

莲房原花青素的超声波辅助提取及其稳定性研究

黄爱妮, 余萃, 赵昕, 李丽, 杜枫, 郑樊
(武昌工学院 城市建设学院, 湖北 武汉 430065)

摘要: 莲房中含有丰富的原花青素, 该文以莲房为原料, 采用超声波辅助法提取莲房中的原花青素, 在单因素试验结果的基础上, 设计正交试验对提取工艺参数进行优化, 以确定超声波辅助提取莲房原花青素的最佳工艺条件。结果表明, 超声波辅助法提取莲房原花青素的最佳工艺参数为乙醇体积分数 50%、料液比 1:25(g/mL)、超声功率 250 W、超声时间 30 min, 在此条件下, 莲房原花青素的提取率为 6.45%。对莲房原花青素的稳定性进行分析, 结果表明高温及太阳光线对莲房原花青素的稳定性影响较大。

关键词: 莲房; 原花青素; 超声波辅助; 提取; 稳定性

Study on Ultrasonic Assisted Extraction and Stability of Procyanidins from Lotus Seed Pot

HUANG Ai-ni, YU Cui, ZHAO Xin, LI Li, DU Feng, ZHENG Fan

(Institute of Urban Construction, Wuchang Institute of Technology, Wuhan 430065, Hubei, China)

Abstract: Lotus seed pots are rich in procyanidins. In this study, a lotus seed pot was used as raw material to extract procyanidins by an ultrasonic assisted method. Based on the results of a single factor experiment, an orthogonal experiment was designed to optimize the extraction process parameters, thus enabling us to determine the optimal process conditions for ultrasonic assisted extraction of procyanidins. Results showed that the optimal extraction parameters were 50% ethanol volume fraction, 1:25 (g/mL) solid-liquid ratio, 250 W ultrasonic power, and 30 min ultrasonic time, and the extraction rate was 6.45%. The stability of rosette procyanidins was analyzed, with results showing that high temperatures and sun rays had considerable effects on the stability of rosette procyanidins.

Key words: lotus seed pot; procyanidins; ultrasonic assisted; extraction; stability

引文格式:

黄爱妮, 余萃, 赵昕, 等. 莲房原花青素的超声波辅助提取及其稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(7): 114-119.

HUANG Aini, YU Cui, ZHAO Xin, et al. Study on Ultrasonic Assisted Extraction and Stability of Procyanidins from Lotus Seed Pot[J]. Food Research and Development, 2021, 42(7): 114-119.

莲房是莲的干燥花托, 莲是湖北省传统的水生经济作物, 莲子的鲜销和加工对地方经济增长和农户增收有重要贡献。近年来, 莲子产业规模不断壮大, 而莲房作为主要的副产物并未得到有效的开发利用, 反而因随意丢弃和焚烧造成资源浪费和环境污染^[1-3]。

莲房具有较强的抗氧化作用, 可有效地抑制黑色素

瘤细胞 B16 的增殖, 莲房原花青素和银杏内酯联用能够改善东莨菪碱所致的小鼠学习记忆障碍, 与半胱氨酸联用可有效地抑制氧化应激损伤, 改善记忆障碍^[4-9]。莲房中含有的原花青素是一种氧自由基清除剂和脂质过氧化抑制剂, 是迄今为止发现的最好的天然抗氧化剂之一, 具有广泛的生物活性和药理作用^[10-14]。

通过查询相关资料发现, 目前提取原花青素的方法主要有乙醇浸提法、酶提取法等, 超声波辅助法在莲房原花青素提取中的应用比较少, 相比较前面几种

基金项目: 湖北省科技厅自然科学基金项目(2018CFC845)

作者简介: 黄爱妮(1985—), 女(汉), 副教授, 硕士, 研究方向: 食品新资源开发与利用。

方法,超声波辅助提取法具有提取效率高、提取时间短、提取温度低、保护有效成分等优点^[15-20]。为了提高莲房的生物利用度,以莲房为原料,采用超声波辅助法提取莲房中的原花青素,通过单因素和正交试验优化提取工艺参数,以确定超声波辅助提取莲房原花青素的最佳工艺条件,并对提取的莲房原花青素的稳定性进行分析,为莲房原花青素的开发利用提供一定的数据基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

莲房:市售;儿茶素标准品(纯度>98%):合肥博美生物科技有限责任公司。

1.2 仪器与设备

高速多功能粉碎机(JY-1000A):浙江省永康市象珠松青五金厂;电子分析天平(AR2140):奥豪斯仪器有限公司;可见分光光度计(V-1100):上海美普达仪器有限公司;数显恒温水浴锅(HH-2):国华电器有限公司;离心机(THZ-82B):金坛市医疗仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 莲房原花青素的提取方法

将莲房去籽,用蒸馏水冲洗干净,撕成茎部相连的条状,在60℃条件下烘至质量恒定,高速粉碎后过40目筛,得到预处理后的莲房粉。取一定量的莲房粉,加入乙醇溶液,充分摇匀后进行超声波处理,超声波处理结束后,在4200 r/min状态下离心5 min,离心后取上清液,剩下的部分再加入10 mL蒸馏水,充分摇匀后,同样的条件下再离心一次。合并上清液,干燥至恒重,得到莲房原花青素产品。

1.3.2 莲房原花青素含量的测定方法

1.3.2.1 儿茶素标准曲线的绘制方法

用无水乙醇溶解并定容20 mg儿茶素标准品,得到1 mg/mL的儿茶素标准储备溶液。分别移取上述儿茶素标准储备液1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL于25 mL容量瓶中,加入无水乙醇定容,摇匀后,分别制得浓度为0.04、0.08、0.12、0.16、0.20 mg/mL的标准品溶液。取干净试剂瓶依次加入标准品溶液1 mL、3%香草醛-甲醇溶液5 mL、30%硫酸-甲醇溶液5 mL,混合后避光并在30℃水浴里反应15 min,在500 nm波长处测定吸光值,以儿茶素浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制儿茶素的标准曲线。

1.3.2.2 莲房原花青素提取率的计算

取一定量的莲房原花青素产品,用无水乙醇稀释至一定浓度作为待测液,取待测液1 mL,依次加入3%

的香草醛-甲醇溶液5 mL、30%硫酸-甲醇溶液5 mL,混合后避光并在30℃水浴里反应15 min,在500 nm波长处测定其吸光值。用无水乙醇作为待测液,在相同条件下,作一组空白对照试验。

利用儿茶素标准曲线的回归方程计算提取液中莲房原花青素的质量浓度,然后计算莲房原花青素的提取率。

$$\text{莲房原花青素提取率}/\% = \frac{ncV}{1000m} \times 100$$

式中: n 为提取液稀释倍数; c 为提取液中原花青素的质量浓度,mg/mL; V 为提取液体积,mL; m 为莲房粉质量,g。

1.3.3 莲房原花青素提取工艺的优化研究

选择乙醇溶液作为莲房原花青素的提取剂,采用超声波辅助进行提取,以莲房原花青素的提取率为考察指标,分别考察乙醇体积分数(40%、50%、60%、70%、80%)、料液比[1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 (g/mL)]、超声时间(10、15、20、25、30 min)、超声功率(100、150、200、250、300 W)、超声温度(20、30、40、50、60℃)等因素对莲房原花青素提取效果的影响,在单因素试验的基础上,选择乙醇体积分数、料液比、超声功率、超声时间4个因素进行正交试验,进一步优化提取工艺参数。

1.3.4 莲房原花青素稳定性的研究

莲房原花青素的稳定性一方面体现在它的含量变化,可以用保存率进行判断;另一方面体现在生物活性如抗氧化性。因此采用保存率和对DPPH自由基的清除率来判断原花青素的稳定性。将提取得到的莲房原花青素分别在不同温度、不同光照条件进行保存,计算原花青素的保存率和对DPPH自由基的清除率,考察外界环境对原花青素稳定性的影响。

1.3.4.1 莲房原花青素保存率的测定方法

按照样品与试剂比为1:5(mL/mL)的比例,在样品中加入对应的1:1(mL/mL)混合的1%浓度的香草醛和盐酸溶液避光反应20 min后取出静置于室温25℃,在500 nm波长处测定其吸光度,将吸光度以 y 带入儿茶素标准品回归方程中即可计算得出原花青素质量浓度 x 。原花青素保存率计算表达公式如下。

$$\mu/\% = x_1/x_0 \times 100$$

式中: μ 为莲房原花青素保存率,%; x_1 为处理后莲房原花青素质量浓度,mg/mL; x_0 为处理前莲房原花青素质量浓度,mg/mL。

1.3.4.2 莲房原花青素对DPPH自由基的清除率测定方法

将配制好的DPPH甲醇溶液与待测液按照39:1

(mL/mL)快速充分混匀后,在紫外分光光度计设置波长为 515 nm 下测定 30 min 时的试验组吸光值 A_1 ,对照试验用蒸馏水代替样品,测出对照组吸光值为 A_2 ,用无水乙醇作为空白组,测空白组吸光值为 A_0 。原花青素对 DPPH 自由基的清除率计算公式如下。

$$C/\%=[1-(A_1-A_2)\div A_0]\times 100$$

式中: C 为 DPPH 自由基清除率,%; A_1 为试验组吸光值; A_2 为对照组吸光值; A_0 为空白组吸光值。

2 结果与分析

2.1 儿茶素标准曲线

采用 1.3.2.1 的方法,绘制出儿茶素的标准曲线如图 1 所示。

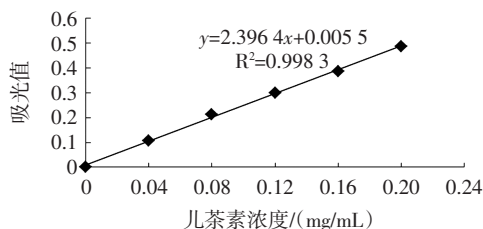


图1 儿茶素标准曲线

Fig.1 Standard curve of catechins

测定标准曲线为 $y=2.3964x+0.0055$, 式中: x 为儿茶素的质量浓度,mg/mL; y 为 500 nm 处吸光值。 $R^2=0.9983$ 。

2.2 莲房原花青素提取工艺优化的单因素试验结果

2.2.1 乙醇体积分数对莲房原花青素提取率的影响

取预处理后的莲房粉,加入一定量的乙醇溶液,采用超声波进行辅助提取,保持其它条件不变,分别改变乙醇体积分数为 40%、50%、60%、70%和 80%,计算莲房原花青素的提取率,试验结果见图 2。

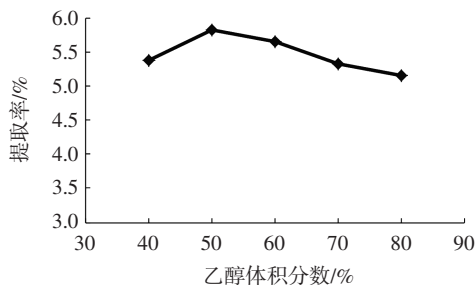


图2 乙醇体积分数对原花青素提取率的影响

Fig.2 Effect of ethanol volume fraction on extraction rate of procyanidins

从图 2 可以看出,当乙醇体积分数在 40%到 50%时,随着乙醇体积分数的增大,原花青素的提取率也随之增大;当乙醇体积分数在 50%到 80%时,随着乙醇体积分数的增大,原花青素提取率在逐渐减小。这

可能是由于原花青素易溶于水,但植物中的原花青素通常与蛋白质多糖等形成氢键,有机溶剂具有断裂氢键的作用,因此乙醇-水的复合溶剂体系有利于原花青素的提取。随着乙醇体积分数的增加,破坏氢键能力增大,然而水穿透植物细胞的能力减弱,因此乙醇体积分数增大会导致原花青素的提取率减小。由此可见,选择乙醇体积分数为 50%最为适宜。

2.2.2 料液比对莲房原花青素提取率的影响

取预处理后的莲房粉,加入一定量的乙醇溶液,采用超声波进行辅助提取,保持其它条件不变,分别改变料液比为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30(g/mL),计算莲房原花青素的提取率,试验结果见图 3。

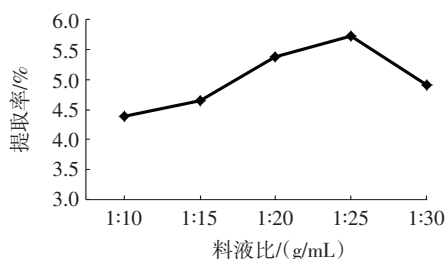


图3 料液比对原花青素提取率的影响

Fig.3 Effect of solid-liquid ratio on extraction rate of procyanidins

从图 3 可以看出,当料液比在 1:10 (g/mL)到 1:25 (g/mL)时,随着溶剂的增大,原花青素提取率也随之增大,可能是由于溶剂量的增加有利于增大原花青素与溶剂的接触面和溶液的传质推动力,从而提高了原花青素的提取率;而当料液比在 1:25 (g/mL)到 1:30 (g/mL)时,原花青素提取率开始下降,可能是因为随着溶剂量的增加超声波破碎细胞的阻力增加,使细胞破碎程度下降,从而降低了原花青素的提取率。由此可见,选择料液比为 1:25 (g/mL)最为适宜。

2.2.3 超声时间对莲房原花青素提取率的影响

取预处理后的莲房粉,加入一定量的乙醇溶液,采用超声波进行辅助提取,保持其它条件不变,分别改变超声时间为 10、15、20、25、30 min,计算莲房原花青素的提取率,试验结果见图 4。

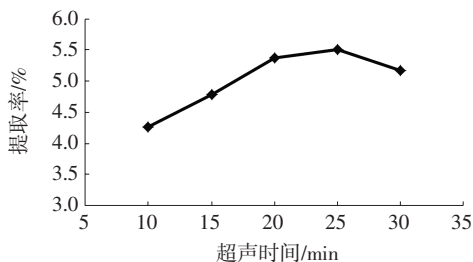


图4 超声时间对原花青素提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic time on extraction rate of procyanidins

从图4可以看出,当超声时间在10 min到25 min时,随着超声时间的增大,原花青素的提取率也不断增大。超声时间超过25 min后,原花青素提取率增长曲线趋于平缓,这可能是因为超声时间为25 min时莲房粉中原花青素已被基本提取,所以继续延长超声时间,对莲房中的原花青素的提取效果影响较小,因此,选择超声时间为25 min最为适宜。

2.2.4 超声功率对莲房原花青素提取率的影响

取预处理后的莲房粉,加入一定量的乙醇溶液,采用超声波进行辅助提取,保持其它条件不变,分别改变超声功率为100、150、200、250、300 W,计算莲房原花青素的提取率,试验结果见图5。

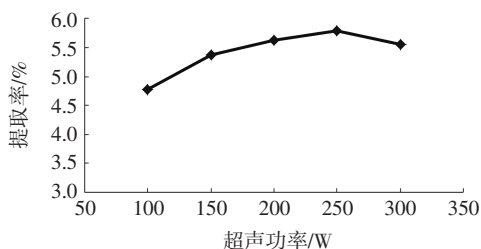


图5 超声功率对原花青素提取率的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic power on extraction rate of procyanidins

从图5可以看出,当超声功率在100 W到250 W时,随着超声功率的增大,原花青素提取率也随之不断增大;当超声功率在250 W到300 W时,随着超声功率的不断增大,原花青素提取率反而呈下降趋势。在超声功率为250 W时,提取率最大。因此,选择超声功率为250 W最为适宜。

2.2.5 超声温度对莲房原花青素提取率的影响

取预处理后的莲房粉,加入一定量的乙醇溶液,采用超声波进行辅助提取,保持其它条件不变,分别改变超声温度为20、30、40、50、60℃,计算莲房原花青素的提取率,试验结果见图6。

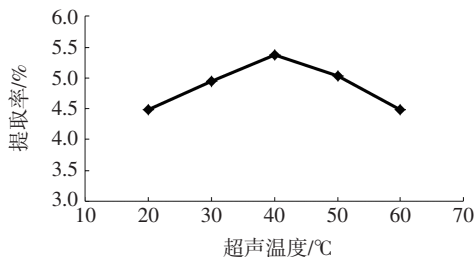


图6 超声温度对原花青素提取率的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic temperature on extraction rate of procyanidins

从图6可以看出,当超声温度在20℃到40℃时,随着超声温度的增加,原花青素提取率也随之不断增

加;在超声温度为40℃时,提取率最高。这可能是因为随着温度升高,增大了莲房表皮细胞组织的渗透性,使表皮组织更容易分解,从而促进原花青素的释放,使原花青素提取率增大,但过高的温度会导致原花青素分解,使原花青素提取率减小。由此可见,选择超声温度为40℃最为适宜。

2.3 莲房原花青素提取工艺优化的正交试验结果

在单因素试验的基础上,选择乙醇体积分数、料液比、超声功率、超声时间4个因素,以莲房原花青素的提取率作为考察指标,设计正交试验。因素水平表见表1,试验结果见表2。

表1 正交试验因素水平

Table 1 Orthogonal test factors and levels

水平	A 乙醇体积分数/%	B 料液比/(g/mL)	C 超声功率/W	D 超声时间/min
1	40	1:20	200	20
2	50	1:25	250	25
3	60	1:30	300	30

表2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results

水平	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	1	1	5.19
2	1	2	2	2	5.65
3	1	3	3	3	5.32
4	2	1	2	3	6.37
5	2	2	3	1	6.29
6	2	3	1	2	5.83
7	3	1	3	2	5.18
8	3	2	1	3	6.10
9	3	3	2	1	5.56
K ₁	16.16	16.74	17.12	17.04	
K ₂	18.49	18.04	17.58	16.66	
K ₃	16.84	16.71	16.79	17.79	
k ₁	5.39	5.58	5.71	5.68	
k ₂	6.16	6.01	5.86	5.55	
k ₃	5.61	5.57	5.60	5.93	
R(极差)	0.77	0.44	0.26	0.38	
因素主→次	A>B>D>C				
优方案	A ₂ B ₂ C ₂ D ₃				

由正交试验的结果分析可得到超声波辅助提取莲房原花青素的最佳工艺参数为:乙醇体积分数50%、料液比1:25(g/mL)、超声功率250 W、超声时间30 min。

为了验证正交试验得到的最佳工艺参数,在最佳工艺条件下进行验证试验,测定莲房原花青素平均提取率为6.45%,高于正交表中的最佳提取率,说明采用正交试验优化超声波辅助提取莲房原花青素的工艺

是可靠的。

2.4 莲房原花青素稳定性的分析结果

2.4.1 保存温度对莲房原花青素稳定性的影响结果与分析

保持其它条件不变,将莲房原花青素分别在10、30、50、70、90℃的温度下进行保存,考察温度对莲房原花青素稳定性的影响,计算不同温度保存后的莲房原花青素的保存率和对DPPH自由基的清除率,试验结果如图7所示。

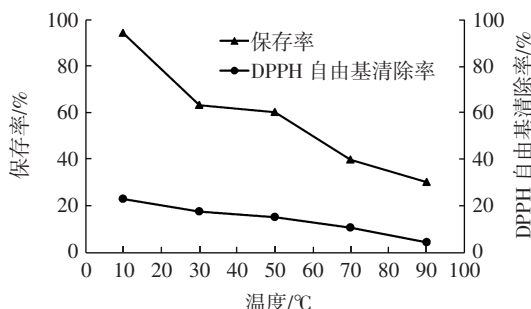


图7 保存温度对莲房原花青素保存率和DPPH自由基清除率的影响

Fig.7 Effect of storage temperature on the preservation rate and DPPH clearance rate of procyanidins

由图7可以看出,当保存温度越来越高时,莲房原花青素保存率和DPPH自由基清除率都呈现不同程度的明显下降趋势,其中突出表现在10℃到30℃的过程中原花青素保存率从94.1%下降到63.1%,下降程度较大;对DPPH自由基的清除率也有一定程度的降低。表明随着温度的上升,莲房原花青素降解程度会变大,稳定性下降。因此,莲房原花青素在运输、储存以及加工应用中应该尽量在较低的温度下进行。

2.4.2 光照对莲房原花青素稳定性的影响结果与分析

保持其它条件不变,将莲房原花青素分别进行避光处理、室内自然光处理和室外太阳光处理,考察光照对莲房原花青素稳定性的影响,计算5d中不同光照条件下的莲房原花青素保存率和DPPH自由基清除率,试验结果如图8和图9所示。

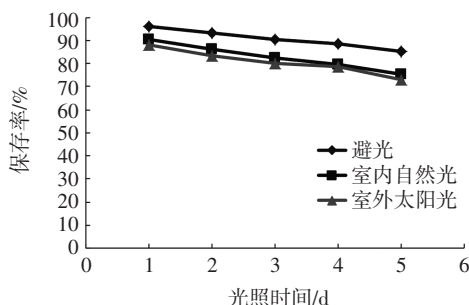


图8 光照对莲房原花青素保存率的影响

Fig.8 Effect of light on the preservation rate of procyanidins in lotus

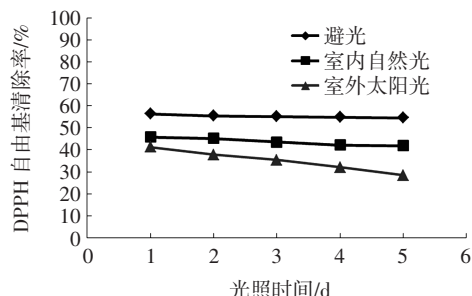


图9 光照对莲房原花青素DPPH自由基清除率的影响

Fig.9 Effect of light on DPPH radical scavenging rate of procyanidins in lotus

由图8可以看出进行光照处理后,随着保存时间越来越长,莲房原花青素保存率都呈现缓慢下降的趋势。在避光处理的情况下,保存率下降的幅度最小,仅从96.1%降到85.1%,其次是室内自然光,下降幅度最大的是室外太阳光,从88.2%降到了73.2%,因此避光保存可以减少莲房原花青素质量浓度的改变,即可以减少其降解程度,使其稳定性更好。

由图9可以看出,随着光照时间的增长,避光处理的莲房原花青素DPPH自由基清除率变化波动很小,只从56.3%降到54.5%,室内自然光次之,室外太阳光对DPPH自由基清除率影响相对较大,从41.2%下降到了28.4%。因此,由上述分析可以得出,光照对莲房原花青素保存率的影响偏大,对DPPH自由基清除率的影响总体较小,避光处理更适合莲房原花青素的保存。

3 结论

将莲房进行预处理后,以乙醇为提取剂进行超声波辅助提取,采用儿茶素作为标准品进行对照计算莲房原花青素的提取率,通过单因素试验和正交试验对提取工艺进行了优化。试验结果表明,莲房原花青素的最佳提取工艺参数为:乙醇体积分数50%、料液比1:25(g/mL)、超声功率250W、超声时间30min,在此条件下,莲房原花青素提取率为6.45%。对提取的莲房原花青素的稳定性进行了分析,结果表明,随着温度的上升,莲房原花青素的稳定性会降低;室外太阳光对莲房原花青素的稳定性影响较大。因此,莲房原花青素在运输、储存以及加工应用中应该尽量在较低的温度和避光的条件下进行。

参考文献:

- [1] 陈梦雨,黄小丹,王钊,等.植物原花青素的研究进展及其应用现状[J].中国食物与营养,2018,24(3):54-58.
- [2] 迪拉热木·热黑木,赵文杰,敬思群.响应面法优化超声波辅助提取新疆昆仑雪菊原花青素工艺[J].食品工业,2014,35(3):86-90.

- [3] 董兴叶,徐振秋,邓辰辰,等.挤压超声联用提取葡萄籽原花青素工艺优化[J].食品研究与开发,2016,37(16):87-91.
- [4] 冯彬彬.莲房原花青素提纯分离工艺条件及优化研究[D].郑州:郑州大学,2014:12-16.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2015 年版[M].北京:中国医药科技出版社,2015:401-1247.
- [6] 罗根连,黄晓辉,陈宁静,等.超声波法提取葡萄籽中原花青素的工艺研究[J].广东化工,2015,42(8):72-74.
- [7] 李佳桥,余修亮,曾林晖,等.响应面试验优化超声波辅助提取莲房原花青素工艺[J].食品科学,2016,37(12):40-45.
- [8] 刘细祥,张婷婷,兰翠玲,等.超声波提取香蕉皮中单宁工艺研究[J].食品工业,2014,35(2):22-25.
- [9] 李云雁,胡传荣.试验设计与数据处理[M].北京:化学工业出版社,2017:123-139.
- [10] 苏芳,顾明广,冯献起.超声波辅助法提取葡萄籽中原花青素工艺的研究[J].中国酿造,2015,34(12):113-116.
- [11] 生利英.超声波检测技术[M].北京:化学工业出版社,2014:56-82.
- [12] 桑雅丽,李晓春,王欣宇,等.山葡萄籽中原花青素的提取及其含量测定[J].赤峰学院学报(自然科学版),2018,34(9):40-42.
- [13] 姚思敏,单虹宇,于雅静,等.响应曲面法优化超声波辅助提取黑果枸杞中花青素工艺[J].食品工业科技,2017,38(16):210-215, 219.
- [14] 喻秀娟,郭达,韦琴,等.李子皮原花青素的提取及抗氧化活性研究[J].广州化工,2018,46(4):51-54.
- [15] 余修亮.莲副产物中原花青素的结构、抗氧化活性及降脂作用的研究[D].南昌:南昌大学,2017:32-43.
- [16] 赵巨堂,刘冉,彭清秀,等.超声波辅助提取火龙果皮花青素工艺研究[J].现代食品,2018(11):178-182.
- [17] 张晓娟,李艳,张玉涛.响应面试验优化超声波辅助提取葡萄皮中原花青素工艺[J].粮食与油脂,2017,30(11):96-100.
- [18] 张晓娟,李丽,刘华,等.金刺梨皮原花青素的提取及抗氧化活性研究[J].粮食与油脂,2018,31(9):97-100.
- [19] LIANG Hui, XU Jialin, LI Qingyong, et al. Optimization of ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of antioxidant compounds from *Curcuma longa* L. using response surface methodology [J]. Industrial Crops and Products, 2015,76 (12): 487-493.
- [20] WU Qiang, LI Shuyi, LI Xiaopeng, et al. A significant inhibitory effect on advanced glycation end product formation by catechin as the major metabolite of lotus seedpod oligomeric procyanidins[J]. Nutrients, 2014, 6(8): 3230.

加工编辑:姚骏

收稿日期:2020-05-30

富强、民主、文明、和谐，
自由、平等、公正、法治，
爱国、敬业、诚信、友善。