

板栗壳原花青素提取及其稳定性研究

张海晖, 李金凤, 段玉清*, 马海乐, 徐菲菲, 秦宇

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 为充分利用板栗壳资源, 采用响应面法优化板栗壳原花青素提取工艺, 并对其稳定性进行探讨以获得最佳贮藏条件。研究乙醇体积分数、料液比、浸提温度和浸提时间对原花青素提取率的影响; 考察 pH 值、光、温度、部分添加剂和金属离子对板栗壳原花青素稳定性的影响。结果显示, 板栗壳原花青素最佳提取工艺为乙醇体积分数 51.1%、料液比 1:14.5(g/mL)、浸提温度 67.3℃、浸提时间 2h, 在此条件下板栗壳原花青素提取率理论值为 40.35mg/g, 实测值为 40.23mg/g。板栗壳原花青素在 pH2.2~6 条件下稳定, 对光不稳定, 宜避光低温(4~20℃)保藏; 适量的亚硫酸氢钠对板栗壳原花青素有一定的保护作用, 苯甲酸钠对其稳定性有影响; 板栗原花青素在 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 和 Al^{3+} 存在时较稳定, 而 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 不能与之共存。因此, 固态条件下, 要保持板栗壳原花青素稳定, 需对温度、光照、金属离子加以控制; 水溶液中, 弱酸性环境及适量亚硫酸氢钠有利于改善板栗壳原花青素的稳定性。

关键词: 板栗壳; 原花青素; 提取; 稳定性

Extraction and Stability of Procyanidins from Chestnut Shells

ZHANG Hai-hui, LI Jin-feng, DUAN Yu-qing*, MA Hai-le, XU Fei-fei, QIN Yu

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: To make full use of chestnut shell resources, the optimum extraction process for procyanidins from chestnut shells (CSPCs) with aqueous ethanol was investigated by response surface analysis, and the stability of CSPCs was explored for its best storage conditions. The effects of ethanol concentration, ratio of solid to liquid, extraction temperature and time on the yield of CSPCs were evaluated, and the effects of pH, light, temperature, additives and metal ions on the stability of CSPCs were also investigated. The optimized extraction conditions were as follows: extraction with a 14.5-fold volume of 51% aqueous ethanol solution at 69.3 °C for 2 h. Under these conditions, the theoretical yield of CSPCs was 40.35 mg/g, and the measured value was 40.23 mg/g. The results of stability experiments showed that CSPCs was stable at pH 2.2—6, whereas it had poor light stability and should be consequently stored in darkness at low temperature (4—20 °C). NaHSO_3 could protect CSPCs to some extent. Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , and Al^{3+} were found to have positive contribution to CSPCs stability, while sodium benzoate, Ca^{2+} , Fe^{2+} and Cu^{2+} could not coexist with CSPCs. Therefore, to maintain the stability of CSPCs, it is necessary to control temperature, light and metal ions. An acidic environment and the presence of NaHSO_3 can improve the stability of CSPCs.

Key words: chestnut shell; procyanidins; extraction; stability

中图分类号: Q949.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)08-0005-05

板栗(*Castanea mollissima* Blume)作为我国传统的农副产品, 年产量超过 100 万吨, 占世界板栗总产量的 3/4, 板栗生产和加工过程中近 8.9%~13.5% 的板栗壳, 仍主要以燃烧和自然腐烂方式被废弃, 仅有少数利用板栗壳

制备活性炭、吸附水中重金属离子和杀虫剂的报道^[1-7], 因此充分利用废弃资源创造更多的经济效益具有重要意义。板栗壳中富含色素已有文献报道^[8-11], 但未见原花青素类物质的报道。本研究发现板栗壳粗提物中富含原

收稿日期: 2010-07-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270938); 国家博士后基金项目(20100471379);

江苏省高校自然科学基金项目(05KJB550011); 江苏大学人才基金项目(05JDG013; 128300289)

作者简介: 张海晖(1975—), 男, 副教授, 博士, 主要从事农副产品活性因子提取分离新技术研究。

E-mail: z_haihui@163.com

* 通信作者: 段玉清(1973—), 女, 副教授, 博士, 主要从事农产品加工与贮藏工程研究。E-mail: dyq101@ujs.edu.cn

花青素(procyanidins, PC), 因原花青素具有较强的清除自由基和抗氧化活性、改善心血管疾病、抗癌、抗辐射和抗病毒等生物活性^[12-13], 使其在农业和医药等领域得到广泛应用。因此寻找新的富含原花青素的资源和适合于工业化生产的提取方法是当前研究热点。鉴于此, 本实验以板栗壳中原花青素为目标成分, 采用响应面分析方法对其提取工艺进行优化, 并对其稳定性进行研究。以期板栗壳工业化制备和资源的综合利用提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

板栗为市售, 剥壳后, 取栗壳洗净, 自然阴干, 粉碎过 40 目筛得板栗壳粉末, 冷冻保存, 备用。

香草醛、苯甲酸钠、浓盐酸、乙醚、无水乙醇上海国药化学试剂有限公司。

722N 分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; 电子天平 赛多利斯科学仪器有限公司; DK-SD 型电热恒温水浴锅 上海金宏实验设备有限公司; KQ-250DB 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 提取板栗壳原花青素工艺

板栗壳→粉碎→过 40 目筛→用正己烷于室温摇床 (150r/min) 脱脂 24h →过滤→残渣→根据料液比加入溶剂→提取(控制适当条件)→过滤(200目尼龙网筛)→收集上清液→测定原花青素含量→计算得率^[14-15]。

1.2.2 原花青素含量和提取得率测定

采用香草醛-浓盐酸法^[16], 以儿茶素为对照品, 得到原花青素质量浓度与吸光度曲线的回归方程: $y=12.003c-0.0086$, $R^2=0.9959$ 。

$$\text{原花青素得率}/(\text{mg/g})=\frac{cv}{m}$$

式中: c 为提取液中原花青素质量浓度 $/(mg/mL)$; v 为提取液的体积 $/mL$; m 为板栗壳干质量 $/g$ 。

1.2.3 板栗壳原花青素提取的单因素试验

提取溶剂: 称取脱脂板栗壳 2.0g, 分别加入料液比 1:10 的不同体积分数乙醇溶液, 60℃ 浸提 2h, 考察不同乙醇体积分数(30%~80%)对提取得率的影响。

料液比(g/mL): 称取脱脂板栗壳 2.0g, 加入 60% 乙醇溶液, 60℃ 浸提 2h, 考察不同料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30)对原花青素提取效果的影响。

浸提温度: 称取脱脂板栗壳 2.0g, 按料液比 1:20 加入 60% 乙醇溶液, 浸提 2h, 考察不同浸提温度(30、40、50、60、70、80℃)对原花青素提取效果的影响。

浸提时间: 称取脱脂板栗壳 2.0g, 按料液比 1:20 加入 60% 乙醇溶液, 60℃ 浸提考察不同浸提时间(0.5、1、2、3h)对原花青素提取效果的影响。

1.2.4 响应面分析试验

选择乙醇体积分数、料液比、浸提温度和浸提时间 4 个因素, 利用 Box-Behnken 中心组合原理, 选取 5 个中心点进行 29 个试验, 试验因素水平见表 1。

表 1 板栗壳原花青素提取响应面分析试验因素水平表
Table 1 Experimental factors and levels in response surface analysis

水平	因素			
	X_1 乙醇体积分数/%	X_2 料液比(g/mL)	X_3 浸提温度/℃	X_4 浸提时间/h
-1	50	12	50	0.5
0	60	15	60	1
1	70	18	70	2

1.2.5 稳定性研究

利用最佳的提取工艺获得的板栗壳原花青素粗提取物, 经 AB-8 大孔吸附树脂柱吸附, 收集 50% 乙醇洗脱液, 于 40℃ 真空浓缩, 冷冻干燥, 得纯化的板栗壳原花青素(procyanidins from chestnut shell, CSPCs)。考察 pH 值、光、温度、不同添加剂及金属离子对 CSPCs 稳定性的影响。

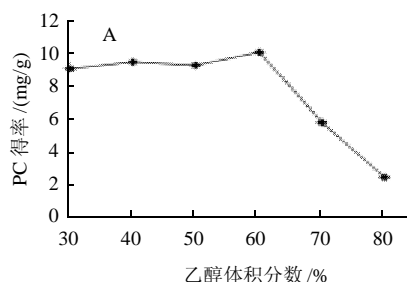
2 结果与分析

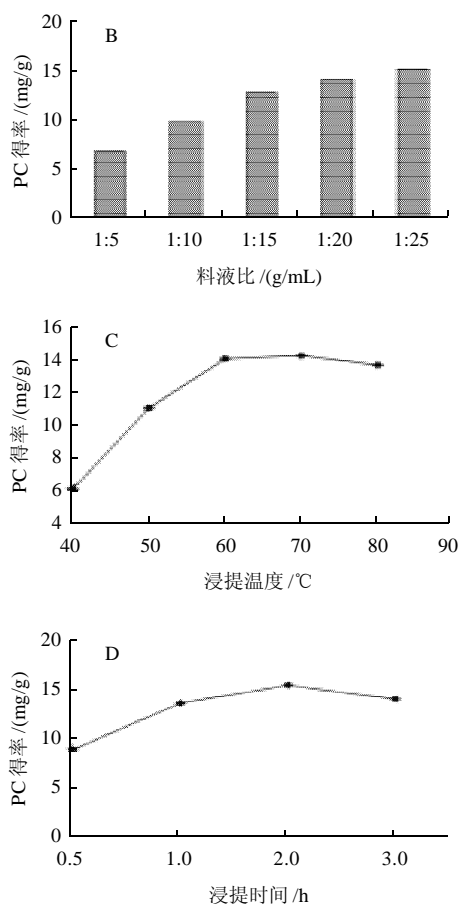
2.1 单因素试验结果

由图 1A 可以看出, 乙醇体积分数 60% 左右时, 提取得率最高。当高于此体积分数后醇溶性杂质、色素和亲脂性强的成分溶出量增加, 这些成分与 PC 竞争乙醇-水分子, 使 PC 溶出率降低, 进而导致原花青素的提取得率下降。

通常溶剂用量越大提取得率越大。由图 1B 可见随着料液比的增加 PC 得率增加, 而当料液比大于 1:20 时, PC 得率随料液比的变化不大。考虑过高的料液比会增加后序的能耗, 增加生产成本, 所以选择料液比为 1:15 左右为宜。

温度升高分子运动速度加快, 进而渗透和扩散速度加快。由图 1C 可见随着温度的升高, PC 得率升高, 但温度过高 PC 结构易破坏, 导致得率降低。故选择 60℃ 左右是 PC 提取的最佳温度。





A. 乙醇体积分数; B. 料液比; C. 浸提温度; D. 浸提时间。

图1 不同提取条件对板栗壳原花青素得率的影响

Fig.1 Effect of process conditions on extraction yield of the chestnut shell procyanidins

由图1D可见,提取时间在0.5~2h之间时,PC得率随时间延长而增加,大于2h后,PC得率随时间延长而降低。可能是由于PC富含酚羟基可作为H供体,易被空气中的氧气所氧化,所以提取时间不超过2h。

2.2 原花青素提取的响应面分析

根据表2通过Design-Expert 7.1.3统计软件对数据分析,建立响应面的回归模型,进而寻求最优响应值的因素水平,分析结果见表3和表4。从表4可以看出,剔除不显著项,回归方程简化为下式:

$$Y = 24.6 - 5.41X_1 + 1.57X_2 + 5.08X_3 + 8.36X_4 - 1.68X_1X_3 - 3.90X_1X_4 + 3.78X_3X_4 - 1.81X_1^2 - 1.11X_2^2 - 1.99X_4^2$$

由表3可以看出,复相关系数 $R^2=0.9841$,说明回归方程的拟合度好。模型的调整确定系数为0.9682,可以较好解释模型的变化。通过响应面分析试验确定板栗壳原花青素提取的最佳工艺条件为乙醇体积分数51.1%、料液比1:14.5(g/mL)、浸提温度67.3℃、浸提时间2h。在此条件下,原花青素得率理论值为40.35mg/g。实际测得板栗壳原花青素得率为40.23mg/g。因此,采用RSE法优化得到的提取工艺参数准确可靠,具有实用价值。

表2 板栗壳原花青素提取响应面分析试验设计及结果

Table 2 Scheme and experimental results of response surface central composite design

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	PC 得率 Y /(mg/g)
1	-1	-1	0	0	23.9
2	1	1	0	0	14.8
3	-1	-1	0	0	30.4
4	1	1	0	0	16.7
5	0	0	-1	-1	13.6
6	0	0	1	-1	14.4
7	0	0	-1	1	22
8	0	0	1	1	37.9
9	-1	0	0	-1	13.1
10	1	0	0	-1	12.1
11	-1	0	0	1	38.9
12	1	0	0	1	22.3
13	0	-1	-1	0	17.8
14	0	1	-1	0	19.7
15	0	-1	1	0	26.6
16	0	1	1	0	31.4
17	-1	0	-1	0	20.5
18	1	0	-1	0	11.6
19	-1	0	1	0	35.7
20	1	0	1	0	20.1
21	0	-1	0	-1	12.3
22	0	1	0	-1	13.7
23	0	-1	0	1	28
24	0	1	0	1	30.4
25	0	0	0	0	25.7
26	0	0	0	0	25.0
27	0	0	0	0	23.3
28	0	0	0	0	24.6
29	0	0	0	0	24.7

表3 回归方程的方差分析结果

Table 3 Analysis of variance for the developed regression equation for extraction yield of the chestnut shell procyanidins

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1706.69	14	121.91	61.87	< 0.0001	**
残差	27.58	14	1.97			
总和	1734.27	28				
复相关系数	$R^2=0.9841$					

注: * $P < 0.05$, 差异显著; ** $P < 0.01$, 差异极显著, 与对照组比较。下同。

表4 回归方程各项的方差分析结果

Table 4 Analysis of variance for each term of the developed regression equation for extraction yield of the chestnut shell procyanidins

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
X_1	351.00	1	351.00	178.15	< 0.0001	**
X_2	29.77	1	29.77	15.11	0.0016	**
X_3	309.07	1	309.07	156.87	< 0.0001	**
X_4	838.34	1	838.34	425.50	< 0.0001	**
X_1X_2	5.29	1	5.29	2.68	0.1236	
X_1X_3	11.22	1	11.22	5.70	0.0317	*
X_1X_4	60.84	1	60.84	30.88	< 0.0001	**
X_2X_3	2.10	1	2.10	1.07	0.3191	
X_2X_4	0.25	1	0.25	0.13	0.7270	
X_3X_4	57.00	1	57.00	28.93	< 0.0001	**
X_1^2	21.33	1	21.33	10.83	0.0054	**
X_2^2	8.04	1	8.04	4.08	0.0629	
X_3^2	1.11	1	1.11	0.56	0.4657	
X_4^2	25.64	1	25.64	13.02	0.0029	**

2.3 稳定性研究

2.3.1 pH 值对 CSPCs 稳定性的影响

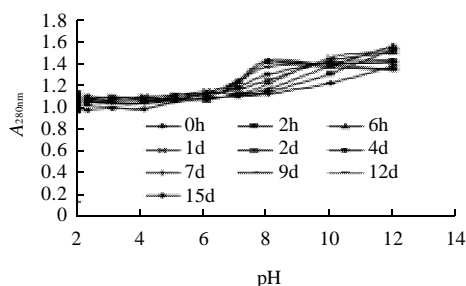


图2 pH 值对 CSPCs 稳定性的影响
Fig.2 Effect of pH on stability of CSPCs

原花青素富含酚羟基, 呈弱酸性^[17-18]。本实验结果显示, 在 pH2.2~6 条件下, CSPCs 室温下封口放置 15d 内, 吸光度变化很小(图2), 表明在此 pH 值范围内 CSPCs 比较稳定。

2.3.2 光对 CSPCs 稳定性的影响

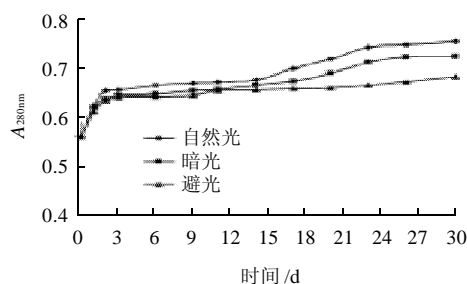


图3 光对 CSPCs 稳定性的影响
Fig.3 Effect of light on stability of CSPCs

由图3可见, 室温下封口2d内原花青素在自然光、暗光和避光条件均较稳定; 2d后随着时间的延长原花青素的稳定性下降, 但避光条件下基本稳定, 说明原花青素宜避光保存。

2.3.3 温度对 CSPCs 稳定性的影响

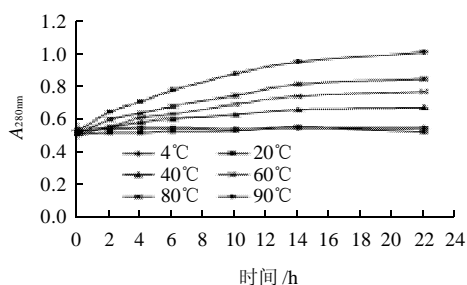


图4 温度对 CSPCs 稳定性的影响
Fig.4 Effect of temperature on stability of CSPCs

由图4可见, CSPCs 在高温下不稳定, 当温度在 40~90℃ 范围内时, CSPCs 极不稳定, 温度过高 CSPCs 会发生氧化聚合反应导致稳定性差; 4℃ 和 20℃ 储存 20d 后, CSPCs 吸光度几乎无变化。所以 CSPCs 应在低温下或 20℃ 以下保存。

2.3.4 苯甲酸钠对 CSPCs 稳定性的影响

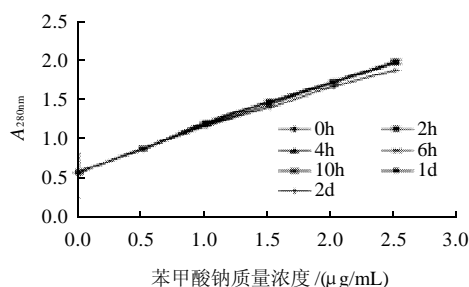


图5 苯甲酸钠对 CSPCs 稳定性的影响
Fig.5 Effect of sodium benzoate on stability of CSPCs

从图5可以看出, 随着苯甲酸钠质量浓度的增加, CSPCs 吸光度明显增加, 这可能是苯甲酸钠的加入破坏了 CSPCs 的结构。所以在 CSPCs 贮藏中尽量不加苯甲酸钠防腐剂。

2.3.5 亚硫酸氢钠对 CSPCs 稳定性的影响

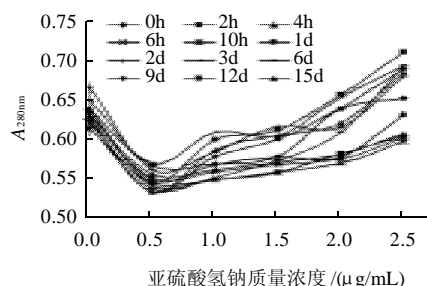


图6 NaHSO₃ 对 CSPCs 稳定性的影响
Fig.6 Effect of NaHSO₃ on stability of CSPCs

由图6可见, 当溶液中 NaHSO₃ 的质量浓度在 0~0.5 μg/mL 时吸光度略微下降, 后来随着 NaHSO₃ 质量浓度的增加, 吸光度缓慢增加。整体上 NaHSO₃ 对 CSPCs 的稳定性影响不大, 并且一定剂量的 NaHSO₃ 对 CSPCs 有保护作用。

2.3.6 金属离子对 CSPCs 稳定性的影响

由图7可见, 0.1mol/L 的不同金属离子对 CSPCs 的稳定性有一定的影响。尤其以 Ca²⁺、Fe²⁺ 和 Cu²⁺ 的影响最为显著; 而 Na⁺、K⁺、Mg²⁺ 和 Al³⁺ 对 CSPCs 的影响较小。表明 CSPCs 不宜与 Ca²⁺、Fe²⁺ 和 Cu²⁺ 共存, 即不宜采用铁和铜器皿贮藏。

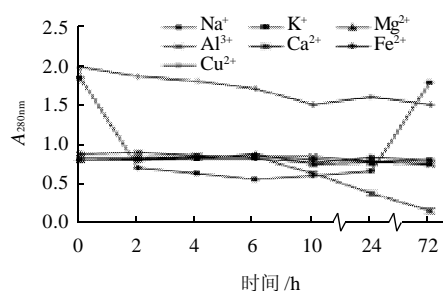


图7 金属离子对CSPCs稳定性的影响

Fig.7 Effect of metal ions on stability of CSPCs

3 结 论

3.1 通过单因素和响应面分析得出CSPCs提取的最佳条件为乙醇溶液体积分数51.1%、料液比1:14.5(g/mL)、浸提温度67.3℃、浸提时间2h,在此条件下CSPCs提取得率理论值为40.35mg/g,实测值为40.23mg/g。

3.2 CSPCs在弱酸性环境下较稳定;对光热不稳定,宜避光、低温保藏;适量的亚硫酸氢钠对CSPCs有一定的保护作用,而苯甲酸钠不能与之共存;在Na⁺、K⁺、Mg²⁺和Al³⁺存在时较稳定,而Ca²⁺、Fe²⁺和Cu²⁺不能与之共存。

参考文献:

- [1] ÖZCİMEN D, ERSOY-MERİBOYU A. A study on the carbonization of grapeseed and chestnut shell[J]. Fuel Processing Technology, 2008, 89 (11): 1041-1046.
- [2] VÁZQUEZ G, GONZÁLEZ-ALVAREZ J, SANTOS J, et al. Evaluation of potential applications for chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts[J]. Industrial Crops and Products, 2009, 29(2/3): 364-370.
- [3] VÁZQUEZ G, CALVO M, SONIA FREIRE M, et al. Chestnut shell as heavy metal adsorbent: optimization study of lead, copper and zinc cations removal[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 172(2/3): 1402-1414.
- [4] VÁZQUEZ G, SONIA-FREIRE M, GONZÁLEZ-ALVAREZ J, et al. Equilibrium and kinetic modelling of the adsorption of Cd²⁺ ions onto chestnut shell[J]. Desalination, 2009, 249(2): 855-860.
- [5] YAO Zengyu, QI Jianhua, WANG Lihua. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on the biosorption of Cu(II) onto chestnut shell [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 174(1/3): 137-143.
- [6] ÖZCİMEN D, ERSOY-MERİBOYU A. Removal of copper from aqueous solutions by adsorption onto chestnut shell and grapeseed activated carbons[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 168(2/3): 1118-1125.
- [7] MEMON G Z, BHANGER M I, AKHTAR M. The removal efficiency of chestnut shells for selected pesticides from aqueous solutions[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2007, 315(1): 33-40.
- [8] WANG Lijuan, LI Jian, FENG Hao. Dyeing of flax fabric with natural dye from chestnut shells[J]. Pigment & Resin Technology, 2009, 38(6): 347-352.
- [9] 李永祥, 詹少华, 蔡永萍, 等. 板栗壳色素的提取、纯化及稳定性[J]. 农业工程学报, 2008, 24(9): 298-302.
- [10] 李永祥, 詹少华, 樊洪泓, 等. 板栗壳色素化学性质及结构的初步研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 51-54.
- [11] 李云雁, 宋光森. 板栗壳色素性质的研究[J]. 科技进展, 2003, 17(3): 37-40.
- [12] PINENT M, BLADE C, SALVADO M J, et al. Procyanidin effects on adipocyte-related pathologies[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2006, 46(7): 543-550.
- [13] YUSUF Y, TOLEDO R T. Health aspects of functional grape seed constituents[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15(9): 422-433.
- [14] 周玮婧, 孙智达, 谢笔钧, 等. 荔枝皮原花青素提取、纯化及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 68-71.
- [15] 张兴茂, 林松毅, 刘静波, 等. 长白山笃斯越橘果实原花青素浸提工艺的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 186-189.
- [16] PORTER L J, HRSTICH L N, CHAN B J. The conversion of Procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin[J]. Phytochemistry, 1986, 25(1): 223-230.
- [17] 杨滢滢, 王雪青, 庞广昌. 原花青素抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 694-697.
- [18] 戚向阳, 陈维军, 王小红. 苹果原花青素的稳定性及其保健饮品的研究[J]. 食品科技, 2003(1): 88-90.