

# 超声波-微波联合提取山核桃壳多酚及其稳定性

孙海涛, 邵信儒, 姜瑞平, 罗霞芳

(通化师范学院 制药与食品科学学院, 长白山食用植物资源开发工程中心, 吉林 通化 134000)

**摘要:**以野生山核桃壳为试材,采用超声波-微波辅助联合提取多酚,研究了贮存条件对多酚稳定性的影响。结果表明:当乙醇体积分数 50%、 $m(\text{核桃壳}):V(\text{溶液})(\text{料液比})=1:20$  g/mL、超声功率 405 W、微波功率 200 W,山核桃壳多酚提取率最高,为 2.361%,提取效率大大高于传统常规水浴浸提法。稳定性研究结果表明,山核桃壳多酚在低温、避光、酸性和中性条件下稳定性好,在一定强度的紫外光线照射下,其性质无明显变化,并具有一定的抗氧化还原性。

**关键词:**多酚;超声波;微波;核桃壳;稳定性

**中图分类号:**TS 202.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0135-05

长白山野生核桃产自长白山植被茂盛的自然环境中,属胡桃科山核桃属,又名小胡桃、小核桃,在东北偏远山区亦有分布,属于稀特产品<sup>[1]</sup>。研究表明,长白山野生核桃果仁中含有丰富的蛋白质、氨基酸及矿物质元素,营养价值高,并具有润肺强肾、降低血脂,预防冠心病之功效,长期食用具有益寿养颜,抗衰老等作用<sup>[2-3]</sup>。

虽然长白山区野生核桃资源丰富,但相关核桃壳的研究较少,常因其坚硬且不可食用而被作为燃料或废弃,没有得到充分开发和利用。目前国内外对山核桃壳的研究主要利用核桃壳制备颗粒活性炭和分子筛<sup>[4-5]</sup>,还有的用于制作吸附剂等。山核桃壳中含有丰富的多酚类物质,大量研究表明,多酚在抗肿瘤、抗病毒、抗衰老等方面都有良好的作用<sup>[6-8]</sup>。若能利用山核桃壳提取多酚,并应用于食品,可大大提高长白山野生核桃资源的附加值。该研究旨在利用超声波-微波辅助联合提取长白山野生核桃壳多酚并研究其稳定性,以期克服常规水浴浸提法的缺陷和多酚保存使用中的问题,为更好的开发利用这一野生资源提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

山核桃壳于 2014 年 10 月采摘于长白山区;福林酚试剂(上海荔达生物科技有限公司),没食子酸、无水碳酸钠、柠檬酸、过氧化氢、亚硫酸钠、无水乙醇,均为分析纯。

**第一作者简介:**孙海涛(1981-),男,博士研究生,讲师,研究方向为食品新资源开发及其功能性。E-mail:sunhaitaoth@126.com

**基金项目:**吉林省“2011 计划”长白山非物质文化遗产传承协同创新中心资助项目([2013]6 号)。

**收稿日期:**2015-07-24

SL-SM50 型超声微波联合提取仪(南京顺流仪器有限公司);LWF-6B1 型振动式药物超微粉碎机(济南龙微制药设备有限公司);TV-1901 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);FA1604A 型电子分析天平(上海精天电子仪器有限公司);pH3C 精密数显酸度计(上海大普仪器有限公司);722S 可见分光光度计(上海棱光技术有限公司);TDL80-2B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂制造);HHS 型电热恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司设备厂);DHG-9245A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 山核桃壳多酚的提取** 将山核桃壳冲洗干净,烘干,放入超微粉碎机中粉碎,过 100 目筛,备用。精确称取一定量的山核桃壳粉末,加入适量的提取剂利用超声波-微波联合提取多酚,提取液定容至相同刻度,静置过滤,滤液离心(4 000 r/min, 20 min),取定量上清液按下述方法显色后测定吸光度,计算提取率。

**1.2.2 标准曲线的绘制及多酚含量的计算** 标准曲线的绘制:精确称取 15.00 mg 干燥的没食子酸,加入适量蒸馏水,溶解冷却,以蒸馏水定容至 50 mL,制成 0.3 mg/mL 没食子酸的溶液,作为对照品溶液。将 0.3 mg/mL 的没食子酸标准溶液分别配制成 0.00、0.03、0.06、0.09、0.12、0.15、0.18、0.21 mg/mL 的溶液,分别取 1 mL 置于 10 mL 的容量瓶中,加入 2 mL 福林酚试剂,摇匀,加入 1 mL 10% 碳酸钠溶液混匀,以蒸馏水稀释至刻度震荡,静置 3 h,在试验确定的最大吸收峰 697 nm 波长下测定吸光度。以吸光度  $A$  为纵坐标,质量体积分数  $c$  为横坐标,绘制标准曲线。用最小二乘法进行线性拟合,得线性回归方程  $Y=0.0477x-0.0117$ ,  $R^2=0.9992$ 。

**1.2.3 野生山核桃壳多酚提取的单因素** 乙醇体积分

数的选择:固定料液比 1:20 g/mL,提取时间 3 min,超声功率 450 W,微波功率 100 W,提取温度 40℃,研究乙醇体积分数为 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%时对山核桃壳多酚提取率的影响。料液比的选择:固定乙醇体积分数 40%,提取时间 3 min,超声功率 450 W,微波功率 100 W,提取温度 40℃,研究料液比为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL 对山核桃壳多酚提取率的影响。提取时间的选择:固定乙醇体积分数 40%,料液比 1:20 g/mL,超声功率 450 W,微波功率 100 W,提取温度 40℃,研究提取时间为 1、3、5、7、9、11 min 对山核桃壳多酚提取率的影响。超声功率的选择:固定乙醇体积分数 40%,料液比 1:20 g/mL,提取时间 3 min,微波功率 100 W,提取温度 40℃,研究超声功率为 180、270、360、450、540、630、720 W 对山核桃壳多酚提取率的影响。微波功率的选择:固定乙醇体积分数 40%,料液比为 1:20 g/mL,提取时间 3 min,超声功率 450 W,提取温度 40℃,研究微波功率为 100、200、300、400、500 W 对山核桃壳多酚提取率的影响。提取温度的选择:固定乙醇体积分数 40%,料液比为 1:20 g/mL,提取时间为 3 min,超声功率 450 W,微波功率 100 W,研究提取温度为 30、40、50、60、70℃ 对山核桃壳多酚提取率的影响。

1.2.4 正交实验设计 为了得到超声波-微波联合提取长白山野生核桃壳多酚的最佳工艺条件,综合考虑上述各因素对山核桃壳多酚提取率的影响,筛选出乙醇体积分数、料液比、超声功率、微波功率,设计  $L_9(3^4)$  正交实验,水平和因素见表 1,平行试验 3 次,优化提取工艺。

表 1  $L_9(3^4)$  正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A 乙醇体积分数 Ethanol concentration /%	B 料液比 Ratio of material to solvent/(g·mL <sup>-1</sup> )	C 超声功率 Ultrasonic power/W	D 微波功率 Microwave power/W
1	40	1:20	360	100
2	50	1:25	405	150
3	60	1:30	450	200

1.2.5 山核桃壳多酚稳定性的研究 为确定山核桃壳多酚的保存及使用条件,取若干等份山核桃壳多酚提取液,在其它条件不变的情况下,分别置于不同温度、pH、光照;不同浓度氧化剂及还原剂条件下,研究各因素对山核桃壳多酚稳定性的影响。

### 1.3 项目测定

多酚含量测定采用福林酚法<sup>[9-10]</sup>。精确量取 1 mL 稀释的山核桃壳多酚溶液,按照上述标准曲线绘制的方法测定吸光度,根据标准曲线求得溶液中多酚质量浓度,并计算山核桃壳多酚提取率。山核桃壳多酚提取率(%) =  $\frac{c \cdot n \cdot v}{m \times 1\,000} \times 100$ ,式中: $c$  为容量瓶中山核桃壳

多酚浓度( $\mu\text{g/mL}$ ); $n$  为稀释倍数; $v$  为待测液总体积(mL); $m$  为山核桃壳粉质量(g)。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数的选择 由图 1 可以看出,乙醇体积分数对山核桃壳多酚提取效果有显著的影响。在其它条件不变的条件下,乙醇体积分数在 20%~80%时,随着乙醇体积分数的逐渐增大,山核桃壳多酚的提取率先升高而后缓慢降低,并在乙醇体积分数 50%时,提取率达到最大值 2.095%。适当浓度的有机溶剂可以破坏多酚与多糖、蛋白质等物质之间的氢键和疏水作用,促进多酚的溶出。但随着乙醇体积分数的进一步增大,超过 70%时,其与山核桃壳多酚的极性差异变大,提取率降低。另外高浓度的有机溶剂可使细胞中的蛋白质凝固,导致多酚不易溶出。故选择乙醇体积分数 40%~60%作为正交实验范围。

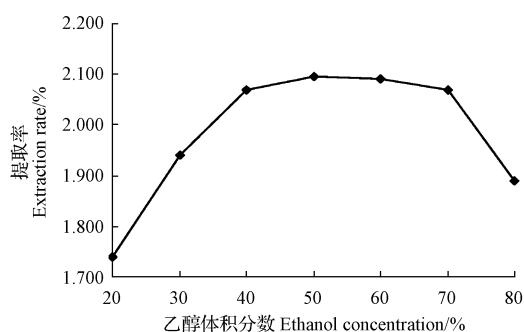


图 1 乙醇体积分数对山核桃壳多酚提取效果的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on pecan shell polyphenol extraction

2.1.2 料液比的选择 料液比是提取过程的一个重要影响因素。由图 2 可以看出,在其它条件不变的条件下,当料液比从 1:10 g/mL 增加到 1:30 g/mL 时,多酚提取率逐渐增大并达到最大值 1.992%;随着料液比继续增加,多酚提取率先缓慢降低而后逐渐升高,其变

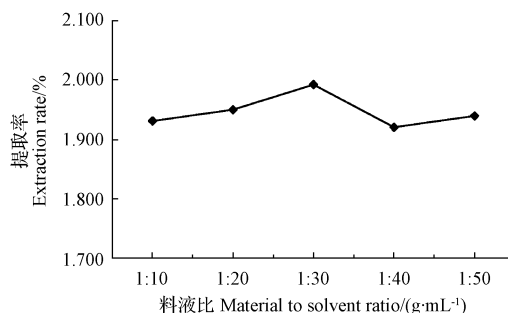


图 2 料液比对山核桃壳多酚提取效果的影响

Fig. 2 Effect of ratio of material to solvent on pecan shell polyphenol extraction

化趋势不明显。即料液比过大,杂质溶出过多,同时也会增大超声波-微波破碎细胞的阻力和能量消耗,降低多酚的提取率。综合考虑各方面因素,选择料液比 1:20~1:30 g/mL 作为正交实验范围。

2.1.3 提取时间的选择 由图 3 可以看出,在其它条件不变的条件下,在 1~5 min 内随着提取时间的延长,山核桃壳多酚类物质通过超声波-微波联合作用使其充分溶出,提取率逐渐增大,但当提取时间超过 5 min 时,山核桃壳多酚类物质的提取率增加不明显,并在超过 9 min 后有下降趋势。原因是超声波-微波作用时间增加,杂质溶出,同时增加了能量消耗和操作时间,给后续分离带来困难。综合考虑相关因素,确定超声波-微波作用时间为 5 min。

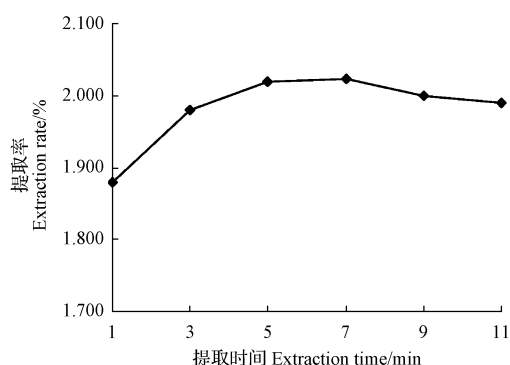


图 3 提取时间对山核桃壳多酚提取效果的影响

Fig. 3 Effect of time on pecan shell polyphenol extraction

2.1.4 超声功率的选择 由图 4 可见,超声波的空化作用、机械效应和热效应等加速胞内有效物质的释放、扩散和溶解,促进有效成分的溶出。在其它条件不变的情况下,超声功率在 180~720 W 范围内变化时,山核桃壳多酚提取率先增大而后缓慢降低,并在超声功率达到 450 W 时达到最大值 2.135%。适当的超声波作用可大大提高山核桃壳多酚的提取效率,故选择超声功率 360~450 W 作为正交实验范围。

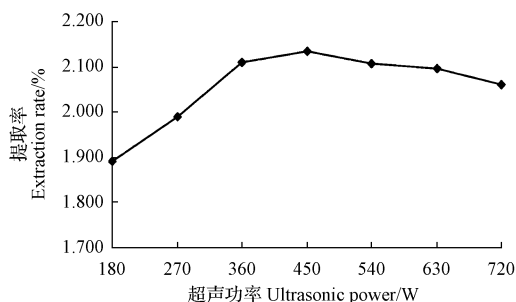


图 4 超声功率对山核桃壳多酚提取效果的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic power on pecan shell polyphenol extraction

2.1.5 微波功率的选择 由图 5 可以看出,微波功率对山核桃壳多酚的提取率有显著的影响,在其它条件不变的情况下,当微波功率不超过 300 W 时,多酚的提取率变化幅度小,并在微波功率 200 W 时达到最大值 2.050%,当微波功率超过 300 W 时,多酚提取率变化总体趋势逐渐下降。适当的微波强度直接与被分离物作用,微波能直接作用于样品基体内,当它作用于分子时,促进了分子的转动,在极性溶剂条件下和微波作用下瞬时极化,从而促进分子活性部分更好地接触和反应,提高了山核桃壳多酚提取率。故考虑能量消耗及试验条件的可操作性等因素,选择微波功率 100~200 W 作为正交实验范围。

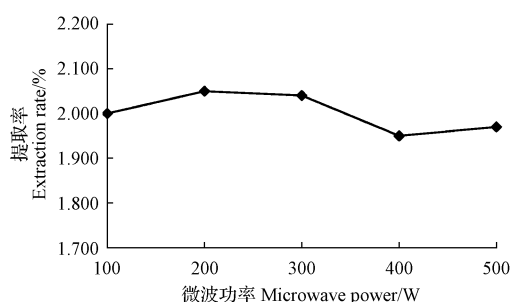


图 5 微波功率对山核桃壳多酚提取效果的影响

Fig. 5 Effect of microwave power on pecan shell polyphenol extraction

2.1.6 提取温度的选择 由图 6 可以看出,在其它条件不变的条件下,提取温度在 30~70℃ 时,随提取温度的升高,山核桃壳多酚提取率先升高后缓慢下降并在 50℃ 时达到最大值 2.176%,继续提高温度,提取率趋于平稳。综合考虑多酚的热不稳定性 and 实际操作等因素,确定超声波-微波提取温度为 50℃。

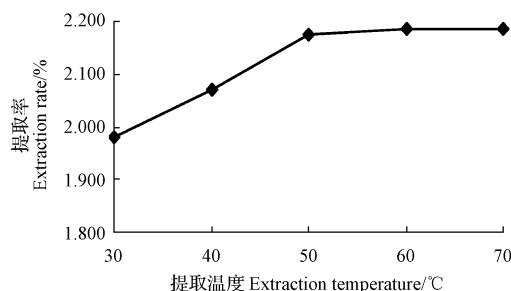


图 6 提取温度对山核桃壳多酚提取效果的影响

Fig. 6 Effect of temperature on pecan shell polyphenol extraction

## 2.2 正交实验

超声波-微波联合提取山核桃壳多酚的正交实验的极差分析结果见表 2,方差分析结果见表 3。各因素对多酚提取率影响程度从高到低依次为 A、D、C、B,即乙醇体积分数、微波功率、超声功率和料液比,其中乙醇体积分



数、微波功率对提取率的影响达到显著水平,料液比和超声功率的影响不显著。根据试验结果结合  $K$  值确定超声波-微波联合提取山核桃壳多酚的最优水平组合为  $A_2B_1C_2D_3$ ,即乙醇体积分数 50%、料液比 1:20 g/mL、超声功率 405 W、微波功率 200 W。此时,山核桃壳多酚提取率的平均值达到 2.361%。

表 2 山核桃壳多酚提取  
工艺正交实验的极差分析

Table 2 Range analysis of orthogonal experiment

指标 Index	A 乙醇体积分数 Ethanol concentration /%	B 料液比 Ratio of material to solvent/(g·mL <sup>-1</sup> )	C 超声功率 Ultrasonic power/W	D 微波功率 Microwave power/W
$K_1$	5.992	6.217	5.952	5.690
$K_2$	6.621	6.214	6.267	6.332
$K_3$	5.775	5.957	6.169	6.366
R	0.282	0.087	0.105	0.225

表 3 山核桃壳多酚提取  
工艺正交实验的方差分析

Table 3 ANOVA orthogonal experiment

变异来源 Sources of variation	偏差平方和 Squared deviations	自由度 Freedom	均方差 Mean variance	F 值 F value	显著性 Significance
1	0.386 1	2	0.193 1	26.630 8	显著
2	0.044 6	2	0.022 3	3.067 4	
3	0.052 0	2	0.026 0	3.587 7	
4	0.290 1	2	0.145 0	20.013 8	显著
误差 Error	0.130 5	18	0.007 3		

### 2.3 对比试验

为考查超声波-微波联合提取野生山核桃壳多酚的效果,根据单因素和正交实验结果,选择乙醇体积分数 50%、料液比 1:20 g/mL,提取温度 50℃,提取时间 30 min 进行常规水浴法提取多酚,平行试验 3 次取平均值,通过计算得到多酚提取率为 2.022%。对比可知,超声波-微波联合提取山核桃壳多酚能够大大缩短提取时间,同时具有更高的提取效率,提取率比常规水浴提取法高 16.77%。

### 2.4 山核桃壳多酚的稳定性研究

2.4.1 温度对山核桃壳多酚稳定性的影响 温度对山核桃壳多酚稳定性的影响研究表明,在 50℃ 以下处理时,山核桃壳多酚溶液的稳定性好。当温度高于 60℃,在 3 h 内,山核桃壳多酚溶液中多酚的残存率大幅度降低,温度愈高,稳定性愈差。山核桃壳多酚在较高温度下易发生氧化聚合,而在低温下则有较好稳定性,适宜于低温使用和保存。

2.4.2 光照对山核桃壳多酚稳定性的影响 光照对山核桃壳多酚稳定性的影响研究表明,在自然光条件下保存,随着保存时间的延长,山核桃壳多酚的残存率呈现明显的下降趋势,而避光保存的山核桃壳多酚溶液,其稳定性较好。通过对紫外光稳定性试验研究表明,在一定强度的紫外光下照射一定时间,山核桃壳多

酚的残存率无明显变化,说明其对紫外光不敏感,可用于紫外杀菌操作。

2.4.3 氧化剂对山核桃壳多酚稳定性的影响 随着氧化剂浓度以及氧化时间的增加,山核桃壳多酚含量呈现下降趋势。在 1.5 h 之内,各浓度氧化剂处理多酚溶液,其残存率降低不明显。1.5 h 以后多酚含量迅速降低,但各浓度处理之间差异不大,说明山核桃壳多酚受抗氧化剂浓度的影响小。3~5 h 时各浓度处理山核桃壳多酚溶液,其含量变化不明显,说明多酚与氧化剂反应速率较慢,具有一定程度的抗氧化作用。

2.4.4 还原剂对山核桃壳多酚稳定性的影响 研究表明,随着亚硫酸钠溶液浓度的增加及时间的延长,多酚溶液中多酚的残存率缓慢降低,但变化趋势不明显,说明还原剂对山核桃壳多酚稳定性的影响较小。

2.4.5 pH 值对山核桃壳多酚稳定性的影响 取相同量的多酚溶液数份,分别调节不同 pH 值,在密闭避光条件下处理一定时间。结果表明,在酸性和中性条件下,山核桃壳多酚的性质较稳定,其残存率可达 97.35%。而当 pH 值大于 8 时,山核桃壳多酚溶液的稳定性较差,其残存率仅为 76.52%。主要由于在碱性条件下,破坏了多酚的结构,使多酚含量降低。

## 3 结论

通过单因素试验和正交实验优化得到超声波-微波联合提取山核桃壳多酚的最佳工艺条件为:乙醇体积分数 50%、料液比 1:20 g/mL、超声功率 405 W、微波功率 200 W。在此条件下山核桃壳多酚提取率的平均值达到 2.361%。与常规水浴提取方式相比较,具有时间短、提取率高、溶剂用量少等优点,在提取时间缩短 5/6 的情况下提取率比常规水浴提取法高 16.77%。

稳定性研究结果表明,山核桃壳多酚在低温、避光、酸性和中性条件下稳定,在一定强度的紫外光线照射下,其性质无明显变化,具有一定的抗氧化还原性,可根据其性质调节在使用和保存条件。

### 参考文献

- [1] 金锦实,赵贞玉. 长白山野生山核桃资源的开发与利用[J]. 吉林农业,2014(5):16.
- [2] 孙海涛,邵信儒. 响应面法优化超声波提取山核桃壳色素工艺[J]. 东北林业大学学报,2012,40(2):74-77.
- [3] 冯妙,王珏,揭雅娇,等. 响应面法优化碱性蛋白酶提取野生山核桃籽粕蛋白[J]. 粮食科技与经济,2014,39(3):57-60.
- [4] LIU L J, LI W SASAKI T, et al. Juglanone, a novel atetralonyl derivative with potent antioxidant activity from Juglans mandshurica[J]. Journal of Natural Medicines, 2010, 64(4):496-499.
- [5] KIM J W, SHN M H, KIM D S, et al. Production of granular activated carbon from waste walnut shell and its adsorption characteristics for  $Cu^{2+}$  ion[J]. Journal of Hazardous Materials, 2001, 85(3):301-315.
- [6] 左丽丽,王振宇,樊梓鸾,等. 植物多酚类物质及其功能研究进展[J]. 中国林副特产,2012(5):39-43.

# 甲基托布津等药剂处理对冬枣贮藏保鲜效果的影响

徐雅玲<sup>1</sup>, 向延菊<sup>2</sup>

(1. 阿克苏职业技术学院 生物工程系, 新疆 阿克苏 843000; 2. 塔里木大学 生命科学学院, 新疆 阿拉尔 843300)

**摘要:**以新疆和田冬枣为研究对象, 采用低温冷藏方法, 研究了不同药剂处理对冬枣贮藏保鲜的效果。结果表明:氯化钙和甲基托布津处理能抑制冬枣的腐烂, 对贮藏保鲜有利。贮藏 56 d 后, 以 0.10% 甲基托布津溶液处理其腐烂率最低(48.40%), 维生素 C 含量最高(58.864 6 mg/100g); 1% 氯化钙和 0.10% 甲基托布津溶液处理其失重率最小(2.49%)、可溶性固形物含量最高(17.75%); 0.05% 甲基托布津溶液处理其果实硬度最大(8.68 Pa); 1% 氯化钙和 0.05% 甲基托布津溶液处理其可滴定酸含量最低(0.33 g/100mL)。综合考虑, 以采用 0.10% 的甲基托布津溶液处理的效果较好, 能较好地保存冬枣的营养成分, 延长冬枣贮藏保鲜期。

**关键词:**冬枣; 甲基托布津; 氯化钙; 贮藏保鲜

**中图分类号:**S 665.109<sup>+</sup>.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0139-04

红枣(*Zizyphus jujuba* Mill)属鼠李科(Rhamnaceae)枣属(*Zizyphus*)植物。原产于我国黄河中下游地区, 在

**第一作者简介:**徐雅玲(1964-), 女, 陕西蓝田人, 本科, 副教授, 现主要从事园艺植物生产研究及园艺专业教学改革等工作。E-mail: xyling313@163.com.

**责任作者:**向延菊(1970-), 女, 土家族, 湖南石门人, 硕士, 副教授, 现主要从事农产品贮藏与加工等研究工作。E-mail: xiangyanju@163.com.

**收稿日期:**2015-07-24

我国已有 8 000 多年的栽培历史, 属我国特产果品之一, 现枣树栽植面积扩大, 近年来已成为我国果树发展的热点<sup>[1]</sup>。鲜枣果实肉脆、味道甜美, 酸甜适口, 营养丰富, 具有极高的食用和药用价值<sup>[2-5]</sup>。冬枣肉质甘甜, 有浓郁的枣香味, 水分含量高, 可食率达 93.8%, 是一种风味极佳的鲜食枣品种。冬枣含天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸等 19 种人体需要的氨基酸及多种维生素, 尤其是维生素 C 含量特高, 被誉为“活维生素丸”, 并含有钙、钾、铁、锌、铜等多种矿质元素, 对预防心血管病、软化血管、防癌、抗

[7] 邵海燕, 李兴飞, 陈杭君, 等. 山核桃多酚物质提取及抗氧化研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 336-341.

[8] 刘洋, 刘婷婷, 于鑫, 等. 蒙古栎叶片多酚的超声提取、优化及抗氧化能力[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(1): 70-73.

[9] 张天财. 鲜核桃保鲜及核桃种皮中多酚化合物的测定、纯化及功能研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2014.

[10] 刘焕云, 温志英, 张香美, 等. 葡萄皮中多酚类物质的微波辅助提取技术[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(8): 77-78, 83.

## Study on Ultrasound-Microwave Combined Extraction and Stability of Pecan Shell Polyphenolic

SUN Haitao, SHAO Xinru, JIANG Ruiping, LUO Xiafang

(Department of Pharmaceutics and Food Science, Tonghua Normal University/Development Engineering Center of Edible Plant Resources of Changbai Mountain, Tonghua, Jilin 134000)

**Abstract:** Taking wild pecan shells as material, using ultrasonic-microwave assisted extraction polyphenols, the influence of storage conditions on the stability of polyphenols were studied. The results showed that, when volume fraction of ethanol 50%,  $m$  (walnut shell) :  $V$  (solution) (solid-liquid ratio) = 1 : 20 g/mL, ultrasonic power 405 W, microwave power 200 W, pecan shell polyphenolic extraction rate was 2.361%. Extraction efficiency was much higher than traditional water extraction method. Stability studies showed that pecan shell polyphenolic had good stability at low temperatures, dark, acidic and neutral conditions. UV light had little impact on polyphenolic and had good antioxidant properties.

**Keywords:** polyphenols; ultrasonic; microwave; walnut shells; stability