

紫甘蓝花青苷提取工艺及抗氧化性研究

党 娅^{1,2,3,4}, 刘 水 英¹

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西理工学院 秦巴蓝莓研究所, 陕西 汉中 723000; 3. 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000; 4. 陕西省黑色有机食品工程技术研究中心, 陕西 汉中 723000)

摘 要:以新鲜紫甘蓝为试材,在单因素试验的基础上,采用响应面法对紫甘蓝花青苷的提取工艺进行了优化试验,并对紫甘蓝花青苷的抗氧化性进行了研究。结果表明:4个单因素对响应值的影响大小顺序为:D(提取时间)>A(提取温度)>B(乙醇浓度)>C(料液比);紫甘蓝花青苷提取的最佳工艺条件为提取温度 64℃,提取时间 3.4 h,乙醇浓度 58%,料液比 1:10 g/mL。在最佳提取条件下,花青苷的平均得率:109.873 mg/g, RSD<5%,与理论值(110.243 mg/g)的相对误差为 0.34%。紫甘蓝花青苷抗氧化性试验研究表明,紫甘蓝花青苷对·OH 和 O₂⁻ 均有较好的清除效果,且在一定浓度范围内对这 2 种活性自由基的清除率与紫甘蓝花青苷的浓度呈正相关变化。总抗氧化活性试验结果表明,当紫甘蓝花青苷和维生素 C 的浓度相同时,其各自的总抗氧化活性及变化趋势相同,没有显著差异。

关键词:紫甘蓝;花青苷;提取工艺;抗氧化性

中图分类号:S 635.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)01-0128-09

紫甘蓝(*Brassica oleracea* L.)属十字花科芸薹属,又称紫包菜、紫卷心菜^[1-4],是甘蓝种的一个变种、结球甘蓝中的一个类型。通体呈紫红色,色素含量高^[5-6]。目前在我国已有一百多年的种植历史,种植技术成熟、种植成本低且种植面积广,产量高、价格低廉,是提取花青苷的理想原料^[7-8]。花青苷是一种黄酮类多酚化合物,广泛存在于植物的花、果实、茎叶及根中^[9]。花青苷不仅是一种天然食用色素物质,而且对人体具有多种保健功能,如抗氧化及清除自由基功能、抗癌活性、抗突变活性、抗炎、预防糖尿病、减肥、护肝胃等^[10-12]。在食品、医药、化妆品等方面均有着较大的应用潜力^[13]。同时紫甘蓝花青苷抗氧化性试验研究表明紫甘蓝花青苷对·OH 和 O₂⁻ 均有较好的清除效果,且在一定浓度范围内对这 2 种活性自由基的清除率与紫甘蓝花青苷的浓度呈正相关变化。总抗氧化活性试验结果表明,当紫甘蓝花青苷和维生素 C 的浓度相同时,其各自的总抗氧化活性及变化趋势相同,没有显著差异。因此,该试验以紫甘蓝为试材,对花青苷提取工艺进行了研究,确定了最佳提取

条件,旨在为紫甘蓝花青苷的进一步研究与开发奠定试验研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料:景东紫甘蓝购买于陕西省汉中市华润万佳超市。

药剂:矢车菊素-3-葡萄糖苷标准品, Sigma 公司;番红花红、乙二胺 4 乙酸二钠、三羟基甲烷、邻苯三酚、维生素 C(分析纯),购于西安化学试剂厂;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇、盐酸、浓硫酸、硫酸钠,均为分析纯购于天津市富宇精细化工有限公司。

仪器:UV-2550 型紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;AUY220 型分析天平,日本岛津公司;RE-52A 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;LC-800 离心机,科大创新股份有限公司;DZF6050 真空干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;HH-S4 型电热恒温水浴锅,北京科伟永兴仪器有限公司;pHs-3C 型精密酸度计,上海大普仪器有限公司;中草药粉碎机,天津泰斯特仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 紫甘蓝花青苷提取工艺流程 紫甘蓝→清理、洗净→打浆→提取→离心→过滤→取上清液→花青苷粗提液→定容→UV-可见分光光度计测定吸光度→计算紫甘蓝花青苷得率。

1.2.2 紫甘蓝花青苷得率测定 矢车菊素标准品溶液

第一作者简介:党娅(1976-),女,硕士,讲师,现主要从事生物资源开发应用等研究工作。E-mail:dangya@snut.edu.cn.

基金项目:陕西省科技统筹创新工程计划资助项目(2014KTCL02-18);汉中市科技统筹创新工程计划资助项目(2014ZKC47-05)。

收稿日期:2014-09-09

的配制:准确称取经 105℃ 干燥至恒重的矢车菊素标准品 1.06 mg,置于 25 mL 容量瓶中,用酸性乙醇(50%乙醇:柠檬酸=80 mL:4.0 g)溶解、摇匀,定容得矢车菊素母液。取 2.5 mL 定容至 25 mL 容量瓶中,摇匀后,分别吸取母液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 分别置于 1~7 号 25 mL 容量瓶中,用提取溶剂定容待测。标准工作曲线的绘制:以 1 号 25 mL 容量瓶中的溶剂为参比,在 200~780 nm 波长范围内对样品测试扫描,确定样品最大吸收波长,采用 UV-2550 型紫外-可见分光光度计,选取 1 cm 比色皿,在最大吸收波长处分别测定 1~7 号矢车菊素样品的吸光度。以矢车菊素的浓度(mg/L)为 X 轴,以吸光度为 Y 轴绘制矢车菊素测定工作曲线。经线性回归处理得到花青苷标准曲线方程: $y=0.1726x-0.0017$ 。式中, x 为花青苷浓度,单位 mg/L, y 为 530 nm 处的吸光度, $R^2=0.9999$ (图 1)。花青苷含量计算方程式:根据矢车菊素工作曲线绘制所取得的数据,用最小二乘法作线性回归,得矢车菊素浓度与吸光度的关系曲线回归方程式为 $Y=0.1726X-0.0017$,相关系数为 $R^2=0.9999$ 。则,花青苷含量计算方程式为:花青苷含量 $X=(Y+0.0017)/0.1726$ 。式中, X 为花青苷测试样的浓度(以矢车菊素计)单位 mg/L; Y 为花青苷测试样吸光度值。准确移取 1 mL 花青苷粗提液并用提取剂稀释定容至 10 mL。以提取剂作为对照,UV-2550 紫外分光光度计最大吸收波长处测定吸光值,根据标准曲线得到相应花青苷浓度。按照公式计算得率:紫甘蓝花青苷得率(mg/g)=浓度×稀释倍数×色素液体积/紫甘蓝质量。

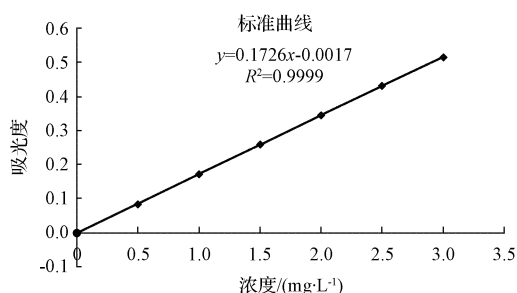


图 1 矢车菊素标准曲线

Fig. 1 Cornflower standard curve

1.2.3 提取溶剂的选择 花青苷在酸性条件下稳定,因此以酸性乙醇为提取剂。花青苷可作为食品添加剂使用,也可作为保健品的原料,因此用食品级柠檬酸来配置酸性乙醇。用量筒量取 50%的乙醇 4 份各 20 mL,依次加入柠檬酸(食品级)0.5、1.0、1.5、2.0 g,摇匀待用。准确称取 4 份新鲜紫甘蓝各 5 g,经清洗、打浆、转入 4 个磨口锥形瓶中,摇匀,均在 60℃ 下恒温水浴回流提取 3 h,过滤提取液。分别取滤液 1 mL,稀释 10 倍,测定不

同比例酸性乙醇提取花青苷得率。

1.2.4 紫甘蓝花青苷提取单因素试验 称取一定量紫甘蓝以酸性乙醇为提取剂(50%乙醇:柠檬酸=80:4.0 mL:g),选择提取温度、提取时间、乙醇浓度、料液比 4 个单因素,分别在 4 个不同水平测定花青苷得率。根据单因素试验得率结果确定进一步优化因素。提取温度:准确称取新鲜紫甘蓝 4 份各 5 g,切碎,转入 5 个磨口锥形瓶中,分别加入上述配置好的酸性乙醇提取液 40 mL,摇匀,在料液比为 1:8 g/mL,提取时间为 30 min,设置温度梯度为:40、50、60、70、80℃ 的条件下,水浴回流提取离心,计算花青苷的得率。考察不同提取温度对花青苷得率的影响。提取时间对紫甘蓝花青苷提取的影响:准确称取新鲜紫甘蓝 4 份各 5 g,切碎,转入 5 个磨口锥形瓶中,分别加入上述配置好的酸性乙醇提取液 40 mL,摇匀,在料液比为 1:8 g/mL,提取温度为 60℃、设置时间梯度为 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 h 的条件下,水浴回流提取离心,计算花青苷的得率。考察不同提取时间对花青苷得率的影响。乙醇浓度对紫甘蓝花青苷提取的影响:准确称取新鲜紫甘蓝 4 份各 5 g,切碎,转入 5 个磨口锥形瓶中,分别加入上述配置好的酸性乙醇提取液 40 mL,摇匀,在料液比为 1:8 g/mL,提取温度为 60℃、设置乙醇浓度梯度为:50%、60%、70%、80%、90% 的条件下,水浴回流提取离心,计算花青苷的得率。考察不同乙醇浓度对花青苷得率的影响。料液比对紫甘蓝花青苷提取的影响:准确称取新鲜紫甘蓝 4 份各 5 g,切碎,转入 5 个磨口锥形瓶中,分别加入上述配置好的酸性乙醇提取液 40 mL,摇匀,乙醇浓度 60%,50℃ 水浴浸提,提取时间为 40 min,料液比梯度设置为 1:2、1:4、1:6、1:8、1:10 g/mL,水浴回流提取离心,计算花青苷的得率。考察不同物料比对花青苷得率的影响。

1.2.5 响应面试验设计 根据 Box-Behnken 模型的中心组合试验设计原理,采用 4 因素 3 水平的响应曲面分析法,选取乙醇浓度、提取时间、提取温度、料液比为自变量,分别以 x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 来表示,并以 1、0、-1 分别代表各自的高中低水平,以花青素的得率为响应值,依据回归分析确定较优的提取工艺条件。响应面试验影响因素水平与编码见表 1。

表 1 响应面试验因素水平及编码

Table 1 The response surface experiment factors level and coding

因素	水平及编码		
	-1	0	1
A 乙醇浓度/%	50	60	70
B 提取温度/℃	50	60	70
C 料液比	6	8	10
D 提取时间/h	2	3	4

1.2.6 抗氧化性试验 为了综合评价紫甘蓝花青苷的抗氧化活性,该试验的抗氧化性试验部分主要包括清除 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 和总抗氧化活性3个部分试验。以紫甘蓝花青苷最佳提取工艺及参数提取得到的紫甘蓝花青苷提取液作为抗氧化活性试验材料^[14]。用Fenton氧化法测定清除 $\cdot\text{OH}$ 的试验^[15-16],邻苯三酚自氧化法测定清除 O_2^- 的试验^[17-18],磷钼络合物法测定总抗氧化活性试验^[19]。Fenton氧化法清除 $\cdot\text{OH}$ 试验:当 OH^- 中原有的1对电子失去其中1个之后便形成了 $\cdot\text{OH}$ 自由基,所得到的 $\cdot\text{OH}$ 只含有一个单电子故而化学性质活泼具有很强的氧化力,极易从别的物质中获得1个电子。在生物体内可引起不饱和脂质及生物大分子的过氧化、破坏生物膜结构使其失去原有活性。紫甘蓝花青苷可以与Fenton反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 发生反应,故而依据紫甘蓝花青苷对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率可以间接衡量紫甘蓝花青苷的抗氧化性。移取40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 番红花红,0.95 mmol/L 新制EDTA-Fe(II),0.15 mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液,3%新制 H_2O_2 各1.0 mL置于37℃恒温水浴中混匀,再加入0.5 mL紫甘蓝花青苷提取液(空白组改为0.5 mL的蒸馏水,对照组以1.5 mL蒸馏水代替 H_2O_2 和紫甘蓝花青苷提取液)30 min后于520 nm波长处测定反应液的吸光值A(试验组吸光值记为 A_1 ,空白组吸光值记为 A_0 ,对照组吸光值记为 A_0)。紫甘蓝花青苷提取液浓度设计5个浓度梯度,各个浓度梯度平行测3次取吸光值的平均值。 $\cdot\text{OH}$ 清除率计算公式^[20]为: $\cdot\text{OH}$ 清除率(%)=($A_1 - A_0$)/($A - A_0$) $\times 100\%$ 。邻苯三酚自氧化法清除 O_2^- 试验:氧分子接受单一个电子后还原得到的产物称为超氧阴离子: $\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^-$ 。 O_2^- 是阴离子,又是自由基,具有很强的氧化性,化学性质极为活泼。在生物体内 O_2^- 过量生成可致组织损伤,机体主要通过超氧歧化酶清除。邻苯三酚自氧化法被广泛应用于我国食品及药品行业中抗氧化剂及各种清除 O_2^- 物质的抗氧化能力评价。邻苯三酚自氧化法通过链式反应产生 O_2^- ,其含量可通过UV-可见分光光度计进行定量检测。当pH低于9.0时,邻苯三酚自氧化速率与 O_2^- 的浓度呈正相关,因而可以采用邻苯三酚自氧化法来测定 O_2^- 的浓度可间接评价紫甘蓝花青苷的抗氧化活性^[21]。分别向10 mL石英比色管中加入0.5 mL蒸馏水,4.5 mL pH 8.2的50 mmol/L Tris-HCl缓冲液,混匀后于25℃下恒温20 min。再往其中加入10 μL 同温度的邻苯三酚溶液(取45 mmol/L邻苯三酚于10 mmol/L HCl中得到),于420 nm波长下每隔30 s测定邻苯三酚自氧化的吸光值,3 min后滴加1滴维生素C混匀,5 min后同波长下测定吸光值 A_0 ,此即为邻苯三酚自氧化速率。将维生素C换为紫甘蓝花青苷提取液(5个浓度梯度,按依次递增的顺序分别加入)测得的吸光值 A_1 ,空白组得到的

吸光值为 A_2 。平行测定3次,吸光值A取平均值。做空白对照时则以蒸馏水代替邻苯三酚,混匀后迅速在420 nm波长下测定混合溶液的吸光值。测定样品时将第一步的蒸馏水换为不同浓度的样品溶液以测定加入样品后邻苯三酚的自氧化能力,同时做样品溶液的空白对照,扣除样品溶液本身的干扰。 O_2^- 清除率计算公式^[22]如下:清除 O_2^- 清除率(%)=[$A_0 - (A_1 - A_2)$]/ $A_0 \times 100\%$ 。磷钼络合物法测定总抗氧化活性试验:高价Mo(VI)可以被具有抗氧化性类的物质还原为低价Mo(V)的绿色络合物,该络合物在695 nm波长处有最大吸收,且生成绿色络合物的浓度与物质的抗氧化性呈正比。故可以用磷钼络合物法测定紫甘蓝花青苷的总抗氧化活性。取4.0 mL磷钼试剂(将0.6 mol/L浓硫酸溶于28 mmol/L磷酸钠和4 mmol/L钼酸铵溶液中即可)于10 mL比色皿中,再加入0.4 mL紫甘蓝花青苷提取液(5个浓度梯度,按依次递增的顺序分别加入)95℃水浴中恒温90 min后于695 nm波长下测定吸光值 $A^{[23]}$ 。每个浓度平行测3次,吸光值取平均值。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的确定

用量筒量取50%的乙醇4份各20 mL,依次加入柠檬酸(食品级)0.5、1.0、1.5、2.0 g,摇匀待用。准确称取4份新鲜紫甘蓝各5 g,经清洗、打浆、转入4个磨口锥形瓶中,摇匀,均在60℃下恒温水浴回流提取3 h,过滤提取液。分别取滤液1 mL,稀释10倍,测不同比例酸性乙醇提取花青苷得率。

由表2可知,随着柠檬酸质量的增加,得率逐渐升高,在1.0 g时得率最高。但随着柠檬酸质量的继续增加,得率反而下降。确定酸性乙醇中柠檬酸与浓度为50%的乙醇的比例为1:20 g/mL。

表2 柠檬酸与乙醇比例的确定

Table 2 The determination of citric acid and ethanol proportion

材料 /g	乙醇浓度 /%	提取温度 /℃	提取时间 /h	柠檬酸:乙醇 /(g·mL ⁻¹)	吸光值 /A
5	50	60	3	0.5:20	0.44473
5	50	60	3	1.0:20	0.61292
5	50	60	3	1.5:20	0.55638
5	50	60	3	2.0:20	0.52267

2.2 单因素试验结果与分析

2.2.1 提取温度对花青苷得率的影响 由图1可知,随着温度的逐渐升高,提取率也逐渐升高,在60℃时提取率最高。但随着温度的继续升高,提取率反而下降。可能的原因是随着温度的逐渐升高,花青苷得到了充分溶解,因而提取率升高,但温度过高又会导致花青苷的降解,且在大生产中升高温度将提高生产成本,所以确定60℃为最佳提取温度。

2.2.2 提取时间对花青苷得率的影响 由图2可知,在

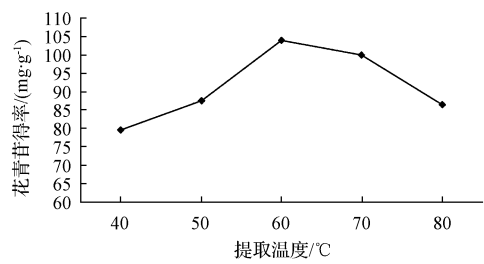


图1 提取温度对花青苷提取率的影响
Fig. 1 The influence of extraction temperature on anthocyanins extraction effect

3.00 h时得率最高,随着时间的增加,得率逐渐降低。可能是在3.00 h以前时间过短,花青苷没有进行充分提取,而在3.00 h后随着时间的增加得率下降,长时间的提取加热导致花青苷氧化分解的缘故,所以确定3.00 h为最佳提取时间。

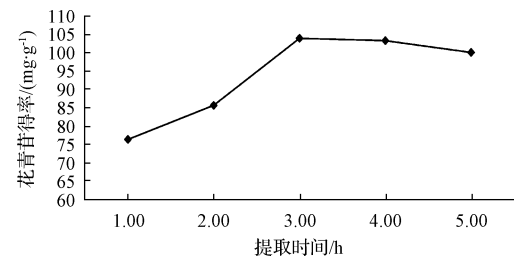


图2 提取时间对花青苷提取率的影响
Fig. 2 The influence of extraction time on anthocyanins extraction effect

2.2.3 乙醇浓度对花青苷得率的影响 由图3可知,随着乙醇浓度的升高,得率逐渐升高,在70%时得率最高。但当乙醇浓度在继续升高,得率反而下降。可能是随着乙醇浓度的增大,一些醇溶性杂质、亲脂性强的成分溶出,这些成分与原花青素竞争同乙醇结合,从而导致提取率降低,且可能浓度为70%乙醇与花青苷类物质极性相近,溶解度大。所以确定70%为最佳乙醇浓度。

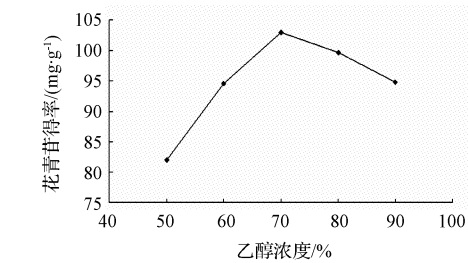


图3 乙醇浓度对花青苷提取率的影响
Fig. 3 The influence of ethanol concentration on anthocyanins extraction effect

2.2.4 料液比对花青苷得率的影响 由图4可知,随着物料比的增加,得率逐渐增加。然而溶剂过高,导致溶

剂的浪费,生产成本提高而且会增加浓缩和纯化难度。所以确定1:8 g/mL为最佳料液比。

2.3 响应面分析法优化花青苷提取

以对紫甘蓝花青苷提取效果有影响的乙醇浓度、提取温度、料液比和提取时间4个因素进行响应面试验。响应面试验影响因素水平与编码设计见表1。

2.3.1 响应面试验结果及分析 在单因素试验及结果的基础上,采用Box-Behnken响应面法的四因素三水平的试验方案,进一步试验。响应面试验方案及结果见表2。

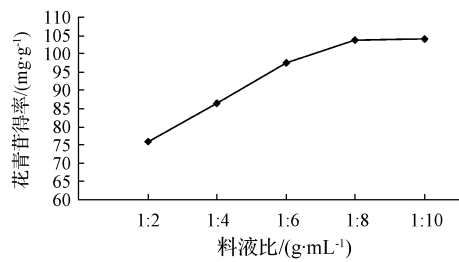


图4 料液比对花青苷提取率的影响
Fig. 4 The influence of material to solvent on anthocyanins extraction effect

表3 响应面试验方案及测定结果

Table 3 Response surface experiment scheme and results					
编号 No.	A 提取温度 /°C	B 乙醇浓度 /%	C 料液比 /(g·mL ⁻¹)	D 提取时间 /h	花青苷得率 /(mg·g ⁻¹)
1	50	50	8	3	76.1164
2	70	50	8	3	92.7037
3	50	70	8	3	65.0240
4	70	70	8	3	78.7730
5	60	60	6	2	85.0216
6	60	60	10	2	90.1843
7	60	60	6	4	99.0410
8	60	60	10	4	104.923
9	50	60	8	2	69.6174
10	70	60	8	2	84.7817
11	50	60	8	4	85.6377
12	70	60	8	4	99.4944
13	60	50	6	3	90.9177
14	60	70	6	3	76.2914
15	60	50	10	3	95.2206
16	60	70	10	3	84.2017
17	50	60	6	3	84.1496
18	70	60	6	3	95.0280
19	50	60	10	3	86.5507
20	70	60	10	3	103.7470
21	60	50	8	2	76.9884
22	60	70	8	2	68.8416
23	60	50	8	4	94.7641
24	60	70	8	4	77.7795
25	60	60	8	3	105.3110
26	60	60	8	3	105.3110
27	60	60	8	3	105.3110
28	60	60	8	3	105.3110
29	60	60	8	3	105.3110

2.3.2 响应面数学模型的建立与显著性检验 用 Design Expert 8.0.6 统计分析软件对表 3 中响应面试验得到的试验数据进行二次多项式回归拟合,以紫甘蓝提取液吸光值为相应值为响应值,以提取温度(A)、乙醇浓度(B)、料液比(C)、提取时间(D)为自变量,建立回归方程如下:

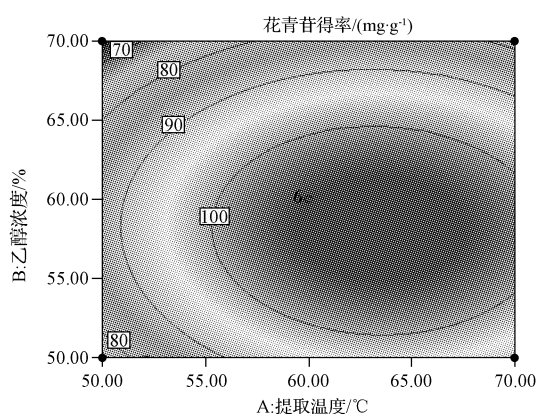
$$Y=105.31+7.29\times A-6.32\times B+2.86\times C+7.18\times D-0.71\times A\times B+1.58\times A\times C-0.33\times A\times D+0.90\times B\times C-2.21\times B\times D+0.18\times C\times D-11.03\times A^2-16.53\times B^2-1.82\times C^2-9.10\times D^2$$
 由回归方程得到的数学模型的回归系数显著性检验及结果见表 4。在试验范围内

表 4 模型回归系数显著性检验及结果

Table 4 Model and regression coefficient significance test and results

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P>F	显著性
模型 Mode	4 286.46	14	306.18	854.53	<0.0001	***
A	637.03	1	637.03	1 777.96	<0.0001	***
B	478.80	1	478.80	1 336.33	<0.0001	***
C	98.49	1	98.49	274.88	<0.0001	***
D	619.27	1	619.27	1 728.38	<0.0001	***
AB	2.01	1	2.01	5.62	0.0326	*
AC	9.98	1	9.98	27.85	0.0001	**
AD	0.43	1	0.43	1.19	0.2932	
BC	3.25	1	3.25	9.08	0.0093	**
BD	19.53	1	19.53	54.50	<0.0001	***
CD	0.13	1	0.13	0.36	0.5575	
A ²	788.79	1	788.79	2 201.50	<0.0001	***
B ²	1 771.88	1	1 771.88	4 945.30	<0.0001	***
C ²	21.51	1	21.51	60.02	<0.0001	***
D ²	536.69	1	536.69	1 497.89	<0.0001	***
残差	5.02	14	0.36			
失拟项	5.02	10	0.50			
绝对误差	0.000	4	0.000			
总和	4 291.47	28				

注: $R^2=0.9988$; $R_{adj}^2=0.9977$; $R_{pred}^2=0.9933$; $CV\%=0.67$ 。* 差异显著 ($P<0.05$); ** 差异高度显著 ($P<0.01$); *** 差异极显著 ($P<0.0001$)。



模型的“ $P>F$ ”值 <0.0001 ,说明该二次多项式回归方程模型达到了极显著的水平,具有较高的可靠性;决定系数 $R^2=99.88\%$,表明试验值与预测值高度相关,即相应值的变化有 99.88% 来自于所选变量;同时变异系数 $CV\%=0.67$,大于 0.05,且失拟项不显著,说明实际值与模型预测值有较好的拟合度;由 F 值可得,4 个因素对响应值的影响大小顺序为: D(提取时间) $>$ A(提取温度) $>$ B(乙醇浓度) $>$ C(料液比)。综上所述,试验所建立的数学回归模型拟合度高,可以较好的反应各因素与响应值间的真实关系。因此,可以用该数学模型预测紫甘蓝花青苷的提取工艺条件。

2.3.3 单因素交互作用及紫甘蓝花青苷提取验证试验

根据二次多项式回归方程得到紫甘蓝花青苷最佳提取工艺及参数为温度 63.98℃,乙醇浓度 57.97%,料液比 1:9.86 g/mL,提取时间 3.42 h,花青苷的理论得率为 110.243 mg/g。结合实际操作,以修正后的提取条件(提取温度 64℃,乙醇浓度 58%,料液比 1:10 g/mL,提取时间 3.4 h)进行紫甘蓝花青苷提取验证试验,平行做 5 组,得到花青苷的平均得率 109.873 mg/g, $RSD<5\%$,与理论值的相对误差为 0.34%。响应面能够反映出单因素交互作用对响应值的影响能力大小,响应面越陡,说明这种因素对相应值影响越显著。由表 3 中“ $P>F$ ”项可以判断二次多项式回归方程中各变量对响应值影响的显著性,各因素中一次项 A、B、C、D 是极显著的;二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 以及 BD 也是极显著的,交互项中 AC、BC 是高度显著的,AB 是显著的。说明各单因素对响应值不是简单的线性关系,二次项也对其有影响。各单因素交互作用(AB、AC、AD、BC、BD、CD)的等高线及响应面图见图 5~10。

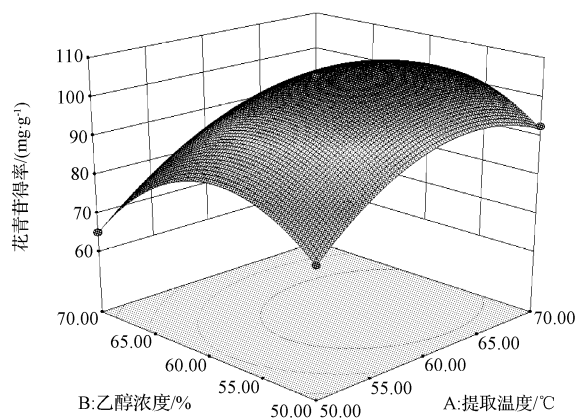


图 5 提取温度和乙醇浓度对花青苷得率的等高线及相应面

Fig. 5 Extracting temperature and ethanol concentration of the yield of purple yam anthocyanins from contour and response surface figure

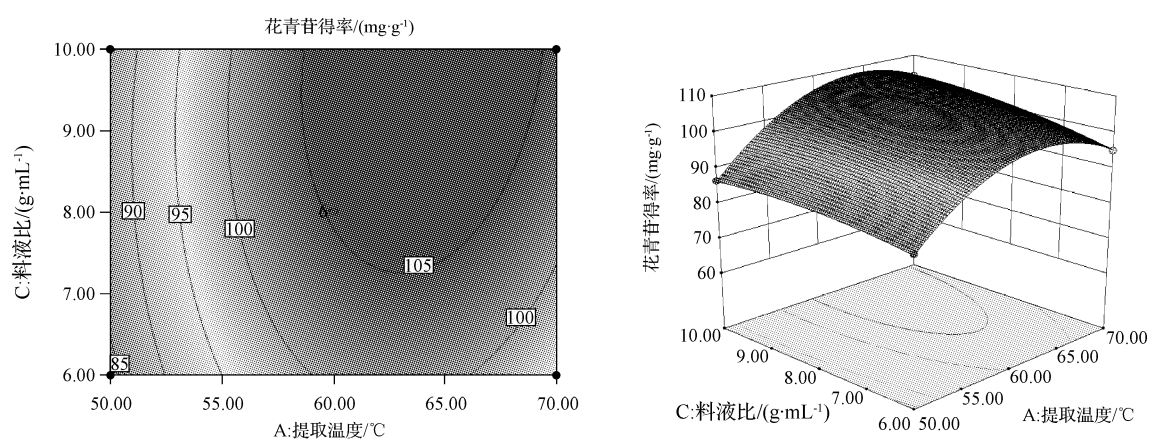


图6 提取温度和料液比对花青苷得率的等高线及相应面

Fig. 6 Extracting temperature and material liquid ratio on the yield of purple yam anthocyanins from contour and response surface figure

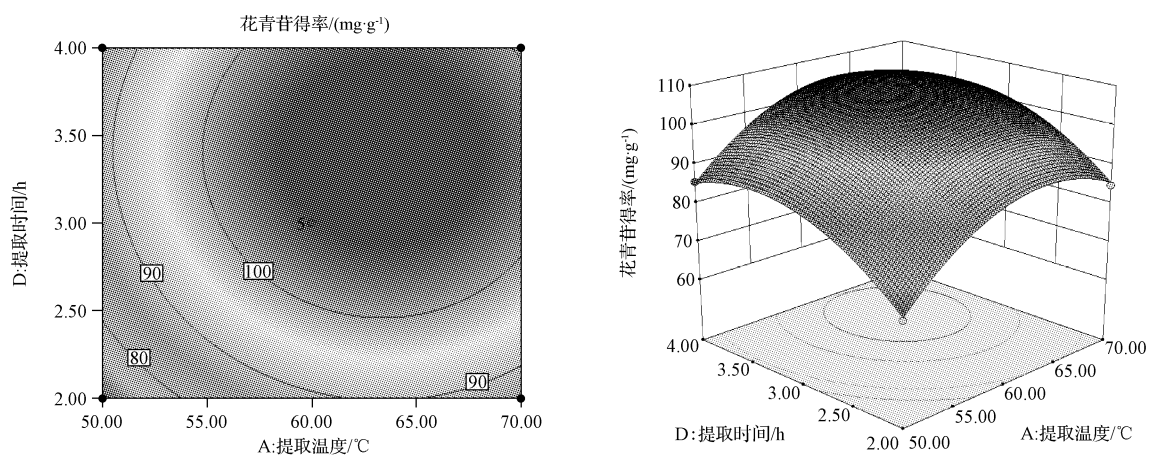


图7 提取温度和提取时间对花青苷得率的等高线及相应面

Fig. 7 Extracting temperature and extraction time on the yield of purple yam anthocyanins from contour and response surface figure

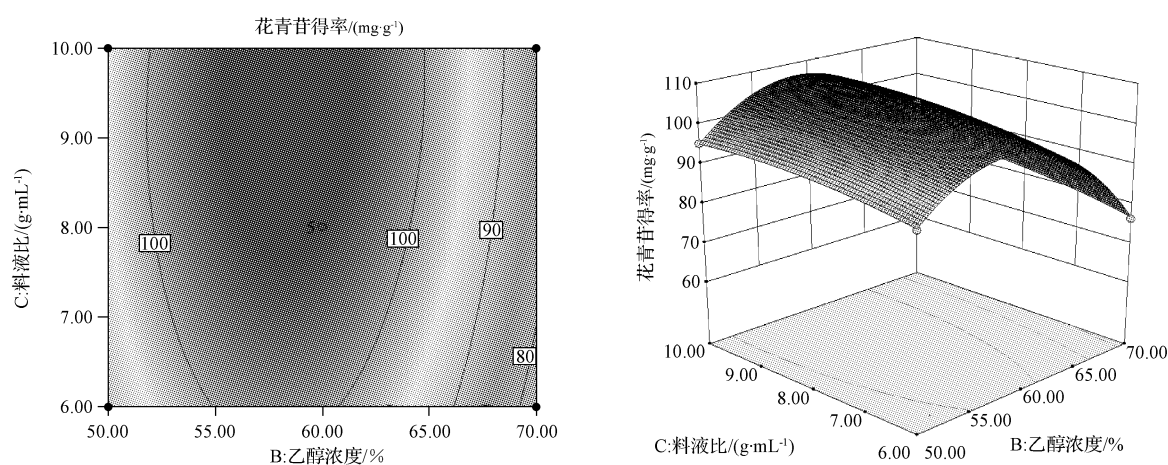


图8 乙醇浓度和料液比对花青苷得率的等高线及相应面

Fig. 8 Ethanol concentration and material liquid ratio on the yield of purple yam anthocyanins from contour and response surface figure

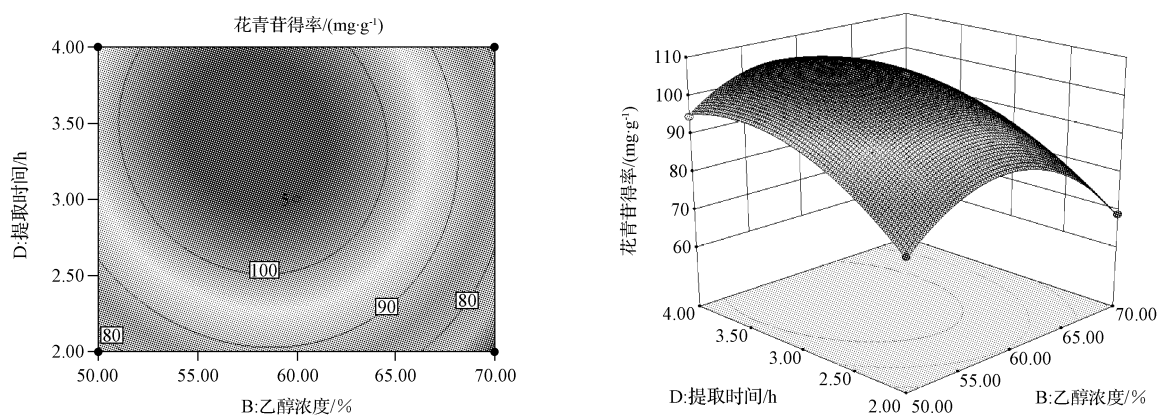


图9 乙醇浓度和提取时间对花青苷得率的等高线及相应面

Fig. 9 Ethanol concentration and extraction time on the yield of purple yam anthocyanins from contour and response surface figure

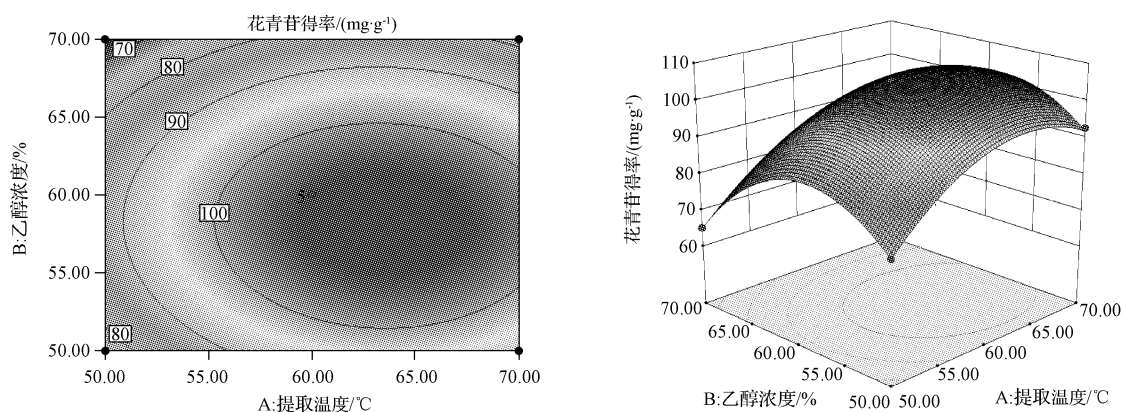


图10 提取温度和乙醇浓度对花青苷得率的等高线及相应面

Fig. 10 Extraction temperature and ethanol concentration on the yield of purple yam anthocyanins from contour and response surface figure

2.4 抗氧化性试验测定结果与分析

2.4.1 Fenton 氧化法清除 $\cdot\text{OH}$ 试验 由图 11 可知, 紫甘蓝花青苷对 $\cdot\text{OH}$ 具有较强的清除效果。当紫甘蓝花青苷提取液浓度在 $0.3\sim 1.1\text{ mg/mL}$ 时, 其对 $\cdot\text{OH}$ 清除率随花青苷浓度的增加而增加, 且 $0.3\sim 0.7\text{ mg/mL}$ 之间增加的趋势较为平缓, $0.7\sim 1.1\text{ mg/mL}$ 之间增加的趋势明显强于前者。

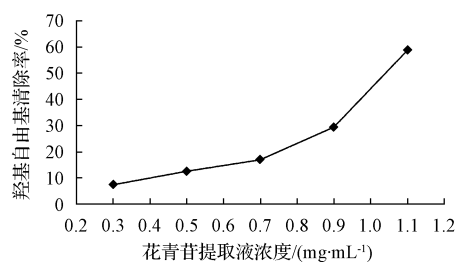


图11 紫甘蓝花青苷对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果

Fig. 11 The $\cdot\text{OH}$ removal effect of purple cabbage anthocyanins

2.4.2 邻苯三酚自氧化法清除 O_2^- 试验 由图 12 可知, 当紫甘蓝花青苷的浓度在 $0.3\sim 1.1\text{ mg/mL}$ 时, 除在 $0.3\sim 0.5\text{ mg/mL}$ 紫甘蓝花青苷对 O_2^- 的清除效率随其浓度的变化趋势较为平缓之外, $0.5\sim 1.1\text{ mg/mL}$ 之间的变化趋势近乎呈现直线递增。说明紫甘蓝花青苷对 O_2^- 的清除效果也较为明显。

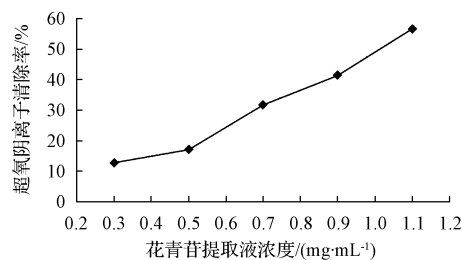


图12 紫甘蓝花青苷对 O_2^- 的清除效果

Fig. 12 The O_2^- removal effect of purple cabbage anthocyanins

2.4.3 磷钼络合物法测定总抗氧化活性试验 由图 13 可知,当紫甘蓝花青苷和维生素 C 的浓度为 0.3~1.1 mg/mL 时,紫甘蓝花青苷和维生素 C 反应液在 695 nm 下的吸光值均随各自浓度的增大而增加,且紫甘蓝花青苷和维生素 C 的变化趋势几乎相同。说明当紫甘蓝花青苷和维生素 C 的浓度相同时,其各自的总抗氧化活性差异不显著。

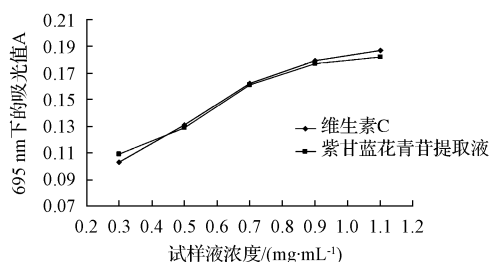


图 13 紫甘蓝花青苷与维生素 C 的总抗氧化活性

Fig. 13 The total antioxidant activity of purple cabbage anthocyanins and vitamin C

3 结论

对紫甘蓝花青苷进行提取,通过单因素试验、Box-benhkn 响应面设计试验及 Design-Expert 8.0.6 响应面分析法对提取温度、提取时间、乙醇浓度、料液比进行优化试验,得到紫甘蓝花青苷提取的最佳工艺条件为温度 64℃,乙醇浓度 58%,料液比 1:10 g/mL,提取时间 3.4 h。在最佳提取条件下,花青苷的平均得率 109.873 mg/g, RSD<5%,与理论值(110.243 mg/g)的相对误差为 0.34%。紫甘蓝花青苷抗氧化性试验包括的 Fenton 氧化法清除·OH 试验、邻苯三酚自氧化法清除 O₂⁻ 试验和磷钼络合物法测定总抗氧化活性试验。试验结果表明紫甘蓝花青苷对·OH 和 O₂⁻ 均有较好的清除效果,且在一定浓度范围内对这 2 种自由基的清除率与紫甘蓝花青苷的浓度呈正相关变化。总抗氧化活性试验结果表明当紫甘蓝花青苷和维生素 C 的浓度相同时,其各自的总抗氧化活性及变化趋势相当,没有显著差异。

参考文献

[1] 王芳,兰素娟.紫甘蓝色素的超声波辅助提取及其稳定性研究[J].广东农业科学,2012(22):112-116.

- [2] 杨东霞,冷春玲.紫甘蓝色素的提取及其稳定性[J].辽东学院学报(自然科学版),2012,19(3):192-195.
- [3] 张桂玲.紫甘蓝叶花色素提取及其稳定性研究[J].西北农业学报,2008,17(3):319-323.
- [4] 宋晓秋,叶琳,杨晓波.紫甘蓝色素提取方法研究[J].食品科学,2011,32(8):74-77.
- [5] 潘文杰,吕文虎.紫甘蓝色素提取条件的研究[J].食品研究与开发,2006,27(2):42-43.
- [6] 王美玲,艾希珍,郑楠.紫甘蓝不同叶位叶片色素含量及需光特性的研究[J].西北农业学报,2008,17(1):221-223.
- [7] 张冰.紫甘蓝春露地早熟高产栽培技术[J].蔬菜,2007(1):20.
- [8] 雷晓燕.超声波辅助提取紫甘蓝色素的工艺研究[J].沈阳化工大学学报,2012,26(2):127-131.
- [9] 钟秋,谢建春,孙宝国.天然食用色素的来源、制备及应用[J].食品研究与发展,2008,29(2):174-177.
- [10] 许友娇,陆利霞,熊晓辉.提高天然食用色素稳定性技术研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(2):188-192.
- [11] Miyazawa, Nakagwak, Kudom, et al. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(3):1083-1091.
- [12] 钱松,金丽琴.矢车菊素-3-葡萄糖苷诱导 Hela 细胞凋亡及其机制的研究[J].中国生化药物杂志,2008,29(6):369-373.
- [13] 徐清海,明霞.天然色素的提取及生理功能[J].应用化学,2005,34(5):268-271.
- [14] 梁引库,王琦,李新生.黑米花青苷胶囊体外清除自由基及抗氧化作用的研究[J].食品科技,2012,37(8):243-246.
- [15] 王喜强,董艳萍.超声波辅助提取紫薯花青素及抗氧化性研究[J].中国酿造,2014,263(1):77-80.
- [16] 陈婵,黄琼,彭宏,等.紫色甘薯原花青素稳定性及抗氧化性的研究[J].安徽农业科学,2012,40(35):17308-17310.
- [17] 王威.常用天然色素抗氧化活性的研究[J].食品科学,2003,24(6):97-100.
- [18] 金华,刘志刚,曾晓丹,等.超声提取葡萄籽原花青素工艺的优化及其抗氧化活性研究[J].中国调味品,2014,39(4):102-107.
- [19] 黄海兰,赵祖亮,王斌贵.磷钼络合物法与β-胡萝卜素-亚油酸法测定海藻脂类成分抗氧化活性的比较[J].中国油脂,2005,30(3):32-34.
- [20] 王巨存,邢国胜,胡文铎,等.有机锗 Ge-132 对氧自由基和由羟基自由基诱导的脂质过氧化的影响[J].中国药理学杂志,1994,29(1):23-24.
- [21] 韩少华,朱靖博,王妍妍.邻苯三酚自氧化法测定抗氧化活性的方法研究[J].中国酿造,2009,36(10):1466-1470.
- [22] 袁建峰,蔡恒,单威,等.一株芽孢杆菌胞外多糖的分离纯化及其抗氧化性测定[J].微生物学通报,2009,36(10):1466-1470.
- [23] 李荣,姜子涛,马丽.月桂精油抗氧化性能及清除自由基能力的研究[J].中国调味品,2009,34(11):58-62.

Study on Purple Cabbage Anthocyanins Extraction Process and Oxidation Resistance

DANG Ya^{1,2,3,4}, LIU Shui-ying¹

(1. College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shannxi 723000; 2. Qinba Blueberry Institute, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shannxi 723000; 3. Shaanxi Key Laboratory of Bio-Resource, Hanzhong, Shannxi 723000; 4. Black Organic Food Engineering Technology Research Center in Shaanxi Province, Hanzhong, Shannxi 723000)

Abstract: Taking fresh purple cabbage as raw material, in the extraction temperature, extraction time, ethanol concentration, ratio of solid-liquid, four factors on the basis of single factor experiment, using the response surface method of purple cabbage anthocyanins of study on the optimized extraction process were studied. The results showed that the

DOI:10.11937/bfyy.201501036

紫萼玉簪根中总黄酮提取工艺优化

于 淼, 徐丽萍, 刘洪章, 刘树英

(吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:以紫萼玉簪根为试验材料,采用单因素结合正交实验方法,研究紫萼玉簪根中总黄酮的最佳提取工艺对玉簪属植物的影响。结果表明:超声波提取法提取紫萼玉簪根中总黄酮的最佳提取工艺为:乙醇浓度 80%,提取温度 80℃,提取时间 60 min,料液比 1:15,总黄酮得率 25.48 mg/g。

关键词:紫萼玉簪根;总黄酮;提取工艺

中图分类号:S 682.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)01-0136-04

玉簪属植物(*Hosta*)属百合科(Liliaceae)多年生宿根草本植物;原产于中国、韩国和日本^[1];生长性状耐寒、喜阴,忌强烈日光照射^[1-3]。中国原产 4 种玉簪,分别为玉簪(*Hosta plantaginea*)、紫萼玉簪^[4](*H. ventricosa*)、东北玉簪(*H. ensata*)、白粉玉簪(*H. albofarinosa*)^[5]。有研究表明,玉簪属植物中化学成分主要包括黄酮类、甾体皂苷类和生物碱类^[6]。据 2006 年版《中药大辞典》中记载,玉簪叶主治痈肿、疔疮等;玉簪花主治咽喉肿痛、小便不通、疮毒等;玉簪根主治消肿、解毒、止血等;现在药理学表明,玉簪属植物具有较高的药用价值^[7-8]。因此,对玉簪属植物的研究具有重要意义。该试验应用超声波提

取法,采用单因素试验、正交实验研究了紫萼玉簪根中总黄酮的最优工艺条件,以期为玉簪属植物的药用开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

紫萼玉簪根于 2013 年 3 月 20 日采自吉林农业大学校园,芦丁标准品、石油醚、无水乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠均为国产分析纯,实验室所用水均为蒸馏水。

KQ-100B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),RE-52C 旋转蒸发器(上海青浦仪器厂),SHB-III 循环水式真空泵(上海豫康科教仪器设备有限公司),JT202N 电子天平(上海精天电子仪器有限公司),GZX-9240 型电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司),台式低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂),HH-6 数显恒温水浴锅(金坛市科析仪器有限公司),立式冷藏柜,粉碎机,通风橱等。

第一作者简介:于淼(1989-),女,硕士研究生,研究方向为植物大分子结构与功能。E-mail:1053216177@qq.com。

责任作者:刘洪章(1957-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为长白山特色植物资源。E-mail:lhz999@126.com。

基金项目:农业部 948 资助项目(2012Z32);吉林省科技厅资助项目(20100254)。

收稿日期:2014-09-22

influence of four factors on the response value size order as follows: D(extraction time) > A(extraction temperature) > B(ethanol concentration) > C(solid-liquid ratio); purple cabbage anthocyanins extraction of optimum technological conditions for extracting temperature were 64℃, extracting time 3.4 hours, ethanol concentration 58%, solid-liquid ratio 1:10 g/mL. Under the optimum extraction conditions, the average yield of anthocyanins 109.873 mg/g, RSD < 5% and the theoretical value (110.243 mg/g) of the relative error was 0.34%. purple cabbage anthocyanins oxidation resistance test research showed that the purple cabbage anthocyanins had good removal effects to $\cdot\text{OH}$ and O_2^- , and in the certain concentration range of the two kinds of active free radical clearance rate and the concentration of the purple cabbage anthocyanins were positively correlated. Total antioxidant activity test results showed that when the concentration of the purple cabbage anthocyanins and vitamin C phase at the same time, their respective total antioxidant activity had the same change trend, there were no significant differences.

Keywords: purple cabbage; anthocyanins; extraction process; anti-oxidation