

利用回归正交旋转实验优化提取枣中总黄酮的提取工艺

翟龙飞, 李田叶, 李雪丹, 王向红*

(河北农业大学食品科技学院河北省农产品加工工程技术研究中心, 河北保定 071001)

摘要:本文以红枣为原料,以总黄酮的提取率和 DPPH·清除率为考察指标,研究提取温度、提取剂浓度、料液比、提取时间、加酶量、pH、超声功率对提取率及抗氧化能力的影响;并通过三元二次回归正交旋转设计对提取条件进行优化,建立了单因素与提取率和 DPPH·清除率的回归方程,确定超声波酶辅助法的最佳提取条件为:温度 45℃,提取剂浓度 60%,料液比 1:25,提取时间 50min,加酶量 0.6%, pH4,超声功率 180W。最佳提取条件下总黄酮的提取率为 0.537%,此时 DPPH·清除率为 40.2%。

关键词:红枣,纤维素酶,黄酮,DPPH·清除率

Optimization of extraction conditions of total flavonoids from *Zizyphus jujube* by quadratic regression orthogonal rotating combination

ZHAI Long-fei, LI Tian-ye, LI Xue-dan, WANG Xiang-hong*

(College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei; Agricultural-Food Processing and Engineering Technology Research Center of Hebei Province, Baoding 071001, China)

Abstract: In this study, zizyphus jujube was used as the raw material to investigate the clearance rate of DPPH· and the extraction rate of flavonoids by ultrasonic treatment. Effects of extraction temperature, extractant concentration, solid-liquid ratio, extraction time, enzyme dose, pH value, ultrasonic power on preparation of flavonoids with cellulase were studied by single factor analysis. The regression models were established with factors and the indexes, including extraction efficiency and DPPH· clearance rate. The results showed that the optimum values of temperature, extractant concentration, solid-liquid ratio, extraction time, enzyme dosage, pH and ultrasonic power were 45℃, 60%, 1:25, 50min, 0.6%, 4 and 180W. Under this condition, the extraction efficiency was 0.537%, the DPPH· clearance rate was 40.2%.

Key words: zizyphus jujube; cellulase; flavonoids; DPPH· clearance rate

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)05-0201-05

大枣,鼠李科(*Rhamnaceae*)枣属(*Zizyphus Mill.*)植物的果实^[1],据文献报道,大枣中富含黄酮、环核苷酸、多糖、微量元素等功效成分,具有补脾健胃,益气生津等功能,是一种药食同源的功能性食品^[2-6]。在我国有非常广泛的种植,是我国特有的植物资源^[7-8],但是枣中有效成分的利用率较低,因此,对红枣进行高值化、资源化、生态化利用,是当前食品新技术急需研究的内容。

收稿日期:2013-07-15 *通讯联系人

作者简介:翟龙飞(1988-),男,硕士研究生,研究方向:农产品加工与贮藏工程。

基金项目:国家林业局公益性行业科研专项(201304708)。

黄酮是自然界普遍存在的一类天然产物,具有清除自由基、抗炎、抗菌、抗病毒等生物活性,对人体健康有重要作用^[9-10]。红枣中含有多种黄酮类物质,对其进行提取研究具有很好的应用价值^[11-13]。研究者多采用水浴浸提、超声提取等方法提取黄酮类物质,本研究采用酶辅助超声法提取黄酮类物质^[14-17]。以总黄酮的提取率和提取液的抗氧化能力为指标,确定枣中总黄酮提取的最佳工艺条件,并对不同提取总黄酮的方法进行了比较,从而为枣黄酮资源的开发利用及进一步的化学成分研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

的提取工艺[J].华南理工大学学报(自然科学版),2004,32(11):28-32.

[18]王慧娜,赵桦.响应面法优化开口箭多糖超声提取工艺研究[J].食品工业科技,2012,33(13):187-193.

[19] Olafsdottir ES, Omarsdottir S, Smestad Paulsen B, et al. Rhamnopyranosylgalactofuranan, a new immunologically active polysaccharide from *Thamnomolia subuliformis* [J]. Phytomedicine, 1999,6(4):273-279.

表1 四种方法的提取条件

Table 1 The extraction conditions of four methods

提取方法	温度(°C)	时间(min)	提取液浓度(%)	功率(W)	料液比	pH	加酶量(%)
超声提取	50	30	60	150	1:25	5.5	-
水浴提取	50	30	60	-	1:25	5.5	-
超声酶辅助提取	50	30	60	150	1:25	5.5	0.55
水浴酶辅助提取	50	30	60	-	1:25	5.5	0.55

红枣 保定市南郊果蔬批发市场提供;纤维素酶(酶活性 $\geq 30000\text{u/g}$) Solarbio 公司;芦丁 上海源叶生物科技有限公司;DPPH Solarbio 公司;其它试剂 均为分析纯。

UV-2008H 型紫外可见分光光度计 上海 UNIC 公司;TGL-16G 离心机 上海安亭科学仪器厂;STARTER 3C pH 计 奥豪斯仪器有限公司;DZWK-C 电子恒温水浴锅 北京市光明医疗仪器厂;HT-300BQ 型数控超声提取器 济宁恒通超声电子设备有限公司;BS 214D 型电子分析天平 Sartorius 公司。

1.2 工艺流程

纤维素酶
↓
红枣→前处理→超声→灭酶→离心过滤→总黄酮提取液

1.3 实验方法

1.3.1 红枣前处理方法 红枣洗净、去核、烘干(60°C)至恒重,粉碎,过 30 目筛,用石油醚(30~60°C)水浴回流脱脂 6h,挥干溶剂,将处理好的样品放入干燥器中保存。

1.3.2 总黄酮含量的测定 标准曲线的绘制:分别吸取芦丁对照品溶液 0、0.5、1、1.5、2、2.5mL 置于 10mL 具塞试管中,加 5% 亚硝酸钠溶液和 10% 硝酸铝溶液各 0.3mL,摇匀,放置 6min,加 4% 氢氧化钠溶液 4mL,用 60% 乙醇溶液稀释至刻度,摇匀,放置 15min,于 510nm 处测定吸光度值,以浓度 C 和吸光度值 A 进行线性回归,做芦丁溶液浓度与吸光度的标准曲线。

将样品液 1mL 置于 10mL 具塞试管中,加 5% 亚硝酸钠溶液和 10% 硝酸铝溶液各 0.3mL,摇匀,放置 6min,加 4% 氢氧化钠溶液 4mL,用 60% 乙醇溶液稀释至刻度,摇匀,放置 15min,于 510nm 处测定吸光度值,根据标准曲线方程计算样品液中总黄酮的质量,按下式得出总黄酮含量。

$$\text{总黄酮含量}(\%) = \frac{\text{黄酮类化合物质量}}{\text{干物料质量}} \times 100$$

1.3.3 DPPH·清除能力的测定 将样品溶液 0.1mL 加 1.9mL 60% 乙醇溶液与 2mL DPPH·溶液(2×10^{-4} mol/L 无水乙醇溶液)混合,振荡,25°C 放置 30min,在 517nm 处检测。以蒸馏水做空白对照,以样品溶液 0.1mL 加 1.9mL 60% 乙醇溶液与 2mL 无水乙醇混合作为参比,以消除样品液中物质对吸收值的干扰。按下式计算抗氧化剂清除率:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = \frac{A_c - (A_i - A_j)}{A_c} \times 100$$

式中, A_i :加样后的测定值, A_j :只加试样的测定值, A_c :只加 DPPH·的测定值。

1.3.4 不同提取工艺的比较 选择超声提取、水浴提取、超声酶辅助提取、水浴酶辅助提取 4 种方法分别在一定条件下对红枣进行黄酮提取,将料液比 1:25 的红枣乙醇水溶液调整到相同的温度和 pH(见表 1),提取 30min 后 100°C 灭酶 10min,在 4°C 下 8000r/min 离心 30min,将上清液定容至 100mL 容量瓶中,取样品液测定总黄酮提取率和 DPPH·清除率。

1.3.5 超声波酶辅助单因素提取实验 超声波酶辅助单因素实验基础条件:精密称取处理后的枣样品 3g,提取剂浓度 60%、温度 50°C、pH 5.5,料液比 1:25,加酶量 0.55%,提取时间 30min,功率 150W,提取结束后 100°C 水浴灭酶,3500r/min 离心 15min,将上清液转移至 100mL 容量瓶中,用相应浓度的乙醇定容,摇匀后取 1mL 样品液测定总黄酮提取率。各因素梯度:提取剂浓度:30%、40%、50%、60%、70%、80%;温度:30、40、50、60、70、80°C;pH:2、3、4、5、6、7;加酶量:0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%;提取时间:10、20、30、40、50、60min;料液比:1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35;功率:120、150、180、210、240、270W。

1.3.6 三元二次旋转回归设计优化超声波酶辅助提取条件 采用 SAS 8.1 进行实验设计,并对实验数据进行多项式回归分析,建立二次回归模型,拟合得到二次回归方程。实验因素水平编码表见表 2。

表2 二次回归正交旋转组合实验设计因素水平编码

Table 2 Factors and levels in quadratic orthogonal rotation combination design

水平编码	因素		
	X_1 提取温度(°C)	X_2 加酶量(%)	X_3 料液比
1.68179	60	0.9	1:35
1	54	0.78	1:31
0	45	0.6	1:25
-1	36	0.42	1:19
-1.68179	30	0.3	1:15

1.3.7 统计分析 采用 SAS 8.1 软件进行一般线性方差分析,邓肯多重检验确定数据间差异,显著水平为 $p < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 芦丁吸光度标准曲线

按照芦丁标准曲线的绘制方法得到芦丁吸光度的标准曲线,结果如图 1 所示。

由图可得回归方程为: $A = 8.4514C - 0.001$,其线性相关系数为 $R^2 = 0.999$ 。

2.2 不同方法对总黄酮的提取

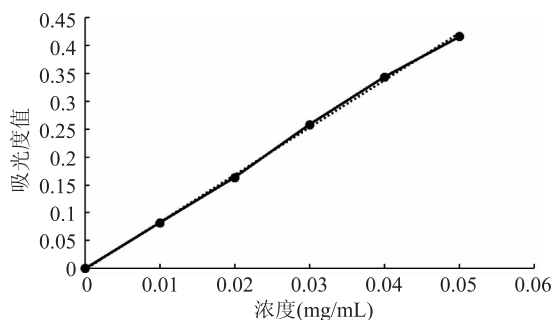


图1 芦丁吸光度标准曲线图

Fig.1 Standard curve of absorption capacity of standard sample

选择超声提取、水浴提取、超声酶辅助法提取、水浴酶辅助法提取四种方法分别在一定条件下对总黄酮进行提取,结果如图2所示。

表3 不同提取方法对总黄酮提取率和 DPPH·清除率的影响

Table 3 Effect of extraction rate and clearance rate for total flavones with different extraction conditions

提取方法	总黄酮提取率 (%)	DPPH·清除率 (%)
超声浸提	0.244 ± 0.011	28.77 ± 0.381
水浴浸提	0.197 ± 0.017	23.39 ± 0.507
超声酶辅助浸提	0.546 ± 0.008	37.62 ± 0.318
水浴酶辅助浸提	0.343 ± 0.005	32.45 ± 0.433

如表3可得,不同的提取方法得到总黄酮的提取率和 DPPH·清除率不同,在相同的条件下超声酶辅助方法优于其他的提取方法。

2.3 超声酶辅助法单因素水解实验结果分析

2.3.1 提取液浓度对提取效果的影响 结果如图2所示。

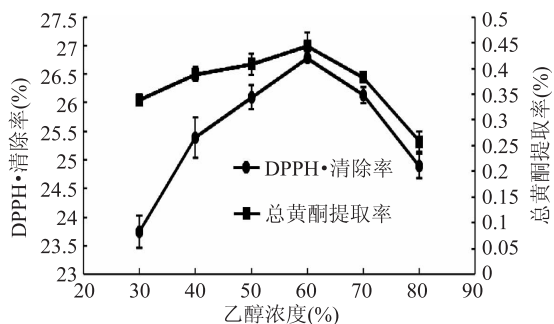


图2 乙醇浓度对总黄酮提取率和清除率的影响

Fig.2 Effect of extraction rate and clearance rate for total flavones with different ethanol concentration

如图2可得,总黄酮提取率和 DPPH·清除率随乙醇浓度的变化趋势都是先增大后减小。在 50% ~ 70% 浓度范围内,总黄酮提取率和 DPPH·清除率均很高,以 60% 浓度提取效果最佳。

2.3.2 料液比对提取效果的影响 结果如图3所示。

由图3所示,料液比在 1:10~1:35 范围内总黄酮提取率和清除率的变化趋势都是先增大后减小,当料液比达到 1:25 时,总黄酮的提取率及 DPPH·清除

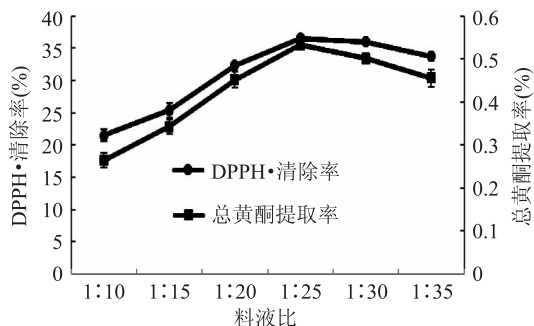


图3 料液比对总黄酮提取率和清除率的影响

Fig.3 Effect of extraction rate and clearance rate for total flavones with different solid-liquid ratio

率增加至最大,之后开始下降,因为随着料液比的增加,酶的浓度随之降低,酶促反应速度也降低,因此适宜的料液比为 1:25。

2.3.3 加酶量对提取效果的影响 结果如图4所示。

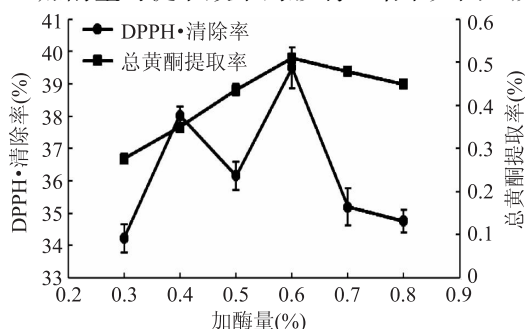


图4 加酶量对总黄酮提取率和 DPPH·清除率的影响

Fig.4 Effect of extraction rate and clearance rate for total flavones with different enzyme amount

如图4可得,加酶量在 0.3% 到 0.6% 范围内,随着加酶量的增加,DPPH·清除率呈现先增加后降低然后又增加后降低的趋势;在 0.6% 到 0.8% 范围内,随着加酶量的增加,总黄酮提取率和 DPPH·清除率下降。这是因为在低的酶浓度下,酶与底物可充分结合,当酶浓度过高时,造成酶的作用受到抑制。综合考虑两个指标,选定 0.6% 为最佳加酶量。

2.3.4 pH 对提取效果的影响 结果如图5所示。

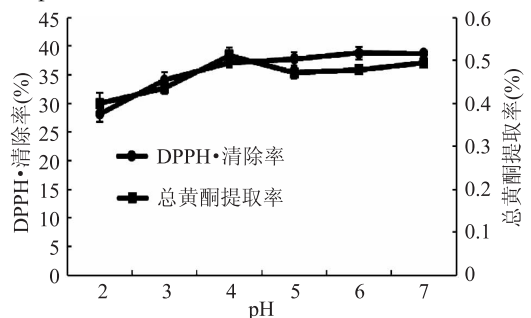


图5 pH 对总黄酮提取率和清除率的影响

Fig.5 Effect of extraction rate and clearance rate for total flavones with different pH

如图5可知,总黄酮的提取率和清除率均随 pH 的增大呈现先增加后下降的趋势,因为 pH 对吸光度值和清除率的影响,主要是对纤维素酶活性的影响,纤维素酶在酸性范围内活性最高。所以 pH = 4 时提

取效果好,吸光度值和清除率均较高。

2.3.5 提取温度对提取效果的影响 结果如图6所示。

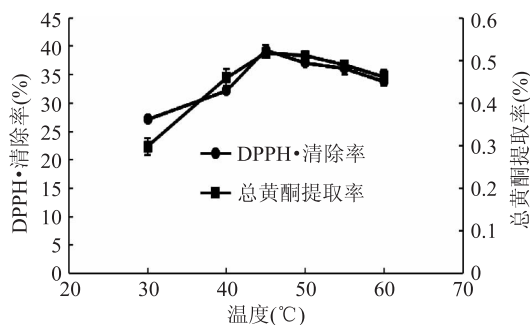


图6 温度对总黄酮提取率和清除率的影响

Fig.6 Effect of extraction rate and clearance rate for total flavones with different temperature

如图6可得,随着提取温度的提高,总黄酮的提取率和 DPPH·清除率逐渐增高,当提取温度超过45℃时,总黄酮的提取率开始降低。在该反应体系中,温度对酶促反应有影响,在没有达到酶的最适温度前,升高温度可增加酶促反应所需的能量,使酶解破壁作用加强;但温度继续升高会导致维系着整个酶三维结构的多重的非共价键相互作用破裂,使生物酶变性,酶促反应就会被抑制。综合两个指标,选择45℃为最适提取温度。

2.3.6 超声功率对提取效果的影响 结果如图7所示。

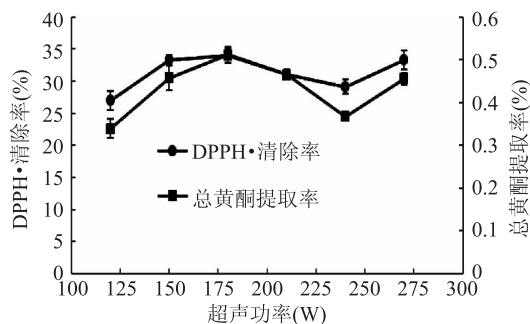


图7 功率对总黄酮提取率和清除率的影响

Fig.7 Effect of extraction rate and clearance rate for total flavones with different ultrasonic power

如图7可得,随着超声功率的提高,总黄酮的提取率和 DPPH·清除率逐渐增高,当超声功率超过180W时,总黄酮的提取率开始降低。综合两个指标,选择180W为最适提取功率。

2.3.7 提取时间对提取效果的影响 结果如图8所示。

如图8可得,随着酶解时间的延长,总黄酮的提取率和 DPPH·清除率逐渐增高,当酶解时间超过50min时,总黄酮的提取率开始降低,这说明在50min时,提取效果已基本达到最佳。综合两个指标,选择50min为最适提取时间。

2.4 回归正交旋转实验设计优化提取条件

根据单因素实验确定了提取温度、加酶量、料液比是主要影响因素,因此固定提取剂浓度60%、时间50min、超声功率180W、pH4,等。通过单因素实验确定三因素的取值范围,以吸光度值和 DPPH·清除率

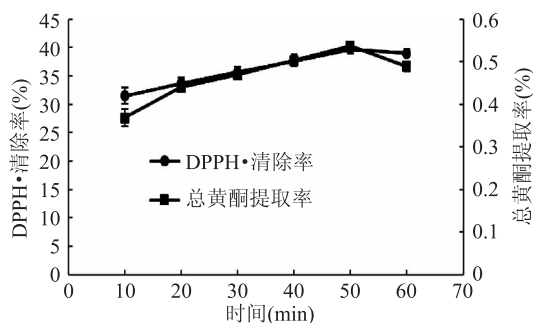


图8 时间对总黄酮提取率和清除率的影响

Fig.8 Effect of extraction rate and clearance rate for total flavones with different extraction time

为指标,选用三元二次回归正交旋转组合,确定最佳提取条件。

表4 二次回归正交旋转组合设计实验结果

Table 4 Experimental results of quadratic regression orthogonal rotation combination design

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁ 总黄酮提取率 (%)	Y ₂ DPPH·清除率 (%)
1	-1	-1	-1	0.32	28.59
2	-1	-1	1	0.35	30.08
3	-1	1	-1	0.25	23.88
4	-1	1	1	0.27	25.12
5	1	-1	-1	0.26	23.49
6	1	-1	1	0.28	24.74
7	1	1	-1	0.21	20.64
8	1	1	1	0.24	22.26
9	-1.68179	0	0	0.29	25.54
10	1.68179	0	0	0.29	25.98
11	0	-1.68179	0	0.32	27.22
12	0	1.68179	0	0.33	27.84
13	0	0	-1.68179	0.20	20.15
14	0	0	1.68179	0.29	25.23
15	0	0	0	0.55	42.48
16	0	0	0	0.55	41.60
17	0	0	0	0.54	41.10
18	0	0	0	0.54	42.17
19	0	0	0	0.55	41.48
20	0	0	0	0.54	41.73
21	0	0	0	0.54	42.23
22	0	0	0	0.55	41.48
23	0	0	0	0.55	42.48

2.4.1 各因素对总黄酮提取率的影响 对总黄酮提取率的实验数据进行多项式回归分析,建立回归模型得到二次回归方程:

$$Y_1 = 0.545225 - 0.013929X_1 - 0.016488X_2 + 0.016688X_3 - 0.088668X_1^2 - 0.078592X_2^2 - 0.106169X_3^2$$

表5的方差分析表明,二次回归方程的回归是显著的,回归方程的相关系数 $R^2 = 98.34\%$,说明回归模型拟合较好,该数学模型拟合了实验数据。由回归模型得到总黄酮提取率最高的组合为:温度为

45℃、加酶量为0.6%、料液比1:25,此时总黄酮提取率为0.546%。

2.4.2 各因素对DPPH·清除活性的影响 对清除率的实验数据进行回归分析,建立回归模型得到二次回归方程:

$$Y_2 = 41.84799 - 1.15649X_1 - 1.022286X_2 + 1.034671X_3 - 5.583162X_1^2 - 4.958432X_2^2 - 6.668221X_3^2$$

表5 总黄酮提取率的方差分析表

Table 5 Significant analysis of the regression orthogonal rotation test

变异来源	DF	SS	MS	F	Pr > F
X ₁	1	0.00265	0.00265	5.012251	0.043293
X ₂	1	0.003713	0.003713	7.023536	0.020004
X ₃	1	0.003803	0.003803	7.19474	0.018818
X ₁ ²	1	0.124922	0.124922	236.31	0.0001
X ₁ X ₂	1	0.000612	0.000612	1.158643	0.301318
X ₁ X ₃	1	5E-7	5E-7	0.000946	0.975933
X ₂ ²	1	0.098143	0.098143	185.6528	0.0001
X ₂ X ₃	1	5E-7	5E-7	0.000946	0.975933
X ₃ ²	1	0.179102	0.179102	338.8	0.0001
Model	9	0.407588	0.045288	85.66885	0.0001
Error	13	0.006872	0.000529		
Total	22	0.414461			

表6 方差分析表明,回归方程的回归是显著的,相关系数R² = 97.88%,回归模型拟合较好。且由回归模型得到清除率最高的组合为:温度为45℃、加酶量0.6%、料液比1:25,此时的DPPH·清除率达到41.8%。

表6 DPPH·清除率的方差分析表

Table 6 Significant analysis of the clearance rate of DPPH·

变异来源	DF	SS	MS	F	Pr > F
X ₁	1	18.26562	18.26562	6.767587	0.021945
X ₂	1	14.27235	14.27235	5.288043	0.038689
X ₃	1	14.62025	14.62025	5.416944	0.036738
X ₁ ²	1	495.2975	495.2975	183.5125	0.0001
X ₁ X ₂	1	2.35445	2.35445	0.872346	0.367331
X ₁ X ₃	1	0.001922	0.001922	0.000712	0.979116
X ₂ ²	1	390.656	390.656	144.7418	0.0001
X ₂ X ₃	1	0.001922	0.001922	0.000712	0.979116
X ₃ ²	1	706.522	706.522	261.7732	0.0001
Model	9	1620.764	180.0848	66.72317	0.0001
Error	13	35.08681	2.698985		
Total	22	1655.85			

2.4.3 实验结果验证 为检测三元二次回归正交旋转实验所得结果的可靠性,采用已得的优化条件进行3次平行实验。实际测定的总黄酮提取率为0.537%,实验值与理论值相对误差为1.6%;实际测得的DPPH·清除率40.2%,实验值与理论值相对误差为3.8%,证明应用三元二次回归正交优化提取总黄酮是可行的。

3 结论

3.1 通过对四种提取方法的总黄酮提取率和DPPH·

清除率的评价,得出超声酶辅助法是提取枣中总黄酮的最佳方法。

3.2 通过单因素实验和二次回归正交旋转组合实验设计,用SAS8.1软件进行回归分析,建立了提取率和DPPH清除率的回归模型,可以对枣中总黄酮的提取率及清除率进行较好的预测,有一定的指导意义。

3.3 通过回归实验设计得到提取率和DPPH·清除率的最优组合基本一致,可能是由于总黄酮提取率的不同对提取液的抗氧化性影响较大。本实验得到总黄酮提取液,选用提取条件:提取剂浓度60%、温度45℃、加酶量0.6%、料液比1:25、pH4、超声功率180W、提取时间50min。在此条件下提取总黄酮的提取率为0.537%,DPPH·的清除率为40.2%。

参考文献

[1]程功,白焱晶,赵玉英.枣属植物化学成分及药理活性研究概况[J].国外医药·植物药分册,1999,14(4):151-157.

[2]Li Jinwei, Fan Liuping, Ding Shaodong, et al.Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube [J].Food Chemistry,2007,103(2):454-460.

[3]Sana Bekir, Yildirim Adnan nurhan.Phenolic, alphanatocopherol, beta-carotene and fatty acid composition of four promising jujube (Ziziphus jujube Miller) selections [J].Journal of Food Composition and Analysis,2010,23(7):706-710.

[4]张文杰,陈锦屏,马娟峰,等.红枣主要活性成分及其药理作用的研究进展[J].农产品加工,2008,10:48-50.

[5]王爱蓉.红枣的营养与药用价值[J].科技情报开发与经济,2005,15(23):143-144.

[6]王向红,崔同,刘孟军,等.不同品种枣的营养成分分析[J].营养学报,2002,24(2):206-208.

[7]郭满玲.我国鲜食枣品种资源及分布研究[D].杨凌:北农林科技大学,2004:12-27.

[8]梁鸿.中国红枣及红枣产业的发展现状、存在问题和对策的研究[D].西安:陕西师范大学,2006:3-23.

[9]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.

[10]彭芳.黄酮类化合物的生物学作用[J].大理医学院学报,1998,7(4):52-54.

[11]韩志萍.陕北红枣中总黄酮的提取及含量比较[J].食品科学,2006,27(12):560-562.

[12]许海燕,杨洁,申彤,等.红枣总黄酮提取工艺[J].生物技术,2008,18(5):64-66.

[13]李红,邴洁,马彦梅,等.沙枣黄酮的提取及其抗氧化作用的研究[J].时珍国医国药,2010,21(1):35-36.

[14]张春兰,张锐利,熊素英,等.超声波辅助提取红枣核中总黄酮的研究[J].安徽农业科学,2010,38(12):6503-6505.

[15]张华,陈新梅.纤维素酶提取黄芪有效成分工艺研究[J].中华中医药学刊,2011,29(8):1832-1833.

[16]姚晓琳,朱新荣,段春红,等.酶解法提取甜橙皮黄酮研究[J].粮食与油脂,2009,2:43-46.

[17]张圣燕,张成.纤维素酶提取冬枣叶中总黄酮工艺的研究[J].食品工业科技,2013(1):188-190.