

杨盛茹, 侯银臣, 张秋双, 等. 超声波辅助提取黄粉虫中黄酮类物质的工艺优化及黄酮类物质的稳定性[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(1): 229-237.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.01.026

超声波辅助提取黄粉虫中黄酮类物质的工艺优化及黄酮类物质的稳定性

杨盛茹¹, 侯银臣¹, 张秋双², 潘春梅¹, 李亚博¹, 田腴澍¹, 韩檀楚¹

(1.河南牧业经济学院食品与生物工程学院, 河南 郑州 450046; 2.河南省兽药饲料监察所, 河南 郑州 450001)

摘要: 以黄粉虫为原料, 乙醇为提取剂, 黄粉虫中黄酮类物质的提取率为指标, 采用超声波辅助-水浴加热的方法, 在单因素(液料比、提取温度、提取时间、超声波功率和乙醇体积分数)试验的基础上设计响应面试验进行工艺优化, 在不同条件(光照、温度、pH 值、添加强氧化剂、添加还原剂和添加食品添加剂)下分析其稳定性。结果表明, 黄粉虫中黄酮类物质最佳提取条件为: 液料比 50 : 1 (ml/g), 提取温度 60 ℃, 提取时间 41 min, 超声波功率 400 W, 乙醇体积分数 76%, 在该工艺条件下黄酮类物质的提取率为 0.563 3%。稳定性分析结果表明, 黄粉虫中的黄酮类物质受光照的影响较为明显, 在过酸或过碱条件下会分解, 在低含量(质量分数 ≤ 0.25%) 强氧化剂作用下, 黄酮类物质的稳定性良好, 在一定范围内, 还原剂亚硫酸钠与食品添加剂对其稳定性的影响不明显。研究结果可为黄粉虫中黄酮资源的开发提供理论依据。

关键词: 黄粉虫; 黄酮类物质; 超声波辅助; 稳定性

中图分类号: S899.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2023)01-0229-09

Study on optimization of ultrasonic assisted extraction process and stability of flavonoids from *Tenebrio molitor*

YANG Sheng-ru¹, HOU Yin-chen¹, ZHANG Qiu-shuang², PAN Chun-mei¹, LI Ya-bo¹, TIAN Yu-shu¹, HAN Tan-chu¹

(1. College of Food and Bioengineering Engineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Province Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Using *Tenebrio molitor* as raw material, ethanol as extraction agent, the extraction rate of flavonoids in *Tenebrio molitor* as index, the ultrasonic auxiliary-water bath heating method was adopted. Based on the single factor (liquid-to-material ratio, extraction temperature, extraction time, ultrasonic power and ethanol concentration) experiments, the response surface test was designed to optimize the process. Its stability was analyzed under different conditions (light, temperature, pH, strong oxidants, reducing agents and food additives). The optimal extraction conditions for flavonoids in mealworm were as follows: liquid-to-material ratio was 50 : 1 (ml/g), extraction temperature was 60 ℃, extraction time was 41 min,

ultrasonic power was 400 W, ethanol concentration was 76%. Under these conditions, the extraction rate of flavonoids was 0.563 3%. The results of stability analysis showed that the flavonoids in mealworm were more obviously affected by light, and would decompose under the condition of acid or alkali. Under the action of strong oxidant with low content (≤ 0.25%), the stability of flavonoids was

收稿日期: 2022-11-04

基金项目: 河南省科技攻关项目(212102110313); 河南省重大公益专项项目(201300110300); 河南牧业经济学院食品科学与工程重点学科建设项目(Xjxk202203)

作者简介: 杨盛茹(1988-) 女, 河南商丘人, 博士研究生, 讲师, 主要研究方向为天然活性产物。(E-mail) 81692@hnuhe.edu.cn

通讯作者: 侯银臣, (E-mail) 307219505@qq.com

good. In a certain range, the effect of reducing agent sodium sulfite and food additives on its stability was not obvious. These results can provide a theoretical basis for the development of flavonoid resources in *Tenebrio molitor*.

Key words: *Tenebrio molitor*; flavonoids; ultrasonic assistance; stability

黄酮是自然界中的多酚类化合物,具有抗癌、抗氧化、抑制病菌、降血糖等功效^[1-3]。黄酮类物质分布于高等植物的根、茎、叶、花和果实中^[4-5],也可由微生物合成^[6],同时也存在于一些低等植物与昆虫中。黄粉虫又叫面包虫,被广泛用于制作动物、鸟类、鱼的饲料^[7-8]。黄粉虫属于食源性昆虫,其价格低廉,易养殖,繁殖速度快,研究黄粉虫中的黄酮类物质,可为昆虫中黄酮类资源的开发提供理论基础。

目前,国内外对植物中黄酮类物质的研究较多^[9-12],对昆虫中黄酮类物质的研究较少,如孙宇辰等^[13]采用甲醇、乙醇、丙酮 3 种提取剂提取美洲大蠊、中华稻蝗、芫菁 3 种昆虫中的黄酮类物质并用其进行了抑菌性测定。传统的黄酮类物质提取方法是以乙醇作为提取剂,采用回流法提取,对溶剂的需求量较大且效率较低,但是长时间高温对黄酮类物质的生物活性有不良影响^[14]。近年来,用超声波辅助法提取植物中的营养成分表现出显著效果,通过超声波的机械作用、空化作用及水浴加热处理能够弥补传统提取方法的不足且效率较高。由于目前对于昆虫中黄酮类物质的研究不多,故本研究使用超声波辅助-水浴加热处理,以乙醇溶液作为提取剂提取黄粉虫中的黄酮类物质,以提取率为指标,在单因素试验的基础上设计响应面试验进行工艺优化,确定最佳提取参数,通过分析不同光照条件、温度、pH 值与添加强氧化剂、还原剂和食品添加剂等条件下提取液中黄酮类物质的稳定性,以期黄粉虫活性物质的应用研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄粉虫,购自爱家宠物水族用品有限公司;芸香苷(纯度 $\geq 98\%$),购自卫辉市众诚消毒剂有限公司;水杨酸钠(分析纯),购自天津市恒兴化学试剂制造有限公司;无水氯化钙(分析纯),购自天津市天力化学试剂有限公司;亚硝酸钠(分析纯),购自天津市天力化学试剂有限公司;硝酸铝(分析纯),购自烟台市双双化工有限公司;硫酸亚铁(分析纯),购自烟台市双双化工有限公司。

1.2 仪器与设备

UV-1900PC 双光束紫外可见分光光度计,购自上海美析仪器有限公司;FA224 电子分析天平,购自上海舜宇恒平科学仪器有限公司;Phs-2F pH 计,购自上海仪电科学仪器股份有限公司;TG16-WS 离心机,购自河南湘仪实验室仪器开发有限公司;KQ5200E 超声波清洗器,购自宁波新芝生物科技股份有限公司;800Y 多功能粉碎机,购自永康市铂欧五金制品有限公司;HH6 数显恒温水浴锅,购自方科仪器(常州)有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 原料预处理 将干燥的黄粉虫粉碎后用石油醚脱脂,液料比设为 8:1 (ml/g),脱脂时间设为 4 h,脱脂温度设为 45 ℃。完成脱脂后静置、分离,将剩余的黄粉虫粉末干燥、过筛(80 目)后低温保存备用。

1.3.2 黄粉虫中黄酮类物质的提取 称取 1.0 g 脱脂黄粉虫样品于锥形瓶中,加入提取剂密封,随后将锥形瓶放入超声波仪中央并固定,设置不同的提取条件。

1.3.3 黄粉虫中黄酮类物质测定波长的确定 取 0.2 mg/ml 芸香苷标准溶液并稀释 5 倍,取 5 ml 稀释液,用碱性显色法进行显色,摇匀后反应 15 min,设置波长为 400~700 nm 进行光谱扫描^[15]。

取 5.0 g 脱脂黄粉虫样品于三角瓶中,随后加入 100 ml 提取剂,设置提取温度为 60 ℃,提取功率为 400 W,超声波处理时间为 40 min,过滤后取 5 ml 上清液于试管中,用碱性显色法进行显色,摇匀后反应 15 min,在 400~700 nm 波长处进行光谱扫描。

1.3.4 黄粉虫中黄酮类物质含量的测定 芸香苷标准溶液的配制:参考汪璇等^[16]的方法称取适量芸香苷样品,用 80%乙醇溶解后配制一系列浓度的标准溶液,取 5 ml 标准溶液用碱性显色法进行显色,于 510 nm 处测定吸光度。

样液中黄酮类物质含量的测定。取 5 ml 定容后的黄酮类物质提取液,使其显色后于 510 nm 处测定吸光度。黄酮类物质提取率(T)的计算公式如下:

$$T=c \times V \times n \times 1\,000 / m \times 100\%$$

式中: c 为黄酮提取液质量浓度 (mg/ml); V 为黄酮提取液的体积 (ml); n 为稀释倍数; m 为脱脂样品质量 (g)。

1.4 黄粉虫中黄酮类物质提取的单因素试验

称取 1.0 g 脱脂黄粉虫样品于锥形瓶中,重复 5 次,在不同液料比 (10 : 1、20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1、60 : 1、70 : 1, ml/g) 下加入不同体积分数 (70%、75%、80%、85%、90%) 乙醇溶液,在不同温度 (40 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃、80 ℃)、不同超声波功率 (300 W、350 W、400 W、450 W、500 W) 下分别提取 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min,每隔 10 min 振荡 1 次锥形瓶,直至物料与提取剂混合均匀,过滤并取上清液定容至 100 ml。取 5 ml 定容后的溶液,用碱性显色法使黄酮类物质显色后测定 510 nm 处的吸光度,研究不同提取因素对黄粉虫中黄酮类物质提取率的影响。

1.5 响应面试验

以黄酮类物质提取率为响应值,在单因素试验结果的基础上选取对黄酮类物质提取率影响显著的因素,设计响应面试验优化工艺参数,因素与水平的设置见表 1。

表 1 响应面试验的因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface

水平	液料比 (ml/g)	乙醇体积分数 (%)	提取时间 (min)
-1	40 : 1	70	30
0	50 : 1	75	40
1	60 : 1	80	50

1.6 黄粉虫中黄酮类物质的稳定性

1.6.1 光照时间对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响 取 100 ml 洁净的容量瓶,向其中加入黄酮类物质提取液至刻度处,分别在室内光、室外自然光及室内避光环境下放置,连续 6 d 每天各取 5 ml 提取液,测定其在 510 nm 处的吸光度。

1.6.2 温度对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响

取 9 支洁净试管,加入 10 ml 黄酮类物质提取液,封口后分别置于 20 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃、80 ℃、90 ℃、100 ℃ 水浴锅中避光放置 1 h,取出后用 80% 乙醇溶液定容至 10 ml,各取 5 ml 待测。

1.6.3 酸碱度对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影

响 取 6 个洁净的锥形瓶 (容量为 25 ml),各加入 10 ml 黄酮类物质提取液,调节 pH 值为 1、3、5、7、9、11,在室温下避光放置 1 h,各取 5 ml 待测。

1.6.4 强氧化剂 H_2O_2 对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响 分别配制质量分数 0、0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25% 的 H_2O_2 溶液。取 6 支洁净的试管,分别加入 10 ml 黄酮类物质提取液,再加入 1 ml 不同质量分数的过氧化氢溶液,摇匀,室温避光 1 h 后各取 5 ml 待测。

1.6.5 还原物对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响 分别配制质量分数为 0、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05% 的 Na_2SO_3 溶液。取 6 支洁净试管,各加入 10 ml 提取液,再分别加入 1 ml 不同质量分数的 Na_2SO_3 溶液,摇匀,避光静置 1 h 后,各取 5 ml 待测。

1.6.6 食品添加剂对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响 分别配制质量分数为 0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 的蔗糖、葡萄糖溶液及质量分数为 0、0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005% 的山梨酸钾、苯甲酸钠溶液,取 24 支洁净的试管,分别加入 10 ml 提取液,再分别向每 6 支试管中各加入 1 ml 上述配制好的不同质量分数的蔗糖溶液、葡萄糖溶液、山梨酸钾溶液、苯甲酸钠溶液,摇匀后避光反应 1 h,各取 5 ml 待测。

1.7 数据处理与分析

用 Excel 2013 整理数据,用 Origin 8.0、Design Expert 8.0、IBM SPSS Statistics 26.0 作图及进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 黄粉虫中黄酮类物质检测波长的确定

由图 1 可知,芸香苷标准溶液、黄酮类物质提取液在 510 nm 处均出现吸收峰,可以确定提取液中含有黄酮类物质,因此检测波长设为 510 nm。

2.2 芸香苷标准曲线

按照绘制芸香苷标准曲线的方法,配制一系列浓度梯度的芸香苷标准溶液,用碱性显色法使其显色,测得 OD_{510} 为 0.019、0.443、0.679、0.939、1.171。以芸香苷标准溶液浓度为横坐标 (x)、吸光度为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线,此标准曲线的线性回归方程为 $Y = 11.910 0x - 0.024 8$, $R^2 = 0.998 5$,线性关系良好。

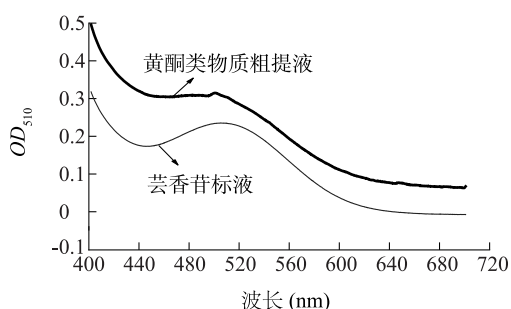


图1 黄粉虫中黄酮类物质检测紫外波长的确定

Fig.1 Determination of ultraviolet wavelength for detection of flavonoids in *Tenebrio molitor*

2.3 单因素试验结果与分析

2.3.1 液料比对黄粉虫中黄酮类物质提取率的影响 由图2可知,在超声波作用下,随着乙醇体积增加,黄酮类物质的提取率先升高后降低。适当的液料比有利于细胞破碎和胞内物质的释放^[17],当液料比为50:1 (ml/g)时,黄酮类物质的溶出量达到最大值,当黄酮类物质溶出达到平衡状态时,溶出量不再增加。继续增大提取剂体积会使溶剂分子与黄酮类物质分子运动提前达到平衡,最终使提取液中的黄酮类物质含量减少。提高液料比会浪费溶剂,增加成本,经单因素方差分析,确定最佳提取液料比为50:1 (ml/g)。

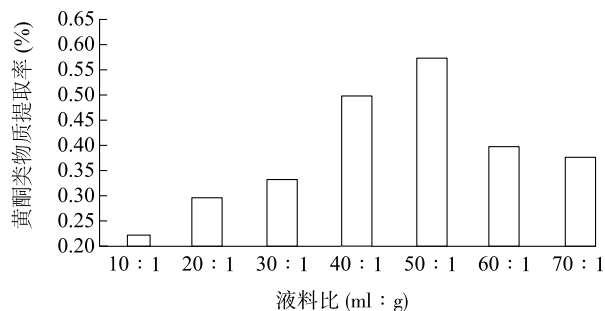


图2 液料比对黄粉虫中黄酮类物质提取率的影响

Fig.2 Effects of liquid-to-material ratio on extraction rate of flavonoids in *Tenebrio molitor*

2.3.2 提取温度对黄粉虫中黄酮类物质提取率的影响 由图3可知,当温度为40~60℃时,随着温度升高,黄酮类物质的提取率整体表现为上升趋势,当温度高于60℃时,黄酮类物质的溶出量逐渐减少,可能是在一定温度范围内黄酮类物质分子随着温度升高表现出运动逐渐加剧,使得溶出量增加,但是当温度过高时,会破坏黄酮类物质的分子结构,影响其稳定性,同时高温条件下其他醇溶性物质更易溶出,

从而影响黄酮类物质的含量^[18-19]。单因素方差分析结果说明,温度对黄酮类物质提取率的影响不显著($P=0.057>0.05$)。

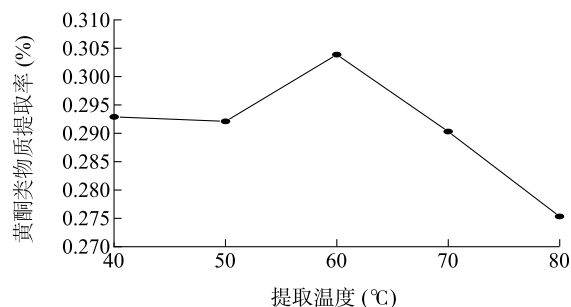


图3 提取温度对黄粉虫中黄酮类物质提取率的影响

Fig.3 Effects of extraction temperature on extraction rate of flavonoids in *Tenebrio molitor*

2.3.3 超声波提取时间对黄粉虫中黄酮类物质提取率的影响 由图4可知,当超声波处理时间为10~50 min时,黄粉虫中黄酮类物质的提取率先升高后降低。可能由于当提取时间较短时,大量黄酮类物质未及及时溶出,当提取时间达到40 min时,由于超声波产生的剧烈振动使黄粉虫表面物质被破坏,黄酮类物质加速溶出,提取率上升;但在超声波作用下,提取时间较长会导致多糖等杂质溶出、黄酮类物质降解^[20-21],从而影响黄酮类物质提取率。经单因素试验分析,确定最佳提取时间是40 min。

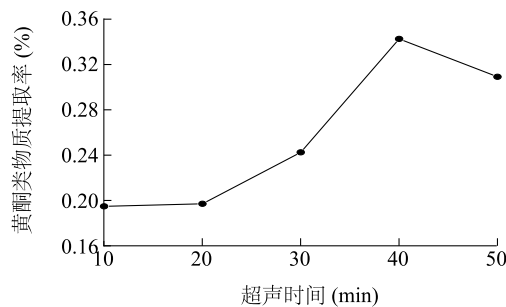


图4 超声波处理时间对黄粉虫中黄酮类物质提取率的影响

Fig.4 Effects of ultrasonic time on extraction rate of flavonoids in *Tenebrio molitor*

2.3.4 乙醇体积分数对黄粉虫中黄酮类物质提取率的影响 由图5可以看出,当乙醇体积分数为70%~90%时,黄粉虫中黄酮类物质的提取率先升高后降低,以75%乙醇溶液作为提取剂时,黄粉虫中黄酮类物质的溶出量最大。若乙醇体积分数过高,溶剂极性过大,会使醇溶性物质(如黄酮苷元)及脂溶性杂质(如色素)的溶出量增大^[22-23],从而影响黄

酮类物质在溶剂中的溶解,最终影响黄酮类物质的溶出量。经单因素方差分析,确定提取黄粉虫中黄酮类物质的最佳乙醇体积分数为75%。

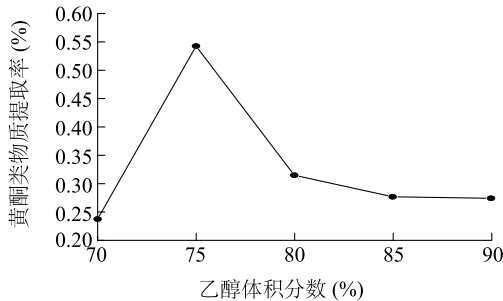


图5 乙醇体积分数对黄粉虫中黄酮类物质提取率的影响

Fig.5 Effects of ethanol concentration on extraction rate of flavonoids in *Tenebrio molitor*

2.3.5 超声波功率对黄粉虫中黄酮类物质提取率的影响 由图6可知,黄酮类物质提取率随着超声波功率的增加大致呈现先升高后降低的趋势。随着超声波功率逐渐增大,超声波对细胞的破碎作用增强,有利于黄酮类物质溶出^[24]。当超声波功率大于400 W时,可能由于功率过高会影响黄酮类化合物的稳定性,从而使得提取率逐渐降低^[25]。经单因素方差分析,认为超声波功率对黄酮类物质提取率的影响不显著($P=0.11>0.05$)。

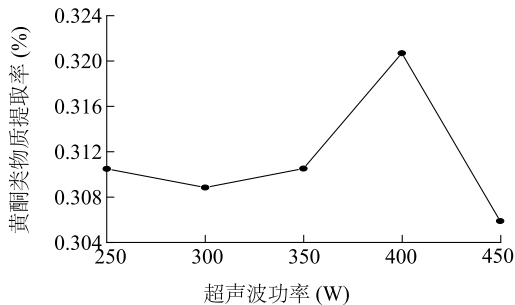


图6 超声波功率对黄粉虫中黄酮类物质提取率的影响

Fig.6 Effects of ultrasonic power on the extraction rate of flavonoids in *Tenebrio molitor*

2.4 响应面试验设计与结果

2.4.1 黄粉虫中黄酮类物质提取率回归模型的建立与分析 以黄粉虫中黄酮类物质提取率为响应值,通过单因素试验选取对提取率影响显著的3个因素(液料比、提取时间、乙醇体积分数),设计3因素3水平响应面试验,共设17个试验点,试验结果见表2。

使用响应面分析软件,以液料比(A)、乙醇体积分数(B)、提取时间(C)为自变量,黄酮类物质提取率为因变量,通过响应面分析、二次多项拟合,得到预测模型如下:

表2 响应面试验结果

Table 2 Results of response surface experiment

编号	各因素的水平			黄酮类物质提取率 (%)
	A (液料比)	B (乙醇体积分数)	C (提取时间)	
1	1	0	1	0.394 21±0.02
2	0	1	-1	0.430 35±0.02
3	1	0	-1	0.372 72±0.02
4	0	1	1	0.426 10±0.01
5	0	0	0	0.574 18±0.03
6	0	0	0	0.554 22±0.05
7	1	1	0	0.391 48±0.02
8	0	-1	-1	0.329 21±0.03
9	0	0	0	0.579 22±0.02
10	0	-1	1	0.408 60±0.03
11	-1	-1	0	0.298 95±0.03
12	1	-1	0	0.352 13±0.02
13	-1	0	1	0.407 88±0.05
14	0	0	0	0.558 75±0.02
15	-1	1	0	0.442 85±0.02
16	0	0	0	0.579 78±0.01
17	-1	0	-1	0.314 93±0.05

$$\text{黄酮类物质提取率} = 0.5700 + 0.0057A + 0.0380B + 0.0240C - 0.0260AB - 0.0180AC - 0.0210BC - 0.1100A^2 - 0.0840B^2 - 0.0830C^2$$

由表3可知,回归模型的 $P<0.0001$,说明使用超声波辅助提取黄粉虫中黄酮类物质的回归模型极显著。失拟项 P 值为0.1832,说明操作中出现的误差在可控范围,实际值与模拟值接近,差异不明显。根据 P 值大小,推测对黄酮类物质提取率影响因素的显著性表现为:乙醇体积分数影响最显著,其次是提取时间,最后是液料比。

2.4.2 黄粉虫中黄酮类物质提取率的响应面分析

在选取的3个因素中,固定1个因素,通过分析其余2个因素变化对黄粉虫中黄酮类物质提取率的影响,得到的响应面图可以直观反映其余2个因素对提取率的影响,并且确定最佳提取条件范围。

图7中的 a_1 、 b_1 、 c_1 等高线图呈椭圆形,等高线分布密集,对应曲面较为陡峭,说明液料比和乙醇体积分数、液料比和提取时间、提取时间和乙醇体积分数之间的交互作用明显,对响应值(黄酮类物质提取率)的影响显著,与表3内容一致。

表 3 回归模型方差分析结果

Table 3 Analysis of variance in response surface test

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
回归模型	0.140 00	9	0.016 00	79.51	<0.000 1
A	0.000 26	1	0.000 26	1.31	0.289 7
B	0.011 00	1	0.011 00	56.66	0.000 1
C	0.004 50	1	0.004 50	22.35	0.002 1
AB	0.002 70	1	0.002 70	13.59	0.007 8
AC	0.001 30	1	0.001 30	6.35	0.039 8
BC	0.001 80	1	0.001 80	8.70	0.021 4
A ²	0.051 00	1	0.051 00	253.42	<0.000 1
B ²	0.030 00	1	0.030 00	147.33	<0.000 1
C ²	0.029 00	1	0.029 00	143.55	<0.000 1
残差	0.001 40	7	0.000 20		
失拟项	0.000 94	3	0.000 31	2.67	0.183 2
纯误差	0.000 47	4	0.000 12		
总离差	0.150 00	16			

A: 液料比; B: 乙醇体积分数; C: 提取时间。决定系数 (R^2) = 0.990 3; 修正决定系数 (R^2_{Adj}) = 0.977 9; 变异系数 = 3.26%。

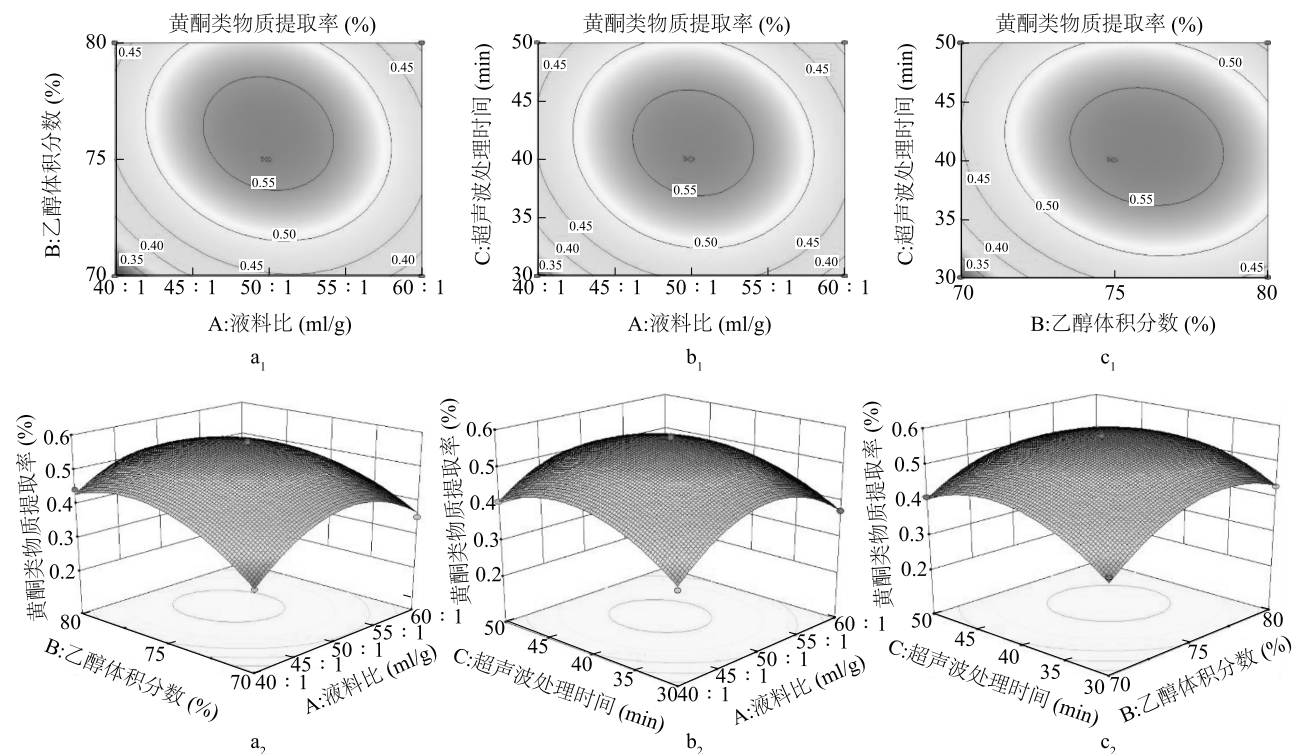
2.4.3 最佳提取工艺参数的验证 利用响应面分析试验, 得出影响黄粉虫中黄酮类物质提取的 3 个

因子对应的最佳提取工艺: 液料比 49.91 : 1.00 (ml/g), 乙醇体积分数 76%, 超声波提取时间 41.16 min, 通过响应面分析得到的预测提取率为 0.570 6%。经综合考虑, 将最佳工艺条件修改为液料比 50 : 1 (ml/g), 乙醇体积分数 76%, 超声波提取时间 41 min。通过 3 次平行试验, 得到黄粉虫中黄酮类物质的平均提取率为 $0.563\ 3\% \pm 0.050\ 0\%$, 与模型计算值接近, 表明响应面模型预测的准确性良好, 该分析法可用于优化黄粉虫中黄酮类物质的提取工艺优化。

2.5 黄粉虫中黄酮类物质的稳定性

2.5.1 光照对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响

如图 8 所示, 日光对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响较大, 经过 6 d 的光照, 黄粉虫中黄酮类物质明显减少, 可能由于日光中的紫外线等引起黄酮类物质的降解与异构化, 导致黄酮类物质含量减少。室内自然光与避光条件对黄酮类物质的影响不是很明显, 但是室内自然光中可能存在少量紫外线, 使得黄酮类物质发生变化, 黄酮类化合物放置较长时间会引起降解, 因此如果要较长时间保存黄酮类物质, 应选择避光条件。



a. 乙醇体积分数与液料比; b. 液料比与超声波处理时间; c. 超声波处理时间与乙醇体积分数; 下标 1, 2 分别为响应面图和等高线图。

图 7 乙醇体积分数、液料比与超声波处理时间对黄粉虫中黄酮类物质提取率的影响

Fig.7 Effects of ethanol concentration, liquid-to-material ratio and ultrasonic time on extraction rate of flavonoids in *Tenebrio molitor*

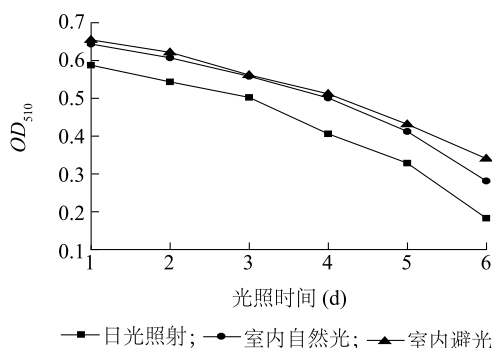


图8 光照对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响

Fig.8 Effects of light on stability of flavonoids in *Tenebrio molitor*

2.5.2 温度对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响

由图9可知,当温度升高时,黄酮类化合物含量逐渐降低,在5℃避光冷藏时,提取液中的黄酮类物质相对于其他温度都比较稳定。在加热条件下,黄粉虫中的黄酮类物质在20~60℃范围相对较稳定,当温度在80℃以上时,黄酮类物质含量减少的速度加快,可能由于温度过高会使黄酮类物质的分解速度加快。由此可见,黄酮类物质在保存过程中应采用低温条件,在加工过程中当温度过高时应加入一定的保护剂。

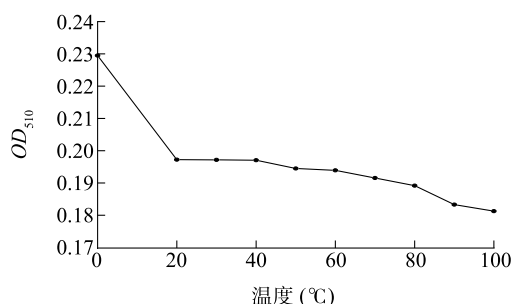


图9 温度对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响

Fig.9 Effects of temperature on stability of flavonoids in *Tenebrio molitor*

2.5.3 pH值对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响

黄酮类物质中的苯环结构中含有酚羟基,通常情况下呈现弱酸性。由图10可以看出,当pH值为6时,吸光度最大,黄酮类物质最稳定,在过酸或过碱条件下,溶液的黄色加深,吸光度降低,说明黄酮类物质含量下降得明显,因此黄酮类物质在加工过程中应避免过酸或过碱条件,或者在加工过程中加入适当保护剂。

2.5.4 强氧化剂对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响 由图11可以看出,加入H₂O₂后,黄酮类物质提

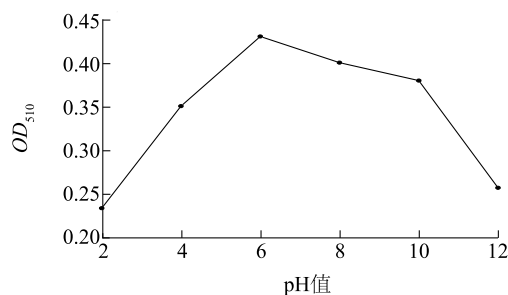
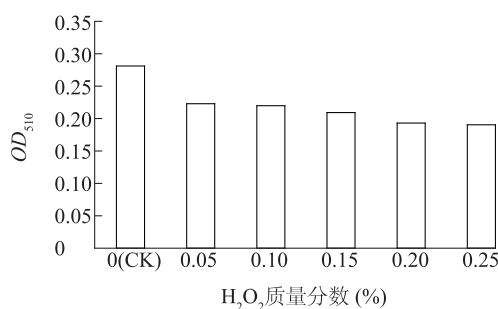


图10 pH值对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响

Fig.10 Effects of pH on the stability of flavonoids in *Tenebrio molitor*

取液的吸光度与对照相比略低,但是总体所受影响不大。在低质量分数H₂O₂溶液作用下,黄酮类物质依然很稳定,但是当H₂O₂质量分数过大时,黄酮类物质就会加速氧化,当H₂O₂质量分数小于0.25%时,黄酮类物质的抗氧化效果较好。黄粉虫中的黄酮类物质在分离纯化后经过进一步加工可以作为很好的抗氧化剂,但是黄酮类化合物在保存时应尽量避免接触强氧化剂。

图11 强氧化剂H₂O₂对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响Fig.11 Effects of strong oxidant H₂O₂ on stability of flavonoids in *Tenebrio molitor*

2.5.5 还原剂对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响 由图12可以看出,随着亚硫酸钠质量分数的增加,黄酮类物质提取液的吸光度无明显变化,说明黄粉虫中的黄酮类物质在加工和存放过程中对还原剂具有良好的稳定性,受还原剂的影响不大。

2.5.6 食品添加剂对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响 由图13可以看出,随着食品添加剂葡萄糖、蔗糖质量分数的增加,黄粉虫中黄酮类物质提取液的OD₅₁₀变化不明显,说明葡萄糖、蔗糖这2种甜味剂对黄酮类物质的稳定性影响不明显,在食品加工过程中可以使用这2种甜味剂。由图14可以看出,随着防腐剂质量分数的增加,黄粉虫中黄酮类物质提取液的

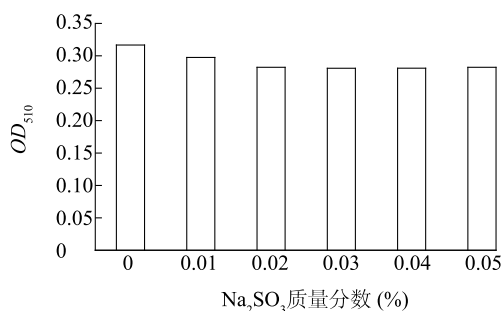


图 12 还原剂对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响

Fig. 12 Effects of reductant on stability of flavonoids in *Tenebrio molitor*

OD₅₁₀变化不大,说明山梨酸钾、苯甲酸钠对黄酮类物质的稳定性影响不大。由此可见,黄酮类物质在含食品添加剂的食品中可以稳定存在,即黄粉虫中的黄酮类物质可以用于食品的深加工。

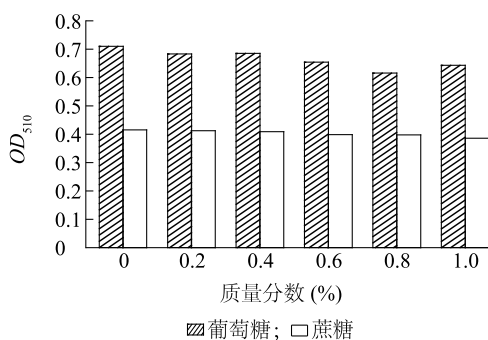


图 13 葡萄糖、蔗糖对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响

Fig. 13 Effects of glucose and sucrose on stability of flavonoids in *Tenebrio molitor*

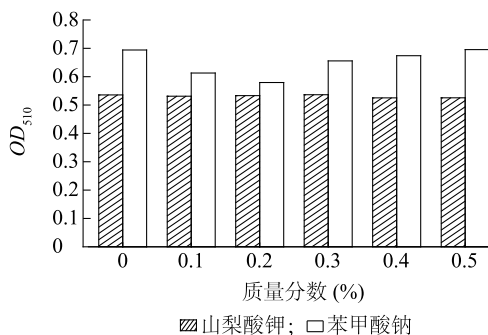


图 14 山梨酸钾、苯甲酸钠对黄粉虫中黄酮类物质稳定性的影响

Fig. 14 Effects of potassium sorbate and sodium benzoate on stability of flavonoids in *Tenebrio molitor*

3 讨论

超声波辅助提取黄粉虫中黄酮类物质主要是利

用超声波产生的强烈振动、粉碎和空化作用来破坏细胞结构,更易于将黄酮类物质提取到溶剂中,该方法具有简单、高效等特点^[26-27]。在试验范围内,黄酮类物质提取率随着超声波功率、超声波处理时间、乙醇体积分数的增加整体呈现出先升高后降低的趋势,可能由于超声波功率过大会破坏黄酮类化合物的结构^[25],超声波处理时间较长会造成多糖等杂质溶出^[20],乙醇体积分数过高时会使醇溶性物质(如黄酮苷元)及脂溶性杂质(如色素)的溶出量增大^[22-23],最终会影响黄酮类物质的提取率。田建华等^[28]从沙棘果渣中提取总黄酮,以乙醇为溶剂,以超声波为辅助,发现超声波功率、超声波处理时间、乙醇体积分数等对总黄酮提取率的影响均呈现出相同的变化趋势,但因原料不同,确定的工艺参数有区别。

日光、室内自然光可能由于紫外线使黄酮类物质降解与异构化,低温条件下黄酮类物质比较稳定,在温度为 80 ℃ 以上时,分解加快,与秦生华等^[29]关于黄酮类物质对紫外线敏感、黄酮类物质应低温保存的研究结果一致。pH 值过高或过低均会影响黄酮类物质的稳定性,当 pH 值为 6 时,黄酮类物质最稳定,黄琼等^[30]研究洛神花总黄酮时得出,在 pH 值为 3.0~6.0 其稳定性最好。葡萄糖与蔗糖,山梨酸钾和苯甲酸钠对黄酮类物质稳定性的影响不大,与冯靖等^[31]关于苯甲酸钠、蔗糖对银杏叶黄酮稳定性影响不大的研究结果一致。

4 结论

在单因素试验基础上,通过响应面试验优化得到黄粉虫中黄酮类物质最佳提取条件为:液料比 50:1 (ml/g)、提取温度 60 ℃、提取时间 41 min、超声波功率 400 W、乙醇体积分数 76%,此时提取率为 0.563 3%,与预测值接近。黄酮类物质的稳定性研究表明,光照、高温、过酸、过碱与强氧化剂对黄酮类物质有一定影响,还原剂与食品添加剂在适用范围内对黄粉虫中黄酮类物质的稳定性影响不大。

参考文献:

- [1] YU J F, LOU Q, ZHENG X Y, et al. Sequential combination of microwave- and ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from *Osmanthus fragrans* Lour. flowers[J]. *Molecules*, 2017, 22 (12): 2216.
- [2] AFIFI H S, HASHIM I B, ALTUBJI S I. Optimizing extraction conditions of crude fiber, phenolic compounds, flavonoids and an-

- tiioxidant activity of date seed powder[J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54(13): 4149-4161.
- [3] 生吉萍,宿文凡,石家豪,等.茶树花黄酮类化合物研究进展[J].食品安全质量检测学报,2022,13(4):1019-1026.
- [4] 林春草,陈大伟,戴均贵.黄酮类化合物合成生物学研究进展[J].药学报,2022,57(3):1322-1335.
- [5] HUANG H S, LIAW E T. Extraction optimization of flavonoids from hypericum and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity[J]. Molecules, 2017, 22(12): 2172.
- [6] 杨文博,彭 丹,曹思逸,等.微生物合成黄酮类化合物研究进展[J].生命科学,2022,34(2):220-227.
- [7] 马 群.浅析黄粉虫作为鸡饲料蛋白添加的应用[J].畜牧业环境,2020(7):70-71.
- [8] BIASATO I, GASCO L, DE MARCO M, et al. Effects of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) inclusion in diets for female broiler chickens: implications for animal health and gut histology[J]. Animal Feed Science and Technology, 2017, 234: 253-263.
- [9] 李 钢,彭 飞,尹洪洋,等.板栗叶总黄酮提取工艺的优化及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2020,41(3):64-72.
- [10] 夏光辉.玉竹二氢高异黄酮分离与抗氧化活性研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2020.
- [11] ZEKOVIĆ Z, VIDOVIĆ S, VLADIĆ J, et al. Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2014, 95: 560-566.
- [12] MA F W, ZHAO Y, GONG X J, et al. Optimization of quercitrin and total flavonoids extraction from Herba Polygoni Capitati by response surface methodology[J]. Pharmacognosy Magazine, 2014, 10(S1): 57-64.
- [13] 孙宇辰,程吉云,张立愔,等.3种昆虫黄酮提取物的大肠杆菌抑菌活性研究[J].安徽农业科学,2019,47(14):183-184,219.
- [14] 王振伟,胡晓冰,陈西良.超声波辅助法和乙醇回流法提取葛根素[J].食品研究与开发,2016,37(9):47-51.
- [15] 吴 芳,李 莉,黄 彭,等.艳山姜叶片和果实化学成分预试验及总黄酮含量测定[J].安徽农业科学,2021,49(9):172-174.
- [16] 汪 璇,张建新,孙长江,等.响应面法优化黄粉虫黄酮提取工艺[J].食品科学,2013,34(4):11-16.
- [17] WU E Y, SUN W J, WANG Y, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Abrus cantoniensis* (Abriherba) by response surface methodology and evaluation of its anti-inflammatory effect[J]. Molecules, 2022, 27(7): 2036.
- [18] LIU J, LI C C, DING G J, et al. Artificial intelligence assisted ultrasonic extraction of total flavonoids from *Rosa sterilis*[J]. Molecules, 2021, 26(13): 3835.
- [19] 张宽朝,陈 杰,马 伟,等.响应面法优化草莓总黄酮提取工艺[J].江苏农业学报,2019,35(6):1450-1458.
- [20] LIAO C Y, HUANG M, HUANG Y. Ultrasound assisted extraction process of total saponins from *Abrus cantoniensis*[J]. North Hortic, 2013(3):161-163.
- [21] CORBIN C, FIDEL T, LECLERC E A, et al. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds[J]. Ultrason Sonochem, 2015(26):176-185.
- [22] 苏 适,王双侠.响应曲面优化超声波辅助提取无花果叶总黄酮的工艺研究[J].食品研究与开发,2019,40(9):101-106.
- [23] HOU M Y, HU W Z, WANG A S, et al. Ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from *Pteris cretica* L.: process optimization, HPLC analysis, and evaluation of antioxidant activity[J]. Antioxidants, 2019, 8(10):425.
- [24] 王 杰,张鹏锋,赵小娜,等.响应面法优化狮头柑果皮总黄酮提取工艺[J].西北林学院学报,2021,36(5):118-124.
- [25] LIU L, GUAN F, ZHANG X Y, et al. Optimization of extraction technique of anthocyanins from *Schisandra chinensis* baill. by Box-behnken design[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2019(21):66-69.
- [26] GIORDANO M, PINELA J, DIAS M I, et al. Ultrasound-assisted extraction of flavonoids from kiwi peel: process optimization and bioactivity assessment[J]. Appl Sci, 2021,11(14): 6416.
- [27] TUNG M U N N I T H U M D, DROUET S, KABRA A, et al. Enrichment in antioxidant flavonoids of stamen extracts from *Nymphaea lotus* L. using ultrasonic-assisted extraction and macroporous resin adsorption[J]. Antioxidants, 2020, 9(7):576.
- [28] 田建华,张春媛,魏 璐.沙棘果渣总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].天然产物研究与开发,2021,33(1):65-72.
- [29] 秦生华,李 珊,凌旭彬,等.百香果果皮总黄酮的超声波辅助提取工艺优化及其性质研究[J].食品工业科技,2020,41(17):153-160,166.
- [30] 黄 琼,谢向机,林嘉丽,等.洛神花总黄酮提取工艺及其稳定性研究[J].保鲜与加工,2021,21(2):102-108.
- [31] 冯 靖,彭效明,李翠清,等.银杏叶黄酮的抗氧化性及其稳定性研究[J].食品科技,2019,44(4):244-249.

(责任编辑:徐 艳)