

响应面法优化马蹄皮渣中总黄酮的微波提取工艺研究

黄利华¹, 刘欣² (1. 广州城市职业学院食品系, 广东广州 510405; 2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要 [目的]为更好地利用马蹄加工皮渣中的资源,优化马蹄皮渣中总黄酮的微波提取工艺,得到得率较高的黄酮类化合物。[方法]采用 Box-Behnken 中心组合响应面法优化马蹄粉加工皮渣中总黄酮的微波提取工艺,建立了不同影响因素与马蹄总黄酮得率之间的函数关系。[结果]确定最佳提取工艺条件为:乙醇浓度 55.4%,料液比 1:30 g/ml,微波功率 320 W,微波 3 min,在此条件下重复提取 2 次,理论得率为 2.376%,经过验证得到总黄酮得率为 2.365%,实测值与理论预测值之间的相对误差为 0.461%。[结论]研究结果表明,优化得到的提取工艺可靠,可为马蹄加工废弃物的综合高效利用提供参考依据。

关键词 马蹄皮渣;总黄酮;响应面法;微波

中图分类号 S645.3;TS209 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)17-05634-04

Optimization of the Ultrasonic Extraction for the Flavonoids from Water Chestnut Starch Waste Residue by Response Surface Method

HUANG Li-hua et al (Department of Food, Guangzhou City Polytechnic, Guangzhou, Guangdong 510405)

Abstract [Objective] In order to take full advantage of processing by-product of water chestnut, the ultrasonic extraction technology for flavone was optimized, high yield flavone compounds were obtained. [Method] The response surface design of Box-Behnken was used to optimize the ultrasonic extraction technology for flavone from waste residue of water chestnut starch, the functional relation was established between the factors and the total content of flavone. [Result] The optimum conditions for ultrasonic extraction were as follows: the ethanol concentration of 55.4%, the material and liquid of 1:30 g/ml, the ultrasonic rate of 320 W, and the time of 3 min. The extraction process was repeated again. Theoretical value of total flavone is 2.376% in the optimal condition, and the final verification of total flavone is 2.365%. The relative error between the theoretical prediction and actual value is 0.461%. [Conclusion] The results showed that the optimized extraction process is reliable, which can provide reference basis for high efficient utilization of water chestnut waste.

Key words Water chestnut starch; Total flavone; Response surface methodology (RSM); Ultrasound

马蹄也称荸荠,属莎草科多年生浅水草本植物。马蹄的地下球茎,不仅汁多味甜、营养丰富,而且具有一定的药用价值,是优良的药食兼用的果蔬类食品^[1-4]。马蹄在广东已有较大面积种植,是广东特色产业之一。目前除直接食用外,马蹄还可被加工成淀粉、果脯和饮料等产品,其中以马蹄粉产品居多,而马蹄粉加工剩余的皮渣通常被丢弃,没有得到充分利用。虽然近年来,马蹄皮渣资源化利用研究已逐渐受到重视,但其研究主要集中于马蹄皮渣成分分析,工业化利用马蹄皮渣的研究报道较少^[5-6]。

马蹄皮渣中含有丰富的黄酮类化合物,而黄酮类化合物的生理活性作用较为广泛,具有生物抗氧化性、抗衰老、治疗心脑血管疾病、抑菌、清除自由基、降血脂、降血压等药用保健功能^[7-9]。马蹄皮渣提取黄酮类化合物可作为其高值利用的重要途径^[10-11]。笔者以马蹄皮渣为原料,采用微波辅助提取技术对马蹄皮渣总黄酮的提取工艺进行响应面设计,优化各因素技术参数,以期得到得率较高的黄酮类化合物,为高效开发利用马蹄皮渣资源提供参考和指导。

1 材料与方 法

1.1 材料 供试马蹄皮渣为广州市泮塘食品有限公司马蹄粉加工后剩余皮渣,50℃烘干 24 h 后粉碎至 80 目。主要试剂:芦丁为生化试剂;亚硝酸钠、无水乙醇、氢氧化钠、硝酸铝均为分析纯。主要仪器:LG 10-2.4A 离心机;WD 800 型微波炉;RE-52A 旋转蒸发器;U-3010 Spectrophotometer 紫外可见分光光度仪;DWF-100 型电动植物粉碎机。

1.2 方 法

1.2.1 马蹄皮渣总黄酮的测定。以芦丁为对照品,采用络合-分光光度法测定马蹄皮渣中总黄酮得率^[12]。

1.2.1.1 配制芦丁标准液。准确称取 120℃干燥至恒重的标准品 10.0 mg,用体积比 30% 的乙醇液溶解,用 100 ml 容量瓶定容,制得芦丁的标准液。

1.2.1.2 确定检测波长。分别取 5 ml 芦丁标准液和马蹄皮渣总黄酮提取液于 10 ml 容量瓶,加入 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 络合试剂,放置 15 min,利用紫外可见分光光度仪在 400~700 nm 波长范围内扫描,考察两者在哪一个波长同时具有强烈吸收,以此来确定检测波长^[12]。

1.2.1.3 绘制标准曲线。准确吸取 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml 的芦丁标准液,分别置于 10 ml 容量瓶,补充 30% 乙醇至 5 ml,然后先加 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 ml,摇匀,放置 6 min,再加 10% 硝酸铝溶液 0.3 ml,摇匀,再放置 6 min,最后加入 4% 氢氧化钠溶液 4.0 ml,用 30% 乙醇定容至刻度,在波长 510 nm 处测吸光度。以吸光度 A 为横坐标,芦丁浓度 C 为纵坐标,得到标准曲线方程: $C = 0.0831A - 0.00007$,相关系数 $r = 0.9981$,在芦丁浓度为 0~0.05 mg/ml 范围内呈良好的线性关系^[12]。

1.2.1.4 测定马蹄皮渣总黄酮。准确吸取 2 份 1.0 ml 马蹄皮渣总黄酮提取液于 10 ml 容量瓶中,一份不加显色剂,另一份加 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 络合试剂显色,均用 30% 乙醇定容。静置 15 min 后,以未加显色剂的提取液为参比溶液,加入显色剂的提取液为样液,在波长 510 nm 处测定吸光度,利用标准曲线方程计算提取液的总黄酮得率^[9,12]。

1.2.2 马蹄皮渣总黄酮的提取。准确称取 2.0 g 马蹄皮渣

作者简介 黄利华(1979-),女,湖南郴州人,讲师,硕士,从事天然产物提取纯化技术研究。

收稿日期 2014-05-12

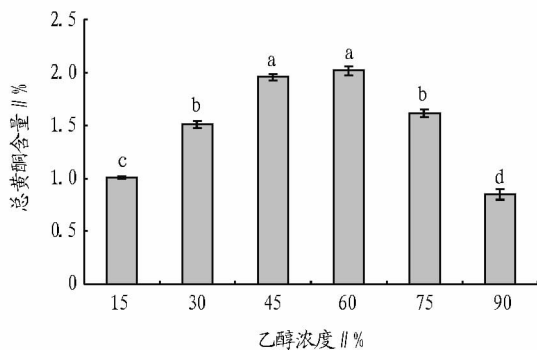
原料,置于 150 ml 锥形瓶中,根据文献方法^[9]进行提取,先进行乙醇浓度、微波时间、料液比、微波功率对马蹄皮渣总黄酮得率影响的单因素试验,根据单因素试验结果进行响应面优化试验,最终获得马蹄皮渣总黄酮的优化提取工艺。马蹄皮渣总黄酮得率根据按“1.2.1.4”中的方法测定。

2 结果与分析

2.1 乙醇浓度对提取效果的影响

将 6 份马蹄皮渣原料(2.0 g/份),置于 150 ml 锥形瓶中,固定料液比为 1:20 g/ml、微波时间为 2.5 min、微波功率为 320 W,分别加入 15%、30%、45%、60%、75% 和 90% 的 6 种不同浓度乙醇溶液。测定提取液的吸光度,比较不同乙醇浓度对马蹄皮渣总黄酮得率的影响。

由图 1 可知,起初随乙醇浓度增加,黄酮类化合物溶解度显著增加($P < 0.05$),在微波场中,乙醇对基体细胞膜的破坏作用要强于水,从而导致更多的总黄酮溶出。但当乙醇浓度大于 60% 时,黄酮类化合物溶解度则随乙醇浓度的增加而逐渐下降。在高醇浓度情况下,一些醇溶性杂质、色素等成分溶出量增加,并与黄酮化合物竞争同乙醇-水分子结合,以致黄酮类物质的得率下降。另外,由于微波炉是个封闭体系,高纯度的乙醇沸点较低,易挥发,使得炉内快速产生大量的乙醇气体,存在安全隐患。因此,以不高于 60% 的乙醇作为研究的上限。



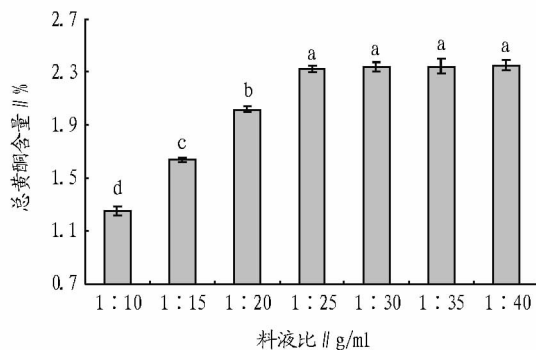
注:图中不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

图 1 乙醇浓度对提取效果的影响

2.2 料液比对提取效果的影响

称取 7 份粉末样品(2.0 g/份),置于锥形瓶中,固定微波时间为 2.5 min、微波功率为 320 W,按照料液比 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40 g/ml 分别加入 60% 的乙醇溶液。测定样品的吸光度,研究不同料液比对总黄酮得率的影响。

由图 2 可知,总黄酮得率随着提取液量的增加而逐渐增大,当料液比达到 1:25 g/ml 后,提取的总黄酮含量进入平台期,继续增加溶剂用量得率几乎没有变化。这是因为溶剂比例的提高加大了溶剂与原料之间总黄酮成分的浓度差,促使原料内部的总黄酮溶出,减少原料内部总黄酮的残留量,因而提高马蹄皮渣总黄酮得率。随着溶剂比例增大,总黄酮得率增加,但当料液比达到 1:25 g/ml 后,因马蹄皮渣中总黄酮已基本提取完全,总黄酮得率趋向稳定,受溶剂比例增加影响不大。在马蹄皮渣总黄酮得率较高情况下,为减少提取成本,以 1:20、1:25 和 1:30 g/ml 作响应面分析法的料液比因素水平。



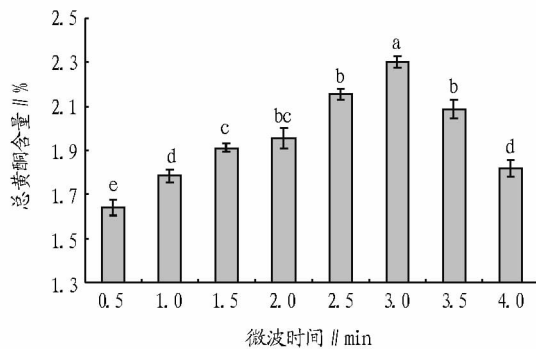
注:图中不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

图 2 料液比对提取效果的影响

2.3 微波时间对提取效果的影响

称取 8 份粉末样品(2.0 g/份),置于锥形瓶中,固定乙醇浓度 60%、料液比 1:25 g/ml、微波功率 320 W,按照 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 min 分别进行微波提取。测定提取液的吸光度,比较微波提取时间变化对马蹄皮渣总黄酮得率的影响。

由图 3 可知,马蹄皮渣总黄酮得率随微波提取时间增加先增大后减小,当微波提取 3.0 min 时得率最大。这是因为当微波提取时间增加时,马蹄皮渣中总黄酮成分及提取溶剂热运动加剧,局部产生极大的热量,导致温度急剧非均匀升高,迅速达到沸点以上,造成内部体积急剧膨胀,在极短时间内使得马蹄皮渣总黄酮所在基体细胞膜破裂,总黄酮成分不断进入溶剂。当微波提取时间过长时,提取环境温度过高,黄酮类物质中某些不耐热的成分分解破坏,提取溶剂挥发损耗,导致总黄酮得率降低。



注:图中不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

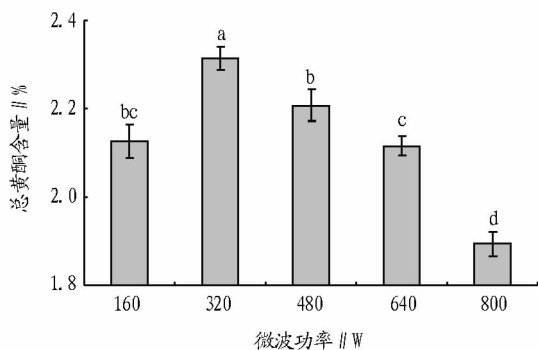
图 3 微波时间对提取效果的影响

2.4 微波功率对提取效果的影响

称取 5 份粉末样品(2.0 g/份),置于锥形瓶中,固定料液比 1:25 g/ml、乙醇浓度 60%,按照 160、320、480、640、800 W 微波功率条件微波提取 3 min,比较微波功率变化对马蹄皮渣总黄酮得率的影响。

由图 4 可知,马蹄皮渣总黄酮得率随微波功率增加先增大后减小,当微波功率为 320 W 时得率最大。这是因为微波功率增加时,料液扩散速度加快,并且功率越高,对马蹄皮渣细胞的破坏性越大,越有利于马蹄皮渣中黄酮类化合物的浸出。但微波功率过高时,提取温度发生较大波动,产生瞬间高温使热不稳定黄酮类化合物分解或部分分解,提取溶剂挥发较快,反而降低马蹄皮渣总黄酮得率。因此,以 160、320

和 480 W 作响应面分析法的微波功率因素水平。



注:图中不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

图4 微波功率对提取效果的影响

2.5 响应面法优化微波辅助提取法工艺 响应面法优化试验方案依据文献^[14-15]设计,以乙醇浓度、料液比和微波功率 3 个因素为自变量,马蹄皮渣总黄酮得率为响应值,采用 3 因素 3 水平的响应面分析方法,响应面设计试验方案见表 1,结果如表 2 所示。共有 15 个试验,其中有 3 个为中心试验,12 个为析因试验。将表 2 的结果用 Design Expert 7.1.3 软件进行编程计算,通过响应面回归 (RSREG) 程序进行数据分析,经二次回归拟合后求得响应函数,即得出回归方程为: $Y(\%) = 2.27 + 0.076A + 0.15B + 0.032C - 0.032AB - 0.013AC - 0.00025BC - 0.025A^2 - 0.061B^2 - 0.089C^2$ 。

表1 响应面法优化马蹄皮渣中黄酮的微波提取试验因素编码水平

编码	因素		
	乙醇浓度(A) // %	料液比(B) // g/ml	微波功率(C) // W
水平			
1	60	1:30	480
0	50	1:25	320
-1	40	1:20	160

表2 Box-benhkn 试验结果

试验号	因素			总黄酮得率 %
	乙醇浓度 (A) // %	料液比 (B) // g/ml	微波功率 (C) // W	
1	60	1:30	320	2.359
2	50	1:20	160	1.912
3	50	1:30	160	2.241
4	50	1:25	320	2.267
5	60	1:20	320	2.144
6	50	1:25	320	2.277
7	60	1:25	160	2.228
8	40	1:25	160	2.037
9	50	1:30	480	2.325
10	50	1:20	480	1.997
11	40	1:30	320	2.285
12	60	1:25	480	2.247
13	40	1:25	480	2.106
14	40	1:20	320	1.943
15	50	1:25	320	2.262

响应面试验的方差分析结果如下: $F_{\text{模型}} = 60.87, P_{\text{模型}} = 0.0001; F_A = 88.81, P_A = 0.0002; F_B = 355.25, P_B < 0.0001;$

$F_C = 15.92, P_C = 0.0104; F_{AB} = 7.78, P_{AB} = 0.0385; F_{AC} = 1.21, P_{AC} = 0.3223; F_{BC} = 4.821E-004, P_{BC} = 0.9833; F_{A^2} = 4.48, P_{A^2} = 0.0879; F_{B^2} = 26.35, P_{B^2} = 0.0037; F_{C^2} = 56.50, P_{C^2} = 0.0007; F_{\text{失拟}} = 14.15, P_{\text{失拟}} = 0.0667$ 。由此可知,马蹄皮渣总黄酮得率的模型回归极显著 ($P = 0.0001$),其中 A、B、C 与 AB、B²、C² 对总黄酮得率的影响是显著的,但是 A²、AC、BC 对总黄酮得率的影响不显著;失拟项不显著,且该模型的 $\text{Adj } R^2 = 0.9747$ 与 $\text{Pred } R^2 = 0.8609$ 比较接近。响应面试验的方差分析结果表明,实际试验与回归方程拟合情况较好,马蹄皮渣总黄酮得率与乙醇浓度、料液比和微波功率之间线性关系显著,三者对马蹄皮渣总黄酮得率的影响大小为:料液比 > 乙醇浓度 > 微波功率。

图 5~7 是根据回归分析结果得出的总黄酮得率响应面图。比较 3 个图可知,料液比对总黄酮得率的影响最大,图形曲面最陡,乙醇浓度对总黄酮得率的影响较小,微波功率对总黄酮得率的影响最不明显。方差分析结果与响应面图形分析结果一致。经过 Design Expert 7.1.3 软件分析得出最佳理论水平,如表 3。

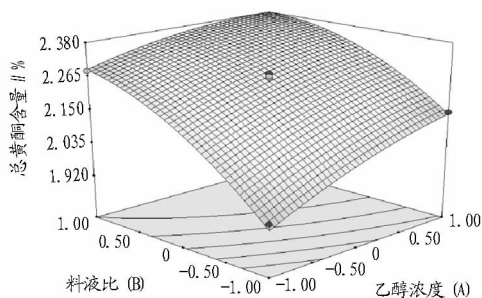


图5 乙醇浓度和料液比对总黄酮得率影响的响应面

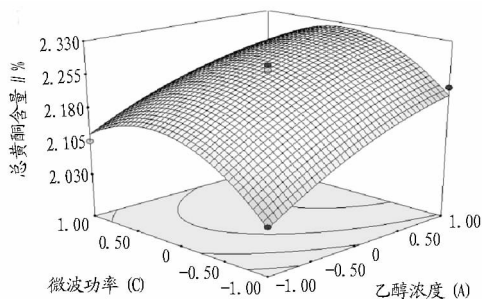


图6 乙醇浓度和微波功率对总黄酮得率影响的响应面

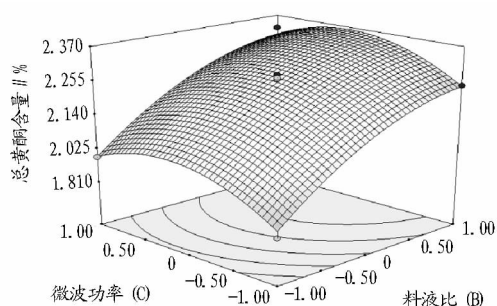


图7 料液比和微波功率对总黄酮得率影响的响应面

表3 响应面预测最优条件

因素	逻辑水平	实际水平
乙醇浓度	0.85	58.5%
料液比	1	1:30 g/ml
微波功率	0.12	339.2 W

以上水平是测出的最佳方案,其预测值为2.380%。但是由于试验条件的限制,按乙醇浓度为58.8%,料液比1:30 g/ml,微波功率320 W进行试验,其预测值为2.379%。为了节约成本该试验选取乙醇浓度55.4%,料液比1:30 g/ml,微波功率320 W,其预测值为2.376%,为该试验条件下最优水平组合。按此最优水平组合工艺验证试验(其他条件与RSM优化试验一致),重复3次,测得实际总黄酮平均得率为2.365%,RSM的理论预测值为2.376%,实测值与理论预测值之间的相对误差为0.461%,说明采用RSM法优化得到的最佳总黄酮得率的提取工艺参数可靠,具有实用价值。

3 结论

以马蹄皮渣总黄酮提取得率为指标,在单因素试验基础上,根据Box-Behnken的中心组合试验设计原理,运用Design Expert 7.1.3软件进行编程计算,采用3因素3水平的响应面分析法优化微波提取马蹄皮渣总黄酮的工艺,得到马蹄皮渣总黄酮的最佳提取条件为:乙醇浓度为55.4%,料液比1:30 g/ml,微波功率320 W,微波3 min,同条件提取2次,在此条件下总黄酮得率为2.365%。与传统的浸提法相比,微波辅助萃取植物有效成分,是利用不同结构物质在微波场中吸收微波能力的差异,使机体物质中某些区域或萃取体系中某些成分选择性加热,从而使被萃取物质从基体或体系中分离,

(上接第5606页)

波顶高8 km,垂直累积液态水含量8~13 kg/m²,17:00之后,回波强度明显减弱,大片层状云回波中镶嵌个别积状云回波,回波顶高降低至5 km左右,垂直累积液态水含量减小为1~5 kg/m²,降水转为以层状云降水为主的积云层状云混合降水,这与卫星云图的分析结果一致。

4 小结

(1)在“两槽一脊”的环流背景下,短波槽引导低层西北涡北上,地面倒槽不断发展加强,是造成2013年6月15日河套地区入夏一次强降水的主要影响系统。

(2)较强的水汽输送和强烈的水汽辐合是出现河套地区大雨的原因之一。正涡度平流和暖平流对河套地区上升运动的产生和维持提供了有利的动力条件。高层辐散、低层辐合的垂直环流机制,为强降水的发生提供了有利的上升运动条件。

(3)降水过程中,河套地区大气层结始终处于对流不稳定状态, K 指数 ≥ 36 °C、 J_{conv} < 0的区域与降水落区一致,可作为以后预报的参考依据。

(4)在一定条件下,喇叭口地形可以加强上升运动并使

是一种新型现代提取技术,具有保护活性成分、时间短、速度快、萃取率高、安全节能等优点,具有良好的应用前景^[9]。

参考文献

- [1] 蔡健,姚芹,黄胜惠,等. 荸荠黄酮提取技术研究[J]. 食品科学,2008,29(8):181-183.
- [2] BRUNO R C, ANA S A, ANDRÉ M L, et al. Chemical composition and functional properties of native chestnut starch (*Castanea sativa* Mill)[J]. Carbohydr Polym,2013,94(1):594-602.
- [3] 罗杨合,黄皓妍,韦飞梅,等. 超声波辅助提取荸荠皮天然棕色素的工艺研究[J]. 应用化工,2008,37(9):999-1005.
- [4] 罗杨合,陈振林,谢复青,等. 马蹄皮棕色素的微波提取工艺研究[J]. 中国调味品,2009,34(1):92-99.
- [5] YADAV B S, GULERIA P, YADAV R B. Hydrothermal modification of Indian water chestnut starch: Influence of heat-moisture treatment and annealing on the physicochemical, gelatinization and pasting characteristics[J]. Food Sci Technol,2013,53(1):211-217.
- [6] MEI J, YUAN Y L, GUO Q Z, et al. Characterization and antimicrobial properties of water chestnut starch-chitosan edible films[J]. Int J Biol Macromol,2013,61:169-174.
- [7] 黄琼,陈薇,田玉红,等. 超声波辅助提取龙须藤总黄酮及其抗氧化活性的研究[J]. 食品科技,2013,38(5):224-227.
- [8] 刘晓艳,张伟良,陈海光,等. 荸荠皮中黄酮类物质的提取及抑菌特性研究[J]. 广东农业科学,2012(12):109-112.
- [9] 徐墨. 荷叶中黄酮类化合物的提取、分离纯化工艺及其抗氧化性研究[D]. 武汉:武汉理工大学,2008.
- [10] 崔福顺,李官浩,金清,等. 响应面法优化超声辅助提取人参茎叶总黄酮的工艺研究[J]. 食品科技,2013,38(8):252-256.
- [11] 杨鹏,巨敏,朱沛沛,等. 正交优化微波辅助提取枸杞中总黄酮的工艺研究[J]. 食品工业,2012(1):28-30.
- [12] 罗杨合,韦学丰,解庆林. 可见分光光度法测定马蹄皮中总黄酮的含量[J]. 食品研究与开发,2009,30(6):135-138.
- [13] 甘正伟,陈学泽. 香薷总黄酮化合物提取工艺研究[J]. 食品与机械,2012,28(2):135-138.
- [14] 王志兵,王力,姜海峰,等. 返魂草总黄酮的微波提取及响应面优化[J]. 食品工业,2012(3):3-6.

降水时间延长。

(5)初始阶段的对流性降水主要由不断生成和消亡的中尺度对流云团活动所致,雷达回波显示,前期降水主要是积状云降水,后期降水转为以层状云降水为主的积云层状云混合降水。

参考文献

- [1] 李金田,张喜林. 巴彦淖尔市农牧业气候资源与区划[M]. 北京:科学普及出版社,2006:37.
- [2] 北京大学地球物理系气象教研室. 天气分析和预报[M]. 北京:科学出版社,1976.
- [3] 文宝安. 水汽通量与水汽通量散度[J]. 气象,1980(7):34-36.
- [4] 朱乾根,林锦瑞,寿绍文,等. 天气学原理与方法[M]. 3版. 北京:气象出版社,1992.
- [5] 李明,张涛,魏杰平. 2008年初夏孝感一次大暴雨天气过程的分析与诊断[J]. 暴雨灾害,2009,28(1):51-57.
- [6] 张端禹,张兵,钟敏. 对2005年9月鄂东一次连续大暴雨的诊断分析[J]. 暴雨灾害,2007,26(1):52-56.
- [7] 刘健文,郭虎,李耀东,等. 天气分析预报物理量计算基础[M]. 北京:气象出版社,2005:85.
- [8] 施望芝,毛以伟,谌伟,等. 台风“云娜”降水云区中单站大暴雨诊断分析和预报[J]. 暴雨灾害,2007,26(1):47-51.
- [9] 林之光. 地形降水气候学[M]. 北京:科学出版社,1995.
- [10] 杨金锡,冯志娟. 9403强热带风暴致暴雨Tbb特征分析[J]. 气象科学,1996,16(4):378-382.