

黄花菜多酚超声辅助提取条件研究

雷秀达*, 曹 熙, 杨大伟#

湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南 长沙

收稿日期: 2021年9月22日; 录用日期: 2021年10月11日; 发布日期: 2021年10月18日

摘 要

为研究黄花菜多酚的提取特性及最佳条件, 实验通过单因素和响应面试验设计, 以多酚得率为试验指标, 探讨了超声时间(10 min、20 min、30 min)、乙醇浓度(40%、60%、80%、100%)、料液比(1:5、1:10、1:15)及超声温度(30℃、40℃、50℃)等因素对黄花菜多酚得率的影响。结果表明, 料液比、超声温度、乙醇浓度对多酚得率的影响达显著水平, 影响顺序为料液比 > 超声温度 > 乙醇浓度 > 超声时间; 料液比与温度、时间和乙醇浓度之间的交互作用对多酚得率均有影响; 黄花菜多酚的最佳提取条件为乙醇浓度66%, 超声时间22 min, 超声温度43℃, 料液比1:12, 多酚得率为2.318%。上述研究结果可为黄花菜多酚提取工艺的研究及实践提供有益的参考。

关键词

黄花菜, 多酚, 超声波辅助, 提取, 响应面

Study on Ultrasonic-Assisted Extraction Conditions of Polyphenols from Daylily

Xiuda Lei*, Xi Cao, Dawei Yang#

College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan

Received: Sep. 22nd, 2021; accepted: Oct. 11th, 2021; published: Oct. 18th, 2021

Abstract

In order to study the extraction characteristics and optimal conditions of polyphenols from daylily, the single factor and response surface test design were carried out and the yield of polyphenols was taken as the test index to discuss the effects of ultrasonic time (10 min, 20 min, 30 min),

*第一作者。

#通讯作者。

ethanol concentration (40%, 60%, 80%, 100%), material-to-liquid ratio (1:5, 1:10, 1:15) and ultrasonic temperature (30°C, 40°C, 50°C) on the yield of polyphenols from daylily. The results showed that the material-to-liquid ratio, ultrasonic temperature, and ethanol concentration had significant effects on the yield of polyphenols. The order of influence was: material-to-liquid ratio > ultrasound temperature > ethanol concentration > ultrasound time; the interactions between material-to-liquid ratio and temperature, time, ethanol concentration had an impact on the yield of polyphenols; the optimal extraction conditions for polyphenols from daylily were 66% ethanol, 22 min of ultrasound, 43°C of ultrasound temperature, and the ratio of material to liquid was 1:12, and the yield of polyphenols was 2.318%. The above research results can provide a useful reference for the research and practice of the extraction technology of daylily polyphenols.

Keywords

Daylily, Polyphenols, Ultrasonic Assist, Extraction, Response Surface

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

黄花菜(*Hemerocallis Fulvs*)又名金针菜、金针花,为百合科萱草属多年生草本植物,其食用部分为花蕾,是中国的特色蔬菜[1]。黄花菜产业已成为湖南祁东、山西大同、宁夏盐池、陕西大荔、甘肃庆阳等地的农业支柱产业。多酚是植物生长过程中普遍存在的一种重要的次生代谢产物,具有抗氧化活性、清除体内多余自由基、保护人体健康的作用[2]。近年来,植物多酚已成为食品产业的研究热点之一。多酚的提取是多酚纯化、结构鉴定、功能及加工特性等方面研究的基础,有关黄花菜多酚提取的研究报道较少,而关于纯化、结构鉴定、功能及加工特性等方面研究报道更少,不利于黄花菜基础理论研究和产业的进一步发展。

多酚等天然植物功能成分大多存在于细胞质中,而细胞壁是植物细胞中多酚提取的主要障碍;同时,多酚化合物在植物体内通常与蛋白质、多糖等以氢键和疏水键形成稳定的复合物[3] [4],导致多酚的提取率低。超声波提取技术是利用超声波具有的机械效应、空化效应及热效应,加强了胞内物质的释放、扩散和溶解,从而加速了有效成分的浸出。超声波提取以其操作简便快捷、提取温度低、提取率高、提取物的结构不易被破坏等特点,被广泛用于天然植物功能成分提取[5]。

本文以乙醇为提取剂,采用超声波辅助提取新鲜黄花菜多酚,在单因素试验的基础上进行响应面多因素试验,研究黄花菜多酚的提取特性及最佳提取条件,为黄花菜多酚的纯化、结构鉴定、功能及加工特性等方面的深入研究提供基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

1) 试验样品

鲜黄花菜,品种:猛子花(湖南祁东金萱生物科技有限公司提供)。

2) 试剂与药品

甲醇,乙醇,无水碳酸钠,盐酸,氢氧化钠(国药集团化学试剂有限公司)没食子酸标准品(德斯特生物科技有限公司),福林酚试剂(合肥博美生物科技有限公司),上述试剂与药品均为国产分析纯。

3) 仪器与设备

超声清洗机(KS-5200DE, 昆山洁力美超声仪器有限公司), 恒温水浴锅(DK-98, 天津市泰斯特仪器有限公司), 可见分光光度计(V-5000, 上海元析仪器有限公司), 离心机(800D, 江苏金怡仪器科技有限公司), 电子天平(WT-K, 常州万泰天平仪器有限公司), 低温冰箱(MDF-40V, 安徽中科都菱有限公司)。

2.2. 方法

2.2.1. 试验设计

1) 单因素对黄花菜多酚提取效果的影响

取新鲜黄花菜 10.0 g, 用粉碎机制成匀浆, 加入提取溶剂, 于固定功率 100 W 的超声清洗机中进行超声波辅助提取, 以转速 4000 r/min 对提取液进行离心, 离心时间 15 min, 取上清液待测。

提取溶剂的选择: 分别以 100% 甲醇, 100% 乙醇, 纯水为提取溶剂对黄花菜多酚进行提取, 黄花菜与提取剂的比例均为 1:10, 提取温度 40℃, 提取时间 20 min, 以多酚得率为指标筛选最佳的提取溶剂。

以乙醇为提取剂, 多酚得率为试验指标, 考察提取时间(10 min、20 min、30 min)、料液比(1:5、1:10、1:15)、提取温度(30℃、40℃、50℃)、提取剂浓度(40%、60%、80%、100%)等单因素, 研究上述因素对黄花菜多酚提取效果的影响。每个处理重复 2 次。

2) 黄花菜多酚提取的响应面试验设计

以提取时间、料液比、提取温度、乙醇浓度为试验因素, 以黄花菜多酚得率为试验指标, 采用 4 因素 3 水平进行响应面试验, 研究黄花菜多酚的提取特性及最佳工艺条件, 因素及水平见表 1。

Table 1. Factors and levels of response surface test for polyphenol extraction

表 1. 多酚提取的响应面试验因素及水平

水平	因素			
	提取时间(min)	料液比	提取温度(℃)	乙醇浓度(%)
1	10	1:5	30	40
2	20	1:10	40	60
3	30	1:15	50	80

2.2.2. 黄花菜多酚含量测定

根据参考文献采用福林酚分光光度法测定黄花菜提取物的多酚含量[6]。

多酚得率(%) = $\frac{c \cdot v}{m} \times 100\%$, 其中 c 为多酚浓度, v 为待测液体积, m 为样品总质量。

2.2.3. 数据统计

采用方差分析和多重比较法(LSD)分析试验结果的显著性。

3. 结果与分析

3.1. 黄花菜多酚含量测定的标准曲线

根据浓度为 0 mg/L、4 mg/L、8 mg/L、12 mg/L、20 mg/L、30 mg/L 的标准系列测定多酚含量绘制标准曲线, 没食子酸标准曲线见图 1, 得到回归方程 $y = 0.0158x - 0.0044$, $R^2 = 0.9961$, 在浓度 0~35 mg/L 范围内线性关系良好, 可用来测定黄花菜多酚含量。

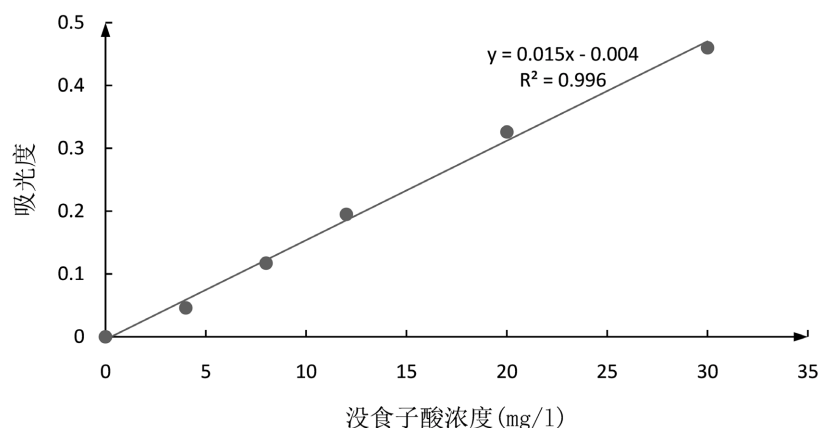


Figure 1. Standard curve of gallic acid
图 1. 没食子酸标准曲线

3.2. 黄花菜多酚提取的单因素试验结果

3.2.1. 提取溶剂对多酚提取效果的影响

甲醇、乙醇、纯水等 3 种提取剂分别对黄花菜多酚进行提取，多酚得率如表 2 所示。

Table 2. The influence of different solvents on the yield of polyphenols

表 2. 不同溶剂对多酚得率的影响

多酚得率(%)	溶剂		
	纯水	甲醇	乙醇
1	1.415	1.848	2.294
2	1.409	1.858	2.264
平均值	1.412 ± 0.004 ^c	1.853 ± 0.007 ^b	2.279 ± 0.02 ^a

表 2 显示，3 种提取剂对多酚的提取效果有显著影响($p < 0.05$)。3 种提取剂的极性最强的是水，其次是乙醇，甲醇的极性最弱，根据相似相溶原理，乙醇的提取效果最好，说明黄花菜多酚的极性强度与乙醇最为接近，因此乙醇的得率最大，随后的单因素和响应面试验均以乙醇作为提取剂。

3.2.2. 乙醇浓度对多酚提取效果的影响

在料液比 1:10，超声温度 40℃，超声时间 20 min 条件下，40%、60%、80%和 100%等浓度的乙醇提取黄花菜多酚得率见表 3 所示。

Table 3. The influence of ethanol concentration on the yield of polyphenols

表 3. 乙醇浓度对多酚得率的影响

多酚得率(%)	乙醇浓度(%)			
	40	60	80	100
1	2.022	2.237	2.313	2.294
2	1.970	2.242	2.324	2.248
平均值	1.996 ± 0.03 ^c	2.239 ± 0.004 ^b	2.318 ± 0.008 ^a	2.271 ± 0.03 ^{ab}

表 3 显示, 乙醇浓度对多酚的提取效果有显著影响($p < 0.05$)。不同浓度的乙醇随浓度的增大其极性降低, 进一步说明了多酚提取效果与提取剂极性的相关性, 极性越强, 多酚的溶解度越低[7], 虽然 80% 乙醇的多酚得率高于无水乙醇, 但两者没有显著差异, 因此, 综合考虑提取成本和溶剂回收成本, 选择 80% 乙醇作为提取剂是合适的。

3.2.3. 超声时间对多酚提取效果的影响

在料液比 1:10, 超声温度 40℃, 乙醇浓度 80% 的条件下, 超声时间 10 min, 20 min, 30 min 时, 多酚得率见表 4。

Table 4. The effect of ultrasound time on the yield of polyphenols

表 4. 超声时间对多酚得率的影响

多酚得率(%)	超声时间(min)		
	10	20	30
1	1.941	2.262	1.881
2	2.069	2.336	1.991
平均值	2.005 ± 0.09 ^{ab}	2.299 ± 0.05 ^a	1.936 ± 0.07 ^b

表 4 显示, 超声时间对多酚的提取效果有显著影响($p < 0.05$)。多酚得率随提取时间的增加逐渐升高, 时间稍长后多酚得率开始下降, 原因可能是提取时间过长, 多酚发生降解、氧化等化学反应致使多酚分子结构发生一定的破坏[8]。

3.2.4. 料液比对多酚得率的影响

在超声温度 40℃, 超声时间 20 min, 乙醇浓度 80% 的条件下, 料液比为 1:5, 1:10, 1:15 时, 多酚得率见表 5。

Table 5. The effect of the ratio of material to liquid on the yield of polyphenols

表 5. 料液比对多酚得率的影响

多酚得率(%)	料液比		
	1:5	1:10	1:15
1	1.680	2.286	2.289
2	1.729	2.316	2.294
平均值	1.704 ± 0.03 ^b	2.301 ± 0.02 ^a	2.291 ± 0.004 ^a

表 5 显示, 料液比对多酚的提取效果有显著影响($p < 0.05$)。料液比 1:10 和 1:15 之间的多酚得率没有显著差异, 但与 1:5 均有显著差异, 原因是: 黄花菜多酚提取过程是一个固-液提取过程, 平衡态的时候, 料液比越小, 提取体系的浓度越大, 固液分离(离心)后, 残留在固相中的多酚量越大, 导致得率越低, 因此应选择大料液比进行提取, 由于 1:10 和 1:15 之间的多酚得率没有显著差异, 料液比越大, 后续浓缩成本越高。

3.2.5. 超声温度对多酚得率的影响

在超声时间 20 min, 乙醇浓度 80%, 料液比 1:10 的条件下, 分别在 30℃, 40℃ 和 50℃ 条件下进行多酚提取, 多酚得率见表 6。

Table 6. The effect of ultrasonic temperature on the yield of polyphenols**表 6.** 超声温度对多酚得率的影响

多酚得率(%)	超声温度(°C)		
	30	40	50
1	1.744	2.281	2.011
2	1.761	2.290	2.001
平均值	1.752 ± 0.01 ^c	2.285 ± 0.007 ^a	2.006 ± 0.007 ^b

表 6 显示, 超声温度对多酚的提取效果有显著影响($p < 0.05$)。多酚得率随提取温度的增加逐渐升高, 温度过高后多酚得率开始下降, 原因可能是提取温度过高, 多酚发生降解、氧化等化学反应致使多酚分子结构发生变化[9]。

3.3. 提取条件响应面结果分析

在单因素基础上, 根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理, 按表 3 的因素水平进行响应面试验, 响应面试验结果见表 7。

Table 7. Response surface results of extraction conditions**表 7.** 提取条件响应面结果

处理	A: 乙醇浓度/%	B: 时间/min	C: 温度/°C	D: 料液比/g/ml	多酚得率/%
1	60	20	40	10	2.235
2	60	10	30	10	1.611
3	60	20	40	10	2.241
4	80	10	40	10	1.966
5	60	20	50	15	2.157
6	60	10	50	10	1.872
7	60	30	40	15	2.033
8	80	20	40	5	1.692
9	40	20	50	10	1.811
10	60	20	50	5	1.601
11	80	20	50	10	2.004
12	60	30	40	5	1.601
13	80	30	40	10	1.951
14	60	30	30	10	1.574
15	60	20	40	10	2.237
16	60	10	40	5	1.433
17	60	20	30	5	1.312
18	40	10	40	10	1.693
19	40	30	40	10	1.681
20	40	20	40	15	1.969

Continued

21	60	30	50	10	1.855
22	40	20	30	10	1.601
23	80	20	30	10	1.755
24	80	20	40	15	2.289
25	60	10	40	15	1.912
26	40	20	40	5	1.411
27	60	20	30	15	1.892

采用 Design-Expert 11 对试验结果进行回归分析, 多酚得率与因素之间的回归方程为

$$Y = 2.24 + 0.1243A + 0.0173B + 0.1296C + 0.2668D - 0.0008AB + 0.0098AC + 0.0097AD + 0.005BC - 0.0118BD - 0.006CD - 0.1691A^2 - 0.2493B^2 - 0.2664C^2 - 0.2342D^2$$

试验结果经过方差分析, 结果见表 8, 表 8 显示, 该回归模型 $P < 0.0001$, 说明模型极显著, 其中乙醇浓度、超声温度和料液比的 $p < 0.0001$, 对多酚提取效果的影响为极显著; 通过 F 值的比较可知各因素对指标影响的大小顺序为料液比 > 超声温度 > 乙醇浓度 > 超声时间。交互项 AB, AC, AD, BC, BD, CD 的 P 值均大于 0.05, 说明各交互项对多酚得率的影响不显著, 因素之间的交互作用不强; 二次型 A^2, B^2, C^2 的 P 值均小于 0.0001, 对多酚得率影响极显著, 模型相关系数 $R^2 = 0.9795$, 说明模型拟合度高, 很好反映了各因素与多酚得率之间的关系, 用于模型试验结果可靠。

Table 8. Variance analysis of the results of the extracted conditional response surface
表 8. 提取条件响应面结果方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.8527	14	0.1323	41.03	<0.0001	**
A-乙醇浓度	0.1853	1	0.1853	57.44	<0.0001	**
B-超声时间	0.0036	1	0.0036	1.12	0.3112	
C-超声温度	0.2015	1	0.2015	62.48	<0.0001	**
D-料液比	0.8544	1	0.8544	264.93	<0.0001	**
AB	0.000002	1	0.000002	0.0007	0.9794	
AC	0.00038	1	0.00038	0.1179	0.7373	
AD	0.00038	1	0.00038	0.1179	0.7373	
BC	0.0001	1	0.0001	0.031	0.8632	
BD	0.000552	1	0.000552	0.1712	0.6863	
CD	0.000144	1	0.000144	0.0447	0.8362	
A^2	0.1526	1	0.1526	47.3	<0.0001	**
B^2	0.3313	1	0.3313	102.74	<0.0001	**
C^2	0.3784	1	0.3784	117.34	<0.0001	**
D^2	0.2927	1	0.2927	90.75	<0.0001	**
残差	0.0387	12	0.003225			
失拟项	0.0387	10	0.003868	414.45	0.2004	

Continued

纯误差	0.000019	2	0.000009
总离差	1.8914	26	
R^2	0.9795		

为了更直观的反映出两两因素交互作用对多酚得率的影响, 根据回归方程绘制出其响应面图和等高线图, 结果如图 2~7 所示。

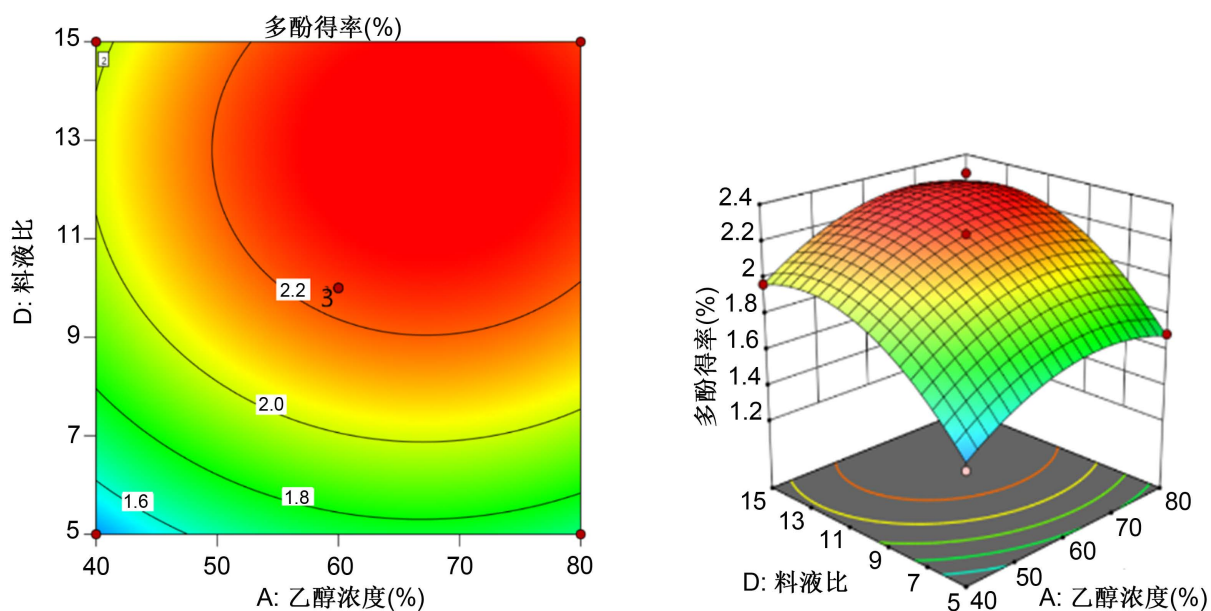


Figure 2. Contour plot and response surface plot of material-to-liquid ratio and ethanol concentration

图 2. 料液比与乙醇浓度等高线及响应面

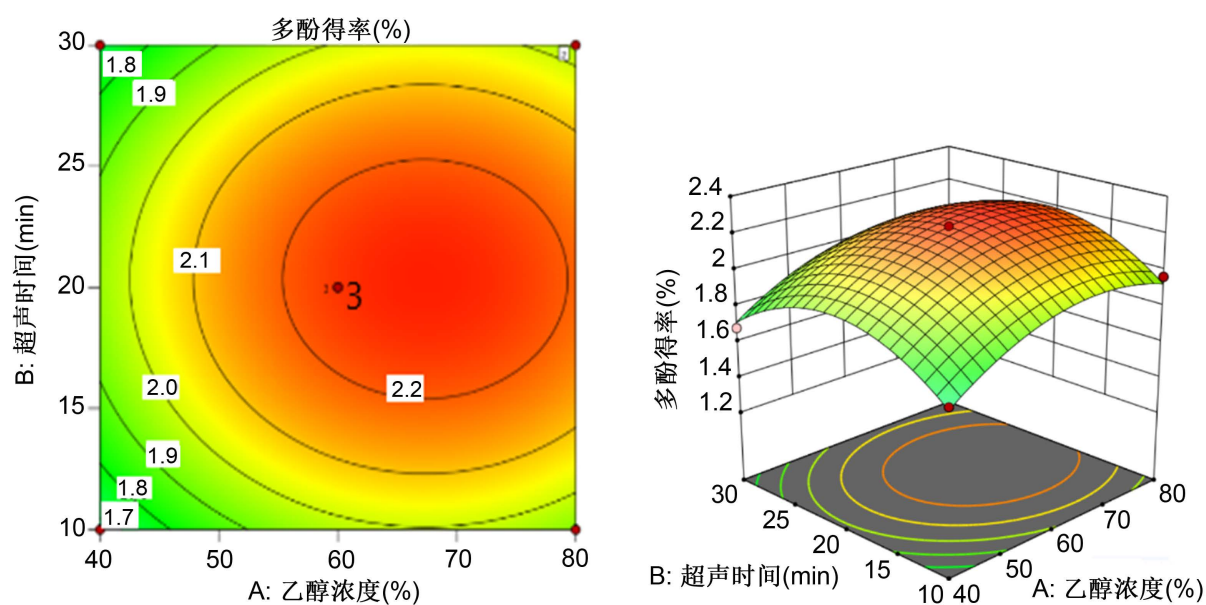


Figure 3. Contour plot and response surface plot of ultrasound time and ethanol concentration

图 3. 超声时间与乙醇浓度等高线及响应面

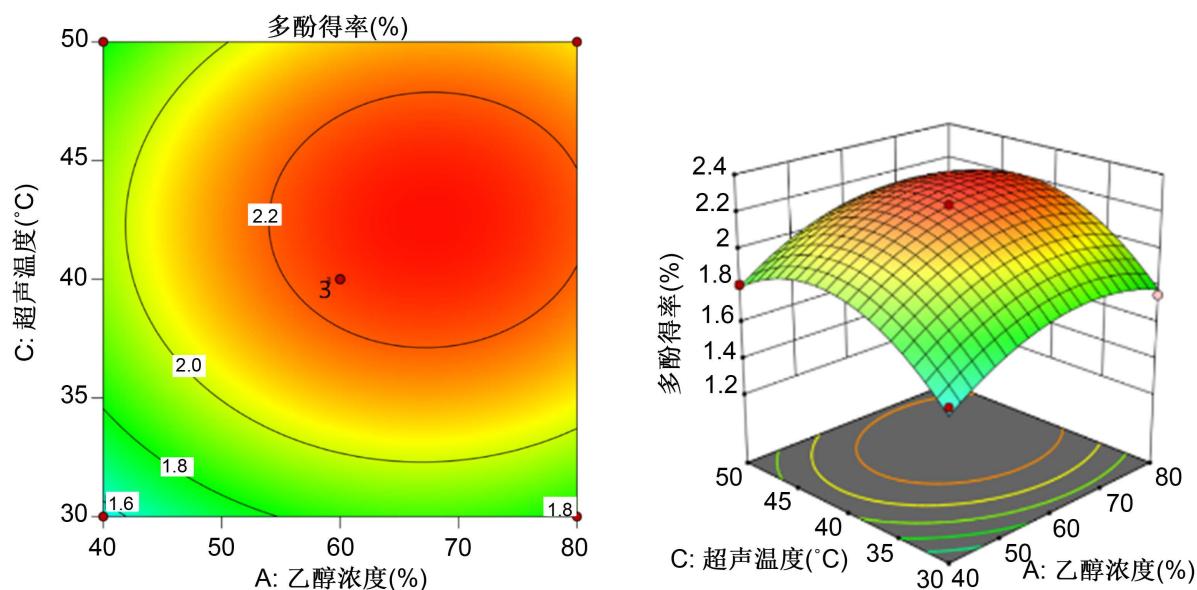


Figure 4. Contour plot and response surface plot of ultrasonic temperature and ethanol concentration

图 4. 超声温度与乙醇浓度等高线及响应面

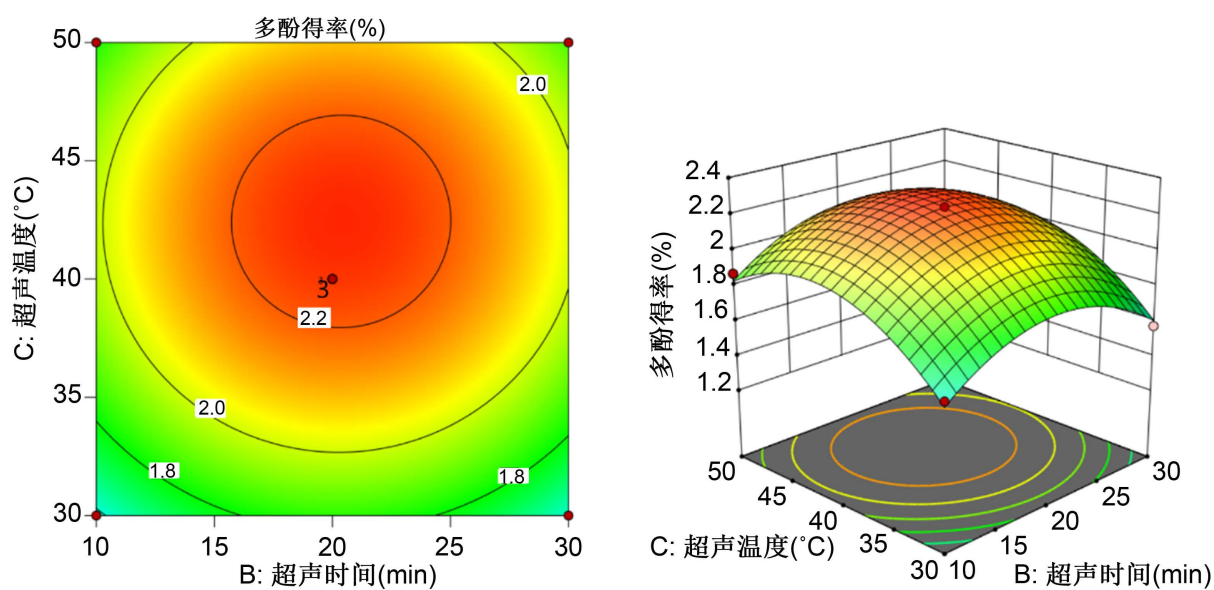


Figure 5. Contour plot and response surface plot of ultrasound time and ultrasonic temperature

图 5. 超声时间与超声温度等高线及响应面

各因素交互作用对响应值影响程度的强弱与响应面坡度和等高线密集度有关。响应面坡度越陡峭，则多酚得率受两因素交互作用影响就越大，反之，影响就越小；等高线密集呈椭圆形，说明其交互作用对响应值的影响显著，等高线稀疏呈圆形，则表示其交互效应不显著[10]。图 6 料液比与超声时间的交互作用的响应曲面坡度最陡峭，且其等高线图椭圆率高，表明其交互作用对多酚得率影响最大；其次是料液比与乙醇浓度之间，料液比与温度之间，都有一定的；其余因素之间的交互作用很小。因素之间的交互作用表明，料液比与其它 3 个因素之间均发生交互作用，说明料液比是一个很重要的因素，对多酚得率的影响很大。

对回归方程计算最大值，得到多酚的最佳提取条件为：乙醇浓度 65.286%，超声时间 21.279 min，超声温度 43.877°C，料液比 1:12.537，在此条件下，多酚得率的最大理论值为 2.343%。考虑到试验的实际

可操作性, 将多酚的提取条件调整为: 乙醇浓度 66%, 超声时间 22 min, 超声温度 43℃, 料液比 1:12, 经过 3 组重复试验, 得到实际多酚得率为 2.318%, 试验结果与理论预测值基本相符。

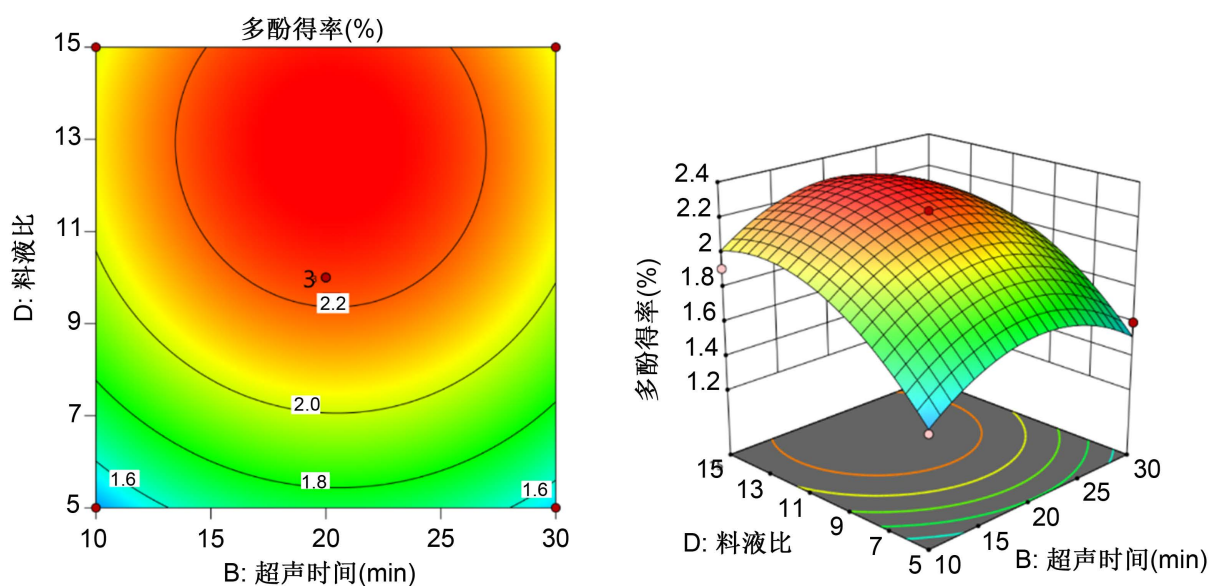


Figure 6. Contour plot and response surface plot of ultrasonic time and material-to-liquid ratio

图 6. 超声时间与料液比等高线及响应面

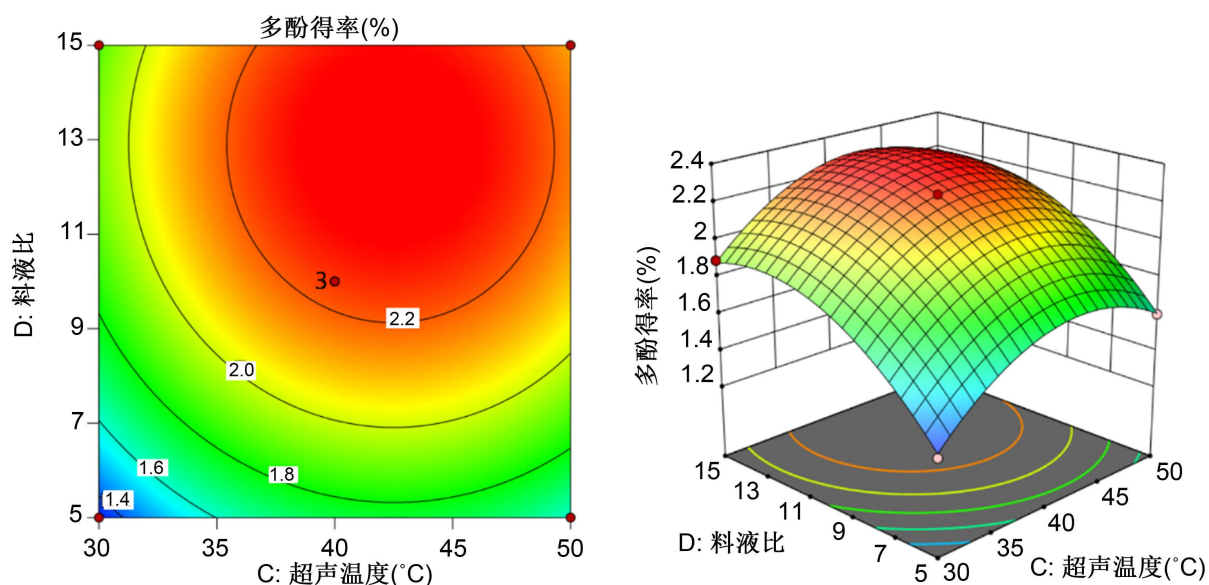


Figure 7. Contour plot and response surface plot of material-to-liquid ratio and ultrasonic temperature

图 7. 料液比与超声温度等高线及响应面

4. 结论

本文通过单因素试验探讨了超声时间、乙醇浓度、料液比及超声温度对黄花菜多酚得率的影响, 设计响应面实验对单因素试验进行了优化, 结果表明, 料液比, 超声温度, 乙醇浓度对多酚得率的影响达显著水平, 各因素对黄花菜多酚得率影响大小顺序为料液比 > 超声温度 > 乙醇浓度 > 超声时间; 料液比与温度、时间和乙醇浓度之间的交互作用对多酚得率均有影响; 黄花菜多酚的最佳提取条件为乙醇浓

度 66%，超声时间 22 min，超声温度 43℃，料液比 1:12，多酚得率为 2.318%。为黄花菜基础理论研究和产业的进一步发展提供理论依据。

基金项目

湖南省自然科学基金(2020JJ4367)。

参考文献

- [1] 杨大伟. 茅岩莓复合催熟剂对干燥黄花菜色泽及营养品质的影响[J]. 食品与机械, 2018, 34(4): 153-157.
- [2] Das, A.J., Das, G., Miyaji, T., *et al.* (2015) *In vitro* Antioxidant Activities of Polyphenols Purified from Four Plant Species Used in Rice Beer Preparation in Assam, India. *International Journal of Food Properties*, **19**, 636-651. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1038835>
- [3] 程正涛, 丁庆波, 张昊, 等. 海红果多酚提取工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 172-176.
- [4] 许玲玉, 陆兰宁, 等. 超声辅助提取牛角瓜中多酚工艺的研究[J]. 中国食品添加剂, 2020(9): 28-32.
- [5] 苏艳玲, 张瑾华. 超声辅助乙醇提取海带多酚工艺优化及抗氧化活性[J]. 中国调味品, 2020(6): 174-180.
- [6] 张卉, 王亚茹, 刘洋峰. XAD-7 型大孔树脂纯化黑果腺肋花楸多酚条件优化[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(8): 159-163.
- [7] 周志娥, 杜华英, 林丽萍, 等. 超声波辅助提取黄花菜中多酚类物质工艺的优化[J]. 食品工业科技, 2014, 35(18): 284-287.
- [8] 周向军, 高义霞, 张继. 黄花菜多酚提取工艺及抗氧化作用的研究[J]. 作物杂志, 2012(1): 68-71.
- [9] 王红玉, 焦玲红, 赵芳, 等. 超声辅助提取盐碱地苦菜多酚及其抗氧化活性研究[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(7): 74-78.
- [10] 王美英, 李化强, 吴菲菲, 等. 响应面法优化超声辅助竹叶鸡爪茶多酚的提取工艺[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(24): 8337-8344.