

超声—果胶酶协同提取山楂类黄酮的工艺优化

Optimization of ultrasonic assisted pectinase extraction of flavonoid in hawthorn juice

刘 慧 张春岭 刘杰超 胡丽娜 焦中高

LIU Hui ZHANG Chun-ling LIU Jie-chao HU Li-na JIAO Zhong-gao

(中国农业科学院郑州果树研究所, 河南 郑州 450009)

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Zhengzhou, Henan 450009, China)

摘要:为了优化果胶酶作用下水提取山楂类黄酮的超声提取工艺,通过单因素试验和正交试验得到超声辅助果胶酶提取山楂类黄酮的最佳工艺为:预煮时间 30 min,超声时间 50 min,超声温度 50 °C,超声功率 150 W。该条件下,提取的山楂汁中类黄酮含量为 335.32 mg/100 mL。与传统水浴振荡提取比较,超声波辅助显著缩短了类黄酮的提取时间。

关键词:山楂;类黄酮;酶法;超声辅助法

Abstract: In order to study the optimum ultrasonic-assisted extraction technology of flavonoids in hawthorn juice under pectinase treatment, the single-factor tests and orthogonal array design were employed to optimize the extraction conditions. The effects of boiling treatment time, ultrasonic extraction time, ultrasonic extraction temperature and ultrasonic power on the content of flavonoids in hawthorn juice were researched. And the hawthorn flavonoid extraction conditions were optimized as follows: boiling treatment time 30 min, ultrasonic extract time 50 min, ultrasonic extract temperature 50 °C and ultrasonic power 150 W. Under the optimized extraction conditions, the content of flavonoids was 335.32 mg/100 mL. Ultrasonic extraction process remarkably decreased the extraction time than shaking extraction.

Keywords: hawthorn; flavonoids; enzymatic extraction; ultrasonic assisted extraction

山楂(*Crataegus pinnatifida* Bge.)又名山里红、红果,属蔷薇科山楂属落叶乔木,是中国传统的药食两用中药材之一。它含有丰富的生物活性物质,如有机酸、多酚、类黄酮、三萜酸、原花青素等,具有较强的抗氧化活性,有扩展血管、

调节血脂、改善微循环、抗动脉粥样硬化、降低胆固醇等作用,其中黄酮类物质是主要的功效成分之一^[1-4]。

山楂黄酮的传统提取方法主要有索氏抽提、回流提取和溶剂浸提等,提取消耗溶剂多,时间长。新的提取技术包括超临界萃取、微波辅助提取、超高压提取和超声波辅助提取等^[5]。与其他方法相比,超声提取具有时间短、能耗低、效率高、能显著提高有效成分浸出等优点^[6]。因其产生的热作用、机械作用和空穴作用,在加工果汁的过程中有利于果浆的细化,使果汁黏性降低,提高出汁率和汁液质量^[7],已成功应用于多种果汁的制备提取^[8-10]。果胶酶已被证实在果汁提取过程中起到重要作用,可以破坏细胞壁,提高黄酮类物质的溶出。超声波辅助酶法在山楂类黄酮提取方面有所涉及^[11],但选用的提取溶剂为乙醇溶液,对山楂汁等以水制备的产品实际指导意义有限。本研究在课题前期试验(确定果胶酶添加量 0.5%、料水比 1:5(m:V))的基础上,以山楂干为原料,拟利用超声波辅助果胶酶提取山楂类黄酮物质,通过单因素及正交试验确定最佳超声提取工艺,旨在为后续山楂类黄酮的提取及应用提供理论支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

山楂干:鲜山楂采自河南登封,无霉烂变质,无病虫害。运回实验室后,切成 5~7 mm 厚度山楂片,去核,50 °C 恒温鼓风干燥箱中烘干至水分含量低于 18%;

PP-1 果胶酶:1 万 U/g,天津利华酶制剂有限公司;

芦丁:纯度≥98%,中国食品药品检定研究所;

亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠:分析纯,天津市瑞金特化学品有限公司;

乙醇:分析纯,天津市富宇精细化工有限公司。

1.2 仪器与amp;设备

电热鼓风干燥箱:GS101-2EB 型,重庆四达试验设备有限公司;

基金项目:中国农业科学院科技创新工程专项经费项目(编号:CAAS-ASTIP-2015-ZFRD);郑州市现代农业科技创新工程项目(编号:131PZDGC113)

作者简介:刘慧(1984—),女,中国农业科学院郑州果树研究所助理研究员,硕士。E-mail: liuhui526@163.com

通讯作者:焦中高

收稿日期:2015-09-16

数控超声波清洗器:KQ3200DE(40KHz)型,昆山市超声仪器有限公司;

紫外分光光度计:Specord 50型,德国 Analytic Jena 公司;

电子分析天平:BS214D型,德国赛多利斯公司;

台式离心机:L-550型,湖南湘仪离心机仪器有限公司;

水浴恒温振荡器:SHA-C型,金坛市荣华仪器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 超声辅助酶法提取山楂黄酮的工艺流程及参数 取20 g山楂干加100 mL水,于35℃恒温浸泡8 h,使山楂干充分吸水,之后100℃预煮一定时间(在预煮前称重),预煮结束之后称重补齐蒸发的水分。冷却至室温后匀浆,加入质量比0.5%果胶酶,超声提取山楂汁。超声结束后90℃水浴保温30 s灭酶,4 000 r/min离心10 min,取上清液。残渣加入100 mL蒸馏水重复超声提取1次,合并2次上清液得类黄酮提取液。

1.3.2 振荡提取山楂汁类黄酮的工艺参数 取20 g山楂干加100 mL水,于35℃恒温浸泡8 h,100℃预煮30 min,补齐蒸发的水分。冷却至室温后匀浆,加入0.5%果胶酶,之后在200 r/min,50℃水浴振荡提取类黄酮。提取结束后90℃水浴保温30 s灭酶,4 000 r/min离心10 min,取上清液。残渣重复提取1次,合并2次上清液得类黄酮提取液。

1.3.3 单因素试验设计

(1) 预煮时间对山楂汁中类黄酮含量的影响:固定超声时间40 min,超声温度50℃,超声功率150 W,分别将山楂干在100℃煮沸10,20,30,40 min,考察预煮时间对山楂汁中类黄酮含量的影响。

(2) 超声温度对山楂汁中类黄酮含量的影响:固定预煮时间30 min,超声时间40 min,超声功率150 W,分别设置提取温度为40,50,60,70,80℃,考察超声温度对山楂汁中类黄酮含量的影响。

(3) 超声时间对山楂汁中类黄酮含量的影响:固定预煮时间30 min,超声温度50℃,超声功率150 W,分别超声提取10,20,30,40,50 min,探讨超声时间对山楂汁中类黄酮含量的影响。

(4) 超声功率对山楂汁中类黄酮含量的影响:固定预煮时间30 min,超声时间40 min,超声温度50℃,考察超声功率为60,90,120,150 W时提取的山楂汁中类黄酮的含量。

1.3.4 正交试验优化设计 根据单因素试验的结果,选取预煮时间、超声温度、超声时间和超声功率为影响因素,以提取的山楂汁中类黄酮含量为响应值,通过 $L_9(3^4)$ 正交试验优化超声提取类黄酮的工艺条件。

1.3.5 山楂汁中类黄酮物质含量测定

(1) 标准曲线的绘制:准确称取干燥至恒重的芦丁标准品5 mg置于25 mL容量瓶中,加无水乙醇充分溶解,定容,得到200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液。分别取标准品母液0.0,0.1,0.2,0.4,0.5,0.8,1.0 mL至具塞试管中,加无水乙醇定容至1 mL。在试管中分别加入5% NaNO_2 0.3 mL,摇匀放置

6 min,再加入10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.3 mL,摇匀放置6 min,最后加入1 mol/L NaOH 溶液3.4 mL,摇匀放置15 min,在510 nm处测量吸光值(A_{510})。得到芦丁吸光度与浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)之间的标准曲线方程为: $C = 334.38A_{510} - 0.7321$,相关系数 $R^2 = 0.9994$ 。

(2) 山楂汁中类黄酮含量测定:采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法^[11]。按照上述标准曲线试验步骤,以样品提取液替代标准液测定 A_{510} 值,代入曲线方程计算山楂汁中类黄酮的含量,结果表示为每100 mL山楂汁中含有的芦丁当量($\text{mg}/100 \text{ mL}$)。

1.3.6 统计方法 单因素及正交试验提取及测定均进行3次平行试验,试验数据以平均值 \pm 标准差($X \pm SD$)表示。由DPS软件中Duncan's新复极差法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 预煮时间对山楂汁中类黄酮含量的影响 由图1可知,随着超声前样品预煮时间的延长,制备的山楂汁中类黄酮含量先增加后减少,预煮30 min时制备得到的山楂汁类黄酮含量最高。超声之前预煮可以使山楂干充分软化,水解部分果胶物质,提高出汁率。但长时间的高温熬煮可能会破坏部分溶出的类黄酮物质的结构,反而使得山楂汁中类黄酮含量降低。因此,选择预煮时间30 min较为适宜。

2.1.2 超声温度对山楂汁中类黄酮含量的影响 由图2可知,随着超声温度的增加,山楂汁中类黄酮含量先显著增加。温度增高有利于果胶酶的反应,使得山楂中的果胶物质水解,破坏细胞壁,增加活性物质的溶出。而当温度超过50℃后,

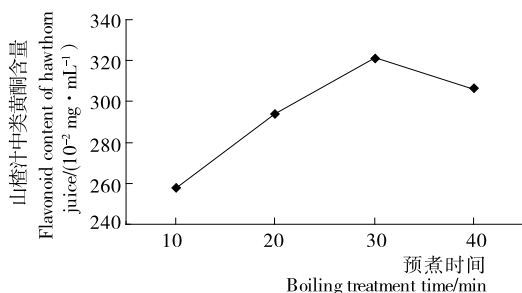


图1 预煮时间对山楂汁中类黄酮含量的影响

Figure 1 Effect of boiling treatment time on flavonoid content in hawthorn juice

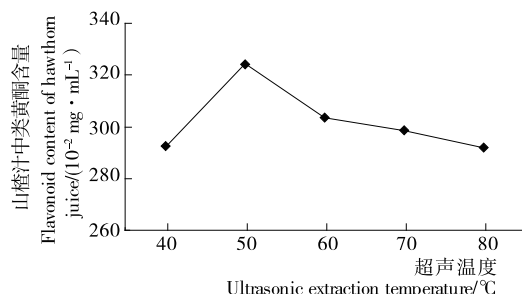


图2 超声温度对山楂汁中类黄酮含量的影响

Figure 2 Effect of ultrasonic extract temperature on flavonoid content in hawthorn juice

山楂汁中类黄酮含量有所下降,一方面高温对酶产生了钝化作用,影响了类黄酮物质的继续溶出,另一方面温度升高可能破坏了活性物质的结构。因此选择 50 °C 为优化工艺中超声温度的最佳水平。

2.1.3 超声时间对山楂汁中类黄酮含量的影响 超声波处理可破坏植物组织细胞结构,使提取物易于从植物材料中快速溶到提取溶剂中^[12-13]。此外超声产生的空化作用能使溶剂充分、迅速渗透到提取物内部^[14]。由图 3 可知,在 10~40 min 内,山楂汁中类黄酮含量随着超声时间的延长而呈现线性增加趋势,但超声时间超过 40 min 后,类黄酮含量有所下降。在一定时间内,超声波有利于山楂干中水分的渗入和山楂细胞壁的破碎,增加了山楂汁中类黄酮物质的溶出。但随着时间的延长,由于超声波具有较强的机械剪切作用,长时间作用会使类黄酮物质分子结构被破坏^[6]。因此选择 40 min 为超声时间的最佳水平。

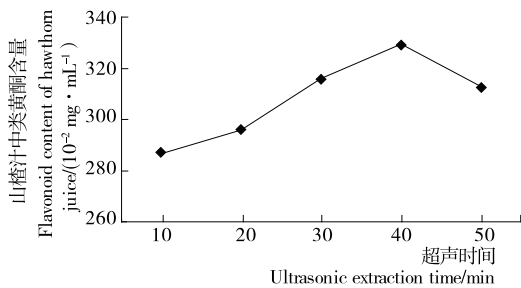


图 3 超声时间对山楂汁中类黄酮含量的影响

Figure 3 Effect of ultrasonic extract time on flavonoid content in hawthorn juice

2.1.4 超声功率对山楂汁中类黄酮含量的影响 由图 4 可知,在 60~120 W 时,超声提取的山楂汁中类黄酮含量随着超声功率的增大而明显增加,之后变化趋势变缓,类黄酮含量在 150 W (仪器最大功率) 时与 120 W 相比较不具有显著性差异。在一定的超声波条件下不会造成类黄酮分子结构的破坏和分子特性的改变,提高超声功率会增加山楂细胞的破碎程度,使山楂汁中类黄酮的溶出率升高。但是极端的增加超声波能量会增加能耗,同时由于超声波的强化和机械作用,可能会破坏生物活性物质的分子链,造成已经溶出的活性物质分子的不正常降解,降低生物活性^[15-16]。因此将最佳超声功率确定为 120 W。

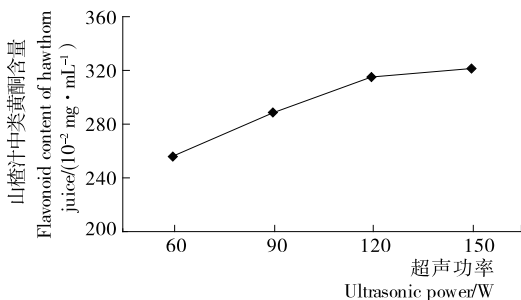


图 4 超声功率对山楂汁中类黄酮含量的影响

Figure 4 Effect of ultrasonic power on flavonoid content in hawthorn juice

2.2 正交优化试验结果

综合以上单因素试验结果,考察预煮时间、超声温度、超声时间、超声功率对山楂汁中类黄酮含量的影响,正交试验因素水平见表 1,试验结果与分析见表 2、3。

表 1 超声提取山楂汁类黄酮正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal array design for ultrasonic extraction of flavonoids in hawthorn juice

水平	A 预煮时间/min	B 提取温度/°C	C 提取时间/min	D 超声功率/W
1	20	40	30	90
2	30	50	40	120
3	40	60	50	150

由表 2 可知,提取工艺参数对山楂汁中类黄酮含量的影响程度大小依次为:超声提取温度(B) > 超声提取时间(C) > 超声功率(D) > 预煮时间(A)。由表 3 可知,超声提取温度对山楂汁中类黄酮含量有显著影响($P < 0.05$),对山楂汁类黄酮的含量起主要作用;其它 3 个因素中,超声提取时间和超声功率的影响次之,但二者对结果的影响不存在显著性差异;预煮时间对类黄酮含量的影响最小,在方差分析中作为误差列。在试验设计范围内,综合极差分析和方差分析结果,最终优化得到超声提取山楂汁类黄酮的最佳工艺条件为 $A_2 B_2 C_3 D_3$,即预煮时间 30 min,超声温度 50 °C,超声时间 50 min,超声功率 150 W。在最佳条件下经过 3 次验证实验提取山楂汁,测得山楂汁中类黄酮含量为 (335.32 ± 9.04) mg/100 mL。在最优试验方案所制备的山楂汁中类黄酮含量均优于其它工艺条件,且数据稳定。

2.3 超声提取与振荡提取的比较

为了比较超声提取与传统水浴振荡提取的差别,设定在

表 2 超声提取山楂汁类黄酮正交试验设计与结果

Table 2 Orthogonal array design and results for ultrasonic extraction of flavonoids in hawthorn juice

试验号	A	B	C	D	类黄酮含量/ (10 ⁻² mg · mL ⁻¹)
1	1	1	1	1	264.83 ± 6.29
2	1	2	2	2	304.03 ± 4.48
3	1	3	3	3	328.98 ± 7.40
4	2	1	2	3	293.64 ± 3.78
5	2	2	3	1	320.37 ± 2.94
6	2	3	1	2	299.72 ± 4.67
7	3	1	3	2	298.41 ± 8.96
8	3	2	1	3	314.80 ± 5.54
9	3	3	2	1	285.45 ± 6.82
k_1	299.28	285.63	293.12	290.22	
k_2	304.58	313.07	294.37	300.72	
k_3	299.55	304.72	315.92	312.47	
R	5.30	27.44	22.80	22.25	

表3 正交试验结果方差分析表[†]

Table 3 Variance analysis of orthogonal experimental results

因素	平方和	自由度	均方	F值	显著性
A(误差 e)	53.36	2	26.68	1.00	—
B	1 187.10	2	593.55	22.25	*
C	985.83	2	492.91	18.47	—
D	743.82	2	371.91	13.94	—

[†] $F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00$; *表示在0.05水平上存在显著差异; —表示不存在显著差异。

与最优超声参数相同的条件下,采用200 r/min水浴振荡提取(见1.3.2),离心收集山楂汁类黄酮提取液。试验证实采用振荡提取山楂汁类黄酮,每次需2.5 h才能达到与超声波(50 min)提取大致相同的类黄酮含量。超声波能显著缩短提取时间,提高类黄酮的提取效率。

3 结论

(1) 相比传统浸提方法,超声波技术可以高效、快速地将山楂汁中类黄酮物质溶出。通过单因素和正交试验设计,优选得到山楂汁类黄酮的最佳超声提取工艺为:预煮时间30 min,超声温度50℃,超声时间50 min,超声功率150 W。在此最优条件下,制备的山楂汁中类黄酮含量为335.32 mg/100 mL。超声温度对山楂汁中类黄酮的含量具有显著性影响,需要严格控制。

(2) 目前国内外学者^[11,17-18]对山楂黄酮的提取研究多以乙醇作为提取溶剂,未将提高黄酮提取率和山楂实际加工生产相结合。山楂汁制备工艺对类黄酮物质影响的研究尚为空白。将超声波与果胶酶共同作用应用于提取山楂汁类黄酮,为山楂的深度开发和利用提供了工艺参数和理论依据。超声波作为一种新型的制汁工艺,在辅助果胶酶协同制备山楂汁的同时,可以更加有效地增加山楂汁中类黄酮物质的含量,提高山楂汁品质。

(3) 超声波辅助酶法提取类黄酮可以明显缩短提取时间,但超声作用与酶作用的交互作用机理尚不明确,需要进一步的试验研究和论证。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2010年版:一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 29.
- [2] Rigelsky J M, Sweet B V. Hawthorn: pharmacology and therapeutic uses[J]. American Journal of Health-System Pharmacy, 2002, 59(5): 417-422.
- [3] Edwards J E, Brown P N, Talent N, et al. A review of the chemistry of the genus *Crataegus*[J]. Phytochemistry, 2012, 79: 5-26.
- [4] Wu Jia-qi, Peng Wei, Qin Rong-xin, et al. *Crataegus pinnatifida*: chemical constituents, pharmacology, and potential applications[J]. Molecules, 2014, 19(2): 1 685-1 712.
- [5] 骆晓涛, 张守勤, 张格, 等. 不同提取方法对山楂总黄酮含量的影响[J]. 农机化研究, 2008(9): 145-147.
- [6] 杨昱, 白靖文, 俞志刚. 超声辅助提取技术在天然产物提取中的

- 应用[J]. 食品与机械, 2011, 27(1): 170-174.
- [7] 刘成莲. 超临界流体萃取与超声技术在农产品加工中的应用[J]. 农产品加工, 2008(12): 32-33.
- [8] 钟烈洲. 超声波对现榨苹果汁的品质影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2013: 5-14.
- [9] Adekunle A O, Tiwari B K, Cullen P J, et al. Effect of sonication on color, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice[J]. Food Chemistry, 2010, 122(3): 500-507.
- [10] Bhat R, Kamaruddin N, Liong M T, et al. Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality[J]. Ultrasonic Sonochemistry, 2011, 18(6): 1 295-1 300.
- [11] 高文秀, 赵文卓, 李平平. 果胶酶解法辅助超声波提取山楂中总黄酮的初步工艺优化[J]. 吉林化工学院学报, 2013, 30(7): 29-32.
- [12] Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction[J]. Ultrasonic Sonochemistry, 2001, 8(2): 137-142.
- [13] Li Hai-zhou, Pordesimo L, Weiss J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans[J]. Food Research International, 2004, 37(7): 731-738.
- [14] 廖维良, 赵美顺, 杨红. 超声波辅助提取技术研究进展[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(3): 347-350.
- [15] Hromádková Z, Alföldi J, Ebringerová A. Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corn cobxylan[J]. Industrial Crops and Products, 1999, 9(2): 101-109.
- [16] 张吉祥, 欧来良. 正交试验法优化超声提取枣核总黄酮[J]. 食品科学, 2012, 33(4): 18-21.
- [17] 刘北林, 董继生, 霍红. 山楂黄酮最佳提取工艺探讨[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 167-170.
- [18] 孙协军, 李秀霞, 冯彦博, 等. 山楂黄酮超高压提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(2): 291-296.

(上接第134页)

- [8] 莫彬彬, 连宾, 万固存, 等. 超临界CO₂分步萃取花椒香气和麻味物质的初步研究[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 201-203.
- [9] 杜双奎, 于修焯, 王青林, 等. 超声波辅助提取亚麻籽油的研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(4): 70-73.
- [10] 杜若源, 谢晶, 王婷, 等. 超声波辅助提取银杏叶中总黄酮的工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 167-170.
- [11] Zhao Bing, Yin Hui. Technology of the ultrasonic-circulated extraction and its application in the research and manufactory of herbal drugs[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2006, 37(1): 154-156.
- [12] Pan Ying-ming, Wang Kai, Huang Si-qin, et al. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of Longan (*Dimocarpus Longan Lour.*) peel[J]. Food Chemistry, 2008, 106(3): 1 264-1 270.
- [13] 王正宽, 周菲, 刘圆, 等. 微波技术在桂枝茯苓胶囊提取过程中的应用[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2 123-2 127.
- [14] 姜欢笑, 蒲彪, 周婷, 等. 超声波辅助提取花椒冷榨油饼粕中油脂的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2014, 35(21): 220-223.
- [15] 李东, 左勇, 邹杰, 等. 藤椒油微波提取工艺研究[J]. 中国调味品, 2013, 38(9): 85-88.