

水蜡树果中原花青素的最佳提取工艺研究

徐亚维, 于晓明, 张 欣

(吉林农业科技学院 生物工程学院, 吉林 吉林 132101)

摘 要: 在单因素实验的基础上, 采用正交 $L_9(3^4)$ 设计, 研究提取温度、提取时间、提取剂、料液比对水蜡树果原花青素提取率的影响。结果表明: 温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 料液比 $1:10$, 时间 40 min , 乙醇浓度 60% 提取时, 原花青素的含量最高, 可达 2.413% ; 对原花青素提取率的影响作用大小顺序为提取剂 $>$ 提取时间 $>$ 提取温度 $>$ 料液比。

关键词: 水蜡树果; 原花青素; 提取; 纯化

中图分类号: Q 949.776.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)22-0045-03

原花青素(Procyanidins, PC)是植物中广泛存在的一大类多酚化合物的总称, 属于缩合鞣质或黄烷醇类^[1-3]。具有抗氧化、抗突变、抗癌细胞等多种药理活性, 能扩张血管和保持血管弹性、提高毛细血管的抗力、增加肝供血、提高肾排泄能力、增加造血细胞活动、减少骨质疏松症、保护皮肤、减少肾结石等^[4-6]。

我国的水蜡树果资源丰富, 主要集中在公路两边用来绿化的冬青等植物上, 原料极为广泛, 且水蜡树果中含有大量的原花青素。若将其中的原花青素开发出来不但可将其变废为宝, 而且将会为我国保健品事业带来巨大的经济效益, 但目前还未见关于水蜡树果中原花青素的报道。现以水蜡树果原花青素的最优提取工艺进行筛选研究, 为水蜡树果原花青素的结构研究和功能分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水蜡树果经 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干、粉碎过 40 目筛备用。

1.2 试剂与主要仪器

无水乙醇、甲醇、浓硫酸、香草醛、石油醚、乙酸乙酯等, 均为分析纯; AB-8 吸附树脂。722 型可见分光光度计, JA1203N-分析天平, OK-S26 恒温水浴锅, 水式循环真空泵, 粉碎机, GL-20G 离心机, 202-1A 型电热恒温干燥箱。

1.3 试验方法

1.3.1 原料的预处理 将采摘来的水蜡树果放入烘箱中干燥, 用粉碎机粉碎, 备用。

1.3.2 溶剂的选择 原花青素为极性物质, 要选用极性

溶剂进行提取。常用的溶剂是水、甲醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮等溶剂。在选择溶剂时需考虑下列 3 个因素: 溶解度: 对目的物质的溶解度应尽量大, 而对杂质的溶解度应尽量小; 稳定性: 不与目的物质发生化学变化(包括成键或成缔合状态); 经济性: 应是价格低廉、使用安全, 而且最终浓缩方便。此外, 尚需考虑溶剂的易燃、易爆、易腐蚀等方面的问题。所以该试验采用乙醇做提取剂。

1.3.3 原花青素的提取 称取 4.0 g 水蜡树果干燥粉末, 加入不同体积分数的乙醇溶液, 在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴中浸提 30 min 。将提取液在 $4\text{ }300\text{ r/min}$ 条件下离心 10 min , 取上清液, 加入石油醚萃取, 弃醚相加入乙酸乙酯, 震荡摇动充分萃取, 得到原花青素的粗品。

1.3.4 原花青素的纯化 将原花青素的粗品加入蒸馏水溶解, 用 AB-8 吸附树脂在层析柱中进行动态吸附, 用 4 倍体积的去离子水洗脱柱子, 然后用洗脱液洗脱柱子, 得纯度较高的原花青素洗脱液, 干燥得纯度较高的原花青素干品^[7,8]。

1.3.5 原花青素的检测 原花青素的含量测定采用香草醛浓硫酸法^[9-11]: 取 1 mL 原花青素稀释液加入 5 mL 显色剂室温显色 20 min , 以 60% 乙醇代替原花青素稀释液做空白对照, 在 500 nm 处测其吸光度。显示剂: 1% 香草醛甲醇溶液 : 10% 硫酸甲醇溶液 = $1:1$, 现配现用。

1.4 试验设计

原花青素的提取率主要受料液比、提取剂、温度和时间的影响, 试验采用单因素和正交实验进行工艺条件的优化。

1.4.1 单因素试验 在温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 提取时间为 40 min , 提取剂为 60% 乙醇溶液时, 料液比选择为 $1:5$ 、 $1:10$ 、 $1:15$ 、 $1:20$ 和 $1:25$; 在料液比为 $1:10$, 温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 提取时间为 40 min , 提取剂乙醇溶液浓度分别为

第一作者简介: 徐亚维(1974), 女, 吉林人, 在读博士, 讲师, 现从事生物技术研究工作。E-mail: xuyaweilucky@163.com。

收稿日期: 2010-08-30

40%、40%、60%、70%、80%；在料液比为 1 : 10 温度为 60℃ 提取剂为 60%乙醇溶液时,提取时间分别为 20、30、40、50、60 min; 在料液比为 1 : 10, 提取时间为 40 min, 提取剂为 60%乙醇溶液时,提取温度分别为 40、50、60、70、80℃;用香草醛硫酸法测原花青素的含量,研究各因素对原花青素提取率的影响,选取最佳提取条件。

1.4.2 正交实验 据文献报道,影响原花青素提取率的因素很多,如溶剂种类、溶剂浓度、提取时间、提取温度、料液比、粉碎粒度、提取次数等。但在选定溶剂的前提下,影响因素主要是溶剂浓度、提取时间、提取温度、料液比 4 因素。因此试验在单因素试验的基础上,以四因素三水平设计 $L_9(3^4)$ 正交实验,3 次重复,确定最佳的提取条件组合,考查原花青素得率,以优化提取工艺。因素水平安排见表 1。

表 1 正交实验因素水平				
水平	A: 料液比	B: 温度 /℃	C: 提取时间 /min	D: 乙醇浓度 /%
1	1 : 10	50	30	50
2	1 : 15	60	40	60
3	1 : 20	70	50	70

2 结果与分析

2.1 曲线方程

由标准曲线图得出吸光度与原花青素浓度的回归

方程为: $y=3.9399x-0.021$, $R^2=0.9998$ (y —吸光度值 x —原花青素浓度, R^2 —正系数)。

2.2 单因素实验

2.2.1 乙醇浓度的选择 如图 1 所示,用 60%、70%、80%的乙醇提取,原花青素提取率相对较高,70%和 80%提取效果非常接近,略低于 60%乙醇提取率;当乙醇浓度为 40%和 50%时,由于乙醇浓度低造成溶解度小,溶液中原花青素的含量低,因而提取率较低;但乙醇浓度过高时,提取率略有降低且浪费了试剂,因而以 60%的乙醇提取效果最好。

2.2.2 提取温度的选择 温度主要影响分子的热运动,温度低时,分子运动缓慢,溶解度随着温度的增加而增加,当温度过高时,溶液的氧化速度过快,从而影响原花青素的提取率。如图 2 所示,不同温度的提取效果依次为 60℃ > 70℃ > 80℃ > 50℃ > 40℃,因而选择 60℃ 较好。

2.2.3 料液比的选择 如图 3 所示,料液比增大,溶液溶解得相对充分,因而提取率增大,但当料液比达到一定时将不再增大,此时应为料液比的最佳条件。料液比从 1 : 5 到 1 : 25,提取率有较大幅度增加,超过 1 : 10 后,直至 1 : 25,提取率随着料液比的增加缓慢下降,但原花青素的含量降低较小,但从成本角度考虑,选择料液比为 1 : 10 较好。

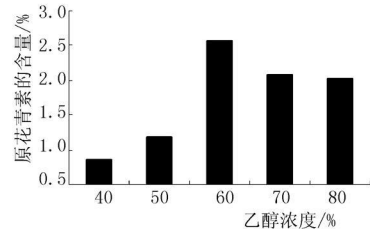


图 1 乙醇浓度试验

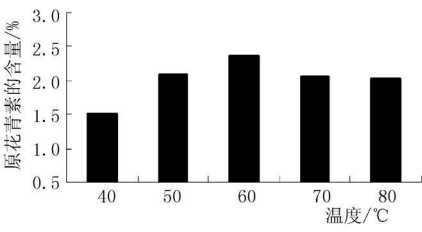


图 2 提取温度试验

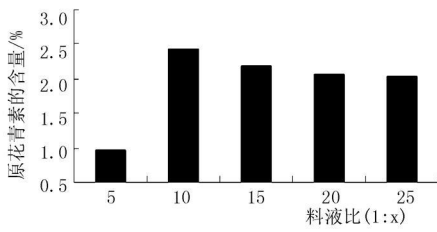


图 3 料液比试验

表 2 正交实验设计及极差分析					
	A	B	C	D	原花青素的含量 /%
1	1	1	1	1	1.700
2	1	2	2	2	2.413
3	1	3	3	3	2.117
4	2	1	2	3	2.220
5	2	2	3	1	1.853
6	2	3	1	2	2.023
7	3	1	3	2	2.203
8	3	2	1	3	1.990
9	3	3	2	1	1.863
K1	6.230	6.123	5.713	5.416	
K2	6.096	6.256	6.496	6.639	
K3	6.056	6.003	6.173	6.327	
k1	2.068	2.040	1.904	1.805	
k2	2.032	2.085	2.165	2.213	
k3	2.019	2.001	2.058	2.109	
R	0.049	0.084	0.261	0.408	

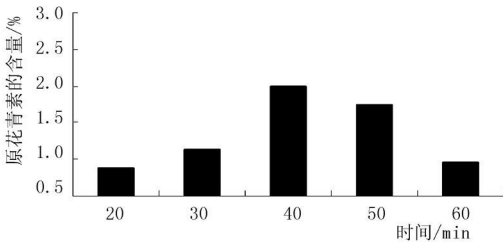


图 4 提取时间试验

2.2.4 提取时间的选择 不同提取时间的提取效果从 20~60 min 不同,但从 20 min 到 30 min 再到 40 min 的增加量已经达到最大,50 min 和 60 min 原花青素的提取率反而下降,因此选择 40 min 即可,如图 4 所示。时间过短,溶解不充分;时间过长,氧化速度过高,影响提取率。

2.3 正交实验结果

由表 2 的正交实验及极差分析结果可见, 温度 60℃、料液比 1 : 10, 时间 40 min, 乙醇浓度 60% 提取时, 原花青素的含量最高, 可达 2. 413%。对原花青素提取率的影响作用大小顺序为提取剂> 提取时间> 提取温度> 料液比; 理论最优提取组合是 A₁B₂C₂D₂。

3 结论

正交实验中理论最优提取组合是 A₁B₂C₂D₂, 与单因素试验的最佳提取工艺条件相吻合, 即提取温度 60℃、料液比 1 : 10, 时间 40 min, 乙醇浓度 60%。该试验为水蜡树果的开发研究提供一定的参考价值, 也为原花青素的提取提供参考数据。

参考文献

[1] 张长贵, 董加宝. 原花青素及其开发应用 [J]. 四川食品与发酵, 2006, 42(1): 8-10.
[2] 吕丽爽. 葡萄籽中低聚原花青素的抗氧化性的研究 [J]. 食品科技, 2000(4): 41-43.

[3] 刘丽萍, 赵祥瑞, 刘建军. 葡萄籽原花青素的功能及提取工艺 [J]. 食品与药品, 2006 12(8): 17-21.
[4] 田云, 卢向阳, 易克, 等. 天然植物抗氧化剂研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(3): 468-470.
[5] 徐璐, 郑建仙. 松树皮提取物的研究进展 [J]. 食品工业, 2005(4): 36-38.
[6] 赵平, 宋学娟. 葡萄籽原花青素含量测定 [J]. 河北化工, 2007 30(1): 46-48.
[7] 王建基, 李汝雄. 国外对寡聚原花青素的研究与应用 [J]. 现代化工, 2002, 22: 91-94.
[8] 奚洪民, 邹宪芝, 刘进邦. 葡萄籽中低聚原花青素研究进展 [J]. 化学世界, 2005(12): 759-762.
[9] 李春阳, 许时婴, 王璋. 从葡萄废弃物中提取分离多酚类生物活性物质 [J]. 食品科技, 2004(6): 88-92.
[10] 李春阳, 许时婴, 王璋. 从葡萄籽中提取分离原花青素的研究 [J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2004(4): 20-23.
[11] 吕丽爽, 潘道东. 微波对葡萄籽中低聚原花青素(OPCs)提取的影响 [J]. 食品与机械, 2004 20(6): 31-32.

Study on Extracting Procedure of Proanthocyanidins from Water Wax Trees Fruit

XU Ya-wei, YU Xiao-ming, ZHANG Xin

(Jilin Agricultural Science and Technology College of Bioengineering, Jilin, Jilin 132101)

Abstract: In the single-factor test on the basis of the orthogonal L₉ (3⁴) design, the effect of extraction temperature, extraction time, extractant, ratio of material to liquid on extraction yield of proyanidins were studied. The results showed that the effects of alcohol concentration was the order of extractant> extraction time> extraction temperature> ratio of material to liquid, the optimal extraction process used for the 60% extractant ethanol in the next 60℃ extraction of raw materials and the use of ethanol than 1 : 10.

Key words: water wax trees fruit; original anthocyanidin; extraction; purification

1 储前准备

由于蔬菜种子粒小、重量轻, 极易黏附虫卵、杂草籽及残叶、碎秸秆等, 这样种子在储藏期间很容易吸潮, 还会传播病虫害。因此蔬菜种子在入库前必须精选加工, 以提高种子净度。为减少病菌、虫卵, 应从无病虫株采种。可采用筛选的方法, 即选用适宜型号的圆孔或长孔筛子进行过筛, 清除秸秆、瘪粒和其它杂质。种子的含水量大小是种子储藏年限的重要因素。种子的含水量小, 其呼吸作用、生理活性就会受到抑制, 从而使种子能安全储藏。菜农需要选择几个无风的天气对种子进行晾晒, 使含水量达到安全水平以下。

2 储藏方法

2.1 堆垛储藏法

留种数量较多的品种可用麻袋包装, 按品种堆垛储藏, 每堆下面应有垫板, 以利通风。堆垛高度一般不宜超过 6 袋, 细小种子不宜超过 3 袋, 隔一段时间要翻动一下。否则, 底层种子易被压伤, 降低发芽率。

2.2 高吊储藏法

如种子带荚或整枝储藏时, 要将收获后的蔬菜种子捆扎成

把, 挂在阴凉通风处, 用时采摘脱粒; 种子直接储藏时, 需晾干透后用纱布缝制的小布袋盛装, 并把布袋吊于通风阴凉的屋顶下, 这样不仅增强通透性, 便于种子呼吸, 而且不易使种子受潮变质。

2.3 密封储藏法

对留存的少量种子可放在纸袋或布袋里, 然后存于玻璃瓶或塑料桶内。在容器底部要放上生石灰、木炭等干燥剂, 上放种子袋, 然后加盖密闭, 放在阴凉干燥处。

3 需要注意的问题

要用麻袋、编织袋、布袋等包装种子, 千万不要用塑料袋包装。控制好储藏期间的温湿度。温度以 20~25℃、空气相对湿度保持在 60% 以下为宜。地面上用砖头或圆木等垫高 30 cm 以上, 并要远离墙壁 30 cm 左右。夏秋季节气温过高时, 早晚要注意通风, 降低室温, 阴雨天气要关闭门窗, 防止潮气进入。要防止品种混杂。蔬菜品种繁多, 种子外形有的非常相似, 尤其是同一种蔬菜的不同品种, 它们的种子更是无法区别。因此, 在收获、脱粒、翻晒时要防止混杂, 包装容器和加工用具均需清理, 储藏时要内外挂标签, 分别放置。蔬菜种子要同农药、化肥等分开储藏。存放的种子要远离火炉, 防止烟气熏蒸。

蔬菜种子安全储藏方法