

超声波-微波协同酶法提取柳蒿芽黄酮

孙海涛^{1,2}, 孙影¹, 朱炎¹, 邵信儒¹, 姜瑞平¹

(1. 通化师范学院 长白山食用植物资源开发工程中心, 吉林 通化 134000;

2. 吉林大学 生物与农业工程学院, 吉林 长春 130022)

摘要:以长白山柳蒿芽为试材,在单因素试验基础上,采用4因素5水平响应面分析法,研究了超声波-微波提取因素对柳蒿芽黄酮提取率的影响,同时建立最佳提取工艺。结果表明:液料比26:1 mL/g、乙醇体积分数42%、超声波功率538 W、酶添加量1.4%,在此条件下柳蒿芽黄酮的提取率为5.42%,与常规水浴法提取柳蒿芽黄酮相比具有更高的提取效率。

关键词:超声波;微波;柳蒿芽;黄酮

中图分类号:TS 202.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)05-0153-04

柳蒿芽 (*Artemisia selengensis* L.) 属菊科多年生草本植物,别名柳叶蒿、柳蒿、水蒿、白蒿等。多生于低海拔或中海拔湿润半湿润地区的草甸、灌丛、沼泽及林地的边缘,在我国东北各省区尤其是长白山区有着丰富的野生资源分布^[1]。柳蒿芽营养丰富、质嫩味香、风味独特,它不仅是一种地方特色蔬菜,而且还有一定药效作用,经研究发现,其有清热凉血、清热利湿、利尿、降糖、降脂及降压作用^[2-3]。柳蒿芽中还含有丰富的黄酮成分,具有抗氧化、抗自由基、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、抗糖尿病及其并发症等生物活性,并能增强机体免疫力^[4-6]。

通化地处长白山脚下,柳蒿芽资源丰富,该研究旨在探索超声波-微波协同酶法提取柳蒿芽黄酮工艺,提高柳蒿芽黄酮的提取效率和扩大其应用范围,为进一步开发利用这一资源提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试柳蒿芽于2014年5月采摘于通化。

供试药品为芦丁标准品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心);纤维素酶(50 000 U/g);无水乙醇、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠,均为分析纯。

供试仪器为SL-SM50型超声微波联合萃取仪(南京顺流仪器有限公司);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);722S可见分光光度计(上海棱光技术有限公司制造);FA1604A型电子分析天平(上海精天电子仪器有限公司);TDL80-2B离心机

(上海安亭科学仪器厂);YS-08型小型高速粉碎机(北京燕山正德机械设备有限公司);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 柳蒿芽黄酮吸收光谱 配制一定浓度的柳蒿芽黄酮提取液,在300~800 nm波长范围内进行光谱扫描,测定黄酮的吸收光谱。

1.2.2 标准曲线的绘制 精密称取干燥的芦丁标准样品37.5 mg置于100 mL烧杯中,用60%乙醇溶解后定容至25 mL容量瓶中,摇匀。精密吸取芦丁标准溶液0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,分别置于10 mL容量瓶中,定容至刻度,得到0.00、0.15、0.30、0.45、0.60、0.75、0.90 mg/mL的标准品溶液,分别取1 mL标准品溶液至10 mL试管中,各加5%亚硝酸钠溶液0.3 mL摇匀,静置6 min;然后加入10%硝酸铝溶液0.3 mL摇匀,静置6 min;最后加入1 mol/L氢氧化钠溶液4 mL,静置10 min,再用60%乙醇溶液稀释至刻度,摇匀静置15 min后,分别在510 nm处测定其吸光度,绘制标准曲线。

1.2.3 柳蒿芽黄酮提取与提取率的计算 1)超声波-微波协同酶法提取柳蒿芽黄酮工艺^[7-9]:新鲜柳蒿芽经挑选、清洗、烘干、粉碎后过筛(20目),备用。精确称取一定量柳蒿芽粉末若干份,加入一定量的提取剂经酶解并进行超声波-微波辅助浸提,提取液定容过滤并在4 000 r/min离心10 min,取其滤液按照1.2.2的方法测定吸光度。2)黄酮提取率的计算^[10]:柳蒿芽总黄酮提取率(%) = $\frac{c \times v}{m \times 1000} \times 100$;式中: c 为提取液总黄酮的质量体积分数,mg/mL; v 为滤液总体积,mL; n 为稀释倍数; m 为柳蒿芽粉末质量,g。

1.2.4 单因素试验 在其它条件不变的情况下,考察酶添加量(0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%)、液料比(10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 mL/g)、乙醇体积

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:shijlu@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);吉林省大学生创新创业训练资助项目(thsys1066)。

收稿日期:2015-10-28

分数(20%、30%、40%、50%、60%)、超声波功率(270、360、450、540、630 W)、微波功率(100、150、200、250、300、350 W)、超声波-微波处理时间(1、3、5、7、9 min)对柳蒿芽黄酮提取率的影响。

1.2.5 响应面优化试验 根据 CCD 中心组合实验设计原理,设计并进行响应面优化试验,因素与水平见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平

Table 1 Factors and levels in the response surface design

水平 Level	因素 Factor			
	X ₁ :液料比 Liquid-material ratio /(mL·g ⁻¹)	X ₂ :乙醇体积分数 Ethanol concentration /%	X ₃ :超声波功率 Ultrasound power /W	X ₄ :酶添加量 Enzyme dosage/%
-2	20:1	35	450	0.5
-1	25:1	40	495	1.0
0	30:1	45	540	1.5
1	35:1	50	585	2.0
2	40:1	55	630	2.5

2 结果与分析

2.1 柳蒿芽黄酮提取液的吸收光谱

由图 1 可知,柳蒿芽黄酮在 $\lambda=510$ nm 处有明显吸收峰。因此,选取 $\lambda_{\max}=510$ nm 作为测定柳蒿芽黄酮吸收光度的特定波长。

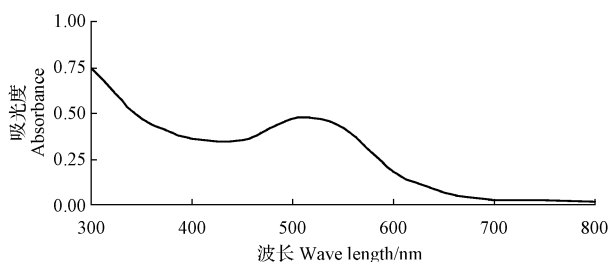


图 1 柳蒿芽黄酮提取液的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum of flavonoids

2.2 芦丁标准曲线

由图 2 可知,得到标准曲线回归方程为 $A = 0.0115c - 0.0085$, c 为芦丁质量体积分数(单位 $\mu\text{g/mL}$), $R^2=0.9994$,表明芦丁质量体积分数在 15~90 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

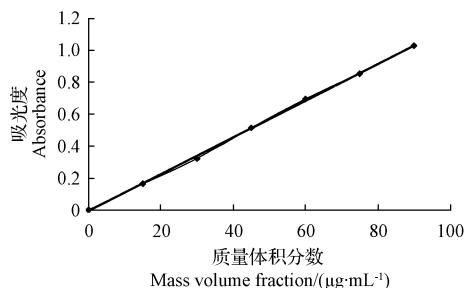


图 2 芦丁标准曲线

Fig. 2 Standard curve of rutin

2.3 单因素试验

单因素试验结果表明,酶添加量、液料比、乙醇体积分数、超声波功率、微波功率、超声波-微波处理时间等因素均对柳蒿芽黄酮提取率有一定的影响,根据试验结果

并利用 Plackett-Burman design 设计筛选出对超声波-微波协同酶法对柳蒿芽黄酮提取率影响显著的 4 个因素,液料比、乙醇体积分数、超声功率、酶添加量作为响应面因素,固定超声波-微波处理时间 3 min,一段微波功率 200 W,二段微波功率 100 W。

2.4 响应面优化超声波-微波协同酶法提取柳蒿芽黄酮工艺

2.4.1 模型的建立与检验 利用 Design Expert 8.0.6 软件进行二次多元回归拟合,并通过 GLM Procedure 对模型处理,剔除不显著项,得到修正后的回归模型为 $Y = 5.21 - 0.40X_1 + 0.12X_2 - 0.15X_4 + 0.25X_1X_2 + 0.11X_1X_3 - 0.21X_1^2 - 0.11X_2^2 - 0.19X_3^2 - 0.09X_4^2$ 。由表 2 可知,响应面回归模型达到了极显著水平,决定系数 R^2 为 0.9387,模型的失拟项检验不显著,表明模型的预测值与实际值拟合度高,该二次方程能够很好地拟合真实的响应面。模型一次项 X_1 、 X_2 、 X_4 ;二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 及交互项 X_1X_2 的影响均达到极显著水平($P < 0.01$),二次项 X_4^2 及交互项 X_1X_3 达到显著水平($P < 0.05$),表明各因素对于柳蒿芽总黄酮提取率的影响不是简单的线性关系。

表 2 回归模型方差分析

Table 2 Analysis of variance for each term of the fitted regression model

方差来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
模型 Model	8.256	14	0.590	16.395	<0.000 1	**
X ₁	3.920	1	3.920	108.977	<0.000 1	**
X ₂	0.335	1	0.335	9.303	0.008 1	**
X ₃	0.056	1	0.056	1.564	0.230 2	
X ₄	0.560	1	0.560	15.572	0.001 3	**
X ₁ X ₂	1.005	1	1.005	27.939	<0.000 1	**
X ₁ X ₃	0.185	1	0.185	5.145	0.038 5	*
X ₁ X ₄	0.027	1	0.027	0.757	0.398 1	
X ₂ X ₃	0.017	1	0.017	0.467	0.504 8	
X ₂ X ₄	0.000	1	0.000	0.006	0.940 5	
X ₃ X ₄	0.044	1	0.044	1.227	0.285 5	
X ₁ ²	1.218	1	1.218	33.871	<0.000 1	**
X ₂ ²	0.357	1	0.357	9.913	0.006 6	**
X ₃ ²	1.023	1	1.023	28.432	<0.000 1	**
X ₄ ²	0.221	1	0.221	6.153	0.025 5	*
残差 Residual	0.540	15	0.036			
失拟项 Lack of fit	0.486	10	0.049	4.521	0.054 8	
净误差 Pure error	0.054	5	0.011			
总离差 Cor total	8.795	29				

注: ** 表示 $P \leq 0.01$, 差异极显著; * 表示 $P \leq 0.05$, 差异显著。

Note: ** express $P \leq 0.01$, highly significant difference; * express $P \leq 0.05$, significant difference; $P > 0.05$ express not significant difference.

2.4.2 交互作用分析 响应面试验结果表明,液料比和乙醇体积分数、液料比和超声波功率之间的交互作用对柳蒿芽的提取效率有显著的影响。由图 3A 可知,随着液料比和乙醇体积分数的增大,总黄酮的提取率先升高后降低。其中,液料比增大时,响应曲面下降坡度明显,表明液料比对柳蒿芽总黄酮提取率的影响较大;当乙醇体积分数增大时,响应曲面上升和下降坡度均表现为较平缓,对柳蒿芽总黄酮提取率影响较小,二者交互作用对柳蒿芽黄酮提取率的影响达到极显著水平,同时表明液料比在二者交互作用的影响中起主要作用。由图 3B

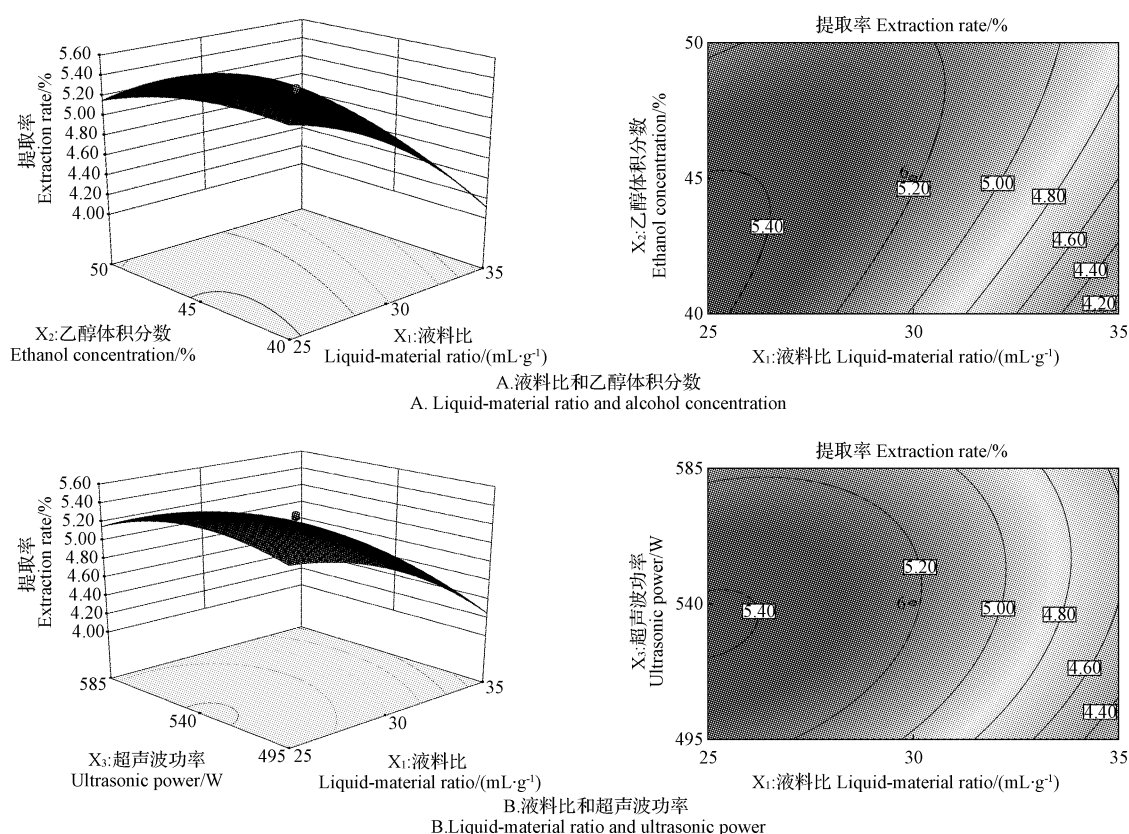


图3 显著交互作用对柳蒿芽黄酮提取率的影响

Fig. 3 Significant interaction effect of flavonoids extraction rate

可知,随着液料比和超声波功率的同时增加,柳蒿芽提取率缓慢增大,在液料比和超声波功率达到最适值后缓慢下降,二者交互作用对柳蒿芽提取率的影响达到显著水平。经试验优化得到超声波-微波协同酶法提取柳蒿芽黄酮的最佳工艺为,液料比 26 : 1 mL/g、乙醇体积分数 42%、超声波功率 538 W、酶添加量 1.4%,在此条件下提取柳蒿芽总黄酮的提取率预测值为 5.36%。在已优化的最佳条件下进行 3 次重复验证试验,得出柳蒿芽总黄酮的提取率的平均值为 5.42%,与模型预测值的偏差小,表明响应面优化试验方案可行,试验结果可靠。

2.5 超声波-微波协同酶法与常规水浴法提取柳蒿芽黄酮的比较

为进一步验证超声波-微波协同酶法提取柳蒿芽黄酮的高效性,在最佳常规水浴浸提法条件下,提取 20 min,平行 3 次试验,得到柳蒿芽总黄酮提取率的平均值为 3.64%,说明超声波-微波协同酶法提取柳蒿芽黄酮具有更高的提取效率。

3 结论与讨论

该研究通过单因素试验和响应面试验分析优化了超声波-微波协同酶法提取柳蒿芽黄酮工艺,建立了多元回归模型。确定超声波-微波协同酶法提取柳蒿芽黄酮的最佳条件为,液料比 26 : 1 mL/g、乙醇体积分数 42%、超声波功率 538 W、酶添加量 1.4%,在此条件下提取柳

蒿芽总黄酮的提取率为 5.42%。相比常规水浴浸提法,超声波-微波协同酶法提取柳蒿芽黄酮的提取效率更高。利用超声波-微波协同酶法提取柳蒿芽黄酮可大大缩短提取时间,该法具有操作简单、成本低、提取效率较高、环境污染小和安全无毒等优点,可为后续柳蒿芽黄酮的研究提供理论参考。

参考文献

- [1] 李佳梅. 柳蒿芽多糖的提取分离纯化及结构研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
- [2] 朱炎, 孙海涛, 崔书蕾, 等. 长白山柳蒿芽即食调味酱的研制[J]. 人参研究, 2015(2): 40-41.
- [3] ZHOU K, ZHAO F, LIU Z, et al. Triterpenoids and flavonoids from celery (*Apium graveolens*) [J]. Journal of Natural Products, 2009, 72(9): 1563-1567.
- [4] 董强. 柳蒿芽醇提物抗氧化作用研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.
- [5] 刘荣, 董强, 王向宏, 等. 柳蒿芽黄酮抗氧化作用的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(12): 319-320.
- [6] 张剑, 李素君, 籍保平, 等. 柳蒿芽对小鼠免疫功能的影响[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 405-408.
- [7] 常桂英, 孙立梅, 赵雪. 长白山刺果甘草中黄酮类化合物提取工艺优化与活性研究[J]. 北方园艺, 2015(3): 116-118.
- [8] 陈雅维, 张延萍, 周冬菊, 等. 响应面法优化葛根总黄酮的超声辅助提取工艺[J]. 食品科学, 2012(14): 41-44.
- [9] 黄中梅, 何自强, 赵婉, 等. 莲子心总黄酮的超声波萃取工艺研究[J]. 北方园艺, 2015(4): 133-136.
- [10] 张爽, 刘淑英, 于莉莉, 等. 响应面法优化东北接骨木总黄酮的超声波提取工艺[J]. 北方园艺, 2012(14): 11-14.

DOI:10.11937/bfyy.201605041

慕萨莱思酒及其酿造葡萄“和田红”中多酚类物质分布规律研究

王伟华, 胡萧梅

(塔里木大学 生命科学学院, 新疆生产建设兵团南疆特色农产品深加工重点实验室,
环塔里木生态农业协同创新中心, 新疆 阿拉尔 843300)

摘 要:以新疆民族传统饮品慕萨莱思酒及其特殊的酿造葡萄“和田红”为材料,采用乙醇提取、浓缩、纯化再浓缩的方法,研究多酚类物质的分布规律。结果表明:慕萨莱思酒中多酚分布规律为酒泥>酒上清液,酒泥中多酚含量为 6.28%;原花青素分布规律为酒泥>酒上清液,酒泥中原花青素含量为 4.59%;黄酮分布规律为酒泥>酒上清液,酒泥中黄酮含量为 0.47%;花色苷分布规律为酒泥>酒上清液,酒泥中花色苷含量为 0.000 2%。慕萨莱思的酿造葡萄“和田红”中多酚分布规律为籽>果皮>果肉,“和田红”葡萄籽中多酚含量为 0.166%;原花青素分布规律为籽>果皮>果肉,“和田红”葡萄籽中原花青素含量为 0.064%;黄酮分布规律为籽>果皮>果肉,“和田红”葡萄籽中黄酮含量为 0.038%;花色苷分布规律为籽>果皮>果肉,“和田红”葡萄籽中花色苷含量为 0.012 8%。该研究为阐述“和田红”葡萄和慕萨莱思酒的营养价值提供科学依据。

关键词:慕萨莱思酒;“和田红”葡萄;多酚类物质;分布规律

中图分类号:TS 262.61 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)05-0156-04

葡萄及葡萄制品中含有丰富的多酚类物质,包括多酚、花色苷类、黄酮类、原花青素类等,相关研究表明,多

酚类物质具有一定的抑菌、保护血管内皮细胞、抗氧化活性,保护心血管及抗癌作用^[1-5]。

慕萨莱思酒是新疆阿瓦提县流传千年的民族特色饮品,是以当地特殊葡萄品种“和田红”葡萄为原料,由传统的工艺秘制而成,经破碎压榨、熬煮后,利用独特环境空气中产生的酵母菌群发酵酿制^[6-8],含有大量对人体有益的维生素、氨基酸以及多酚类化合物等,不仅营养丰富,而且具有一定的养生功效,是保健品中的极品^[9-11]。关于慕萨莱思酒的报道,多集中于工艺改进和

第一作者简介:王伟华(1977-),女,吉林双阳人,博士,副教授,现主要从事食品质量安全等研究工作。E-mail:wangweihua6688@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31360409;31471667);新疆生产建设兵团“兵团英才”选拔培养工程资助项目(第一周期第三层次培养人选)。

收稿日期:2015-09-24

Optimization of Flavonoids Extraction Technology From *Artemisia integrifolia* L. by Ultrasound-microwave Enzyme Synergistic Method

SUN Haitao^{1,2}, SUN Ying¹, ZHU Yan¹, SHAO Xinru¹, JIANG Ruiping¹

(1. Development Engineering Center of Edible Plant Resources of Changbai Mountain, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134000;
2. College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun, Jilin 130022)

Abstract: Taking *Artemisia integrifolia* L. as materials, on the basis of single factor experiment, the effect of ultrasonic and microwave factors on flavonoids from *Artemisia integrifolia* L. were studied by the response surface methodology with four factors and five levels to determined the optimum technology. The results showed that liquid-material ratio 26 : 1 mL/g, alcohol concentration 42%, ultrasonic power 538 W, and enzyme dosage 1.4%. In these conditions, the extraction rate of *Artemisia integrifolia* L. flavonoids was 5.42%. The extraction rate of *Artemisia integrifolia* L. flavonoids by ultrasound-microwave enzyme synergistic method was better than conventional water bath method.

Keywords: ultrasound; microwave; *Artemisia integrifolia* L.; flavonoids