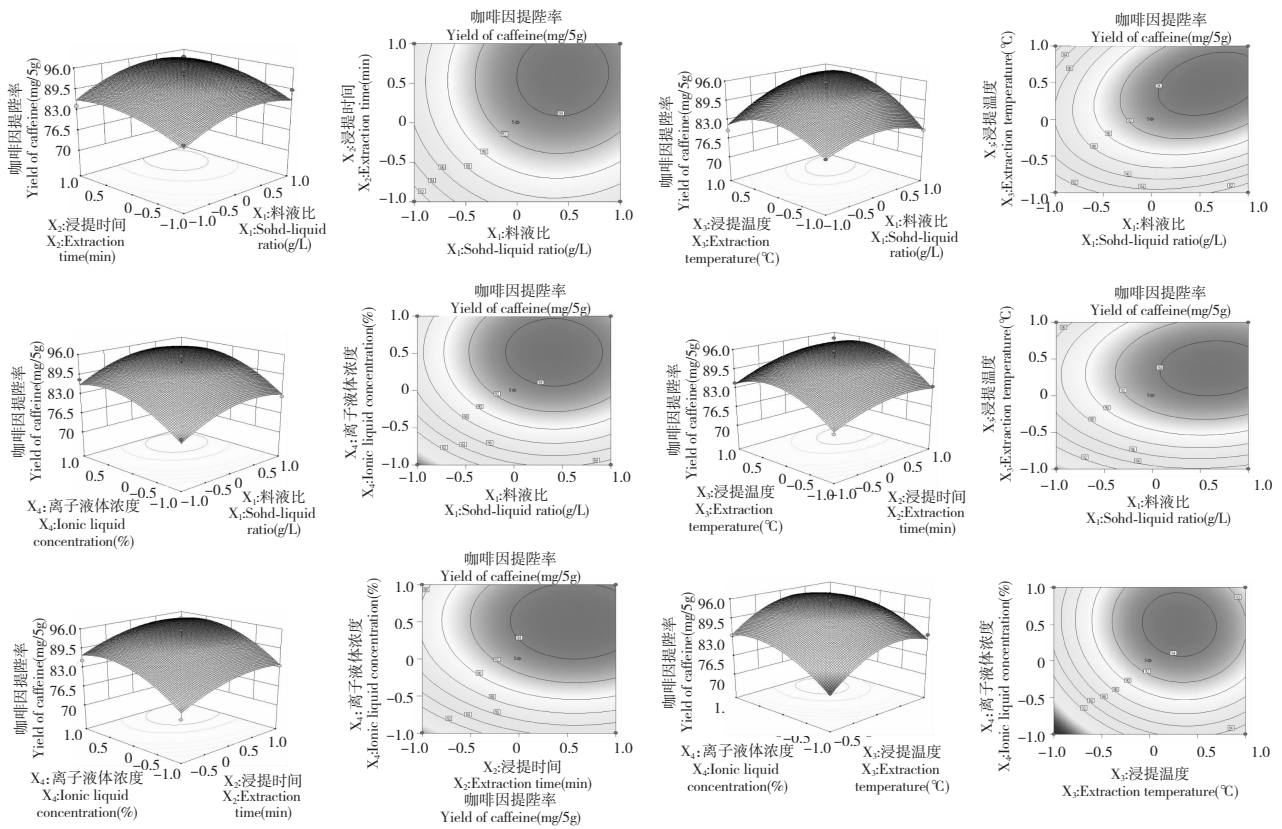


图3 料液比(X_1)与浸提时间(X_2) (A-A')、料液比(X_1)与浸提温度(X_3) (B-B')、料液比(X_1)与离子液体浓度(X_4) (C-C')、浸提时间(X_2)与浸提温度(X_3) (D-D')、浸提时间(X_2)与离子液体浓度(X_4) (E-E')及浸提温度(X_3)与离子液体浓度(X_4) (F-F')对咖啡因提取率影响的效应面图及等高线图

Fig. 3 Response surface plots and contour plots showing the interactive effects of solid-liquid ratio(X_1) and extraction time(X_2) (A-A'), solid-liquid ratio(X_1) and extraction temperature(X_3) (B-B'), solid-liquid ratio(X_1) and ionic liquid concentration(X_4) (C-C'), extraction time(X_2) and extraction temperature(X_3) (D-D'), extraction time(X_2) and ionic liquid concentration(X_4) (E-E') and extraction temperature(X_3) and ionic liquid concentration(X_4) (F-F') on the extraction yield of caffeine

提时间(X_2)、料液比(X_1)和离子液体浓度(X_4)、浸提时间(X_2)和浸提温度(X_3)、浸提时间(X_2)和离子液体浓度(X_4)、浸提温度(X_3)和离子液体浓度(X_4)的相互作用没有显著影响。四个因素对咖啡因提取率的影响显著程度排序为： $X_4 > X_3 > X_2 >$

X_1 ，且各实验因素交互作用多提取咖啡因提取率的影响强弱依次为 $X_1X_3 > X_2X_3 > X_3X_4 > X_1X_2 > X_1X_4 = X_2X_4$ 。因此，该二项式方程较好地描述了咖啡因提取率随各个因素的变化规律，具有良好的预测指导性。

表3 回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the regression equation

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean squares	F 值 F value	P 值 Prob > F P value
模型 Model	1085.54	14	77.54	19.46	<0.0001***
X_1 -料液比 X_1 -Solid-liquid ratio	120.33	1	120.33	30.20	<0.0001***
X_2 -浸提时间 X_2 -Extraction time	124.16	1	124.16	31.16	<0.0001***

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean squares	F 值 value	P 值 Prob > F P value
X_3 -浸提温度 X_3 -Extraction temperature	185.65	1	185.65	46.60	<0.0001***
X_4 -离子液体浓度 X_4 -Ionic liquid concentration	274.56	1	274.56	68.91	<0.0001***
X_1X_2	0.49	1	0.49	0.12	0.7310
X_1X_3	34.22	1	34.22	8.59	0.0110*
X_1X_4	2.500E-003	1	2.500 E-003	6.275E-004	0.9804
X_2X_3	1.82	1	1.82	0.46	0.5098
X_2X_4	2.500 E-003	1	2.500 E-003	6.275E-004	0.9804
X_3X_4	1.44	1	1.44	0.36	0.5573
X_1^2	94.82	1	94.82	23.80	0.0002**
X_2^2	49.89	1	49.89	12.52	0.0033**
X_3^2	221.86	1	221.86	55.69	<0.0001***
X_4^2	140.15	1	140.15	35.18	<0.0001***
残差 Residual	55.78	14	3.98		
失拟性 Lack of Fit	42.67	10	4.27	1.30	0.4301
纯误差 Pure Error	13.11	4	3.28		
总差 Cor Total	1141.32	28			

注:*** $P < 0.0001$ 为极显著,** $P < 0.01$ 为非常显著,* $P < 0.05$ 为显著。

Note:*** $P < 0.0001$ indicated extremely significant difference,** $P < 0.01$ indicated highly significant difference,* $P < 0.05$ indicated significant difference.

3.2.3 效应面和等高线图分析

根据二项式数学模型,应用 Design-Expert 8.0.6 软件,绘制考察指标与影响较显著的两个自变量的三维效应面图和二维等高线图,可以直观地反映各因素对效应值的影响,每个效应面对其中两个因素进行分析,另外一个因素固定在零水平上。从实验所得的三维效应面图上可以看出它们在反应过程中的相互作用,如图 3 所示。

由图 3 三维效应面图(A-F)及二维等高线图(A'-F')能够直观的观察各因素以及各因素之间的关系,等高线表现为椭圆形或效应面倾斜度陡峭,则说明该因素对咖啡因提取率的影响越显著,等高线越密集表明该因素对咖啡因提取率的影响效果越大;而等高线表现为偏圆形或效应面倾斜度平滑,则说明该因素对咖啡因提取率的影响不显著,等高线越稀疏表明该因素对咖啡因提取率的影响效果越小。由图 3 三维效应面图(A-F)和二维等高线图(A'-F')可看出,各影响因素对咖啡因提取率的影响不是简单的线性关系,各等高线呈椭圆形或圆形,效应面倾斜度较陡峭,表明两实验因素间的相互影响较为显著。从二维等高线上看,当料液比为 0.05 mg/L、浸提时间为 160 min、浸提温度为 90 ℃、离子液体浓度为 70% 附近值时对提高咖啡因的提取率有重要影响。

结合三维效应面图(A-F)和二维等高线图(A'-F')分析可知,各实验因素的主次顺序为离子液体浓度 > 浸提温度 > 浸提时间 > 料液比。

3.2.4 最佳工艺条件的选取及验证实验

根据回归模型,利用 Design-Expert 8.0.6 软件对实验结果进行分析,得到了离子液体提取茶叶中咖啡因的最优化条件为:料液比为 0.051 g/mL,浸提时间为 161.42 min,浸提温度为 90.35 ℃,离子液体浓度为 70.53%,咖啡因提取率的预测值为 95.74 mg/g。考虑到实际操作的可行性,将优化条件修正为:料液比为 0.05 g/mL,浸提时间为 160 min,浸提温度为 90 ℃,离子液体浓度为 70%。根据预测得出的最优提取工艺条件,平行进行 3 次验证实验,咖啡因的提取率分别为 94.3 mg/g、96.1 mg/g、94.8 mg/g,平均值为 95.1 mg/g,与预测值的相对误差为-0.52%,表明所建立的数学模型具有准确的预测性,所选工艺条件具有较好重现性。

4 结论

在单因素实验的基础上,通过 Box-Behnken 设计-效应面法考察各实验因素对咖啡因提取率的影响,实验结果表明,料液比、浸提温度、浸提时间、离子液体[$\text{HSO}_3\text{-pmim}^+$][HSO_4^-]浓度对咖啡因的提取率具极显著影响,并确定了离子液体[$\text{HSO}_3\text{-$

pmim]⁺[HSO₄]⁻提取废次茶叶中咖啡因的最优工艺条件:料液比为 0.05 g/mL,浸提时间为 160 min,浸提温度为 90 ℃,离子液体浓度为 70%,在此条件下咖啡因的提取率为 95.1 mg/5 g。

本研究首次采用 Box-Behnken 设计-效应面法对离子液体提取废次茶叶中咖啡因工艺进行优化,并进行了验证实验,该方法简便,精确度高,可预测性好,为进一步开发应用茶叶中咖啡因提供了科学合理的理论和实验依据。

参考文献

- 1 Peeling P, Dawson B. Influence of caffeine ingestion on perceived mood states, concentration, and arousal levels during a 75-min university lecture. *Adv Physiol Edu*, 2007, 31: 332-335.
- 2 Brunyé TT, Mahoney CR, Lieberman HR, et al. Caffeine modulates attention network function. *Brain and Cognition*, 2010, 72: 181-188.
- 3 Costa MS, Botton PH, Mioranza S, et al. Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor (TrkB) content in mice. *Neuroscience*, 2008, 153: 1071-1078.
- 4 Ritchie K, Carrière I, de Mendonca A, et al. The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology*, 2007, 69: 536-545.
- 5 Arendash GW, Schleif W, Rezaei-Zadeh K, et al. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience*, 2006, 142: 941-952.
- 6 Singh S, Singh K, Patel S, et al. Nicotine and caffeine-mediated modulation in the expression of toxicant responsive genes and vesicular monoamine transporter-2 in 1-methyl 4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease phenotype in mouse. *Brain Res*, 2008, 1: 193-206.
- 7 Yi CR(易超然), Wei ZQ(卫中庆), Deng XL(邓湘蕾). Pharmacological action and application of caffeine. *J Med Postgraduates* (中国糖尿病杂志), 2006, 14: 144-145.
- 8 Merighis S, Benini A, Mirandola P, et al. Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, and interleukin-8 expression in hypoxic human colon cancer cells. *Molecular Pharmacol*, 2007, 72: 395-406.
- 9 Giri A, Sturgeon SR, Luisi N, et al. Caffeinated coffee, decaffeinated coffee and endometrial cancer risk: A prospective cohort study among US postmenopausal women. *Nutrients*, 2011, 3: 937-950.
- 10 Li WP(李文萍), Wang Q(王颀), Xu J(许娟). *In vitro* study of the enhancing effects of chemotherapy on breast cancer via caffeine. *Chin J Cancer Prev Treat* (肿瘤防治杂志), 2005, 12: 1857-1860.
- 11 Ma L(马莉), Cao P(曹平), An CY(安陈阳), et al. Research progress of caffeine in cancer prevention and control. *Chin J Clin* (中华临床医师杂志), 2013, 7: 9272-9274.
- 12 Wu MY(吴命燕), Fan FY(范方媛), Liang YR(梁月荣), et al. The physiological functions of caffeine and their related mechanisms. *J Tea Sci* (茶叶科学), 2010, 30: 235-242.
- 13 Huang YW, Liu Y, Dushenkov S. Anti-obesity effects of epigallocatechin-3-gallate, orange peel extract, black tea extract, caffeine and their combinations in a mouse model. *J Funct Foods*, 2009, 1: 304-310.
- 14 Yan ZJ(严子军), Lu KM(鲁昆明), Lin L(林玲), et al. Microwave assisted extraction process of caffeine from leaves of *Cratogeomys cochinchinense*. *J Zhaoqing Univ*, 2014, 35: 52-55.
- 15 Wehon T. Room temperature ionic liquids solvent for synthesis and catalysis. *Chem Rev*, 1999, 99: 2071-2083.
- 16 Zhang XP(张香平), Bai YG(白银鸽), Yan RY(闫瑞一), et al. Progress in ionic liquids for extraction of organic compounds. *Chem Ind Eng Progr* (化工进展), 2016, 35: 1587-1605.
- 17 Huang F(黄飞), Qu FQ(屈飞强), Wei XW(魏先文), et al. Study on microwave-assisted catalytic synthesis technology of dimethyl fumarate by ionic liquid catalyst and its application. *J Shaanxi Normal Univ* (陕西师范大学学报), 2015, 43: 53-58.
- 18 Xu FY(徐凤英), Liang Y(梁英), Wang YF(王亚飞). Optimization process of caffeine by ultrasonic-assisted ethanol extraction. *J Heilongjiang Bayi Agric Univ* (黑龙江八一农垦大学学报), 2013, 25: 85-87.
- 19 Huang F(黄飞). Study on extracting caffeine from tea by orthogonal experiment. *J Heilongjiang Bayi Agric Univ* (黑龙江八一农垦大学学报), 2014, 26: 63-66.
- 20 Zeng SQ(曾昭琼), Zeng HP(曾和平). Experiment of organic chemistry. Beijing: Higher Education Press(高等教育出版社), MSc. 2000.
- 21 Yu HN(于海南). Study on the extraction and separation of caffeine in tea-leaf by ionic liquids. Daqing: Northeast Petroleum University(东北石油大学), PhD. 2012.