

苦荞壳总黄酮超声辅助醇提工艺的优化

Optimization of ultrasonic-assisted ethanol extraction for total flavonoids from buckwheat husk

杨 芳 杨万林 陈锦玉 邵金良 兰珊珊

YANG Fang YANG Wan-lin CHEN Jin-yu SHAO Jin-liang LAN Shan-shan

(云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所, 云南 昆明 650223)

(Institute of Agriculture Quality Standards & Testing Technique, Yunnan

Academy of Agricultural Science, Kunming, Yunnan 650223, China)

摘要:以云南苦荞壳为研究对象,对超声辅助醇提法提取苦荞壳总黄酮的工艺条件进行优化。通过单因素试验,以总黄酮得率为考察指标,分别考察超声时间、温度、乙醇浓度、料液比对总黄酮得率的影响,初步确定各因素的适宜水平;通过响应面法试验,确定苦荞壳中总黄酮提取的最佳工艺条件。结果表明:苦荞壳总黄酮提取的最佳工艺条件为乙醇浓度 69%,料液比 1:51($m:V$),提取时间 30 min,提取温度 59℃,该条件下苦荞壳总黄酮得率为 3.542%。

关键词:苦荞壳;总黄酮;超声辅助;醇提法

Abstract: The extraction of total flavonoids from buckwheat husk was optimized by ultrasound-assisted ethanol extraction method. Through the optimization by single factor, with extraction efficiency of total flavonoids, the effects of ultrasonic extraction time, ultrasonic extraction temperature, ethanol concentration and material-to-liquid ratio of total flavonoids from buckwheat husk were investigated. Through the optimization by response surface method, the optimal extraction conditions were found. The experimental results showed that the best conditions were ethanol concentration 69%, material-to-liquid ratio 1:51($m:V$), extraction time 30 minute and ultrasonic extraction temperature 59℃, the yield rate of total flavonoids was 3.542%.

Keywords: buckwheat husk; total flavonoids; ultrasonic-assisted; ethanol extraction method

苦荞麦为蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum*)双子叶植物,学名鞑靼荞麦(*F. tataricum*)^[1],主要分布在中国的西南山区^[2]。它含有丰富的蛋白质、维生素、矿物质及黄酮类物质等^[3]。目前,荞麦加工中的主要原料是荞麦仁,而苦荞壳作

为苦荞加工过程中的主要副产物,并未得到充分利用^[4]。研究^[5-7]表明,黄酮类化合物具有抗氧化、降血糖、降血脂、抗肿瘤和增强人体免疫力等多种生物活性。而苦荞壳富含黄酮类化合物且价格低廉,是潜在的黄酮类化合物的提取原料。

传统的荞麦黄酮的提取方法主要有:热水浸提法、碱水浸提法、乙醇回流提取法等,但是这些方法提取率低,提取时间较长^[8]。新兴的方法主要有微波辅助提取法、亚临界提取法和超声波辅助提取法^[9]。微波辅助提取法和亚临界提取法对设备要求较高,操作工艺条件需严格控制;而超声辅助提取法利用超声波在液体中的空化效应、热效应和机械作用,提高植物中有效成分的溶出速率,具有提取效率高、提取时间短的优点,且操作简单、成本低廉,更利于工业化生产。虽已有学者^[10,11]采用超声波辅助提取法对荞麦籽粒、荞麦麸皮和荞麦壳中的荞麦黄酮提取工艺进行了研究,但因提取原料不同,提取工艺也有较大的差异。本试验拟以苦荞壳为原料,在单因素试验的基础上,采用响应面法对苦荞壳总黄酮的提取工艺进行优化,旨在为苦荞壳总黄酮的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

云南苦荞壳:云南省昆明市寻甸县。荞麦壳在 105℃ 下烘干至恒重,粉碎过 60 目筛,备用;

95%乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

紫外分光光度计:UV-1800PC 型,上海美谱达仪器有限公司;

超声波清洗机:KM-615D 型,广州市科洁盟实验仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总黄酮得率的测定 参照文献[12]测定样品中的总

作者简介:杨芳(1982—),女,云南省农业科学院助理研究员,硕士。
E-mail: yfyb917@163.com

通讯作者:杨万林

收稿日期:2015-04-15

黄酮含量,按式(1)计算总黄酮得率。

$$\text{总黄酮得率} = \frac{\text{提取液中总黄酮含量}}{\text{原料质量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2 单因素试验 本试验以苦荞壳中总黄酮得率为指标,分别选取乙醇浓度、超声温度、超声时间和料液比4个因素作5个水平的单因素试验,每个试验重复3次。

(1) 乙醇浓度:准确称取2.0 g苦荞壳粉末,置于250 mL的烧杯中。在超声温度60℃、超声时间30 min、料液比1:40($m:V$)的条件下,分别加入40%,50%,60%,70%,80%的乙醇溶液进行超声提取。研究乙醇浓度对苦荞壳总黄酮得率的影响。

(2) 超声温度:准确称取2.0 g苦荞壳粉末,置于250 mL的烧杯中。在乙醇浓度70%、超声时间30 min、料液比1:40($m:V$)的条件下,设定不同超声温度(40,50,60,70,80℃)进行超声提取。研究超声温度对苦荞壳总黄酮得率的影响。

(3) 超声时间:准确称取2.0 g苦荞壳粉末,置于250 mL的烧杯中。在乙醇浓度70%、超声温度60℃、料液比1:40($m:V$)的条件下,设定不同超声时间(10,20,30,40,50 min)进行超声提取。研究超声时间对苦荞壳总黄酮得率的影响。

(4) 料液比:准确称取2.0 g苦荞壳粉末,置于250 mL的烧杯中。在超声温度60℃、超声时间30 min、乙醇浓度70%的条件下,设定不同料液比(1:30,1:40,1:50,1:60,1:70, $m:V$)进行超声提取。研究料液比对苦荞壳总黄酮得率的影响。

1.2.3 响应曲面优化试验 在单因素试验基础上,根据Box-Behnken试验设计原理,选择乙醇浓度、料液比、超声时间、温度进行四因素三水平的响应面分析,确定总黄酮最佳提取条件。

1.3 数据处理

采用Design-Expert 8统计软件。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇浓度对苦荞壳总黄酮得率的影响 由图1可知,乙醇浓度对苦荞壳总黄酮得率的影响较大。总黄酮得率先随乙醇浓度的升高而升高,当乙醇浓度为70%时达到最高值,随后呈下降趋势。随着乙醇浓度的逐渐升高,醇溶性物质的溶出率也随之增加,所以总黄酮得率先呈现升高的趋势;但是随着乙醇浓度的增加,苦荞壳中的一些醇溶性和脂溶

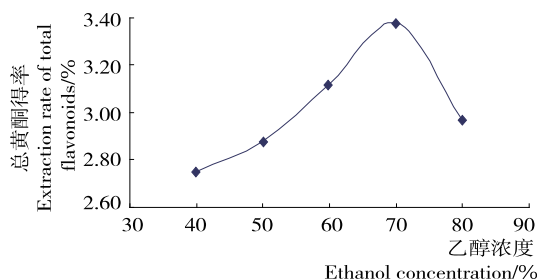


图1 乙醇浓度对苦荞壳总黄酮得率的影响

Figure 1 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of total flavonoids

性的杂质溶出量也逐渐增多,这些成分可能会与乙醇—水分子体系结合,与黄酮类化合物形成竞争,影响苦荞壳黄酮类物质的溶出,从而导致总黄酮得率下降。综合考虑试验结果、成本及后处理因素,乙醇溶液浓度控制在70%左右为宜。

2.1.2 超声温度对苦荞壳总黄酮得率的影响 由图2可知,温度对总黄酮得率影响较大。在提取温度低于60℃时,随着提取温度的上升,总黄酮得率也随之增加,高于60℃后,总黄酮得率急剧下降。这可能是由于随着温度的升高,总黄酮在乙醇溶液中的溶解度增加;同时由于温度升高,分子运动加快,扩散速率增加,促使提取速度加快^[13]。但是当温度过高,黄酮类物质容易被氧化,分子结构遭到破坏。因此,提取过程中温度不宜过高,以60℃左右为宜。

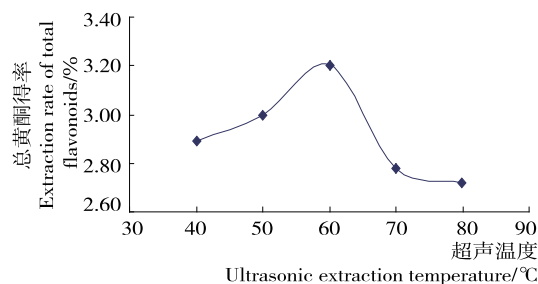


图2 超声温度对苦荞壳总黄酮得率的影响

Figure 2 Effect of ultrasonic extraction temperature on the extraction rate of total flavonoids

2.1.3 超声时间对苦荞壳总黄酮得率的影响 由图3可知,随着超声时间的延长,总黄酮得率逐渐增大,当超声时间为30 min时达到最大值,随后总黄酮得率呈下降趋势。超声时间的延长可有效增加原料与提取液的接触时间,提高总黄酮的提取率;超声时间过长,醇溶性杂质的溶出量也会增加,对黄酮形成竞争性抑制,使总黄酮得率下降。因此,超声时间控制在30 min左右为宜。

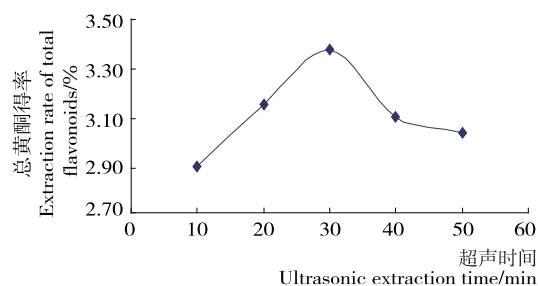


图3 超声时间对苦荞壳总黄酮得率的影响

Figure 3 Effect of ultrasonic extraction time on the extraction rate of total flavonoids

2.1.4 料液比对苦荞壳总黄酮得率的影响 由图4可知,总黄酮得率先随料液比的增大而增大,当料液比为1:50($m:V$)时达到最大值,随后随着料液比的增加,总黄酮得率呈下降趋势。增大料液比,可使荞壳与溶剂的接触面积增大,有利于有效成分的溶出,提高提取率;但是随着料液比的增加,溶剂用量增多,达到提取完全所需时间会相应增长,同

时浸出的黄酮对未浸出的黄酮有抑制浸提作用,使黄酮类物质的溶出速率减慢,从而影响总黄酮得率,且大量的溶剂会对后续的浓缩等操作带来不便。因此料液比控制在 1 : 50 ($m : V$)左右为宜。

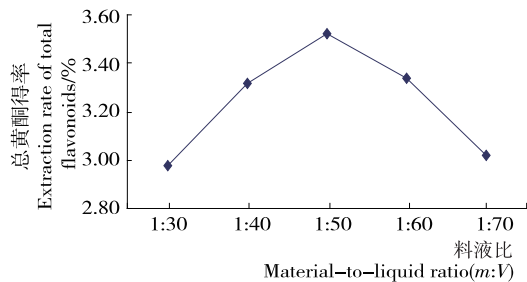


图 4 料液比对苦荞壳总黄酮得率的影响

Figure 4 Effect of material-to-liquid ratio on the extraction rate of total flavonoids

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面试验结果及模型建立 根据单因素试验结果,选取乙醇浓度、料液比、超声时间和温度 4 个因素中较优的水平(表 1),采用响应面试验优化超声辅助醇提法提取荞麦黄酮的最佳工艺条件,试验结果见表 2。

表 1 响应曲面优化试验因素水平表

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in response surface analysis

水平	A 乙醇浓度/ %	B 料液比 ($m : V$)	C 超声时间/ min	D 温度/ ℃
-1	60	1 : 40	20	50
0	70	1 : 50	30	60
1	80	1 : 60	40	70

表 2 苦荞壳总黄酮提取响应面分析方案及结果

Table 2 Flavonoids from the analysis of programs and results by response surface

试验号	A	B	C	D	总黄酮得率/%	试验号	A	B	C	D	总黄酮得率/%
1	-1	0	-1	0	3.127	16	1	0	1	0	2.989
2	0	1	1	0	3.156	17	0	-1	0	-1	3.003
3	0	0	-1	-1	2.917	18	0	0	1	1	2.781
4	0	-1	1	0	3.189	19	1	0	-1	0	2.989
5	-1	0	1	0	3.108	20	0	-1	0	1	2.839
6	1	0	0	1	2.571	21	-1	0	0	-1	2.912
7	-1	0	0	1	2.760	22	0	0	0	0	3.517
8	0	0	-1	1	2.889	23	-1	1	0	0	3.197
9	1	-1	0	0	2.973	24	0	1	-1	0	3.233
10	0	0	1	-1	3.058	25	1	0	0	-1	2.910
11	0	0	0	0	3.496	26	0	1	0	-1	3.125
12	-1	-1	0	0	3.131	27	0	0	0	0	3.583
13	0	0	0	0	3.611	28	1	1	0	0	2.990
14	0	-1	-1	0	3.171	29	0	0	0	0	3.583
15	0	1	0	1	2.832						

采用 Design-Expert 8 软件进行统计分析,得到荞麦总黄酮得率(Y)对乙醇浓度、料液比、超声时间、超声温度的二次多项回归方程:

$$Y=3.558-0.0678A+0.0189B-0.00375C-0.104D-0.0122AB+0.00475AC-0.0468AD-0.0238BC-0.0323BD-0.0623CD-0.316A^2-0.168B^2-0.197C^2-0.448D^2 \quad (2)$$

由表 3 可知,试验中选用的模型 $P<0.0001$,表明响应回归模型达到了极显著水平,具有统计学意义;相关系数 $R^2=0.9892$,表明该方程的拟合效果较好,可以用于不同条件下苦荞壳中总黄酮提取工艺的理论预测;失拟项 $P=0.8403$,不显著,说明该方程对试验拟合较好。乙醇浓度和超声温度对总黄酮得率的影响极显著,超声时间和料液比对总黄酮得率的影响不显著;二次项对总黄酮得率均达到极显

著水平;交互项 CD 对总黄酮得率的影响极显著,AD 对总黄酮得率的影响显著,其余交互项均不显著。

2.2.2 响应曲面分析 图 5 直观地反映了乙醇浓度、料液比、超声时间、提取温度 4 个因素之间的交互作用对总黄酮得率的影响。响应面图中曲线走势越陡,表明该因素对总黄酮得率的影响越大;走势平滑,则影响较小。等高线图中椭圆形表示两因素交互作用对总黄酮得率影响显著,圆形则相反。由图 5 可知,乙醇浓度和温度、超声时间和温度的响应面图曲线坡度较陡,等高线图呈椭圆形,说明其交互作用对总黄酮得率影响显著;料液比和温度的交互作用对总黄酮得率的影响也较大,但是未达到显著水平(P 值为 0.1192),这与方差分析结果相一致。当乙醇浓度为 64%~74%,料液比为 1 : 44~1 : 57($m : V$),提取时间为 24~36 min,温度为 55~63 ℃ 时,总黄酮得率较高。

表 3 回归模型方差分析[†]
Table 3 Variance analysis for the established regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.93	14	0.14	91.31	< 0.000 1	* *
A	0.06	1	0.06	36.46	< 0.000 1	* *
B	4.29E-03	1	4.29E-03	2.84	0.113 9	
C	1.69E-04	1	1.69E-04	0.11	0.743 2	
D	0.13	1	0.136	86.61	< 0.000 1	* *
AB	6.00E-04	1	6.00E-04	0.40	0.538 6	
AC	9.02E-05	1	9.02E-05	0.06	0.810 4	
AD	8.74E-03	1	8.74E-03	5.79	0.030 5	*
BC	2.26E-03	1	2.26E-03	1.49	0.241 8	
BD	4.16E-03	1	4.16E-03	2.75	0.119 2	
CD	1.55E-02	1	1.55E-02	10.26	0.006 4	* *
A ₂	0.65	1	0.65	427.76	< 0.000 1	* *
B ₂	0.18	1	0.18	121.01	< 0.000 1	* *
C ₂	0.25	1	0.25	166.43	< 0.000 1	* *
D ₂	1.30	1	1.30	862.30	< 0.000 1	* *
残差	2.11E-02	14	1.51E-03			
失拟项	1.16E-02	10	1.16E-03	0.48	0.840 3	
纯误差	9.58E-03	4	2.40E-03			
总变异	1.95	28				

[†] $R^2=0.989\ 2$, Adeq Precision=35.15, $R^2_{\text{adj}}=0.978\ 3$, $R^2_{\text{pred}}=0.958\ 2$, CV=1.26%; * 表示显著水平 ($P<0.05$),
* * 表示极显著水平 ($P<0.01$)

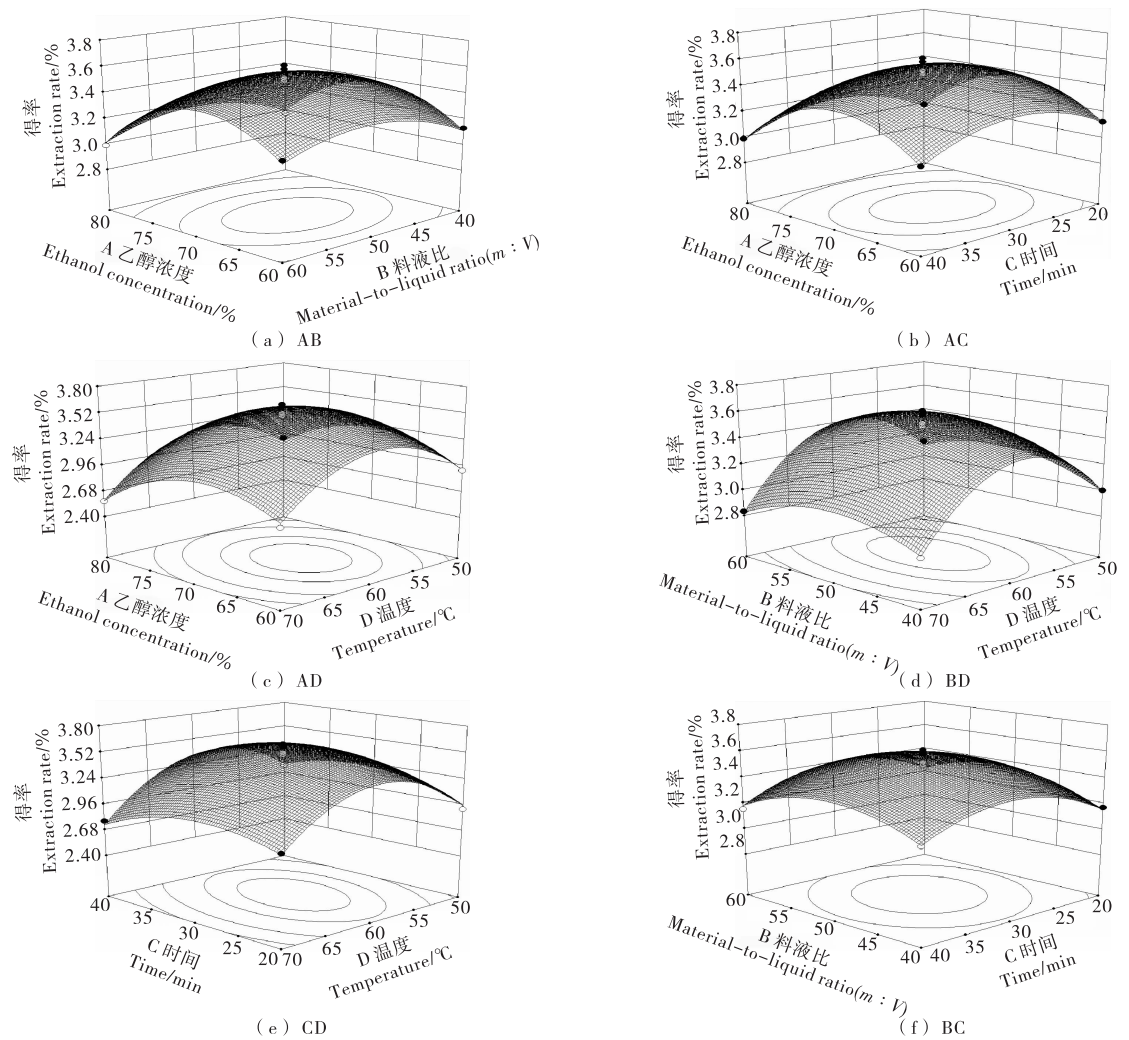


图 5 各两因素交互作用对总黄酮得率影响
Figure 5 Effects of pairwise interactions of the factors on the extraction rate of total flavonoids

通过 Design-Expert 8 软件进行统计分析,苦荞壳总黄酮的最佳提取工艺条件为乙醇浓度 69.00%,料液比 1:50.71 ($m:V$),提取时间 30.03 min,提取温度 58.86 °C,总黄酮得率的预测值为 3.568%。考虑实际操作,将试验条件修改为乙醇浓度 69%,料液比 1:51 ($m:V$),提取时间 30 min,提取温度 59 °C。

2.3 苦荞壳总黄酮最佳提取条件验证实验

在乙醇浓度 69%,料液比 1:51 ($m:V$),提取时间 30 min,提取温度 59 °C 的条件下进行超声波辅助乙醇浸提苦荞壳总黄酮试验,平行验证 3 次,测得总黄酮的平均得率为 3.542%,与预测值 3.568% 接近,偏差较小。结果表明该回归模型能较好地预测苦荞壳总黄酮得率,得到的最佳工艺条件比较可靠。

3 结论

本试验以单因素试验为基础,采用响应曲面试验优化超声辅助提取苦荞壳中总黄酮的工艺条件,得到超声辅助提取苦荞壳中总黄酮的最佳工艺条件为:乙醇浓度 69%,料液比 1:51 ($m:V$),提取时间 30 min,提取温度 59 °C,在该工艺条件下总黄酮的实际得率为 3.542%。通过与王廷璞等^[14]报道的采用浸提法提取苦荞壳中总黄酮的工艺相比,该工艺条件缩短了提取时间,显著提高了总黄酮得率。本研究得到的最佳工艺条件可为工业提取荞麦黄酮提供参考,为充分开发利用苦荞壳中黄酮提供依据。

参考文献

1 黄凯丰,彭慧蓉,郭肖,等. 2 个苦荞品种成熟期内源激素的含

量差异及其与产量和品质的关系[J]. 江苏农业学报, 2013, 29 (1): 28~32.

2 施卫省,罗小林,曹新佳,等. 苦荞麦黄酮含量萃取工艺的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(15): 260~263.

3 贾洪峰,唐宇,孙俊秀,等. 苦荞茶和荞麦面条中芦丁及槲皮素含量分析[J]. 食品与机械, 2013, 29(1): 57~60.

4 杨美莲,陈旭清. 表面活性剂—超声波协同提取荞麦壳黄酮工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2013, 26(6): 46~49.

5 勾向博,白静,姜妍,等. 荞麦糠皮提取物对 II 型糖尿病大鼠血糖和血脂的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 303~306.

6 秦培友. 我国主要荞麦品种资源品质评价及加工处理对荞麦成分和活性的影响[D]. 北京:中国农业科学院作物科学研究所, 2012.

7 赖红芳,黄秀香,陆俊宇. 超声波辅助提取山豆根中的黄酮和多糖工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 196~198.

8 闫斐艳. 苦荞总黄酮的提取及体外抗肿瘤活性研究[D]. 太原:山西大学, 2010.

9 慕婷婷,韩玲. 亚临界—超声波协同萃取苦荞麸中的黄酮[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(1): 230~232.

10 宋小利,高立国,刘华. 超声波法提取甜荞麦壳中黄酮类化合物的工艺研究[J]. 应用化工, 2013(5): 857~859.

11 赵强,索有瑞,李天才,等. 响应面法优化苦荞皮中总黄酮超声波提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2014(1): 1~11.

12 杨芳,刘美艳,陈锦玉,等. 超声提取云南甜荞籽粒总黄酮工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2013(6): 129~132.

13 孙美,黄艳菲,赵小燕,等. 响应曲面法优化荞麦总黄酮的提取工艺[J]. 现代食品科技, 2012, 28(12): 1 714~1 718.

14 王廷璞,赵强,袁建军. 响应面法优化苦荞壳中总黄酮的提取工艺[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(6): 1 629~1 640.

(上接第 196 页)

5 Wang Jia, Wang Ke, Wang Ying, et al. Improvement of antioxidant activity of peptides with molecular weights ranging from 1 to 10 kDa by PEF technology[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(3): 244~249.

6 Liao Ching-lung, Lai Kuang-chi, Huang An-cheng, et al. Gallic acid inhibits migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells through suppressing the matrix metalloproteinase -2/-9, protein kinase B (PKB) and PKC signaling pathways[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(5): 1 734~1 740.

7 Subramanian V, Venkatesan B, Tumala A, et al. Topical application of Gallic acid suppresses the 7, 12-DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis by modulating anti-oxidants and MMP-2/MMP-9 in Swiss albino mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 66(1): 44~55.

8 Mansouri M T, Farbood Y, Sameri M J, et al. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2): 1 028~1 033.

9 吴昊,朱俊向,王成荣,等. 壳聚糖没食子酸衍生物制备及其对鲜切苹果的保鲜作用[J]. 现代食品科技, 2014, 30(5): 251~257.

10 Jiang Zhan-mei, Wang Li-zhe, Wu Wei, et al. Biological activi-

ties and physicochemical properties of Maillard reaction products in sugar-bovine casein peptide model systems[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 3 837~3 845.

11 金寒冰,方丽,赖蓓蕾,等. 苦苣多酚超声辅助提取及抗氧化研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 211~215.

12 Gülçin I, Bursal E, Şehitoglu M H, et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey[J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(8): 2 227~2 238.

13 Awah F M, Uzoegwu P N, Oyugi J O, et al. Free radical scavenging activity and immunomodulatory effect of Stachytarpheta angustifolia leaf extract[J]. Food Chemistry, 2010, 119(4): 1 409~1 416.

14 Wang Qiu-kuan, Li Wei, He Yun-hai, et al. Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (Crassostrea talienwhanensis) [J]. Food Chemistry, 2014, 145 (1): 991~996.

15 魏钰鑫. 生物复合微球的制备及固定化脂肪酶的研究[D]. 兰州:西北师范大学, 2010.

16 靳园敏. 聚氨酯/明胶共聚物的制备及其成膜性能研究[D]. 西安:陕西科技大学, 2012.

17 刘方. 银杏酸的结构修饰及其抗肿瘤活性研究[D]. 镇江:江苏大学, 2009.