

# 正交试验优化“天仙红”桃果肉中花青素的提取工艺

周静<sup>1</sup>, 王富荣<sup>2</sup>, 黄华鹏<sup>1</sup>, 何华平<sup>2</sup>, 徐凌云<sup>1\*</sup>

- (1. 武汉轻工大学生物与制药工程学院, 武汉 430023;
2. 湖北省农业科学院果树茶叶研究所, 武汉 430209)

**[摘要]** 目的: 优选“天仙红”桃果肉中花青素的提取工艺。方法: 以花青素提取量为指标, 在单因素试验基础上, 通过正交试验考察料液比、提取液 pH、乙醇体积分数、提取时间对花青素提取工艺的影响。采用 HPLC 测定花青素含量, 色谱条件为流动相 4% 磷酸-乙腈 (85:15, pH 2.0), 检测波长 520 nm。结果: 各因素对花青素提取量的影响顺序为提取液 pH > 料液比 > 乙醇体积分数 > 提取时间。最佳提取工艺为加 10 倍量 20% 乙醇溶液 (pH 2.5) 于 40 °C 提取 3 h; 花青素提取量达 55.8 μg·g<sup>-1</sup>。结论: 优选的提取工艺简单可行, 为“天仙红”桃的开发利用提供实验依据。

**[关键词]** 红肉桃; 花青素; 正交试验; 提取工艺; 单因素试验; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0030-03

**[doi]** 10.11653/syfy2014060030

## Optimization of Extraction Technology for Anthocyanins from ‘Tianxianhong’ Peach Flesh by Orthogonal Test

ZHOU Jing<sup>1</sup>, WANG Fu-rong<sup>2</sup>, HUANG Hua-peng<sup>1</sup>, HE Hua-ping<sup>2</sup>, XU Ling-yun<sup>1\*</sup>

- (1. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;
2. Institute of Fruit and Tea, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan 430209, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of anthocyanins from ‘tianxianhong’ peach flesh. **Method:** With yield of anyhocyanins as index, based on single factor tests, orthogonal test was adopted to optimize extraction technology by taking ethanol concentration, pH of extract, extraction time and solid-liquid ratio as factors. HPLC was used to determine the content of anyhocyanins with mobile phase of 4% phosphoric acid-acetonitrile (85:15, pH 2.0) and detection wavelength of 520 nm. **Result:** The order of factors influencing yield of anthocyanins was pH of extract > solid-liquid ratio > ethanol concentration > extraction time. Optimum extraction technology was as following: extracted 3 h with 10 times the amount of 20% ethanol (pH 2.5) at 40 °C; Yield of anthocyanins was up to 55.8 μg·g<sup>-1</sup>. **Conclusion:** This optimized extraction process was simple and feasible, it would provide experimental basis for further development and utilization of ‘tianxianhong’ peach.

**[Key words]** *Prunus perica*; anthocyanins; orthogonal test; extraction technology; single factor test; HPLC

红肉桃品种“天仙红”是湖北省农业科学院果

树茶叶研究所桃课题组 2000 年在湖北孝感资源收集时发现的“大红袍”桃自然后代变异单株, 其果肉全红、离核、食用方便<sup>[1]</sup>。研究表明“天仙红”果肉的主要呈色物质为花青素, 花青素的主要存在形式是矢车菊素-3-葡萄糖苷, 且红肉桃中花青素含量明显高于白肉桃和黄肉桃<sup>[2-3]</sup>。花青素是花色素与糖以糖苷键的形式结合而成的 2-苯基苯并吡喃阳离子衍生物, 属于类黄酮类化合物, 为植物次生代谢产

**[收稿日期]** 20130704(003)

**[基金项目]** 湖北省农业科技创新项目(2011-620-005-003-04)

**[第一作者]** 周静, 在读硕士, 从事天然产物活性成分研究, Tel: 13667227079, E-mail: zhoujing1112@126.com

**[通讯作者]** \* 徐凌云, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事天然产物活性成分研究, Tel: 027-83956793, E-mail: doctoryly9898@163.com

物,具有抗氧化、抗突变及保护心血管等生理活性<sup>[4,5]</sup>。本实验采用单因素试验和正交试验优选“天仙红”果肉中花青素的提取工艺,并建立该成分的HPLC检测体系,为“天仙红”的营养价值开发提供参考。

## 1 材料

P1680型高效液相色谱仪(美国戴安公司),BS201S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),XHF-D型高速内切式匀浆机(宁波新芝生物科技有限公司),80-2型离心机(上海云楼医用仪器厂),TGL-16C型离心机(上海安亭科学仪器厂),PB-10型酸度计(德国赛多利斯公司)。

成熟期“天仙红”红肉桃由湖北省农业科学院果树茶叶研究所何华平研究员选育并鉴定为*Prunus perica*(L.) Batsch,2009年通过湖北省农作物品种审定委员会审定,编号鄂审果20090003,命名为“天仙红”,采自湖北省农业科学院果树茶叶研究所桃资源育种圃;矢车菊素-3-葡萄糖苷对照品(纯度>98%,批号12061101,成都曼斯特生物科技有限公司),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 花青素的含量测定

**2.1.1 HPLC 色谱条件**<sup>[3]</sup> HypersilC<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相4%磷酸-乙腈(85:15,pH 2.0),流速0.8 mL·min<sup>-1</sup>,进样量20 μL,检测波长520 nm,柱温30℃。

**2.1.2 标准曲线的绘制**<sup>[6]</sup> 精密称取矢车菊素-3-葡萄糖苷对照品10 mg置于50 mL棕色量瓶中,以1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸甲醇溶解,临用前用1 mol·L<sup>-1</sup>的盐酸甲醇稀释至6.25,12.5,25,50,100,150 mg·L<sup>-1</sup>,按**2.1.1**项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.820 4X - 0.168 2$ ( $R^2 = 1.000$ ),线性范围6.25~150 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.1.3 样品测定** 称取一定质量的桃样经液氮研磨,加入适量提取液,避光静置一定时间,3 500 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,取上清液,用提取液定容至10 mL,经0.45 μm微孔微膜滤过,平行制样3次,按**2.1.1**项下色谱条件测定,计算花青素提取量。

### 2.2 单因素试验考察

**2.2.1 乙醇体积分数** 精确称取4份桃样,每份2 g,分别加入体积分数为20%,40%,60%,80%的乙醇溶液(用甲酸调pH 2.0)6 mL,于25℃静置提取3 h,计算花青素提取量分别为68.9,162.6,105.0,78.0 μg·g<sup>-1</sup>。结果表明随着乙醇体积分数

的增加,花青素提取量呈先增加后降低的趋势,可能是过高的乙醇体积分数会破坏花青素的结构<sup>[7]</sup>,故设定乙醇体积分数水平为20%,40%,60%。

**2.2.2 酸的种类** 精确称取6份桃样,每份2 g,各加入40%乙醇6 mL,分别用甲酸、乙酸、三氟乙酸、盐酸调提取液pH 2.0,于25℃静置提取3 h,结果花青素提取量分别为68.7,64.3,61.5,43.8 μg·g<sup>-1</sup>,表明甲酸的提取效果最好,盐酸最次,原因是无机酸在花青素的电离平衡中作用不如有机酸,有机酸能增加花青素解离形成烺盐,增加花青素的水溶性和稳定性,故而增加其提取量<sup>[8,9]</sup>。

**2.2.3 pH** 精确称取6份桃样,每份2 g,分别加入pH为1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5的40%乙醇6 mL,于25℃静置提取3 h,结果花青素提取量分别为95.2,134.2,142.3,178.9,263.0,132.5 μg·g<sup>-1</sup>,表明花青素提取量随pH升高呈先逐渐升高后降低的趋势,因为pH过高会致使花青素结构发生转变<sup>[9]</sup>,故设定pH水平分别为2.5,3.0,3.5。

**2.2.4 料液比** 精确称取桃果肉5份,分别加入10,5,3,2,1倍量pH 2.0的40%乙醇溶液于25℃静置提取3 h,计算花青素提取量分别为260.8,278.1,198.6,157.0,144.4 μg·g<sup>-1</sup>,结果表明随着料液比的增加,花青素提取量先升高后降低,故设定料液比水平为1:2,1:6,1:10。

**2.2.5 提取时间** 精确称取5份桃样,每份1.5 g,各加入pH 3.0的40%乙醇溶液7.5 mL,分别于25℃静置提取1,2,3,6,12 h,计算花青素提取量分别为98.6,119.8,135.3,87.1,44.0 μg·g<sup>-1</sup>,结果发现提取时间>3 h后提取量迅速下降,可能是因为花青素不稳定易被氧气和多酚氧化酶氧化,长时间的提取会损失花青素<sup>[9]</sup>,故设定提取时间水平分别为1,3,6 h。

**2.2.6 提取温度** 精确称取5份桃样,每份1.5 g,各加入40%乙醇(pH 2.0)7.5 mL,分别于4,25,40,60,80℃静置提取3 h,结果花青素提取量分别为99.6,88.0,108.1,96.5,88.2 μg·g<sup>-1</sup>,表明温度对花青素提取量的影响较小,因为在酸的保护下,一定温度内花青素的结构不会发生太大变化。

**2.3 正交试验设计**<sup>[10]</sup> 在单因素试验基础上,选取提取液pH、乙醇体积分数、料液比、提取时间为考察因素,以花青素提取量为评价指标,固定提取温度40℃,用甲酸调节提取液pH,称取桃样9份,每份2 g,按L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表进行试验,因素水平见表1,试验安排及结果见表2,方差分析见表3。

表 1 红肉桃果肉中花青素提取工艺正交试验因素水平

水平	A 料液比	B pH	C 乙醇体积分数 /%	D 提取时间 /h
1	1:2	2.5	20	1
2	1:6	3.0	40	3
3	1:10	3.5	60	6

表 2 红肉桃果肉中花青素提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D	花青素提取量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
1	1	1	3	2	41.0
2	1	2	1	1	35.7
3	1	3	2	3	31.5
4	2	1	2	1	51.0
5	2	2	3	3	31.3
6	2	3	1	2	41.3
7	3	1	1	3	55.8
8	3	2	2	2	48.3
9	3	3	3	1	33.2
$K_1$	108.2	147.7	132.7	119.9	
$K_2$	123.6	115.3	130.9	130.5	
$K_3$	137.3	106.0	105.5	118.6	
R	9.7	13.9	8.5	4.0	

表 3 花青素提取量方差分析

差异源	SS	f	MS	F	P
A	141.13	2	70.56	9.92	>0.05
B	319.90	2	159.95	22.50	<0.05
C	154.65	2	77.32	7.11	>0.05
D(误差)	28.44	2	14.22		

注： $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

由直观分析可知,各因素对花青素提取工艺的影响顺序为  $B > A > C > D$ 。以极值最小的 D 因素为误差项进行方差分析,结果表明因素 B 具有显著性影响,A,C 因素则均无显著性影响,确定最佳提取工艺为  $A_3B_1C_1D_2$ ,即加 10 倍量 20% 乙醇(pH 2.5,用甲酸调节)于 40 ℃ 提取 3 h。

### 3 讨论

“天仙红”是具有地方特色的红肉桃新品种,其果肉中花青素含量较高<sup>[2-3]</sup>。本文采用酸性乙醇溶剂提取,通过单因素试验和正交试验优选提取工艺,该工艺简单且成本较低,适合用于工业生产。与文献报道的采用盐酸甲醇<sup>[11-14]</sup>相比,改用甲酸乙醇降低了毒性且更加安全和廉价。

单因素试验考察了酸的种类及提取温度对花青素提取量的影响,结合文献资料,确定正交试验中采

用甲酸调节提取液 pH,提取温度固定 40 ℃,正交试验发现提取液 pH 对花青素提取工艺的影响最大,与文献报道相符<sup>[15]</sup>。以往果实中花青素多采用紫外分光光度法进行分析检测<sup>[12,14]</sup>,本文采用 HPLC 检测花青素含量,准确度更高,为“天仙红”营养价值的开发提供了实验依据。

### [参考文献]

- [1] 何华平,龚林忠,王富荣,等. 红肉桃新品种——天仙红的选育[J]. 果树学报,2010,7(1):150.
- [2] 赵秀林,王富荣,徐凌云,等. 红肉桃果实发育过程中色素含量及 PAL 活性的变化[J]. 食品工业科技,2012,33(12):125.
- [3] 赵秀林,王富荣,徐凌云,等. HPLC 法测定桃不同品种果实中花色苷组成和含量[J]. 食品科学,2013,34(8):208.
- [4] 徐渊金,杜琪珍. 花色苷分离鉴定方法及其生物活性[J]. 食品与发酵工业,2006,32(3):67.
- [5] Wootton-Beard P C, Ryan L. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages [J]. Food Res Int,2011,44(10):3135.
- [6] 薛平,徐春蕾,李祥,等. 三白草中三白草酮提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):44.
- [7] 王兆雨,徐美玲,朱蓓薇. 蓝莓花青素的提取工艺条件[J]. 大连轻工业学院学报,2007,26(3):196.
- [8] 张秀丽,李劲涛,杨军. 植物花色苷定性定量研究方法[J]. 西华师范大学学报:自然科学版,2006,27(3):300.
- [9] 孙建霞,张燕,胡小松,等. 花色苷的结构稳定性与降解机制研究进展[J]. 中国农业科学,2009,42(3):996.
- [10] 邹登峰,叶妹,窦锡彬,等. 正交试验优选桂花籽中原花青素的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):28.
- [11] 胡亚东,贾惠娟,孙崇德. 桃果实中花青苷的提取、检测及应用[J]. 果树学报,2004,21(2):167.
- [12] Ohmiya A. Effects of auxin on growth and ripening of mesocarp discs of peach fruit [J]. Sci Hortic,2000,84(3/4):309.
- [13] Wang H Q, Arakawa O, Motomura Y, et al. Influence of maturity and bagging on the relationship between anthocyanin accumulation and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in ‘Jouathan’ apples [J]. Postharvest Bio Tec,2000,19(2):123.
- [14] Leng P, Qi J X. Effect of anthocyanin on David peach (*Prunus davidiana* Franch) under low temperature stress [J]. Sci Hortic,2003,97(1):27.
- [15] 于莉莉,李景文,王庆钰,等. 超声波法辅助提取黑豆种皮花青素的工艺优化[J]. 食品科技,2013,38(4):210.

[责任编辑 仝燕]