

RSD 法优化紫葡萄皮花色苷超声辅助萃取工艺研究

肖功年^{1,2}, 李言郡³, 陈波³, 林玲玲^{1,2}, 尤玉如^{1,2}

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 杭州 310023; 2. 浙江省农产品化学与生物加工技术
重点实验室, 杭州 310023; 3. 杭州娃哈哈集团有限公司, 杭州 310018)

摘 要: 紫葡萄皮糖苷是一种水溶性色素,以紫葡萄皮为材料。采用超声工艺提取,以超声功率、超声温度、超声频率、超声时间为主要因素,通过测定花色苷的吸光值,采用 pH 示差法以确定其含量,应用响应面设计进行优化。试验结果表明,紫葡萄皮糖苷超声提取最优提取条件为:超声功率 286 W,超声温度为 45.2 °C,超声频率为 48.8 kHz,超声时间为 45 min。此时花色苷得率为 0.235 g/100g。

关键词: 紫葡萄;糖苷;超声波;响应面分析

中图分类号: TS209

文献标志码: A

文章编号: 1671-8798(2013)01-0021-06

Optimization research of anthocyanins ultrasonic extraction by response surface design from purple grapes peels

XIAO Gongnian^{1,2}, LI Yanjun³, CHEN Bo³, LIN Linlin^{1,2}, YOU Yuru^{1,2}

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical and Biological Processing Technology of Farm Produces, Hangzhou 310023, China; 3. Hangzhou Wahaha Group Co., Ltd., Hangzhou 310018, China)

Abstract: Anthocyanin in the purple grapes peels is a water-soluble pigments, the optimization research of anthocyanins ultrasonic extraction by response surface design from purple grapes peels was studied in this paper. Through Box-behen design, the effects of Ultrasonic power, ultrasonic temperature, ultrasonic frequency, ultrasonic time were selected as the main factors. The results showed that the optimal extraction conditions as followed: ultrasonic power is 286 W, ultrasonic temperature is 45.2 °C, ultrasonic frequency is 49.8 kHz, and ultrasonic time is 45 min. At this point the maximum anthocyanin yield is 0.235 g/100g.

Key words: anthocyanin; ultrasonic-assisted; response surface analysis

收稿日期: 2012-11-26

基金项目: 浙江省重大科技专项项目(2009C12032)

作者简介: 肖功年(1976—),男,江西省萍乡人,副教授,博士,主要从事食品工程技术研究。

紫葡萄皮中含有大量糖苷,为花色苷配基花青素(anthocyanidin)^[1-2],是苯丙吡喃(phenotyrylium)的衍生物,有黄酮的 $C_6C_3C_6$ 结构(图 1)^[3],具有阳离子的性质。葡萄中的花色苷主要为矢车菊素、飞燕草素、锦葵色素、甲基花青素及矮牵牛苷配基(petunidin)5 种花色素诱导体^[4-5]。据报道,花色苷具有降低肝脏及血清中脂肪含量、抗氧化、抗肿瘤、延缓血小板凝集等营养和药理作用,在食品、化妆品、医药领域有着巨大的应用潜力^[6]。但花色苷通常不太稳定,在葡萄中主要以糖苷形式(即花色苷)存在。紫葡萄皮中糖苷提取较难,而超声波提取不改变有效成分的结构,并且缩短了提取时间,提高得率,为植物成分的提取提供了快速、高产的新方法^[7-9]。影响超声波提取工艺的因素较多^[10-11],本试验以紫葡萄皮为原料,采用响应面设计方法(response surface design, RSD),对超声功率、超声温度、超声时间、超声频率等因素进行优化,以提高超声辅助萃取紫葡萄皮花色苷产率,为紫葡萄皮及花色苷的综合利用和产品开发提供重要的实验和理论依据。

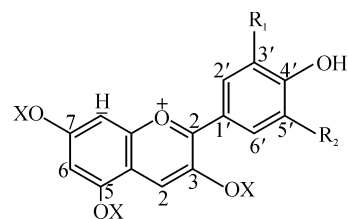


图 1 花色苷结构

Fig. 1 Structure of anthocyanidin

1 材料与方法

1.1 材料

紫葡萄,购自杭州市农贸市场,无水甲醇、浓盐酸、氯化钾、无水乙酸钠均为分析纯试剂。

1.2 实验仪器

超声波药品处理机(JBT/C-YCL400T/3P(D)),离心机(KQ3200B),紫外可见分光光度计(UV-7504C),温度计,容量瓶,三口烧瓶,量筒,玻璃棒,药匙,铁架台,移液管,滴定管等。

1.3 RSD 优化提取超声工艺设计

在前期研究基础上,确定超声波的功率(额定功率,154~286 W)、温度(30~50 ℃)、频率(25~70 kHz)和时间(25~45 min)对紫葡萄皮花色苷的提取影响较大。以 70% 乙醇为萃取溶剂,应用 Box-Behnken 中心组合进行四因素三水平的实验设计(取 $\alpha=2$),见表 1。以花色苷的吸光值为响应值,进行响应面分析,优化葡萄皮花色苷超声波提取条件。

表 1 实验因素及水平

Table 1 Experimental factors and levels

水平	超声功率/W	超声温度/℃	超声频率/kHz	超声时间/min
-1	154	30	25	25
0	220	40	45	35
1	286	50	65	45

1.4 花色苷的测定

采用 pH 示差法测定花色苷总量^[11]。确定两个对花色苷吸光度差别最大但使花色苷稳定的 pH 值,因葡萄皮花青素在 pH1.0 和 pH4.5 处的吸光值差是极大^[12],故选定 pH1.0 和 pH4.5 两个 pH 值测定花色苷的吸光值。

将提取液分别用两组缓冲溶液稀释 10 倍,静置 2 h,测定其在 520 nm 和 700 nm 处的吸光值。

pH4.5 的缓冲液 $V(1\text{ N NaAc}) : V(1\text{ N HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 100 : 60 : 90$;

pH1.0 的缓冲液 $V(0.2\text{ N KCl}) : V(0.2\text{ N HCl}) = 25 : 67$ 。

花色苷吸光值 $= (A_{520\text{pH}1.0} - A_{700\text{pH}1.0}) - (A_{520\text{pH}4.5} - A_{700\text{pH}4.5})$

根据 T. Fuleki^[12] 的研究,计算方法如下:

花色苷得率(g/100g):
$$\omega = \frac{\Delta A \cdot V \cdot F \cdot 100}{\text{av}E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot m}$$

式中: $\Delta A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$; V —花色苷溶液体积, mL; F —稀释倍数; $\text{av}E_{1\text{cm}}^{1\%}$ —平均消光系数, 98.2^[13]; m —鲜葡萄皮质量, g。

2 结果与分析

在单因素实验的基础上对四因素进行二次回归设计试验和分析,吸光值为响应值,实验采用 Box-Behnken 中心组合设计,设计方案及结果见表 2。

表 2 响应面设计实验及结果

Table 2 Response surface design and results of experiments

实验号	A(超声功率)	B(超声温度)	C(超声频率)	D(超声时间)	得率/(g · 100g ⁻¹)
1	1	0	0	-1	0.187
2	0	0	0	0	0.156
3	0	0	-1	1	0.154
4	0	1	-1	0	0.147
5	0	0	1	1	0.171
6	-1	0	0	-1	0.204
7	1	0	1	0	—
8	0	0	1	-1	0.144
9	0	0	0	0	0.164
10	-1	1	0	0	0.167
11	0	-1	0	1	0.151
12	1	-1	0	0	0.189
13	-1	0	0	1	0.176
14	0	1	0	-1	0.142
15	1	0	-1	0	0.181
16	0	-1	1	0	0.138
17	0	0	0	0	0.160
18	0	1	1	0	0.120
19	0	1	0	1	0.172
20	0	-1	-1	0	0.126
21	0	-1	0	-1	0.145
22	0	0	-1	-1	0.153
23	-1	0	1	0	0.171
24	-1	-1	0	0	0.157
25	1	0	0	1	0.240
26	1	1	0	0	0.217
27	-1	0	-1	0	0.162

经 Minitab 软件回归拟合后,各实验因子响应值的影响可用上述四元三次回归方程表示。从表 3 中可以看出,用上述回归方程描述各因子与响应值的关系时,其应变量与全体自变量之间的线性、平方及交互作用关系都是显著的, $R-Sq=96.23\%$,模型的响应值的变化有 96.23%来自所选因子,即超声功率、超声温度、超声频率、超声时间 4 个因素可以很好地解释模型变化。

根据回归方程,可以利用 Minitab 软件绘出曲面图和等值线图,见图 2 至图 7。每个响应面分别代表着两个独立变量之间的相互作用,此时其余变量保持在最佳水平。由响应面图可以看出所选因子对花色苷提取的相关性。从图中还可以看出,超声功率及其平方项,超声温度、超声频率的平方项及超声功率与超声时间的交互项对花色苷提取极显著,各单因素对花色苷提取的影响依次为超声功率>超声时间>超声温度>超声频率。

表 3 回归分析

Table 3 Analysis of regression

来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P	系数	系数标准误	T
回归	14	0.017 341	0.017 341	0.001 239	20.04	0.000			
线性	4	0.002 794	0.003 089	0.000 772	12.49	0.000			
平方	4	0.012 123	0.012 086	0.003 021	48.88	0.000			
交互作用	6	0.002 425	0.002 425	0.000 404	6.54	0.004			
残差误差	11	0.000 680	0.000 680	0.000 062					
失拟	9	0.000 648	0.000 648	0.000 072	4.5	0.195			
纯误差	2	0.000 032	0.000 032	0.000 016					
合计	25	0.018 021							
常量						0.000	0.160 000	0.004 539	35.247
A						0.000	0.014 600	0.002 486	5.872
B						0.053	0.004 917	0.002 270	2.166
C						0.533	0.001 600	0.002 486	0.644
D						0.007	0.007 417	0.002 270	3.268
A * A						0.000	0.033 975	0.003 553	9.563
B * B						0.003	-0.013 300	0.003 442	-3.864
C * C						0.002	-0.014 025	0.003 553	-3.948
D * D						0.047	0.007 700	0.003 442	2.237
A * B						0.277	0.004 500	0.003 931	1.145
A * C						0.688	0.002 050	0.004 973	0.412
A * D						0.000	0.020 250	0.003 931	5.151
B * C						0.031	-0.009 750	0.003 931	-2.480
B * D						0.155	0.006 000	0.003 931	1.526
C * D						0.126	0.006 500	0.003 931	1.653
S=0.007 862 36 PRESS=0.004 360 36									
R-Sq=96.23% R-Sq(预测)=75.80% R-Sq(调整)=91.42%									

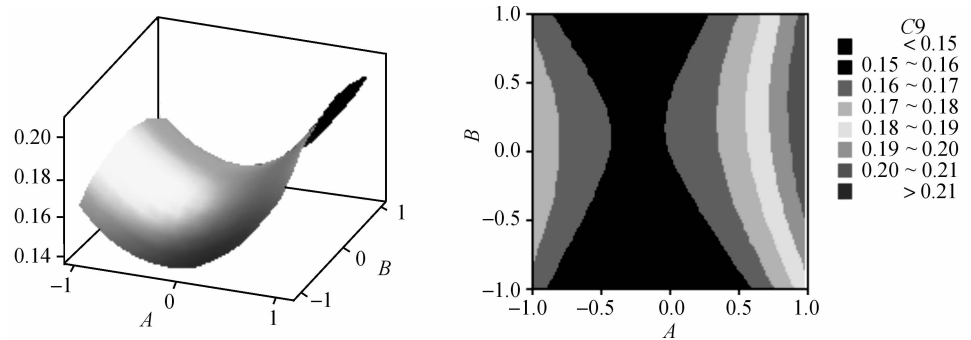


图 2 $Y=f(A,B)$ 的响应曲面图及等值线图

Fig. 2 Response surface and contour results of $Y=f(A,B)$

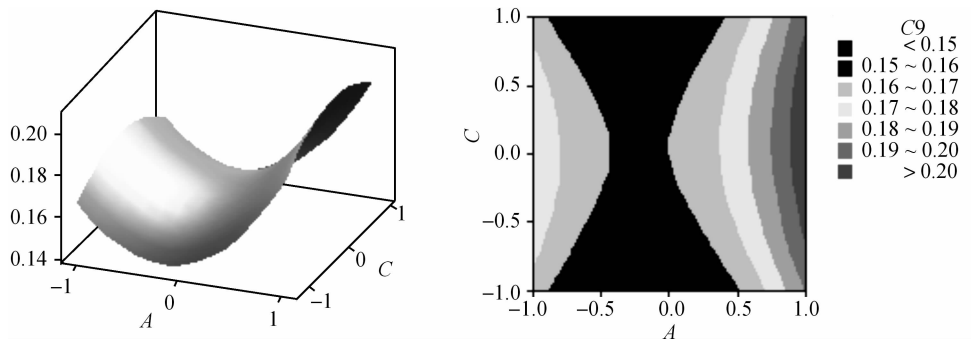
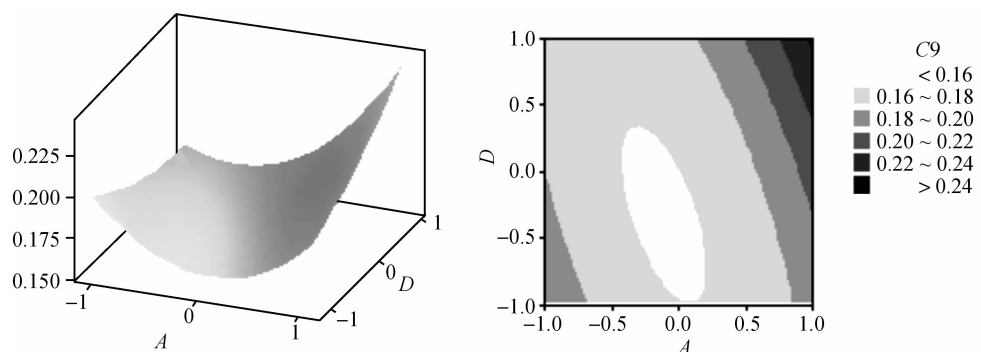
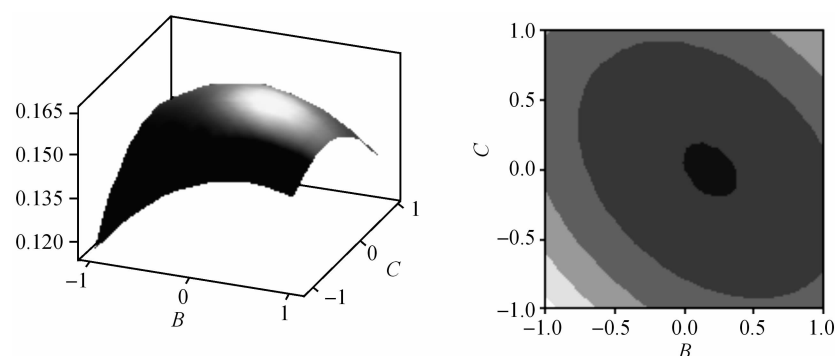
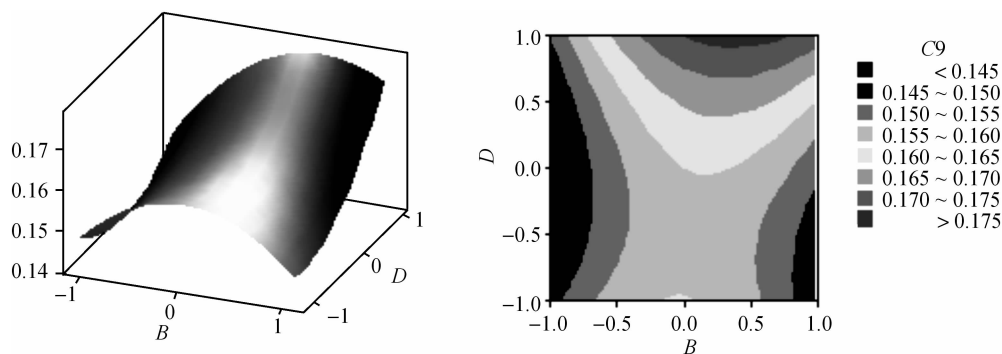
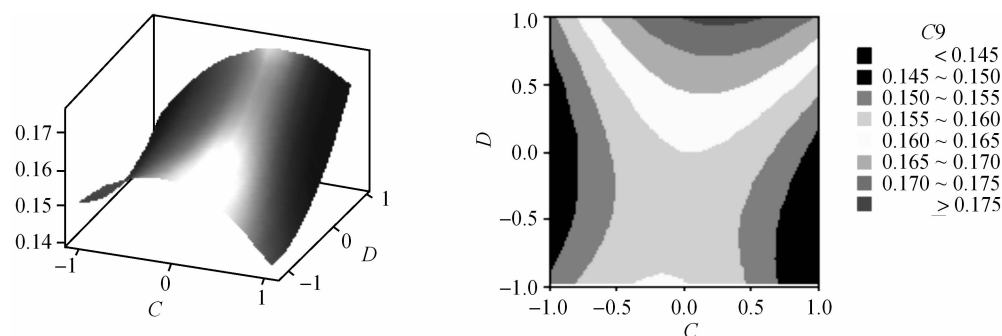


图 3 $Y=f(A,C)$ 的响应曲面图及等值线图

Fig. 3 Response surface and contour results of $Y=f(A,C)$

图 4 $Y=f(A,D)$ 的响应曲面图及等值线图Fig. 4 Response surface and contour results of $Y=f(A,D)$ 图 5 $Y=f(B,C)$ 的响应曲面图及等值线图Fig. 5 Response surface and contour results of $Y=f(B,C)$ 图 6 $Y=f(B,D)$ 的响应曲面图及等值线图Fig. 6 Response surface and contour results of $Y=f(B,D)$ 图 7 $Y=f(C,D)$ 的响应曲面图及等值线图Fig. 7 Response surface and contour results of $Y=f(C,D)$

根据 Minitab 的响应优化器分析可以得图 8,由复合合意性可知设置能够为所有响应获得一个较好的结果,即评定总得分的最优工艺参数为超声功率 286 W,超声温度为 45.2 °C,超声频率为 48.8 kHz,超声时间为 45 min。理论花色苷的得率为 0.248 8 g/100g。

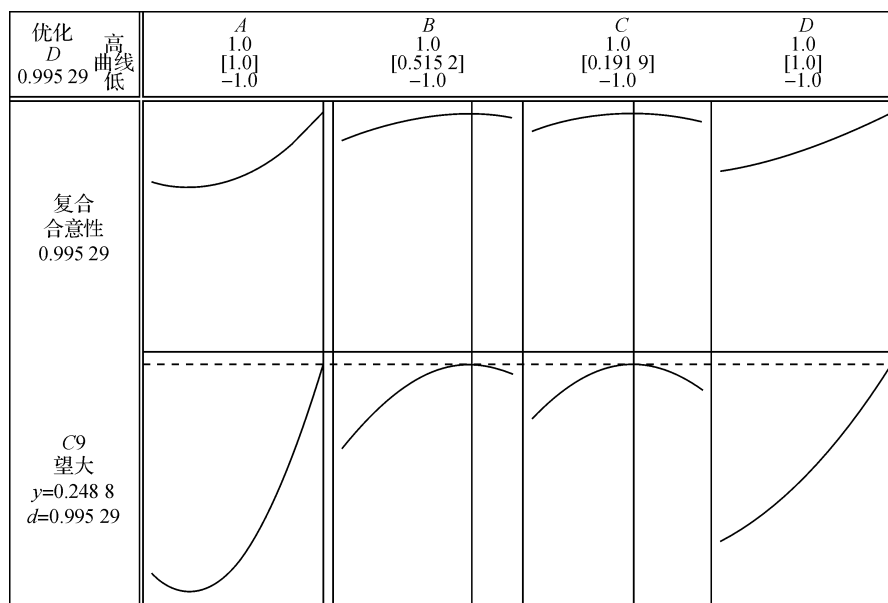


图 8 最优水平分析

Fig. 8 Analysis of optimal level

实验中采用超声波功率 286 W,超声温度 45 °C,超声频率 45 kHz,超声时间为 45 min,萃取紫葡萄皮花色苷,得率为 0.235 g/100g。

3 结 语

利用响应面设计分析得出,紫葡萄最优提取工艺为超声功率 286 W,超声温度为 45.2 °C,超声频率为 48.8 kHz,超声时间为 45 min,花色苷得率为 0.235 g/100g。

参考文献:

- [1] Bridle P, Timberlake C F. Anthocyanins as natural food colours: selected aspects [J]. Food Chemistry, 1997, 58(1/2): 103-109.
- [2] Johanna B, Timberlake C F. The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1985, 36(12): 1315-1324.
- [3] 慕妮, 吴海浩, 顾颖娟, 等. 咖啡酸对紫玉米花色苷的辅色作用研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(5): 58-62.
- [4] 朱振宝, 吴园芳, 易建华. 紫甘蓝花色苷色素稳定性研究 [J]. 粮食与油脂, 2011, 10: 46-49.
- [5] 唐传核, 彭志英. 天然花色苷类色素的生理功能及应用前景 [J]. 食品添加剂, 2000(1): 26-28.
- [6] 方忠祥, 倪元颖. 花青素生理功能研究进展 [J]. 广州食品工业科技, 2001, 17(3): 60-62.
- [7] 焦岩, 王振宇. 蓝靛果花色苷超声波辅助提取优化及其降血脂作用 [J]. 中国食品学报, 2010, 10(2): 54-59.
- [8] 吴素仪, 丘泰球, 范晓丹. 超声波在中草药有效成分提取应用中的研究进展 [J]. 江苏中医药, 2008, 40(7): 93-94.
- [9] 盛桂华, 周泉城. 超声波辅助提取山豆根氧化苦参碱研究 [J]. 农业工程学报, 2008, 24(3): 291-294.
- [10] 徐怀德, 闫宁环, 陈伟, 等. 黑莓原花青素超声波辅助提取优化及抗氧化性研究 [J]. 农业工程学报, 2008, 24(2): 264-269.
- [11] 王萍, 苗雨. 酶法提取黑加仑果渣花色苷的研究 [J]. 林产化学与工业, 2008, 28(1): 113-118.
- [12] Fuleki T, Ricardo da S J M. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in ontario [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1997, 45(4): 1156-1160.
- [13] 徐金瑞, 张名位, 刘兴华, 等. 黑大豆种子抗氧化能力及其与总酚和花色苷含量的关系 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(8): 1545-1552.