

新疆野苹果果实中总黄酮的提取工艺

克热木江·吐尔逊江, 努尔阿米娜·阿布都肉苏, 吐尔逊娜依·迪力夏提, 阿不都拉·阿巴斯*
(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要: 以新疆野苹果果实为原料, 对新疆野苹果果实中的总黄酮提取工艺进行研究, 采用单因素试验法对总黄酮提取率的主要因素进行分析, 利用正交试验优化最佳工艺条件, 并在最佳提取条件下对3种栽培苹果(二曲子、红元帅、槟子)进行总黄酮的提取, 并与野苹果的总黄酮含量进行对照。结果表明: 新疆野苹果果实中提取总黄酮的最佳条件为乙醇体积分数55%、提取温度50℃、料液比1:45(g/mL)、提取时间2h, 在最佳条件下热风干燥的野苹果果实中总黄酮的提取率为6.78%, 冷冻干燥的野苹果、红元帅、二曲子和槟子的总黄酮提取率分别为13.61%、2.01%、1.45%和6.69%。

关键词: 新疆野苹果; 总黄酮; 冷冻干燥

Extraction of Total Flavonoids from *Malus sieversii* Fruits

Kerimjan TURSUNJAN, Nuramina ABDURUSUL, Tursunay DILXAT, Abdulla ABBAS*
(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Ürümqi 830046, China)

Abstract: Major factors influencing the extraction of total flavonoids from *Malus sieversii* (Ldb.) Roem fruits were studied by single factor tests, and the optimal extraction process conditions of total flavonoids were explored by orthogonal tests. Results indicated that the optimal extraction conditions of total flavonoids were ethanol concentration of 55%, extraction temperature of 50 °C, material-liquid ratio of 1:45 and extraction time of 2 h. Under the optimal extraction process conditions, the extraction rate of total flavonoids was 6.78%. In addition, the extraction rates of total flavonoids from freeze-drying *Malus sieversii*, freeze-drying red-marshall, erquzi and small apple were 13.61%, 2.01%, 1.45% and 6.69%, respectively.

Key words: *Malus sieversii* (Ldb.) Roem; flavonoid; freeze-drying

中图分类号: S661.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)10-0020-04

野苹果(*Malus sieversii* (Ldb.) Roem)又名塞威士苹果, 乔木, 是我国特有种^[1], 生于山间台地、阴坡和半阴坡, 海拔1100~1400m, 常组成大面积群林。主要分布在伊犁谷地和准噶尔西部巴尔鲁克山。其果实形状有扁圆形、近圆形、圆形和圆锥形等, 果皮颜色有绿、黄、橘黄、粉红、红和深红等, 具有栽培苹果的典型特征^[2]。研究表明, 与富士、金帅和红星品种相比, 新疆野苹果在矿物质元素、3种糖(果糖、葡萄糖、蔗糖)及苹果酸含量方面表现出很好的营养优势^[3]。

黄酮类化合物作为一种功能成分, 具有许多有益的生理效应和药理作用, 越来越引起人们的重视^[4-5]。本研究利用乙醇提取法提取新疆野苹果果实的总黄酮, 并优化提取工艺, 为新疆野苹果在保健食品方面的开发利用提供可靠的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新疆野苹果果实于2010年9月采于新疆伊犁哈萨克自治州霍城县大西沟山坡。

二曲子、红元帅、槟子苹果均从大西沟乡农民果园里采集。

芦丁标准品 上海源叶生物科技有限公司; 无水乙醇 天津市致远化学试剂有限公司; 乙醚 江苏省南通友邦机械有限公司; NaNO₂、NaOH 天津市化学试剂三厂; Al(NO₃)₃·9H₂O 天津市盛淼精细化工有限公司。上述试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

S24 可见分光光度计 上海棱光技术有限公司; RE-

收稿日期: 2011-09-14

作者简介: 克热木江·吐尔逊江(1985—), 男, 硕士研究生, 主要从事植物有效成分分析研究。E-mail: kerim703@126.com

*通信作者: 阿不都拉·阿巴斯(1951—), 男, 教授, 主要从事资源植物研究。E-mail: abdulla@xju.edu.cn

52A 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-D(III)循环水式真空泵、HH-S 型水浴锅 巩义市予华仪器厂; 电子分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; WH-3 微型旋涡混合仪 上海泸西分析仪器厂; DHG-9141A 型电热恒温干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; MDF-U53V 超低温冰箱 Sanyo (日本)电子有限责任公司; RZ2 真空泵、Alpha1-2 LD 冷冻干燥器 北京五洲东方科技发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样粉的制备

对新疆野苹果果实采用热风干燥方法制备样粉: 取一部分新疆野苹果果实置于 60℃ 干燥箱进行烘干, 粉碎过筛(60 目), 经石油醚脱脂脱色后烘干至无残留, 得到苹果果实样粉备用。

1.3.2 总黄酮的提取

精密称取 2.0g 脱脂后的果实粉末, 置于 250mL 圆底烧瓶中, 加适量相应体积分数(40%、50%、60%、70%、80%)乙醇在混合仪中混合约 20s, 至相应的料液比[(1:20、1:30、1:40、1:50、1:60(g/mL))], 在相应温度(20、40、60、80、100℃)的水浴条件下提取相应时间(1、1.5、2、2.5、3h)后, 过滤, 将滤液用旋转蒸发仪在 55℃ 条件下浓缩, 将浓缩液加体积分数 60% 的乙醇溶液定容至 50mL 备用。

1.3.3 总黄酮含量的测定

采用亚硝酸钠-硝酸铝分光光度法^[6]测总黄酮含量。

标准曲线的绘制: 精密称取在 120 干燥至质量恒定的芦丁对照品 5mg, 置于 50mL 容量瓶中, 加适量体积分数 60% 乙醇溶液, 在温水(40)中溶解, 放冷后加 60% 乙醇溶液定容为质量浓度为 0.1mg/mL 的标准品溶液。

精确量取上述储备标准品溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL 分别置于 25mL 容量瓶中, 加入质量分数 5% 的亚硝酸钠 0.8mL, 摇匀, 放置 6min, 后加入质量分数 10% 的硝酸铝溶液 0.8mL, 摇匀, 放置 6min, 再加入质量分数 4% 的 NaOH 溶液 10mL, 用体积分数 60% 乙醇溶液定容, 摇匀, 放置 12min 后, 在 510nm 波长处测定其吸光度。以吸光度(y)为纵坐标、溶液浓度(x)为横坐标作图, 得回归方程^[7]: $y = 5.6071x - 0.0002 (R^2 = 0.9997)$ 。

1.3.4 总黄酮提取率的计算^[8]

将 1.3.2 节提及的提取液稀释至相应倍数后如 1.3.3 节方法, 自“加入质量分数 5% 的亚硝酸钠溶液 0.8mL”开始操作, 测定吸光度, 代入回归方程, 计算出相应的黄酮质量浓度。按下式计算黄酮的提取率:

$$\text{黄酮提取率} / \% = \frac{\text{样液黄酮质量浓度} \times \text{样液体积}}{\text{样品质量}} \times 100$$

1.3.5 冷冻干燥各苹果品种与热风干燥新疆野苹果果实的黄酮提取率的比较

将新疆野苹果、二曲子、红元帅以及槟子先在 -86℃ 冷冻 6h 后, 在 -54℃、真空度 70Pa 条件下进行真空冷冻干燥 24h, 后粉碎过筛(60 目), 经石油醚脱脂脱色后烘干至无残留, 得到苹果果实样粉备用, 在最优条件下按照 1.3.2 节方法分别提取此 4 种果实的黄酮, 并与热风干燥后新疆野苹果果实的黄酮提取率进行比较。

2 结果与分析

2.1 提取温度对提取率的影响

在乙醇体积分数 60%、料液比 1:40(g/mL)、提取时间 2h 条件下, 不同提取温度对黄酮提取率的影响如图 1 所示。由图 1 可知, 在温度为 60℃ 时提取率最高。温度增高, 提取率反而下降。原因可能是在温度过高的情况下, 可溶性蛋白质溶出变性, 导致溶液黏度增大, 影响细胞的破裂。从而阻碍了黄酮类物质的溶出, 因此降低了黄酮的提取率^[9]。

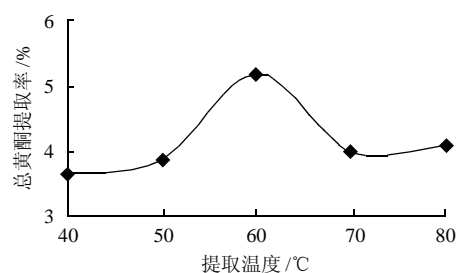


图 1 提取温度对提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on extraction rate of total flavonoids

2.2 提取时间对提取率的影响

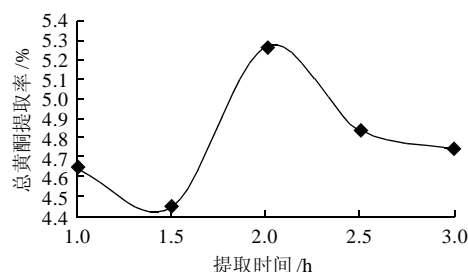


图 2 提取时间对提取率的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on extraction rate of total flavonoids

图 2 显示了提取温度为 60℃ 时不同提取时间对野苹果果实中黄酮类物质的提取率的影响, 其他试验条件同

2.1 节。由图可知,当提取时间为 2h 时,提取效果最好。时间过短,黄酮类化合物还未充分溶出,但当时时间继续延长时,因为黄酮逐渐被氧化而导致总黄酮提取率的降低。

2.3 料液比对提取率的影响

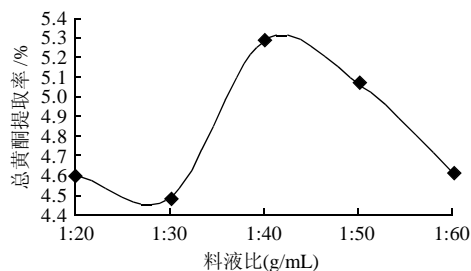


图3 料液比对提取率的影响

Fig.3 Effect of material-liquid ratio on extraction rate of total flavonoids

图3显示提取时间为 2h 的条件下,不同料液比对新疆野苹果中黄酮提取率的影响,其他试验条件如 2.2 节。结果表明:料液比为 1:40(g/mL)时的提取效果达到最佳。当料液比过小时,样品里的总黄酮没能充分地溶解出来;料液比过高,导致有些对总黄酮不利的成分的溶解,干扰黄酮的提取。

2.4 乙醇体积分数对提取率的影响

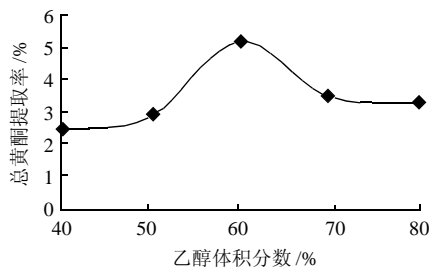


图4 乙醇体积分数对提取率的影响

Fig.4 Effect of ethanol concentration on extraction rate of total flavonoids

图4显示了在料液比为 1:40(g/mL)条件下,不同乙醇体积分数对新疆野苹果中黄酮的提取率的影响,其他试验条件同 2.3 节。由图4可知,随着乙醇体积分数的提高,黄酮类物质的提取率也增加,在乙醇体积分数为 60% 时出现峰值。在乙醇体积分数大于 60% 时,提取率有所下降,这可能由于乙醇体积分数高会在细胞壁上产生保护膜,阻止细胞内黄酮的溶解出来。

2.5 总黄酮提取工艺优化

由以上单因素试验可知,总黄酮的提取温度、料液比、提取时间、乙醇体积分数等多个因素对黄酮类

的提取率均具有很大的影响。为了对总黄酮提取工艺条件优化,选择 $L_9(3^4)$ 正交试验^[10],其因素水平见表1。正交试验结果和方差分析结果见表2、3。

表1 总黄酮提取工艺正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal tests

水平	A 温度/℃	B 料液比(g/mL)	C 提取时间/h	D 乙醇体积分数/%
1	50	1:35	1.5	55
2	60	1:40	2	60
3	70	1:45	2.5	65

表2 总黄酮提取工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果

Table 2 Design and results of orthogonal tests

试验号	因素				总黄酮提取率/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	4.96
2	1	2	2	2	5.69
3	1	3	3	3	4.94
4	2	1	2	3	3.78
5	2	2	3	1	4.8
6	2	2	3	1	4.89
7	3	1	3	2	3.78
8	3	2	1	3	4.05
9	3	3	2	1	5.44
k_1	5.20	4.17	4.63	5.10	
k_2	4.52	4.88	4.97	4.78	
k_3	4.43	5.09	4.54	4.26	
R	0.77	0.91	0.43	0.84	

表3 正交试验结果方差分析

Table 3 Variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1.08	2	4.46	
B	1.36	2	4.46	*
C	0.32	2	4.46	
D	1.08	2	4.46	*
误差	0.03	8		

注:“*”表示差异显著($P < 0.05$)。

从表2、3可以看出,各因素对提取效果影响的大小顺序是:料液比对提取效果的影响最大,其次为乙醇体积分数和提取温度,提取时间影响最小。料液比和乙醇体积分数对提取的影响达到显著水平,最优提取方案为 $A_1B_3C_2D_1$,即提取温度 50℃、料液比 1:45(g/mL)、提取时间 2h、乙醇体积分数 55%,在此参数组合条件下,做了3次重复实验,野苹果果实中黄酮类化合物提取率平均为 6.78%,高于正交试验中的总黄酮提取率,证明了实验的可靠性^[11]。

2.6 冷冻干燥各苹果品种与热风干燥新疆野苹果果实的总黄酮提取率的比较

表4 5种苹果粉体的部分特性
Table 4 Properties of five apple powders

苹果品种	粉体颜色	果实直径/cm	干燥时间/d	总黄酮提取率/%
烘干野苹果	枣红色	3~4	4.5	6.78
冻干野苹果	土黄色	3~4	1.5	13.61
冻干红元帅	奶黄色	8~12	1.5	2.01
冻干二曲子	奶白色	9~14	1.5	1.45
冻干槟子	土黄色	2~4	1.5	6.69

表4表明,4种苹果(新疆野苹果、二曲子、红元帅、槟子)粉末中,烘干和冷冻干燥的野苹果的总黄酮含量、粉体颜色及品味其他品种有明显的差别:冷冻干燥的野苹果果实黄酮提取率最高,槟子的总黄酮提取率次之,为6.69%,含量最低的是二曲子1.45%。但热风干燥的野苹果总黄酮提取率远远大于冷冻干燥的其他品种苹果的总黄酮含量。干燥方法的不同决定黄酮含量的高低。冷冻干燥的时间短,有效成分损失小,但是一次能干燥的样品的量少,耗电量较高。冷冻干燥后的样品可以保留新鲜食品的色、香、味及营养成分,比其他干燥方法生产的食品更接近新鲜食品,避免了一般干燥方法中因物料内部水分向表面迁移而将无机盐和营养携带到物料表面而造成表面硬化和营养损失等现象^[12-13],而烘干的样品在干燥过程中会流失部分有效成分。

3 结 论

本实验结果表明,影响总黄酮提取率的因素主次顺序为料液比、乙醇体积分数、提取温度、提取时间。最佳的参数组合为提取温度50℃、料液比1:45(g/mL)、提取时间2h、乙醇体积分数55%,在此条件下,烘干

的新疆野苹果果实中黄酮类物质的提取率达到6.78%,冷冻干燥的野苹果的总黄酮含量为13.61%,相当于烘干野苹果中总黄酮含量的2.01倍。新疆野苹果中的黄酮类化合物明显高于其他3种栽培苹果,并且其在矿物质元素、糖类和苹果酸等物质含量方面优于其他品种,因此新疆野苹果能为药学,保健食品领域提供很好的绿色植物资源。

参考文献:

- [1] 郭仲军,刘丽艳,张炜银,等.新疆野苹果资源现状分析及前景展望[C]//中国生物多样性保护与研究进展.VII:第七届全国生物多样性保护与持续利用研讨会论文集.北京:气象出版社,2006:54-61.
- [2] 安争夕,周桂玲,杨昌友,等.新疆植物志[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1995,2(2):292-295.
- [3] 张小燕,陈学森,彭勇,等.新疆野苹果矿质元素与糖酸组分的遗传多样性[J].园艺学报,2008,35(2):277-280.
- [4] 陈乃富,张莉,夏冠军.金樱子黄酮类化合物提取条件研究[J].中国林副特产,2006(4):1-4.
- [5] 张梅.旱莲草中黄酮类成分的免疫调节作用[J].中草药,1997,28(10):615.
- [6] 董彩文,梁少华,汤风雨,等.苹果渣中总黄酮的提取及其抑菌活性研究[J].安徽农业科学,2008,36(27):11931;11662.
- [7] 宫玉婷,王钰,阿不都拉·阿巴斯.梓树果实中黄酮类化合物提取工艺研究[J].食品科学,2008,29(4):193-195.
- [8] 库尔班尼沙·买提卡思木.苘麻黄酮类化合物的提取分离及其体外抗菌研究[D].乌鲁木齐:新疆大学,2009.
- [9] 高梦祥,赵喜红.柿叶黄酮类物质提取工艺研究[J].陕西农业科学,2005(3):41-43.
- [10] 石永平,汪海.正交设计优选贯叶连翘中总黄酮提取工艺[J].天然产物开发与研究,2005,17(3):325-326.
- [11] 刘颖,高晗,范婷婷.壳聚糖-戊二醛交联吸附法固定 β -葡萄糖苷酶的研究[J].食品科学,2008,29(5):315-318.
- [12] 宫元娟,王博,林静.香菇冷冻干燥工艺参数的试验研究[J].农业工程学报,2004,20(1):226-229.
- [13] 石小琼.真空预冷技术在芋冷藏保鲜上的应用研究[J].农业工程学报,2001,17(4):86-90.