

超声辅助酶解法提取紫花苜蓿总皂苷工艺研究

李小安, 尹卫, 杨国柱, 田海宁, 张敏, 张承胜

(青海大学 生态环境工程学院, 青海 西宁 810016)

摘要:以“青大1号”紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)新品系青干草为试材,采用超声辅助酶解法提取总皂苷,对所得总皂苷提取液用石油醚、正丁醇进行2项萃取,紫外分光光度法测定总皂苷的含量。以单因素试验设计分别考察固液比(A)、超声时间(B)、超声温度(C)、超声功率(D)4个因素对总皂苷的粗总皂苷提取率的影响。以单因素试验结果为依据,采用4因素(固液比、超声时间、超声温度、超声功率)3水平正交实验设计进行提取工艺优化,以开发新的紫花苜蓿总皂苷资源。结果表明:超声法提取总皂苷最优工艺条件为 $A_3B_1C_1D_2$,即固液比为1:30 g/mL、超声时间20 min,超声温度20℃、超声功率360 W。

关键词:紫花苜蓿;总皂苷;超声辅助酶解法;正交实验

中图分类号:S 551⁺.7;Q 946.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)07-0116-03

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)简称苜蓿,是世界范围内栽培历史最悠久,面积最大,研究最深入的优良豆科牧草,产量高,品质好,营养丰富,含有未知促生长因子,适口性好,具有抗旱耐盐碱、固氮增肥、保持水土等作用,被誉为“牧草之王”^[1]。营养成分丰富,是迄今发现对人体健康营养最全面的植物之一^[2]。其对人类和动植物营养作用最为突出的成分主要包括:种类较齐全,组成比例相对均衡的氨基酸和蛋白质;膳食纤维;含量丰富的钙、磷、硒等微量元素^[3];叶酸、维生素K、维生素E、维生素C、B族维生素和胡萝卜素^[4];具有明显药理作用的苜蓿多糖、苜蓿总皂苷又称苜蓿总皂苷(Toatl of alfalfa saponins, TAS);苜蓿酸及不饱和脂肪酸^[5-6];以及部分未知生长因子等^[7-8]。该试验以“青大1号”紫花苜蓿新品系青干草粉为试验材料,采用超声辅助酶解法提取TAS^[9],利用紫外分光光度法^[10]测定提取物TAS含量,探索TAS提取最优工艺,以期为进一步TAS的工业化生产提供依据。

第一作者简介:李小安(1978-),女,硕士,副教授,现主要从事高海拔地区牧草育种与生态环境保护等研究工作。E-mail:598581214@qq.com.

责任作者:杨国柱(1960-),男,教授,现主要从事高海拔地区牧草遗传育种与三江源植物资源开发利用等研究工作。E-mail:Yang-gz110@126.com.

基金项目:青海省科学技术厅资助项目(2011-N-512);华美源科研基金资助项目(SHJ-12-1)。

收稿日期:2014-11-10

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试“青大1号”紫花苜蓿于2012年10月收割于青海省三角城种羊场试验田。

试剂:乙醇、正丁醇、石油醚、5%香草醛、果胶酶(30 U/mg)、冰乙酸、高氯酸等试验试剂均为分析纯。

仪器:锥形瓶、试管、移液管、分液漏斗、HH-6数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)、PL203电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)、移液枪(艾本德中国有限公司)、移液管、JFSD-100粉碎机(上海市嘉定粮油检测仪器厂)、KQ-600DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、UV-2802H型紫外分光光度计(龙尼柯(上海)仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 试验材料预处理 收割盛花期的紫花苜蓿,阴凉处风干,粉碎后过60目筛,备用。

1.2.2 TAS的提取 称取3 g苜蓿草粉于锥形瓶中,按一定的固液比预浸30 min,加入适量的果胶酶(以每克苜蓿草粉加15 U果胶酶为准),在50℃恒温水浴锅中酶解2.5 h后,进行超声波处理,将经过处理的混合液进行过滤,将滤渣加入20 mL的50%乙醇在相同条件下进行超声处理,将2次所得滤液进行合并,对滤液进行水浴蒸馏,浓缩成干浸膏,再将其溶于20 mL蒸馏水中,滤去不溶物后加入等体积的石油醚进行两相萃取。萃取时摇匀,静置分层,待2层液面分层彻底后,再进行分液。萃取除去脂溶性杂质后的水相,再用正丁醇进一步萃取,得TAS正丁醇的提取液。提取液再次进行水浴蒸

馏,浓缩成干浸膏,得 TAS 成品。转移至 10 mL 容量瓶中使用蒸馏水进行定容,测定 TAS 含量^[11]。提取 TAS 工艺流程如图 1 所示。

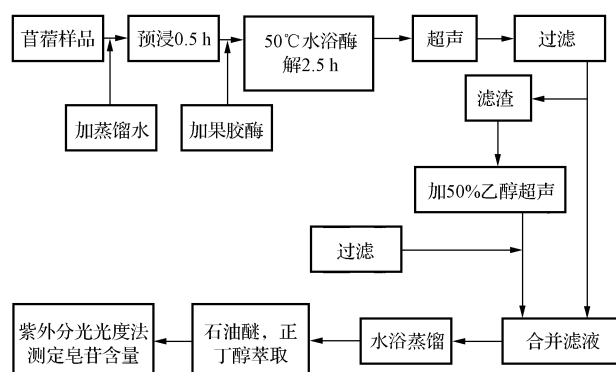


图 1 提取 TAS 工艺流程

Fig. 1 The extraction chart of TAS

1.2.3 TAS 含量测定 用移液枪吸取 50 μL 提取液,将其置于试管中,70℃水浴挥发干后,加入 200 μL 5%香草醛和 800 μL 的高氯酸混匀。70℃水浴 15 min,进行显色反应,然后用水冷却,加入 5 mL 的冰醋酸,充分震荡,静止 10 min。将其转移到比色皿中,以空白样进行对照,用 UV-2802H 型紫外分光光度计于 546 nm 波长下测吸光值^[12]。其中 TAS 的提取参照 GB/T 22996-2008 中的标准方法,同时使用上述方法进行 TAS 含量测定,得到“青大 1 号”紫花苜蓿总皂苷含量为 0.724%。以齐墩果酸标准品为标准品获得标准方程 $A=0.1501C-0.0072$, $R^2=0.998$ 计算出 TAS 的含量。TAS 提取率 = $n \times 5 (\text{mL}) \times V / 50 (\mu\text{L}) / 3 (\text{g}) \times 0.724\%$ 。式中: n 为所测 TAS 的浓度(g/mL); V 为提取的 TAS 成品的总体积(mL)。

1.2.4 单因素试验 利用超声法提取 TAS,研究浸提固液比、超声时间、超声温度及超声功率 4 个单因素对 TAS 提取率的影响。在单因素试验分析基础上,通过正交实验设计确定最优提取条件。1) 浸提固液比(A)选择:浸提固液比分别为 1:5、1:10、1:20、1:30、1:40 g/mL 预浸 30 min。加入一定量的果胶酶调 pH 至 4.0, 50℃酶解 2.5 h,取出后在温度 40℃,时间 30 min,功率 360 W 的条件下进行超声处理,测吸光值,

根据标准方程及计算公式获得 TAS 提取率。2) 超声时间(B)选择:按固液比 1:20 g/mL 预浸 30 min,加入一定量的果胶酶调 pH 至 4.0, 50℃酶解 2.5 h,取出后分别在时间 10、20、30、40、50 min,温度 40℃,功率 360 W 的条件下进行超声处理,测吸光值,根据标准方程及计算公式获得 TAS 提取率。3) 超声温度(C)选择:按固液比 1:20 g/mL 预浸 30 min。加入一定量的果胶酶调 pH 至 4.0, 50℃酶解 2.5 h,取出后分别在温度 20、30、40、50、60℃,时间 30 min,功率 360 W 的条件下进行超声处理,测吸光值,根据标准方程及计算公式获得 TAS 提取率。4) 超声功率(D)选择:按固液比 1:20 g/mL 预浸 30 min。加入一定量的果胶酶调 pH 至 4.0, 50℃酶解 2.5 h,取出后分别在功率 240、300、360、420、480 W,时间 30 min,温度 40℃的条件下进行超声处理,测吸光值,根据标准方程及计算公式获得 TAS 提取率。

1.2.5 正交优化实验 根据单因素试验确定的条件范围,通过 $L_9(3^4)$ 正交优化实验,得出优选因素组合^[13]。试验设计见表 1。

表 1 因素水平

水平	A 固液比	B 时间	C 温度	D 功率
Level	Solid-liquid ratio/(g · mL ⁻¹)	Time/min	Temperature/℃	Power/W
1	1:10	20	30	300
2	1:20	30	40	360
3	1:30	40	50	420

2 结果与分析

2.1 单因素对 TAS 提取率的影响

从表 2 可以看出,通过固液比的试验确定了最优的提取固液比为 1:20 g/mL,研究发现随着固液比的增大,TAS 提取率逐渐上升但到一定程度后 TAS 提取率会有所下降。当超声时间为 30 min 时 TAS 提取率最高为 12.8%,当超声时间逐渐增大时 TAS 提取率有下降的趋势。而超声时间小于 30 min 时,其 TAS 提取率随超声时间的增加而逐渐增大。通过不同超声温度的试验确定当超声温度为 40℃时,TAS 提取率最大为 9.1%。当超声功率为 420 W 时总皂苷提取率最大为 11.6%。不同浸提固液比、超声时间、超声温度及超声功率的处理水平对 TAS 提取率显著差异($P<0.05$)。

表 2 不同条件下多糖提取率的比较

Table 2 Comparison of polysaccharide extraction yield under different conditions

A 固液比	TAS 平均提取率	B 时间	TAS 平均提取率	C 温度	TAS 平均提取率	D 功率	TAS 平均提取率
Solid-liquid ratio/(g · mL ⁻¹)	TAS extraction rate/%	Time/min	TAS extraction rate/%	Temperature/℃	TAS extraction rate/%	Power/W	TAS extraction rate/%
1:5	2.1 A d	10	8.7 A e	20	3.6 A d	240	8.8 A d
1:10	7.6 B c	20	11.9 B c	30	7.0 B c	300	9.7 B c
1:20	13.0 C a	30	12.8 C a	40	9.1 D b	360	10.7 C b
1:30	9.4 D b	40	12.3 D b	50	8.1 D b	420	11.6 D a
1:40	8.4 E c	50	9.1 E d	60	7.8 E b	480	9.5 E c

注:TAS 平均提取率后的字母表示数据的差异显著性,当后面 2 个字母不同时表示数据之间存在显著差异。

2.2 多因素的正交设计对多糖提取率的影响

在单因素试验的基础上,确定以浸提固液比、超声时间、超声温度及超声功率 4 种因素进行正交实验。

由表 3 可知,按照极差 R 的大小影响 TAS 提取率的因素主次顺序为:固液比>超声时间>超声温度>超声功率,最佳组合条件为 $A_3B_1C_2D_2$,从各因素对 TAS 提取率的影响主次顺序上来看,A 因素即固液比影响最大,D 因素超声功率影响最小。综合考虑以上因素,同时考虑生产成本,以 $A_3B_1C_1D_2$ 即固液比为 1 : 30 g/mL,超声时间 20 min,超声温度 30℃,超声功率 360 W 时是 TAS 提取的最佳条件。

表 3 正交实验组合及其结果

Table 3 The compound of orthogonal test and results

试验号 No.	A 固液比 Solid-liquid ratio /(g · mL ⁻¹)	B 时间 Time /min	C 温度 Temperature /℃	D 功率 Power /W	TAS 平均提取率 TAS extraction rate /%
1	1 : 10	20	30	300	3.308
2	1 : 10	30	40	360	2.964
3	1 : 10	40	50	420	2.849
4	1 : 20	20	40	420	5.737
5	1 : 20	30	30	300	3.171
6	1 : 20	40	50	360	5.281
7	1 : 30	20	50	360	5.694
8	1 : 30	30	30	420	3.859
9	1 : 30	40	40	300	6.015
K_1	9.121	14.739	12.448	12.494	
K_2	14.189	9.994	14.716	13.939	
K_3	15.568	14.145	11.714	12.445	
R	6.447	4.754	3.002	1.494	

3 结论

为了进一步完善试验中提取工艺参数,在单因素试验的基础上开展正交实验。从而全面的考虑 4 种因素

对 TAS 提取率的影响及其变化。确定了影响 TAS 提取率的因素从大到小依次为:固液比>超声时间>超声温度>超声功率。而最优提取条件为:固液比 1 : 30 g/mL、超声温度 30℃、超声时间 20 min、超声功率 360 W。

参考文献

- [1] 赵桂琴,慕平,张勃. 紫花苜蓿基因工程研究进展[J]. 草业学报, 2006,15(6):9-18.
- [2] Srinivasan K S,Sharnthaka M C. Amino acid composition of some leaf protein concentrates progress in leaf research[M]. Narendra Singh,1984;307-309.
- [3] Nowacka J,Oleszek W. Determination of alfalfa (*Medicago sativa* L.) saponins by high-performance liquid chromatography[J]. Agr,1994,42:727-730.
- [4] 王成章,王恬. 饲料学[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [5] 李珍珠. 人类的第七大营养素—膳食纤维[J]. 生物学教学,2004,29(10):33-34.
- [6] 张清林,杨文宾. 叶蛋白饲料生产技术[J]. 吉林畜牧兽医,2003(2):21-22.
- [7] 何云,霍文颖,张海棠,等. 紫花苜蓿的营养价值及其影响因素[J]. 安徽农业科学,2007,35(11):3243-3244.
- [8] Malinow MR,Connor W E,Mclaughlin P,et al. Effects of alfalfa saponins[J]. Journal of Clinical Investigation,1981,67(1):156-162.
- [9] 胡明,卢德勋,牛文艺,等. 苜蓿皂苷对绵羊瘤胃内纤维物质降解动力学的影响[J]. 河南农业科学,2007(1):98.
- [10] 丛学滋,李子行,秦孟根,等. 苜蓿皂苷的降胆固醇及减轻实验性动脉粥样硬化形成的作用[J]. 中国药理学通报,1998,4(5):69-76.
- [11] 李波,魏广培. 超声波提取苜蓿皂苷优化工艺的研究[J]. 食品科技,2012,37(4):167-168.
- [12] 贾秀峰,李波,王佳莹. 苜蓿皂苷提取方法的研究及皂苷含量的测定[J]. 食品研究与开发,2007,28(9):11-13,28.

Extraction Technology of Total Saponins from Alfalfa by Enzymatic Hydrolysis Method Assisted by Ultrasonic Technology

LI Xiao-an, YIN Wei, YANG Guo-zhu, TIAN Hai-ning, ZHANG Min, ZHANG Cheng-sheng

(College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016)

Abstract: Taking new strain of alfalfa 'Qingda No. 1' hay as raw material, the total saponins were extracted by enzymatic hydrolysis method assisted by ultrasonic technology, then total saponins extracted liquid with petroleum ether and n-butanol to two extraction, while determine the content of total saponins in UV spectrophotometry. The ratio of solid to liquid(A), ultrasonic time(B) and ultrasonic temperature(C), ultrasonic power(D) as a single factor gradient test, based on single factor test results, using four factors (solid-liquid ratio, ultrasonic time, ultrasonic temperature, ultrasonic power) three levels orthogonal experiment design to optimize the extraction process, to develop new resources of alfalfa saponins. The results showed that the best ultrasonic method to extract the total saponins conditions was $A_3B_1C_1D_2$, the ratio of solid-liquid was 1 : 30 g/mL, ultrasonic time was 20 minutes, ultrasonic temperature was 20℃, ultrasonic power was 360 W.

Keywords: *Medicago sativa* L.; total saponins; enzymatic hydrolysis method assisted by ultrasonic technology; orthogonal method