

超声波辅助提取苹果皮中总黄酮工艺条件的优化

焦岩^{1,2}, 常影^{1,*}

(1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006;

2. 齐齐哈尔大学农产品加工黑龙江省普通高校重点实验室, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要: 采用超声波辅助法对苹果皮中的总黄酮进行提取和条件优化。在单因素实验的基础上, 用响应面研究了乙醇体积分数、液固比、提取时间对黄酮得率的影响。并由此确定了超声波辅助提取苹果皮中总黄酮最佳提取工艺条件: 乙醇体积分数50.3%、液固比28.9:1、时间49.1min, 黄酮得率为19.32mg/g。

关键词: 苹果皮, 黄酮, 超声波提取, 响应面法, 工艺条件

Optimization of ultrasonic wave-assisted extraction process of flavonoids from apple peels

JIAO Yan^{1,2}, CHANG Ying^{1,*}

(1. College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China;

2. Key Laboratory of Processing Agricultural Products of Heilongjiang Province, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract: The extraction process of flavonoids from apple peels by the ultrasonic assisted technique was studied. Based on single factor test, response surface methodology (RSM) was used to study effect of the ethanol concentrations, ratio of solutions to material, extraction time on extraction rate of flavonoids. The best extraction conditions were determined as follows: ethanol concentrations 50.3%, ratio of solutions to material 28.9:1, time 49.1min, the flavonoids yield was 19.32mg/g.

Key words: apple peels; flavonoids; ultrasonic wave extraction; response surface method; process conditions

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)09-0283-04

黄酮化合物是广泛存在于水果和蔬菜中的一类次生代谢物质, 近来研究发现, 黄酮类物质对心脑血管疾病、新陈代谢及免疫系统有重要作用, 对缺血性脑血管疾病有很好的防治及缓解作用^[1-2]。此外, 黄酮能够有效地预防和治疗癌症、骨质疏松、妇女更年期综合征等多种疾病, 黄酮在保健食品和医药领域有着广阔的应用前景^[3-5]。黄酮是苹果果实中的主要多酚类物质, 是苹果中的重要抗氧化物质来源。苹果果实中含有丰富的黄酮类物质, 且主要集中在果皮部分, 果皮中的黄酮含量远高于果肉和果心^[6-7]。近年来, 国内外研究者对苹果果实中的黄酮研究较多, 而由于苹果皮中含有较多营养和功能成分, 因此对苹果皮中黄酮类物质的提取和功能研究也成为当今国内外研究的热点^[8-11]。例如美国康奈尔大学的研究者正在研究苹果皮中的多酚和黄酮类物质的结构和抗癌功能, 并研究其提取物作为功能食品添加剂等。超

声波辅助提取法因具有提取时间短、效率高、提取液中杂质少、对有效成分结构破坏较小、提取温度可控等优点在天然植物活性成分的提取有较多应用^[12-13]。为了充分利用苹果加工副产物, 有效利用苹果皮中的活性黄酮类物质, 首先在比较了四种市售苹果皮中的黄酮含量基础上, 筛选了黄酮含量比较高的苹果皮种类, 采用单因素实验和响应面法, 得到了超声波辅助提取苹果皮中总黄酮的最佳工艺条件, 为苹果资源的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜富士苹果、花牛苹果、国光苹果、黄元帅苹果 市售, 清洗后取皮, 将苹果皮真空干燥箱低温干燥, 粉碎至60目, 于-20℃冻藏备用; 芦丁标准品 美国Sigma公司; 无水乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠等试剂 上海化学试剂公司, 分析纯。

DHG-9240A型电热真空干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; JA2003电子天平 上海良平仪器仪表有限公司; DK-98-1型电热水浴锅, FW100型高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; UV-2450

收稿日期: 2011-08-23 * 通讯联系人

作者简介: 焦岩(1981-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 生物活性物质与功能食品。

型紫外—可见分光光度计 日本岛津;PB-10型pH计 德国Sartorius公司。

1.2 实验方法

1.2.1 苹果皮黄酮提取工艺流程 干燥恒重的苹果皮→粉碎→过60目筛→超声波辅助提取→测定黄酮得率

1.2.2 黄酮含量的测定 标准方程的建立: 苹果皮黄酮按 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法显色法测定^[14](40%乙醇作溶剂),以芦丁为标准对照品,用紫外可见分光光度计在510nm处比色,测定不同浓度芦丁标准品溶液吸光度,绘制标准曲线,得到标准方程: $A=0.0015x+0.0002$ ($R^2=0.9987$),式中:A为吸光度;x为芦丁含量,mg/mL。

样品中黄酮含量的测定:取各组不同实验条件下所得的定容样液依法显色,按下式计算苹果皮黄酮得率y(以芦丁计), $y=(A-0.0002)V/(0.0015m)$,式中:y为黄酮得率,mg/g;A为样液的吸光度;m为各组实验样品质量,g;V为总体积数,mL。

1.2.3 不同种类苹果皮中黄酮含量的比较 分别取干燥后的富士苹果、花牛苹果、国光苹果、黄元帅苹果果皮粉末,以60%的乙醇为溶剂,以一定的液固比,在相同的提取条件下进行三次超声波提取,合并提取液定容,然后测定黄酮得率,比较不同种类苹果皮中黄酮的含量。

1.2.4 超声波法提取苹果皮黄酮单因素实验^[15] 选择黄酮含量最高的苹果皮为原料,研究超声波辅助提取苹果皮黄酮的工艺条件,考察不同乙醇体积分数、提取时间、提取温度、液固比等单因素对黄酮得率的影响。

1.2.5 响应面优化实验 在单因素实验基础上,采用Box-Behnken实验设计优化苹果皮黄酮提取工艺参数^[16]。采用统计分析软件SAS9.0进行4因素3水平的响应面分析实验^[17],实验因素水平见表1。

表1 Box-Behnken实验因素水平编码表

Table 1 Coded levels of variables of the Box-Behnken experimental design

水平	因素		
	X ₁ 乙醇体积分数(%)	X ₂ 液固比	X ₃ 时间(min)
-1	40	20:1	30
0	50	30:1	40
+1	60	40:1	50

2 结果与分析

2.1 不同种类苹果皮中黄酮含量的比较

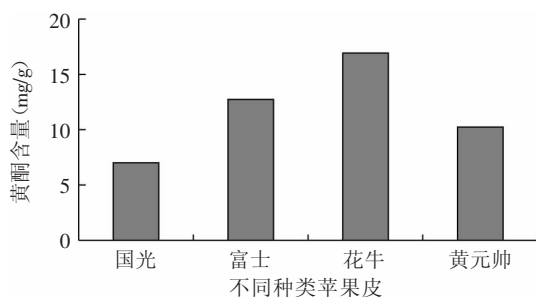


图1 不同种类苹果皮中黄酮含量的比较

Fig.1 Comparison of flavonoid content in different kinds of apples

由图1可以看出,四种苹果皮中的黄酮含量差异很大,其中花牛苹果皮中黄酮含量最高,国光苹果皮黄酮含量最低,四种苹果黄酮含量大小依次为花牛>红富士>黄元帅>国光。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 乙醇体积分数对黄酮得率的影响 由图2可知,在超声温度50℃、超声功率300W、液固比50:1、超声时间30min条件下,乙醇体积分数为60%左右时,苹果皮黄酮提取率较高。

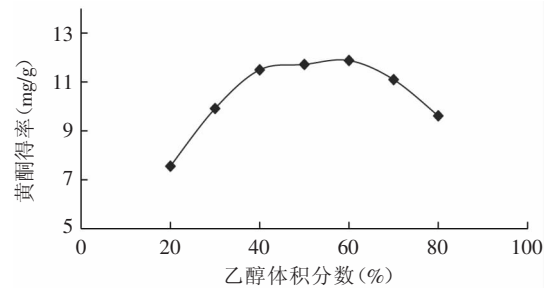


图2 不同乙醇体积分数对黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of different ethanol concentrations on flavonoid yield

2.2.2 液固比对黄酮得率的影响 由图3可知,在乙醇体积分数60%,超声温度50℃,超声功率300W,超声时间30min条件下,液固比为30:1左右时,苹果皮黄酮提取率较高。

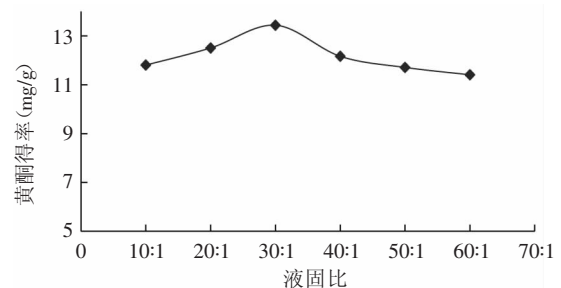


图3 不同液固比对黄酮得率的影响

Fig.3 Effect of different ratio of solutions to material on flavonoid yield

2.2.3 超声提取时间对黄酮得率的影响 由图4可知,在乙醇体积分数60%,超声温度50℃,超声功率300W,液固比30:1条件下,提取时间为50min时黄酮得率较高。

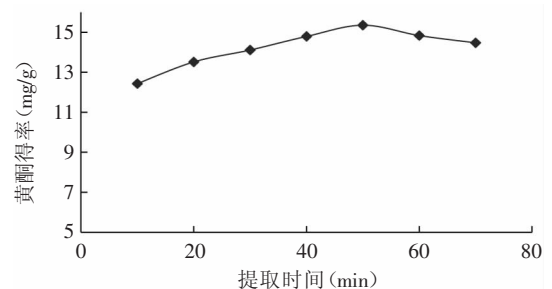


图4 不同提取时间对黄酮得率的影响

Fig.4 Effect of different extraction time on flavonoid yield

2.2.4 超声温度对黄酮得率的影响 由图5可知,在乙醇体积分数60%,超声功率300W,液固比50:1,超

声时间50min条件下,苹果皮黄酮得率随温度的升高而增大,当温度超过50℃时逐渐趋于平稳,故超声波提取苹果皮黄酮的温度控制在50℃为宜。

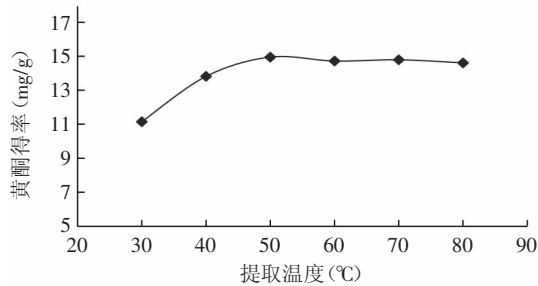


图5 不同提取温度对黄酮得率的影响

Fig.5 Effect of different extraction temperature on flavonoid yield

2.3 响应面优化实验结果分析

表2 Box-Behnken实验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and its results

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	黄酮得率Y (mg/g)
1	-1	-1	0	17.30
2	1	-1	0	17.87
3	-1	1	0	9.84
4	1	1	0	14.79
5	-1	0	-1	10.35
6	1	0	-1	13.36
7	-1	0	1	12.63
8	1	0	1	13.07
9	0	-1	-1	18.39
10	0	1	-1	15.31
11	0	-1	1	18.86
12	0	1	1	10.59
13	0	0	0	18.58
14	0	0	0	19.15
15	0	0	0	18.59

表3 二次响应面回归模型方差分析及参数估计

Table 3 Analysis of variance and parameter estimate of the regression model of quadratic response

变异来源	自由度	参数估计	标准误差	T	P值	显著性	
常量	1	-155.738000	20.612672	-7.56	0.0006	**	
一次项	X ₁	4.555500	0.547210	8.32	0.0004	**	
	X ₂	1.672500	0.424395	3.94	0.0100	**	
	X ₃	1.489000	0.481992	3.09	0.0272	*	
交互项	X ₁ X ₂	0.001000	0.004730	0.21	0.8409		
	X ₁ X ₃	-0.013900	0.004730	-2.94	0.0323	*	
	X ₂ X ₃	-0.000500	0.004730	-0.11	0.9199		
二次项	X ₁ ²	-0.038800	0.004923	-7.88	0.0005	**	
	X ₂ ²	-0.029400	0.004923	-5.97	0.0019	**	
	X ₃ ²	-0.007900	0.004923	-1.60	0.1695		
变异来源	自由度	平方和	均方	F	P值	显著性	
回归项	一次项	3	38.193200	0.2887	14.23	0.0070	**
	二次项	3	81.845173	0.6187	30.48	0.0012	**
	交互项	3	7.778400	0.0588	2.90	0.1410	
	总回归	9	127.816773	0.9662	15.87	0.0036	**
残差项	失拟	3	4.258000	1.419333	13.09	0.0718	
	随机误差	2	0.216800	0.108400			
	总残差	5	4.474800	0.894960			
总和	14	132.2915733					

注:*为显著(0.01<P≤0.05);**为高度显著(P≤0.01)。

2.3.1 回归模型的建立与分析 以乙醇体积分数(X₁)、液固比(X₂)、温度(X₃)3因素为自变量,黄酮得率(Y)为响应值,进行响应面分析实验,得出了不同实验条件下所提取的苹果皮黄酮得率(表2)。

2.3.2 模型的建立及分析 利用SAS9.0对表2的实验数据进行方差分析、参数估计及显著性检测,具体分析见表3,并得到标准形式的三元二次回归方程:

$$Y = 18.7720 + 1.49X_1 - 0.62X_2 + 1.47X_3 + 0.1X_1X_2 - 1.39X_1X_3 - 0.05X_2X_3 - 3.88X_1^2 - 2.94X_2^2 - 0.79X_3^2$$

由表3可知,影响超声波辅助提取苹果皮中黄酮含量大小顺序为X₁>X₂>X₃,即乙醇体积分数>液固比>提取时间。从回归分析结果来看,此模型的P<0.01,响应面回归模型达到显著水平,决定系数R²为0.950。逐项显著性检验结果表明,一次项、二次项对实验结果有显著性影响;交互项X₁X₃对实验结果的影响显著;残差项各项数据分析表明,该模型失拟P=0.0718>0.05不具有高显著性;因此该二次方程能够较好地拟合真实的响应面。

2.3.3 响应曲面分析与优化 为了考察三因素间的交互作用情况,采用design exper7.0软件对回归模型进行降维分析,并得到任意两因素响应曲面图和等高线图,如图6~图8所示。

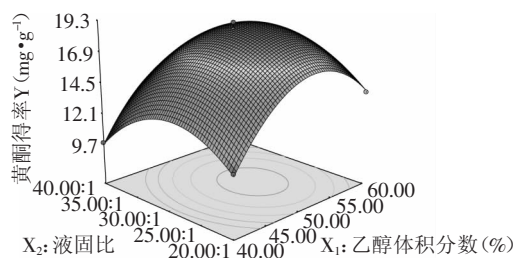
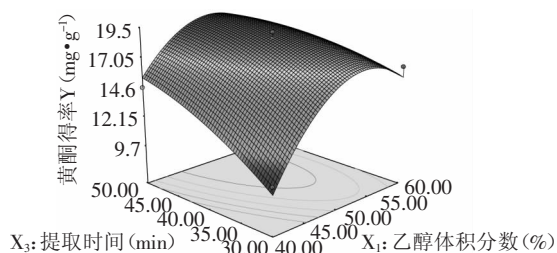
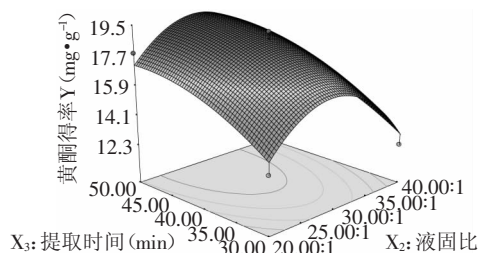
由图6~图8可以看出,乙醇体积分数和液固比之间、乙醇体积分数和提取时间之间的交互作用显著,相比较而言,提取时间和液固比之间的交互作用较小。从图6可以看出,乙醇体积分数、液固比对苹果皮黄酮提取率的影响最大,随着乙醇体积分数和液固比的增加,苹果皮黄酮提取率呈现先上升后下降的趋势,两个因素与黄酮得率之间的变化符合所建立的响应面模型方程。

2.3.4 最佳工艺参数的确定和验证 利用SAS9.0

表4 典型相关和特征值分析结果

Table 4 Canonical and eigenvalues analysis of test results

因子	编码值	实际值	预测值 y	特征向量			特征值
				x_1	x_2	x_3	
x_1	0.028402	50.284021		-0.209957	-0.015193	0.977593	-0.640347
x_2	-0.111838	28.881622	19.495686	0.035914	0.999085	0.023240	-2.938784
x_3	0.908932	49.089323		0.977051	-0.039988	0.209219	-4.030869

图6 $Y=f(X_1, X_2)$ 响应曲面图及其等高线Fig.6 Response curved surface figure and its equal-height line of $Y=f(X_1, X_2)$ 图7 $Y=f(X_1, X_3)$ 响应曲面图及其等高线Fig.7 Response curved surface figure and its equal-height line of $Y=f(X_1, X_3)$ 图8 $Y=f(X_2, X_3)$ 响应曲面图及其等高线Fig.8 Response curved surface figure and its equal-height line of $Y=f(X_2, X_3)$

RSREG Procedure分析数据软件得到表4。从特征值分析结果可以看出,其特征值均为负值,因此在曲面内有最大响应值(点),这种情况都可直接从曲面找出最优工艺参数,且无需用岭脊回归寻优分析,所得到的该稳定点即为理论上的最佳点^[14]。

进一步验证模型分析结果,在乙醇体积分数50.3%、液固比值28.9、时间49.1min条件下进行重复提取工艺实验验证,实验重复三次,得到苹果皮黄酮得率为 (19.32 ± 0.16) mg/g ($n=3$),与本研究中所建立的响应面模型分析结果中的预测值19.495686mg/g比较接近。按实际提取工艺情况,可将乙醇体积分数50.3%、液固比28.9:1、时间49.1min作为超声波辅助

法提取花牛苹果皮黄酮的最佳工艺参数。

3 结论

采用超声波辅助法提取苹果皮黄酮,首次筛选出花牛苹果皮中的黄酮含量最高。在单因素实验的基础上采用响应面法对提取过程中的各因素进行了优化,得出其最佳工艺条件为:乙醇体积分数50.3%、液固比28.9:1、时间49.1min,黄酮得率为19.32mg/g。

参考文献

- [1] 梁大伟,江银枝. 黄酮类化合物合成的研究进展[J]. 化学研究,2008,19(4):102-106.
- [2] 乌兰格日乐,白海泉,翁慧. 黄酮的抗氧化活性研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报:自然科学版,2008,23(3):278-280.
- [3] 梁丹,张保东. 黄酮类化合物提取和分离方法研究进展[J]. 周口师范学院学报,2007,24(5):87-89.
- [4] 裴凌鹏,惠伯棣,金宗濂,等. 黄酮类化合物的生理活性及其制备技术研究进展[J]. 食品科学,2004,25(2):203-207.
- [5] 陈国友,齐鹤,徐东花. 黄酮类化合物生物活性的研究进展[J]. 黑龙江医药,2008,21(3):81-83.
- [6] 聂继云,吕德国,李静,等. 苹果果实中类黄酮化合物的研究进展[J]. 园艺学报,2009,36(9):1390-1397.
- [7] 李红,张元湖. 苹果果实中总黄酮的提取方法优化研究[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2003,34(4):471-474.
- [8] 陈莉,屠康,王海,等. 采用响应曲面法对采后红富士苹果热处理条件的优化[J]. 农业工程学报,2006,22(2):159-163.
- [9] 李锦运,郭玉蓉. 超声辅助提取冷破碎苹果皮渣中多糖的工艺优化[J]. 农产品加工·学刊,2010,10(2):30-32.
- [10] 董彩文,梁少华,汤风雨,等. 苹果渣中总黄酮的提取及其抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(27):11631-11662.
- [11] He X-J, Liu R-H. Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity[J]. J Agric Food Chem,2007,55(11):4366-4370.
- [12] 高云涛,付艳丽,王辰,等. 响应面优化超声提取苦荞麦苗黄酮的研究[J]. 食品科学,2010,31(24):28-31.
- [13] 王玫,张泰铭,熊运海. 超声波法提取紫甘薯叶总黄酮的工艺研究[J]. 广州化学,2010,35(2):13-18.
- [14] 王振宇,周芳,赵鑫. 响应面分析法优化超声提取大果沙棘总黄酮工艺[J]. 中国食品学报,2007,6(7):44-51.
- [15] 孙金旭,朱会霞,肖东光. 超声波提取覆盆子干果黄酮工艺研究[J]. 中国酿造,2010(4):147-150.
- [16] Dong C-H, Xie X-Q, Wang X-L, et al. Application of Box-Behnken design in optimization for polysaccharides extraction from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis* [J]. Food and Bioproducts Processing,2008,53:1-6.