



引用格式: 张文叶, 吴刚. 山楂总黄酮乙醇热浸提工艺优化研究[J]. 轻工学报, 2018, 33(2): 20-26.

中图分类号: R284.2; TS255.1 文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.2096-1553.2018.02.004

文章编号: 2096-1553(2018)02-0020-07

山楂总黄酮乙醇热浸提工艺优化研究

Study on the process optimization of ethanol thermal extraction of flavonoid from hawthorn

张文叶, 吴刚

ZHANG Wenye, WU Gang

关键词:

山楂; 黄酮; 乙醇热浸提; 响应面优化

郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001

College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

Key words:

hawthorn; flavonoid; ethanol thermal extraction; response surface optimization

摘要: 以山楂浸提液中黄酮提取量为指标, 选取浸提时间、乙醇体积分数和料液比(m/V)为主要影响因素, 进行山楂黄酮乙醇热浸提工艺的优化研究. 在单因素试验基础上, 通过响应面优化得到山楂黄酮的最佳热浸提条件为: 料液比 1:6, 乙醇体积分数 60%, 浸提时间 80 min. 该条件下的黄酮提取率达到 98.12%.

收稿日期: 2017-10-25

基金项目: 郑州轻工业学院研究生科技创新基金项目(2015029)

作者简介: 张文叶(1965—), 女, 河南省辉县市人, 郑州轻工业学院教授, 主要研究方向为发酵工程.

Abstract: The extraction process of flavonoid from hawthorn was optimized with hawthorn fruit, extraction time, ethanol concentration and the material liquid ratio as the main influence factors, flavonoid of hawthorn extraction as an index for research. On the basis of single factor experiment, optimized by response surface analysis, the best extraction conditions for extraction were: liquid ratio was 1 : 6, ethanol concentration was 60%, thermal extraction time was 80 min. Under the condition the flavonoid extraction rate reached 98.12%.

0 引言

山楂, 又称山里红、红果果, 属于蔷薇科苹果亚科山楂属植物。我国山楂栽培历史悠久, 距今已有 1700 多年, 蕴藏量丰富。山楂树多生长在贫瘠之地, 对生长环境要求不高, 我国北方广泛种植, 东北、京津、辽冀、山东和太行山区是我国山楂的五大产区^[1]。

山楂是一种药食同源的水果, 民间常用于消食化积、行气散瘀, 近年来临床常以生山楂治疗高血脂、高血压、冠心病等^[2]。此外, 山楂还能够缓解人体疲劳、增强机体免疫力、清除自由基、延缓衰老、抑制肿瘤等^[3-4]。最新研究表明^[5], 山楂中含有的黄酮类化合物、三萜类化合物、原花青素、有机酸、酚酸等植物化学物质是其具有生物活性的重要物质基础。其中, 黄酮是山楂中的一类非常重要的生物活性物质。已有研究证实^[6-7], 黄酮具有治疗心血管疾病和抗肿瘤作用。卢润双等^[8]利用微波技术对山楂黄酮进行提取工艺的优化研究, 发现在微波功率 300 W, 提取溶剂为体积分数 50% 的乙醇, 料液比 (m/V) 为 1 : 15, 时间 3 min 条件下, 黄酮得率为 8.02%。张小乔等^[9]获得了乙醇热回流提取山楂黄酮的最佳工艺条件: 料液比 (m/V) 为 1 : 40, 体积分数 70% 的乙醇, 热浸提温度为 70 ℃, 时间为 2 h; 其黄酮得率为 602 $\mu\text{g/g}$ 。孙协军等^[10]确定了超声波提取山楂黄酮的最佳工艺参数: 体积分数 90% 的乙醇, 料液比 (m/V) 1 : 24.9, 超声波功率 600 W, 提取时间 24.9 min; 其黄酮得率为 0.036 3%。王玉茹等^[11]采用响应面分析方法, 得出了超声波提取

山楂黄酮的最佳工艺条件: 体积分数 52% 的乙醇, 料液比 (m/V) 1 : 42, 超声时间 20 min; 其黄酮得率为 4.43 mg/g 。张明^[12]对山楂黄酮提取工艺进行研究, 结果表明, 山楂黄酮最适宜提取方法为渗漉法: 体积分数 50% 的乙醇, 料液比 (m/V) 1 : 8, 浸泡时间 72 h; 其黄酮质量浓度达 2.23 mg/mL 。此方法适用于黄酮的大规模提取生产。然而, 利用微波和超声波强化提取山楂黄酮时, 对企业的设备投资要求较高。值得注意的是, 目前山楂黄酮的提取研究中, 料液比普遍较高, 中小企业进行黄酮提纯生产时会出现耗时、产能不高的问题。

热浸提法简便易行, 设备投入少, 在工业生产中应用较广。乙醇溶液与其他有机溶剂相比, 成本低, 对人体安全, 回收再利用简便, 且用于山楂黄酮提取时其得率明显优于蒸馏水提取。此外, 用乙醇溶液提取山楂黄酮时, 剩余物为糖、果胶、蛋白质和纤维素等^[13], 均可作为食品原料用于山楂黄酮类食品的生产。鉴于此, 本研究以水为热浸提参照, 采用乙醇热浸提回流方法对山楂黄酮的提取工艺进行优化研究, 以期确定山楂黄酮提取的最佳工艺参数, 为中小企业进行山楂黄酮类化合物提取和下游相关保健食品的生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

山楂: 选择成熟度良好且大小均匀的、采自山西省运城地区的山楂鲜果。

试剂: 无水乙醇, NaOH, 天津市永大化学试剂有限公司产; NaNO_2 , 天津市福晨化学试剂厂

产;Al(NO₃)₃,北京化工厂产;芦丁标准品,贵州迪大生物科技有限责任公司产.以上试剂均为分析纯.

1.2 仪器与设备

T6 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司产.

1.3 实验方法

1.3.1 标准曲线的绘制 分别取芦丁标准对照品溶液 0 mL,1 mL,2 mL,3 mL,4 mL,5 mL,置于 25 mL 容量瓶中,加入 0.3 mL 质量分数 5% 的 NaNO₂,6 min 后再加入 0.3 mL 质量分数 10% 的 Al(NO₃)₃,6 min 后再加入 4 mL 1 mol/L NaOH 溶液,用体积分数 20% 的乙醇溶液定容至刻度,15 min 后在 510 nm 处测定吸光度值.以吸光度值为横坐标,芦丁质量浓度为纵坐标,绘制标准曲线.

1.3.2 山楂黄酮的提取 将山楂清洗后去梗、籽和蒂,纵向切片,均分.称取一定量经过预处理的山楂片放入 500 mL 的烧瓶中,加入一定量的乙醇溶液,进行微沸浸提.浸提结束后自然冷却,测定浸提液中的黄酮含量.

1.3.3 黄酮含量的测定^[14] 取 1 mL 浸提液,按照 1.3.1 中的方法将吸光度值代入标准曲线,求得样品中的黄酮含量.在预实验基础上,在料液比(*m/V*)为 1:6,20 ℃ 条件下,分别用体积分数 60% 的乙醇溶液(20 ℃)与蒸馏水对山楂黄酮进行提取,测定提取液中山楂黄酮浓度.

1.3.4 乙醇热浸提山楂黄酮的单因素试验 选择乙醇浓度、料液比和浸提时间作为影响山楂黄酮提取的因素,进行单因素试验.分别采用体积分数为 40%、50%、60%、70%、80% 的乙醇溶液(20 ℃)对山楂进行黄酮热浸提实验,以确定最佳乙醇浓度;用料液比(*m/V*)分别为 1:4,1:5,1:6,1:7,1:8 的乙醇溶液对山楂进行黄酮浸提实验,以确定最佳料液比;在

20~120 min 内对山楂进行热浸提,以 20 min 的时间间隔进行取样分析,以确定最佳浸提时间.

1.3.5 响应面优化试验 以料液比(*A*)、乙醇体积分数(*B*)和浸提时间(*C*)3 个单因素为响应因子,总黄酮提取量为响应值,设计 3 因素 3 水平试验,见表 1.

表 1 响应面试验因素与水平
Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平	料液比 <i>A</i>	乙醇体积分数 <i>B</i> /%	浸提时间 <i>C</i> /min
-1	1:5	50	60
0	1:6	60	80
1	1:7	70	100

1.3.6 数据分析 采用 Design-Expert 8.0.6 Trial,SPSS 和 Origin 软件对试验数据进行处理与分析,结果采用(平均值±标准差)表示,差异显著水平为 *p*<0.05.

2 结果与讨论

2.1 标准曲线分析

按照 1.3.1 方法绘制反映芦丁质量浓度与吸光度值关系的标准曲线,如图 1 所示.由图 1 可知,吸光度值与芦丁质量浓度的回归方程为 $y=2\,430.9x+11.232$,相关系数 $R^2=0.999\,1$.

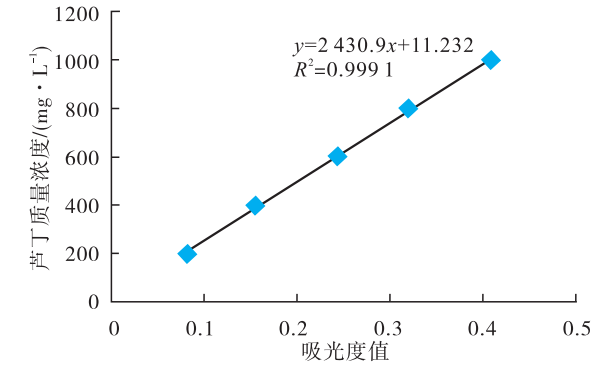


图 1 芦丁质量浓度与吸光度值的关系

Fig. 1 The relationship between the concentration of rutin and the absorbance value

这表明,在 0 ~ 1000 mg/L 浓度范围内,芦丁质量浓度与吸光度值线性关系良好.

2.2 乙醇溶液和蒸馏水热浸提山楂黄酮效果的比较分析

在料液比(m/V)为 1 : 6 条件下,分别用体积分数 60% 的乙醇溶液(20 ℃)与蒸馏水对山楂中的黄酮进行提取,研究浸提时间对黄酮提取效果的影响,结果如图 2 所示. 由图 2 可知,随浸提时间的延长,黄酮含量均呈现逐步增加的趋势. 当浸提时间为 140 min 时,乙醇和蒸馏水提取液中黄酮含量分别为 2277 mg/L 和 1492 mg/L. 此外,在 0 ~ 80 min 内,乙醇溶液浸提山楂黄酮含量上升速度明显高于蒸馏水浸提. 在热浸提 80 min 时,乙醇和蒸馏水提取液中黄酮含量分别达到 2212 mg/L 和 1157 mg/L. 综合以上分析可知,乙醇溶液提取山楂黄酮的效果明显优于蒸馏水浸提.

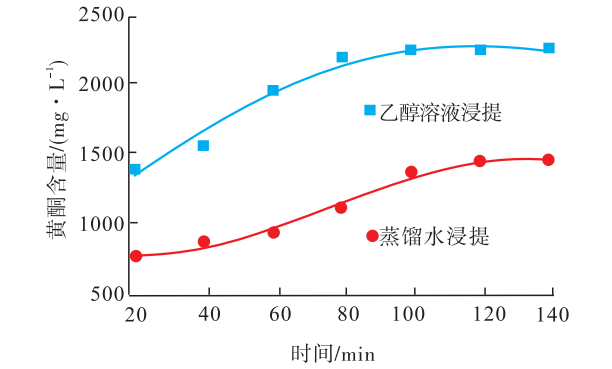


图2 乙醇溶液与蒸馏水热浸提山楂黄酮的效果比较
Fig.2 Comparison of the effect of ethanol and distilled water on the contents of hawthorn flavonoids

2.3 乙醇回流热浸提山楂黄酮的单因素试验分析

2.3.1 乙醇体积分数对黄酮浸提效果的影响

研究乙醇体积分数对山楂黄酮提取效果的影响,结果如图 3 所示. 由图 3 可知,在料液比(m/V)为 1 : 6,乙醇回流热浸提 80 min 条件下,黄酮含量随乙醇体积分数的增加呈先上升后趋于稳定的趋势;继续加大乙醇体积分数,其

含量增加程度变小,可能是因为乙醇体积分数不同,溶液极性不同,故黄酮提取效果不同. 另外,在乙醇体积分数为 70% 时,山楂在热浸提时出现轻微团块状,在乙醇体积分数为 80% 时,此现象较为明显. 这可能是由于山楂中果胶在高浓度乙醇环境下产生了凝胶反应. 综合以上分析可以得出,乙醇体积分数 60% 为最佳山楂黄酮提取条件.

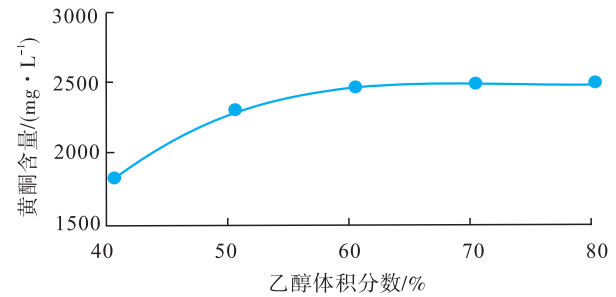


图3 乙醇体积分数对山楂黄酮提取效果的影响
Fig.3 Effect of ethanol concentration on the contents of hawthorn flavonoids

2.3.2 料液比对黄酮提取效果的影响

研究料液比对山楂黄酮提取效果的影响,结果如图 4 所示. 由图 4 可知,在乙醇体积分数为 60%,热浸提 80 min 条件下,黄酮提取程度随料液比(m/V)的增加而增加. 在料液比(m/V)为 1 : 4 时,黄酮总提取量为 11 950 mg;在料液比(m/V)为 1 : 6 时,黄酮总提取量为 13 018 mg. 进一步加大料液比进行黄酮浸提,黄酮含量和黄酮提取量略有增加,但增加趋势缓慢. 当料液比(m/V)为 1 : 8 时,黄酮总提取量为 13 114 mg. 综合以上分析可以得出,料液比(m/V)为 1 : 6 时进行山楂黄酮提取更为经济合理.

2.3.3 浸提时间对黄酮提取效果的影响

研究浸提时间对山楂黄酮提取效果的影响,结果如图 5 所示. 由图 5 可知,在乙醇体积分数为 60%,料液比(m/V)为 1 : 6 条件下,浸提时间 20 ~ 80 min 时,黄酮含量呈逐渐上升趋势;在 80 ~ 120 min 之间时,黄酮含量虽有上升,但上

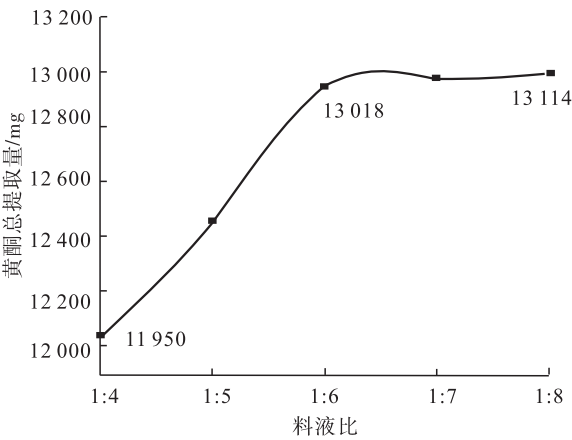


图 4 料液比对山楂黄酮提取效果的影响

Fig. 4 Effect of solid-liquid ratio on the contents of hawthorn flavonoids

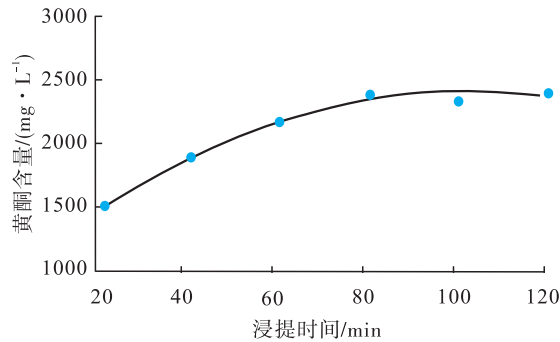


图 5 浸提时间对山楂黄酮提取效果的影响

Fig. 5 Effect of extraction time on the contents of hawthorn flavonoids

升幅度不明显;在浸提时间为 120 min 时,黄酮含量为 2382 mg/L. 综合以上分析可以得出,将浸提时间设为 80 min 较为适宜.

2.4 响应面优化试验结果

2.4.1 回归方程的建立与分析 采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件对表 2 中响应面试验数据进行回归拟合,得到黄酮含量与 3 个因素之间的多项回归模型,并对该模型进行方差分析,结果见表 3.

由表 3 可知,该回归模型的 F 值为 116.923, $P < 0.000\ 1$,回归模型极显著. 一次项 A, B 和 C 对山楂黄酮提取量有极显著影响,3 个因素对山楂黄酮提取量的影响次序为 A (料

表 2 响应面试验设计方案和结果

Table 2 Design scheme and results of response surface experiment

序号	料液比 A	乙醇体积分数 $B/\%$	浸提时间 C/min	黄酮含量 $Y/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
1	1 : 6	60	80	2 475.17
2	1 : 5	70	80	2 773.20
3	1 : 5	60	60	2 300.84
4	1 : 6	50	100	2 252.60
5	1 : 6	50	60	2 063.86
6	1 : 6	70	100	2 500.55
7	1 : 5	60	100	2 365.36
8	1 : 6	60	80	2 454.64
9	1 : 7	70	80	2 458.38
10	1 : 6	60	80	2 441.23
11	1 : 7	60	100	2 077.69
12	1 : 6	70	60	2 339.39
13	1 : 7	50	80	2 194.89
14	1 : 6	60	80	2 457.45
15	1 : 5	50	80	2 602.54
16	1 : 6	60	80	2 423.39
17	1 : 7	60	60	1 915.30

液比) $> B$ (乙醇体积分数) $> C$ (浸提时间). 交互项 AB, AC, BC 对山楂黄酮提取量均无显著影响. 二次项 B^2 对山楂黄酮提取有极显著影响, A^2 对山楂黄酮提取量有显著影响. 相关系数 $R^2 = 0.993, R^2_{Adj} = 0.985$.

根据回归模型的诊断分析结果可知,该模型失拟项 P 值为 0.169 1,模型失拟项不显著,说明模型的拟合度良好. 变异系数可反映该回归模型的可信度,数值越低则可信度越高,本试验中变异系数为 1.097%,说明模型能较好地反映真实值. 综合上述结果可知,该模型的拟合度较好,可以利用该模型分析和预测山楂黄酮的提取效果.

2.4.2 优化结果 利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件绘制响应面图,考察所拟合响应面形状,分析料液比 A ,乙醇体积分数 B 和浸提时间 C 对山楂黄酮提取效果的影响,结果如图 6 所示. 通过软件分析,得到 3 个单因素与黄酮含量 Y 之

表3 回归方程模型方差分析及其系数的显著性检验

Table 3 Variance analysis of regression equation model and the significance test of its coefficient

分析对象	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值	系数的显著性
模型	704 513. 173	9	78 279. 241	116. 923	<0. 000 1	* *
A	243 490. 333	1	243 490. 333	363. 691	<0. 000 1	* *
B	114 631. 902	1	114 631. 902	171. 221	<0. 000 1	* *
C	41 588. 722	1	41 588. 722	62. 119	0. 000 1	* *
AB	2 154. 352	1	2 154. 352	3. 218	0. 115 9	
AC	2 394. 634	1	2 394. 634	3. 577	0. 100 5	
BC	190. 164	1	190. 164	0. 284	0. 610 6	
A ²	4 785. 543	1	4 785. 543	7. 148	0. 031 8	*
B ²	34 553. 505	1	34 553. 505	51. 611	0. 000 2	* *
C ²	267 099. 916	1	267 099. 916	398. 956	<0. 000 1	
残差	4 686. 476	7	669. 497			
失拟项	3 191. 617	3	1 063. 872	2. 847	0. 169 1	
纯误差	1 494. 859	4	373. 715			
总和	709 199. 649	16				
标准差	25. 875					
平均值	2 358. 616					
变异系数	1. 097					

注:复相关系数 0. 993,校正相关系数 0. 985,预测相关系数 0. 925,信噪比 44. 568

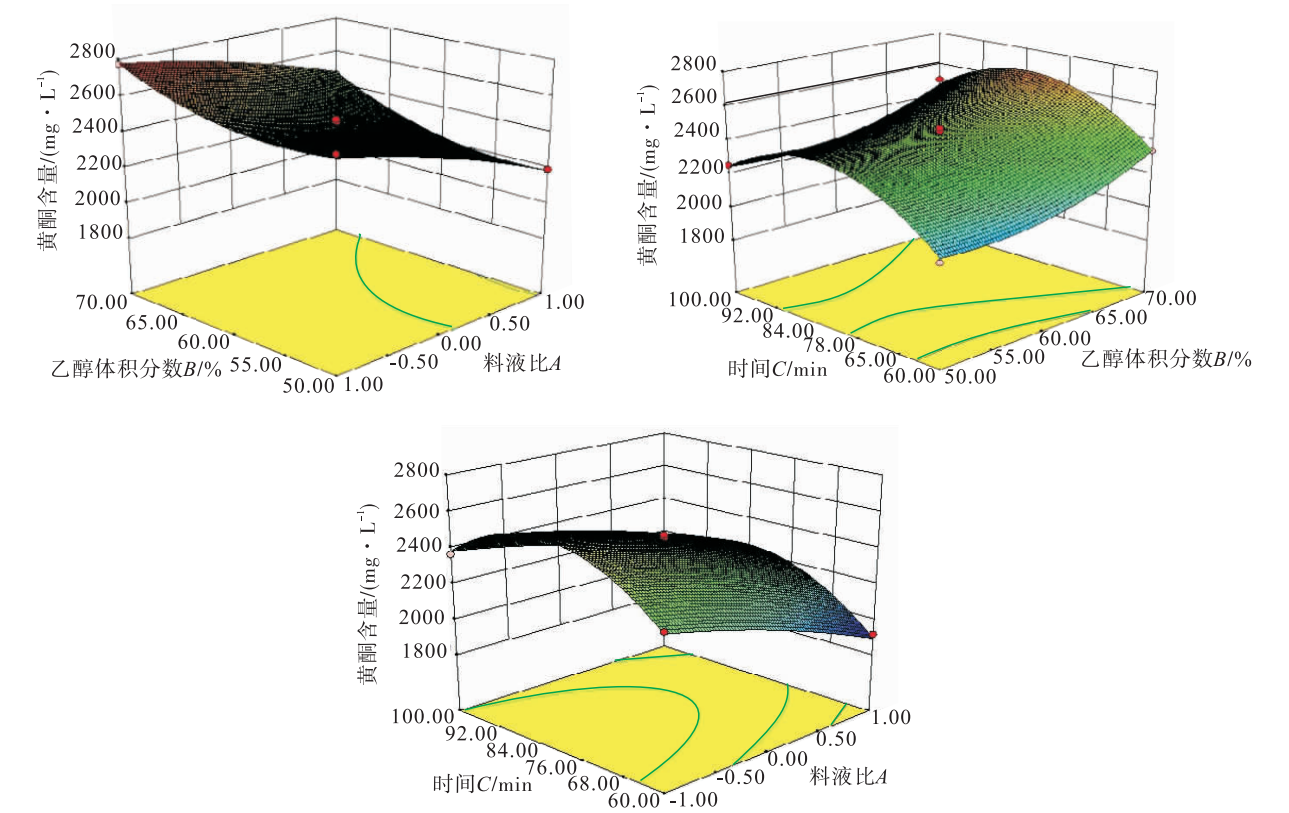


图6 各因素交互作用对黄酮得率的响应面分析

Fig. 6 Response surface analysis of the flavonoid yield influenced by the interaction of various factors

间的方程为

$$Y=2\,450.38+174.46\times A+119.70\times B+$$

$$72.10\times C+23.21\times A\times B+24.47\times A\times C-6.89\times B\times C-33.71\times A^2+90.59\times B^2-$$

$$251.87 \times C^2$$

由图6可知,当料液比(m/V)为1:6,乙醇(20℃)体积分数为60%,浸提时间为80 min时,山楂黄酮提取效果最优.在该工艺条件下,山楂黄酮提取含量的预期值为2 450.38 mg/L,黄酮总提取量的预期值为14 702.28 mg,实际值分别为2 489.042 mg/L和13 938.645 mg.这表明响应面优化的实验值与回归方程的预测值吻合良好.在该条件下,山楂黄酮提取率为98.12%.

3 结论

本文通过单因素试验和响应面优化试验对乙醇热浸提山楂黄酮的工艺参数进行了优化研究,得出山楂黄酮的最佳提取条件为:料液比(m/V)为1:6,乙醇体积分数60%,浸提时间80 min.在该工艺条件下,山楂黄酮含量的预期值为2 450.38 mg/L,黄酮总提取量的预期值为14 702.28 mg,实际值分别为2 489.042 mg/L和13 938.645 mg,山楂黄酮提取率为98.12%.

本研究的结论为进一步研究山楂黄酮类化合物的提纯,山楂饮料、山楂酒、山楂黄酮类食品的加工生产提供了理论参考.

参考文献:

- [1] 兰士波. 中国山楂种质资源的研究现状及利用前景[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(7): 182.
- [2] 吕玲霞, 辛立红, 管仁伟, 等. 山楂多糖药理作用和提取工艺发展[J]. 药物评价研究, 2016, 39(6): 1081.
- [3] 王玲, 吴军林, 吴清平, 等. 山楂降血脂作用和机理研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(15): 245.
- [4] 董银萍, 李拖平. 山楂果胶的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2014, 35(3): 29.
- [5] 何改. 山楂叶黄酮类化合物最佳提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2002, 23(1): 15.
- [6] 刘北林, 董继生, 倪小虎, 等. 山楂黄酮提取及降血脂研究[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 324.
- [7] 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.
- [8] 卢润双, 张俊瑾, 李满秀. 山楂黄酮的微波提取及抗氧化性研究[J]. 晋中学院学报, 2010, 27(3): 69.
- [9] 张小乔, 何勇, 田志宏. 山楂黄酮提取工艺的研究[J]. 科技视界, 2013(8): 23.
- [10] 孙协军, 李秀霞, 刘雪飞, 等. 山楂黄酮超声波辅助提取工艺参数优化研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(9): 203.
- [11] 王玉茹, 李楠. 山楂总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 现代食品, 2017(14): 65.
- [12] 张明. 山楂黄酮提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2014(33): 11857.
- [13] 刘北林, 董继生, 霍红. 山楂黄酮最佳提取工艺探讨[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 167.
- [14] 高红梅, 丁志刚, 郭元新, 等. 山楂总黄酮的提取及其抗氧化性研究[J]. 安徽科技学院学报, 2017, 31(2): 31.