

杏仁种皮黑色素提取工艺优化

李巨秀¹, 李红姣², 赵忠^{2,*}, 夏秋敏¹, 朱海兰²

(1.西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100; 2.西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以杏仁种皮为试验材料,采用碱溶解酸沉淀的方法提取黑色素,以氢氧化钠溶液浓度、提取温度、提取时间、料液比为考察因素,以黑色素得率为指标,通过单因素和正交试验,研究山杏种皮黑色素的提取工艺。结果表明:氢氧化钠浓度、提取温度、料液比3个因素对黑色素的得率均表现出极显著($P < 0.01$)影响;3个因素对黑色素提取得率影响的主次顺序为提取温度>氢氧化钠浓度>料液比;最佳工艺为氢氧化钠浓度0.4mol/L、提取温度80℃、提取时间6h、料液比1:20(g/mL),黑色素得率达到7.2%。

关键词:杏仁种皮;黑色素;提取工艺

Optimization of Extraction Process for Melanin Pigment from Apricot Kernel Skin

LI Ju-xiu¹, LI Hong-jiao², ZHAO Zhong^{2,*}, XIA Qiu-min¹, ZHU Hai-lan²

(1. College of Food Technology and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Melanin is a kind of complex polymeric phenolic compound, which can be used in the field of medicine, cosmetics, food and electron. In this work, melanin was extracted from apricot kernel skin by alkaline extraction, acid hydrolysis, and repeated precipitation, and one-factor-at-a-time and orthogonal array design methods were used to optimize four extraction conditions including NaOH concentration, extraction temperature, extraction time and material-to-liquid ratio based on melanin yield. Three extraction conditions except extraction time had a highly significant effect on melanin yield ($P < 0.01$), and could be ranked in descending order of importance as follows: extraction temperature > NaOH concentration > material-to-liquid ratio. The optimal extraction conditions were NaOH concentration of 0.4 mol/L, extraction temperature of 80 °C, and extraction duration of 6 h, and material-to-liquid ratio of 1:20. Under these conditions, the yield of melanin was 7.2%.

Key words: apricot kernel skin; melanin; extraction process

中图分类号: S662.209.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)08-0011-04

黑色素是多酚或吡啶的复杂聚合物,具有抗紫外线辐射、螯合金属离子、促进免疫和抗氧化活性等功能作用^[1-3]。已有研究表明,从黑香种草(*Nigella sativa* L.)中提取的黑色素可治疗与细胞因子产生不平衡相关的一些疾病;茶叶黑色素可以保护由联氨诱导的肝脏损失,并且黑色素可以在天然产品中用于防治自由基氧化反应^[4-6]。黑色素根据其组成可分为3类:真黑色素(eumelanins)、棕黑色素(phaeomelanins)和异黑色素(allomelanins)。真黑色素是一种深黑色的颜色,含有氮元素,而棕黑色素是黄色-微红色-褐色,含有硫元素的色素^[7-8]。已有研究人员对不同材料中黑色素的提取、性质等方面做了大量研究,如黑米、乌骨鸡、鱿鱼墨、乌饭树叶等中的黑色素^[9-13]。

黑色素由于其独特的功能特性,在医药、化工、食品等领域的应用越来越广泛。目前,黑色素的市场主要以化学合成为主,而植物中的天然黑色素需要研究和开发。杏仁种皮是杏仁产品加工的副产物,大约占杏仁质量的5%^[14]。杏仁种皮中含有丰富的黑色素,但对杏仁黑色素的提取工艺参数和性质研究报道较少。由于黑色素除了溶于碱溶液,微溶于二甲基亚砜外,几乎不溶于其他任何常规试剂和有机溶剂^[15-16],因此利用碱溶液溶解、盐酸溶液沉淀提取杏仁种皮中的黑色素,通过单因素和正交试验优化出杏仁黑色素的提取工艺,为该黑色素的理化性质、功能特性和开发应用奠定基础。

收稿日期: 2011-01-27

基金项目: 国家林业局林业公益性科研专项(200904020)

作者简介: 李巨秀(1972—),女,副教授,博士,主要从事食品化学和功能食品的研究。E-mail: lijuxiu@nwsuaf.edu.cn

*通信作者: 赵忠(1958—),男,教授,博士,主要从事森林培育研究。E-mail: zhaozh@nwsuaf.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

杏仁种皮：将产自甘肃平凉的杏仁手工去皮，种皮在自然条件下风干后备用；氢氧化钠、丙酮、乙酸乙酯 天津市博迪化工有限公司；盐酸 成都市科龙化工试剂厂；无水乙醇 西安三浦化学试剂有限公司。所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

DSY-1-4 型电热恒温水浴锅 北京爱琦霞商贸有限公司；AG135 型分析天平 瑞士梅特勒-托利多集团；PHS-3C 型 pH 计 上海雷磁仪器厂；R-200 型旋转蒸发器 巩义市予华仪器有限责任公司；SC-3610 型低速离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 杏仁种皮黑色素提取工艺流程

采用碱溶酸沉淀法提取杏仁种皮黑色素的工艺流程见图 1。

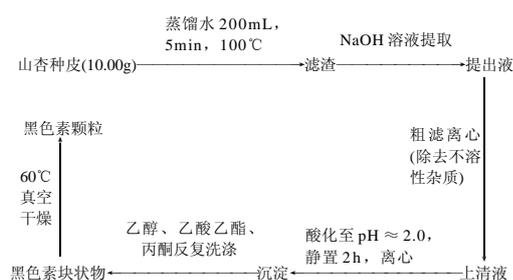


图 1 杏仁种皮黑色素的提取工艺

Fig.1 Flow chart for melanin extraction from apricot kernel skin

1.3.2 杏仁种皮黑色素提取的单因素试验

以黑色素得率作为评价指标，分别对氢氧化钠浓度、提取时间、提取温度、料液比进行单因素试验，以确定各因素的影响效果和适宜范围。

1.3.2.1 氢氧化钠浓度对黑色素得率的影响

称取 5 份 10.00g 杏仁种皮于 500mL 烧杯中，加入 200mL 蒸馏水，煮沸 5min，用纱布过滤后将滤渣转移至烧杯中，以 0.00、0.25、0.50、0.75、1.00mol/L NaOH 溶液作为提取剂，料液比 1:15(g/mL)，烧杯用保鲜膜封口后置于 60℃ 水浴中提取 2h。计算黑色素的得率，以确定适宜的氢氧化钠浓度。

1.3.2.2 提取时间对黑色素得率的影响

以 0.50mol/L NaOH 溶液作为杏仁种皮提取剂，其余条件同 1.3.2.1 节，研究水浴 2、4、5、6、8h 对黑色素得率的影响，以确定适宜的提取时间。

1.3.2.3 提取温度的选择

水浴 6h，其余条件同 1.3.2.2 节，研究水浴温度 20、40、60、80、100℃ 对黑色素得率的影响，以确定适宜的提取温度。

1.3.2.4 料液比对黑色素得率的影响

水浴温度 100℃，其余条件同 1.3.2.3 节，研究料液比 1:6、1:10、1:15、1:20、1:25 对黑色素得率的影响，以确定适宜的料液比。

1.3.3 杏仁种皮黑色素提取的优化试验

在单因素试验的基础上，选用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计，以氢氧化钠浓度、提取温度、提取料液比为考察因素，提取时间 6h，以黑色素得率为指标，优化提取工艺参数，从中筛选最优的工艺条件和技术参数。因素水平见表 1。所有组合均进行两次重复试验。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Levels of the factors tested in orthogonal array design

水平	因素		
	A 氢氧化钠浓度/(mol/L)	B 提取温度/℃	C 料液比(g/mL)
1	0.40	60	1:16
2	0.50	80	1:20
3	0.60	100	1:24

1.3.4 黑色素得率计算

按照下列公式计算黑色素得率。

$$X/\% = \frac{m_1}{m} \times 100$$

式中：X 为黑色素得率/%； m_1 为真空干燥后的黑色素质量/g；m 为称取的杏仁种皮质量/g。

1.4 数据分析

用 DPS7.55 统计软件设计试验和分析数据。

2 结果与分析

2.1 氢氧化钠浓度对杏仁种皮黑色素得率的影响

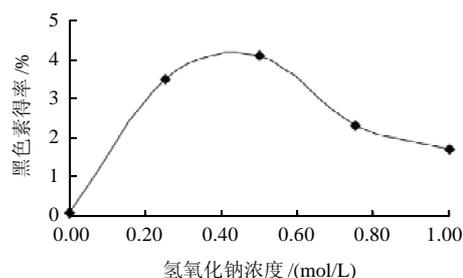


图 2 氢氧化钠浓度对杏仁种皮黑色素得率的影响

Fig.2 Effect of NaOH concentration on the yield of melanin

在生物体内,黑色素一般与蛋白质、糖类等其他成分结合在一起,提取黑色素需先破坏化学键。由于黑色素一般溶于碱性溶液和微溶于二甲基亚砜,所以试验中通常采用氨水或NaOH溶液等碱溶液作为提取溶剂,但氨水易挥发,而且挥发气体具有刺激性,因此本试验以不同浓度的NaOH溶液为提取溶剂进行对比研究,结果如图2所示。

由图2可知,NaOH浓度对杏仁种皮黑色素得率有显著影响,蒸馏水几乎提取不出黑色素,随着氢氧化钠浓度的增大,黑色素的得率也不断增大,当浓度增大到0.50mol/L时取得最大值,此后黑色素得率随着氢氧化钠浓度的增大而减小,由此可知提取杏仁种皮黑色素的NaOH适宜浓度为0.50mol/L。

2.2 提取时间对杏仁种皮黑色素得率的影响

黑色素为非均匀性的无定形大分子物质,具有不溶于水 and 常见的有机溶剂,且一般与蛋白质或糖类牢固地结合在一起等特殊的性质,因而氢氧化钠深入到植物组织中充分溶解黑色素需要一定的时间。提取时间对杏仁种皮黑色素得率的影响结果如图3所示。

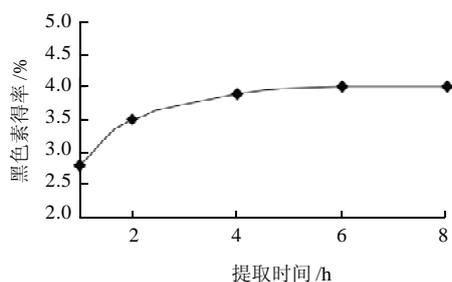


图3 提取时间对杏仁种皮黑色素得率的影响

Fig.3 Effect of extraction duration on the yield of melanin

由图3可知,在提取时间1~6h范围内,黑色素提取得率不断增大,但6h之后提取得率几乎不变,综合考虑黑色素提取得率和成本,以6h作为进一步试验的提取时间。

2.3 提取温度对杏仁种皮黑色素得率的影响

一般来说,温度越高,扩散速度越快,被提取的目标组分的得率就越高。因为温度升高,分子运动加快,使得植物组织软化变快,促进了膨胀,从而增加可溶性物质的溶解度和扩散速度,促进有效成分浸出。因此温度对于黑色素的提取是一个重要的因素,不同提取温度对杏仁种皮黑色素得率的影响结果见图4。

由图4可知,随着温度升高黑色素的提取得率不断增大,室温下黑色素的得率很低。植物黑色素是一类由酚类聚合而成的大分子物质,易于被氧化,在温度高于60℃后,可能会造成一部分黑色素被氧化,前人

研究表明,在氧化过程中,酚羟基会转变为醌基。因此本试验中对黑色素进行了充氮保护。温度过高一方面会增大氧化程度,另一方面消耗的热量过多,不利于工业化提取,所以将100℃作为杏仁黑色素的提取温度。

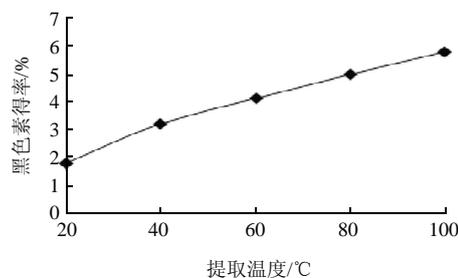


图4 提取温度对杏仁种皮黑色素得率的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on the yield of melanin

2.4 料液比对杏仁种皮黑色素得率的影响

浓度差是溶剂提取过程的一个推动力。在提取过程中,保持良好的浓度差,将得到良好的浸提效果。一般情况下,用的溶剂越多,浸取出来的物质就越多,当扩散达到平衡时,再增加溶剂量也不能使浸出物质有所增加。因此选择适宜的料液比也是对原料和溶剂的最大化利用,不同料液比对黑色素得率的影响如图5所示。

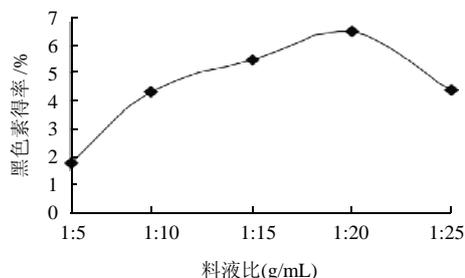


图5 不同料液比对黑色素得率的影响

Fig.5 Effect of material-to-liquid ratio on the yield of melanin

由图5可知,料液比对杏仁种皮黑色素的得率有较为显著的影响。在料液比(g/mL)1:6~1:20范围内,黑色素得率随料液比的增加而逐步增大,当增加到1:20时黑色素的得率达到最大值,当料液比再增大,黑色素的得率趋于下降,因此,选择1:20作为进一步试验的提取料液比。

2.5 杏仁种皮黑色素提取工艺优化试验

在单因素试验基础上,选用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表,对影响山杏种皮黑色素得率的因素进行提取工艺优化研究。试验设计及结果见表2,方差分析见表3。

表2 杏仁种皮黑色素提取的正交试验设计及结果
Table 2 Orthogonal array design and experimental results for optimizing the extraction of melanin from apricot kernel skin

试验号	A 溶剂浓度/(mol/L)	B 温度/°C	C 料液比(g/mL)	空列	黑色素得率/%	
					I	II
1	1(0.4)	1(60)	1(1:16)	1	5.5	5.4
2	1	2(80)	2(1:20)	2	7.2	7.2
3	1	3(100)	3(1:24)	3	6.9	6.8
4	2(0.5)	1	2	1	5.5	5.3
5	2	2	3	2	6.1	6.3
6	2	3	1	3	5.4	5.0
7	3(0.6)	1	3	1	5.3	5.3
8	3	2	1	2	6.1	5.9
9	3	3	2	3	6.6	6.4
K_1	39	32.3	33.3	36.3		
K_2	33.6	38.8	38.2	35.4		
K_3	35.6	37.1	36.7	36.5		
k_1	6.5	5.3833	5.55	6.05		
k_2	5.6	6.4667	6.3667	5.9		
k_3	5.9333	6.1833	6.1167	6.0833		
R	0.9	1.0833	0.8167	0.1833		

表3 正交设计方差分析表

Table 3 Variance analysis for the experimental results of orthogonal array design

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
A	2.4844	2	1.2422	48.0391	0.0001
B	3.7878	2	1.8939	73.2402	0.0001
C	2.1011	2	1.0506	40.627	0.0001
空列	0.1144	2	0.0572		
模型误差	0.1144	2	0.0572	3.0294	0.2728
重复误差	0.17	9	0.0189		
合并误差	0.2844	11	0.0259		

由表2可知, 3个因素对黑色素提取得率影响的主要顺序为 $B > A > C$, 即提取温度 $>$ 氢氧化钠浓度 $>$ 料液比。试验所得最佳优化工艺组合为 $A_1B_2C_2$, 即氢氧化钠浓度 4.0mol/L 、提取温度 80°C 、料液比 $1:20$ 。由表3可知, 氢氧化钠浓度、提取温度、料液比3个因素对黑色素的得率均表现出极显著($P < 0.01$)影响。

3 结论

采用碱溶酸沉淀法提取杏仁种皮中黑色素的优化工

艺为氢氧化钠浓度 0.40mol/L 、提取温度 80°C 、料液比 $1:20$ 、提取时间 6h , 黑色素得率达 7% 以上, 且氢氧化钠浓度、提取温度和料液比3个因素对黑色素的得率均表现出极显著($P < 0.01$)影响, 三者对黑色素得率影响的主次顺序为提取温度 $>$ 氢氧化钠浓度 $>$ 料液比。该工艺操作简单, 提取效率较高。

参考文献:

- [1] 徐磊, 钱振明, 孙继波, 等. 短梗霉黑色素的分离纯化及结构的初步分析[J]. 氨基酸和生物资源, 2009, 31(2): 9-13.
- [2] 涂勇羽, 孙亚真, 田颖刚, 等. 泰和乌骨鸡黑色素的体外抗氧化作用[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 145-149.
- [3] SAVA V M, GALKIN B N, HONG M Y, et al. A Novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immuno-stimulating activity[J]. Food Research International, 2001, 34(4): 337-343.
- [4] SAVA V M, HUNG Y C, BLAGODARSKY V A, et al. The liver-protecting activity of melanin-like pigment derived from black tea[J]. Food Research International, 2003, 36(5): 505-511.
- [5] HUNG Y C, SAVA V M, BLAGODARSKY V A, et al. Protection of tea melanin on hydrazine-induced liver injury[J]. Life Sciences, 2003, 72(9): 1061-1071.
- [6] HUNG Y C, SAVA V M, MAKAN S Y, et al. Antioxidant activity of melanins derived from tea: comparison between different oxidative states[J]. Food Chemistry, 2002, 78(2): 233-240.
- [7] CAPOZZI V, PEMA G, CARMONE P, et al. Optical and photoelectronic properties of melanin[J]. Thin Solid Films, 2006, 511-512(3): 362-366.
- [8] BARBARA B. Progress of infrared investigations of melanin structures[J]. Spectrochimica Acta Part A, 1996, 52(9): 1157-1162.
- [9] 张吉祥, 赵文静, 白晓杰, 等. 正交试验法优化黑米黑色素的超声辅助提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 39-42.
- [10] 李欣, 田颖刚, 谢明勇, 等. 乌骨鸡黑色素的提取分离及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 117-121.
- [11] 宋茹, 李厚宝, 邓尚贵. 鲑鱼墨黑色素酶解法提取工艺优化及其紫外、红外光谱特征分析[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 63-67.
- [12] 胡志杰, 蔡智慧. 微波辐射提取乌饭树叶黑色素工艺的研究[J]. 中国野生植物资源, 2007, 26(6): 52-57.
- [13] 陆懋荪, 尹佩玉, 容蓉, 等. 黑芝麻黑色素的化学结构研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 91-94.
- [14] 姚增玉, 赵忠, 史清华, 等. 山杏种皮黑色素提取工艺研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(5): 120-126.
- [15] 叶明, 朱立, 杨柳, 等. Plectania YM421 胞内黑色素提取及其生物功能[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 229-233.
- [16] 徐磊. 短梗霉黑色素的分离提取及其结构分析[D]. 大连: 大连理工大学, 2006.