

木豆叶球松素的超声提取工艺及其抗氧化活性研究

付丽楠¹,袁肖寒^{2,3},顾成波^{1,*},蔡 曼¹,祖元刚¹

(1.东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室,黑龙江哈尔滨 150040;

2.东北林业大学林学院,黑龙江哈尔滨 150040;

3.东北农业大学生命科学与生物技术研究中心,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:在考察单因素(甲醇浓度、提取时间、提取温度和料液比)实验条件对木豆叶中球松素提取率影响的基础上,采用正交实验设计法优化得到球松素的最佳提取工艺条件,同时通过DPPH自由基清除实验评价了提取物的抗氧化活性。结果表明,木豆叶中球松素超声提取的最佳工艺条件为,甲醇提取浓度80%,提取时间60min,提取温度50℃,料液比1:40(g/mL),球松素的提取率可达到1.832mg/g;甲醇提取物清除自由基的IC₅₀值为0.281mg/mL。本研究建立的木豆叶中球松素的超声提取工艺具有提取效率高、操作简便等优点,适合木豆叶中球松素的提取,且甲醇提取物具有良好的抗氧化活性。

关键词:木豆叶,球松素,正交设计,超声提取,抗氧化

Study on optimization of ultrasonic-assisted extraction technology and its antioxidant activity of pinostrobin from pigeonpea leaves

FU Li-nan¹, YUAN Xiao-han^{2,3}, GU Cheng-bo^{1,*}, CAI Man¹, ZU Yuan-gang¹

(1.Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2.College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

3.Life Science and Biotechnology Research Center, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract:Based on single-factor experimental results, effects of four parameters including methanol concentration, extraction time, extraction temperature and ratio of solid to liquid on the extraction yield of pinostrobin from pigeonpea leaves were optimized by orthogonal test design, and the antioxidant capacity of methanol extract (ME) was evaluated by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging ability. Optimal extraction conditions were obtained as follows: methanol concentration 80%, extraction time 60min, extraction temperature 50℃ and solid-liquid ratio 1:40(g/mL). Under optimum conditions, the extraction yield of pinostrobin reached 1.832mg/g, and ME of pigeonpea leaves exhibited good antioxidant activity with an IC₅₀ value of 0.281mg/mL. Ultrasonic-assisted extraction technology established in the study possessed the advantages of high efficiency and ease of operation, which was suitable for the extraction of pinostrobin from pigeonpea leaves.

Key words: pigeonpea leaves; pinostrobin; orthogonal design; ultrasonic-assisted extraction; antioxidant activity

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)14-0224-05

木豆[*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]是豆科木豆属一年生或多年生木本植物,分布于东南亚、印度、中国西南及海南诸省^[1]。近年来,国内外学者对木豆的化学成分进行的研究表明,黄酮类和芪类化合物是木豆叶的主要活性成分,具有重要的药理作用^[2-4]。球松

素是一种双氢黄酮类化合物^[5],其广泛存在于木豆、山核桃(*Carya cathayensis* Sarg)、山柃(*Lindera reflexa* Hemsl)、镰形棘豆(*Oxytropis falcata* bunge)等植物中,并且蜂胶(propolis)中球松素含量较高^[6-9]。因球松素具有保护血管内皮细胞、抗芳香酶活性、抗肿瘤、抗病毒及抗幽门螺旋杆菌等多种生物活性^[10-14],而倍受国内外研究者的关注。超声提取是一种通过机械振动波来减少目标萃取物与样品基体之间的作用力从而实现固液萃取分离的过程^[15],与索氏、热回流提取等传统方法相比,超声提取具有提取充分、提取速度快、能耗较低等优点^[16]。目前有关木豆叶中球松素的提取工艺及抗氧化活性研究的相关报道较少。本

收稿日期:2013-01-15 * 通讯联系人

作者简介:付丽楠(1988-),女,硕士研究生,主要从事植物化学与植物药方面的研究。

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助(DL13CA02);公益性行业科研专项经费项目(201204601);哈尔滨市科技创新人才专项资金(2011RFQXS074)。

实验研究了超声法从木豆叶中提取球松素的工艺条件,建立了RP-HPLC分析球松素的检测方法,在考察了单因素实验条件(甲醇浓度、提取时间、提取温度、料液比)对木豆叶中球松素提取率影响的基础上,采用正交实验设计优化了超声法提取球松素的最佳工艺参数,并通过DPPH自由基清除实验,评价了提取物的抗氧化活性,以期为木豆叶中球松素的提取分离及木豆资源开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

木豆 采于海南东方市人工种植基地,由东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室聂绍荃教授鉴定,将木豆叶干燥至质量恒定,将叶粉碎,过60目筛,备用;球松素对照品 纯度大于98%,上海顺勃生物工程有限公司;色谱纯 美国迪马科技有限公司;DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼) Sigma公司;超纯水 Milli-Q系统自制;其他试剂 均为分析纯。

Waters高效液相色谱仪 1525型泵,717plus型自动进样器,2487型双波长紫外检测器,2996型全波长监测器;色谱柱HiQ sil C₁₈W 4.6mm×250mm×5μm, KYA TECH, Japan; KQ-250DE型数控超声清洗器 昆山市超声仪器有限公司;UV-2100型紫外可见分光光度计 日本岛津公司;22R型高速离心机 德国Heraeussepatee公司。

1.2 实验方法

1.2.1 木豆叶中球松素含量测定

1.2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取球松素对照品10mg,置10mL容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,得球松素对照品储备液(1.00mg·mL⁻¹)。分别精密吸取0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2mL球松素对照品储备液至10mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得不同浓度的球松素对照品溶液(0.010~0.320mg·mL⁻¹)。

1.2.1.2 色谱条件 色谱柱:HiQ sil C₁₈W,4.6mm×250mm×5μm;流动相:甲醇-水,梯度洗脱,洗脱程序见表1;流速:1.0mL·min⁻¹;检测波长为287nm。理论板数按球松素峰计算均不低于10000。在以上色谱条件下,木豆叶中的球松素与其他组分的色谱峰分离度良好。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

洗脱剂	时间(min)		
	0~15	15~25	25~40
甲醇(%)	75→70	70→85	85→75
水(%)	25→30	30→15	15→25

1.2.1.3 线性关系的考察 分别精密吸取不同浓度的球松素对照品溶液,进样10μL,按上述色谱条件测定峰面积,并以浓度(μg·mL⁻¹)为横坐标,以峰面积为纵坐标进行线性回归,得标准曲线。结果表明:球松素在0.010~0.320mg·mL⁻¹浓度范围内线性关系良好,回归方程为y=50232x+626342, R²=0.9949。

1.2.1.4 样品中球松素提取率的计算 精密称取1.00g木豆叶粉末,加入一定体积分数的甲醇溶液超声提取,提取液过滤,离心,取上清液检测,每样重复进样3次,将峰面积取平均值,代入标准曲线,计算样品中球松素提取率:

$$\text{提取率}(\text{mg/g}) = CV/M$$

式中:C:样品中物质的浓度(mg·mL⁻¹);V:样品体积(mL);M:木豆叶粉末干燥质量(g)。

1.2.2 正交实验设计 在超声提取球松素的过程中,所用甲醇浓度、超声时间、提取温度以及料液比对球松素的提取率有直接影响。因此,本实验先进行以上4个方面的单因素实验,再根据单因素实验结果,设计正交实验找出该提取方法的最优方案及工艺条件。因素与水平设计见表2。

表2 正交实验因素与水平表

Table 2 The table of factors and levels

水平	因素			
	A 甲醇浓度(%)	B 提取时间(min)	C 提取温度(°C)	D 料液比(g/mL)
1	60	30	40	1:30
2	70	45	50	1:40
3	80	60	60	1:50

1.2.3 抗氧化活性测定 参照Wu等^[17]的方法,对DPPH自由基清除活性进行比较。最佳条件下提取球松素,收集提取液,在45°C减压旋转蒸发除去溶剂后,冷冻干燥得提取物。精密称取一定质量的提取物和抗坏血酸(V_C),用80%甲醇分别配制成浓度为2.000、1.000、0.500、0.250、0.125mg/mL的溶液,分别取各浓度的溶液100μL,加入80%甲醇1.4mL,混匀;再加入0.004%DPPH甲醇溶液1mL,混匀,室温避光静置70min,于517nm测定OD值。

2 结果与分析

2.1 木豆叶中球松素的HPLC测定结果

木豆叶甲醇提取物与球松素对照品色谱图见图1。对照品球松素峰的保留时间为15.622min,与样品中球松素峰的保留时间一致,并且样品中球松素峰与样品中其他组分达到了很好的分离。

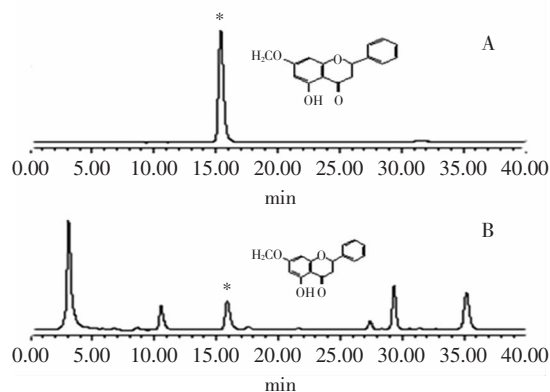


图1 球松素标准品(A)与木豆叶样品(B)色谱图
Fig.1 Chromatography spectrum of the standard (A) and sample (B) of pinostrobin

2.2 单因素实验结果

2.2.1 甲醇体积分数对球松素提取率的影响 在溶剂的选择上,首先考察了甲醇、乙醇、丙酮以及乙酸乙酯对木豆叶中球松素提取效果的影响,结果发现,甲醇作为提取溶剂能有效提取木豆叶中的球松素,故选择甲醇作为提取的溶剂。当提取时间为30min、提取温度为40℃、料液比为1:30(g/mL)时,甲醇体积分数对球松素提取率影响如图2所示。由此可以看出,随着甲醇体积分数的增大,球松素的提取率先增加后降低,当甲醇体积分数为70%时球松素提取率最高,本实验选择甲醇体积分数60%~80%用于进一步优化实验。

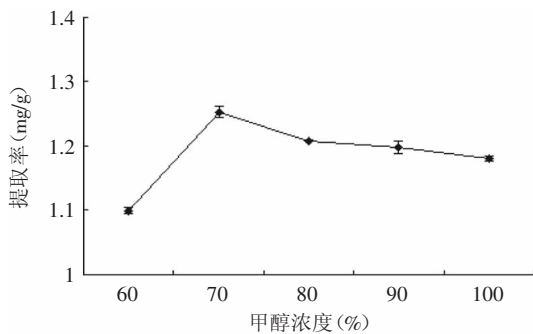


图2 甲醇浓度对木豆叶球松素提取率的影响

Fig.2 Influence of methanol concentration on pigeonpea leaves pinostrobin extraction rate

2.2.2 提取时间对球松素提取率的影响 当甲醇浓度为70%、提取温度为40℃、料液比为1:30(g/mL)时,提取时间对球松素提取率影响如图3所示。可以看出随着提取时间的延长,球松素的提取率先增加,当提取时间达到45min之后球松素的提取率基本保持不变,从节能角度考虑,本实验选择提取时间在30~60min用于进一步优化实验。

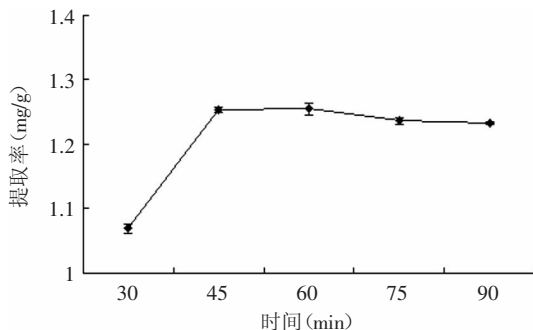


图3 提取时间对木豆叶球松素提取率的影响

Fig.3 Influence of extraction time on pigeonpea leaves pinostrobin extraction rate

2.2.3 提取温度对球松素提取率的影响 当甲醇浓度为70%、提取时间为45min、提取料液比为1:30(g/mL)时,从图4中可以看出,随温度的升高,提取率随之增大。这可能是由于球松素在甲醇溶液中的溶解度随着温度的升高而增大。但温度过高,破坏了其中的活性成分,杂质的溶出量增加,同时亦造成了溶

剂的损失。综合各因素考虑,选择提取温度40~60℃用于进一步优化实验。

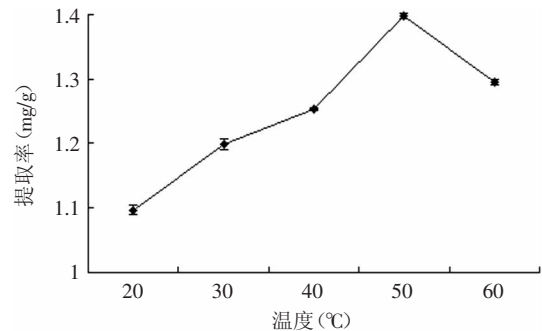


图4 提取温度对木豆叶球松素提取率的影响

Fig.4 Influence of extraction temperature on pigeonpea leaves pinostrobin extraction rate

2.2.4 料液比对球松素提取率的影响 当甲醇浓度为70%、提取时间为45min、提取温度为50℃时,由图5可知,随着料液比值的减小,提取率增大。但料液比达到1:40(g/mL)时,提取率开始降低。这可能是由于在超声波的作用下,木豆叶所含球松素已经基本提取完全,且其他杂质进入提取液,使提取液黏度增大,扩散速度变慢,导致球松素不易溶出。因此料液比选择1:30~1:50用于进一步优化实验。

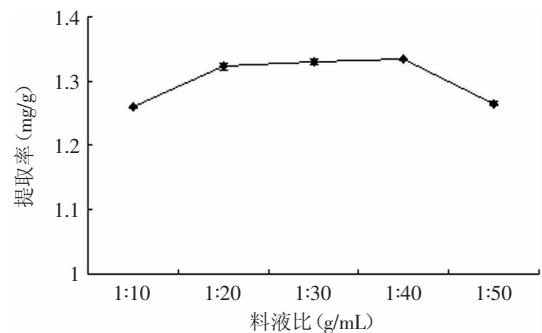


图5 料液比对木豆叶球松素提取率的影响

Fig.5 Influence of ratio of solid to liquid on pigeonpea leaves pinostrobin extraction rate

2.3 正交实验

为了寻找最佳提取条件,考察甲醇浓度、提取时间、提取温度和料液比4个因素对球松素提取率的影响,选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验,结果见表3,方差分析见表4。

由表3可知,R值由大到小依次为A>B>D>C,即对木豆叶球松素提取率影响的主次顺序为:甲醇浓度>提取时间>料液比>提取温度。由表4方差分析可知,甲醇浓度和提取时间对球松素提取率有显著影响($p<0.05$)。由k值得到的最优方案为 $A_3B_3C_2D_2$,即甲醇浓度80%,提取时间60min,温度50℃,料液比1:40(g/mL)。

2.4 验证实验

准确称取1.00g木豆叶粉末,按最优提取方案:甲醇浓度80%,提取时间60min,温度50℃,料液比1:40

表3 正交实验结果

Table 3 Design and results of orthogonal test

实验号	A	B	C	D	提取率(mg/g)
1	1	1	1	1	1.293
2	1	2	2	2	1.536
3	1	3	3	3	1.358
4	2	1	2	3	1.484
5	2	2	3	1	1.698
6	2	3	1	2	1.791
7	3	1	3	2	1.592
8	3	2	1	3	1.635
9	3	3	2	1	1.755
k ₁	1.396	1.456	1.573	1.582	
k ₂	1.658	1.623	1.592	1.640	
k ₃	1.661	1.635	1.549	1.492	
R	0.265	0.179	0.043	0.148	

表4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

来源	离差平方和	自由度	F值	显著性
A	0.139	2	46.333	*
B	0.060	2	20.000	*
C	0.003	2	1.000	
D	0.033	2	11.000	

注: F_{0.05}(2, 2)=19; F_{0.01}(2, 2)=99; *, p<0.05; **, p<0.01。

(g/mL)提取球松素,重复实验3次。结果木豆叶球松素提取率分别为1.825、1.837、1.834mg/g,均值为1.832mg/g, RSD为0.341%, 优于正交实验及单因素中的任何一组实验,该工艺条件下重复性良好。

2.5 甲醇提取物清除DPPH自由基能力

DPPH·是性质较为稳定的自由基,通常以此体系进行相关物质的抗氧化能力的评价。较低的半数抑制浓度(IC₅₀)值表示具有更高的自由基清除能力。木豆叶甲醇提取物清除DPPH自由基的IC₅₀(0.281mg/mL)与V_c的IC₅₀(0.202mg/mL)接近,表明甲醇提取物具有良好的自由基清除能力(图6)。

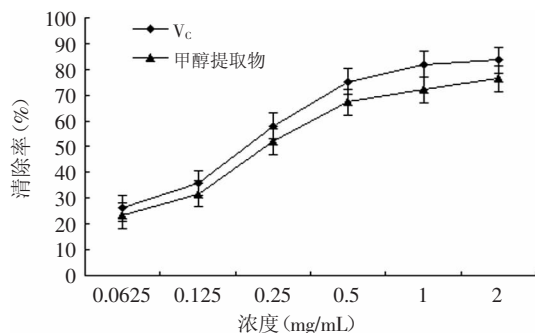


图6 甲醇提取物清除DPPH自由基能力

Fig.6 DPPH free radical-scavenging activity of methanol extract

3 结论

3.1 本实验通过正交实验法对木豆叶球松素的超

声辅助提取工艺条件进行了优化,最终确定木豆叶中球松素的最佳超声提取条件为,甲醇浓度80%,提取时间60min,提取温度50℃,料液比1:40(g/mL),在此条件下球松素的提取率为1.832mg/g。本研究建立的提取工艺具有短时、高效、操作简单等优点,为木豆叶中球松素的开发利用提供了依据。

3.2 研究表明,木豆叶甲醇提取物具有良好的抗氧化活性,其清除DPPH的IC₅₀值为0.281mg/mL,低于球松素单体对DPPH的IC₅₀值(大于0.500mg/mL)^[17],与V_c的IC₅₀(0.202mg/mL)接近。木豆叶甲醇提取物可作为一种具有发展潜力的天然抗氧化剂,应用于医药和食品领域。

参考文献

- [1] 王秋雪,顾成波,付丽楠,等. 响应面优化纤维素酶辅助提取木豆叶总黄酮工艺[J]. 植物研究, 2012, 32(6): 765-769.
- [2] Duker-Eshun, G Jaroszewski, J W Asomaning, et al. Antiplasmodial constituents of *Cajanus cajan*[J]. Phytother Res, 2004, 18: 128-130.
- [3] Zu Y G, Fu Y J, Liu W, et al. Simultaneous determination of four flavonoids in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves using RP-LC-DAD[J]. Chromatographia, 2006, 63: 499-505.
- [4] Zheng Y Y, Yang J, Chen D H, et al. Effects of the stilbene extracts from *Cajanus cajan* L. on ovariectomy-induced bone loss in rats[J]. Acta Pharm Sin, 2007, 42: 562-565.
- [5] 袁捷,陈志维,武文,等. RP-HPLC法测定木豆叶中球松素的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(3): 293-296.
- [6] 马灵媛. 一种从药用植物中提取纯化球松素的方法及其药物制剂与应用: 中国, CN 101875648 A[P]. 2010-11-03.
- [7] 吴德玲,陈仕云,刘劲松,等. 山核桃外蒲壳化学成分及抗肿瘤活性研究[J]. 中药材, 2011, 34(7): 1055-1057.
- [8] 申桂芬. 山檀药材的质量研究[D]. 郑州: 河南中医学院, 2007.
- [9] 侯丰灏,杨欢,许惠琴,等. 反相高效液相色谱法分析镰形棘豆中球松素的含量[J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(3): 171-172.
- [10] 付玉杰,祖元刚,吴楠,等. 木豆叶中木豆芪酸及球松素在制备抗疱疹病毒药物中的应用: 中国, CN 101485649 A[P]. 2009-07-22.
- [11] 杨艳. 球松素对脂多糖致人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用及其机制研究[D]. 泰山: 泰山医学院, 2010.
- [12] Bhamarapravati S, Juthaputh S, Mahachai W, et al. Antibacterial activity of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and *Myristica fragrans* Houtt Against *Helicobacter pylori* Songklanakarim[J]. Technol, 2006, 28: 157-163.
- [13] Nan Wu, Yu Kong, Yuangang Zu, et al. Activity investigation of pinostrobin towards herpes simplex virus-1 as determined by atomic force microscopy[J]. Phytomedicine, 2011, 18: 110-118.
- [14] Hadi Poerwono, Shigeru Sasaki, Yoshiyuki Hattori, et al. Efficient microwave-assisted prenylation of pinostrobin and biological evaluation of its derivatives as antitumor agents[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010, 10: 2086-2089.
- [15] 柳青海,张唐伟,李天才. 肝蛋白提取纯化及应用研究进

响应面法优化黑灵芝膳食纤维提取工艺

殷鹏飞,李 昌,聂少平,王君巧,戴 君,谢明勇*

(南昌大学,食品科学与技术国家重点实验室,江西南昌 330047)

摘要:以黑灵芝为原料,采用酶法和化学法联用,从黑灵芝中提取出可溶性膳食纤维和不可溶性膳食纤维,借助响应面设计分析,考察酶解温度、酶解时间、料液比和碱提pH、碱提温度、碱提时间分别对黑灵芝可溶性膳食纤维(SDF)、不可溶性膳食纤维(IDF)得率的影响。结果表明,最佳提取工艺条件分别为:酶解温度98℃、酶解时间103min、料液比1:32和碱提pH10、碱提温度48℃、碱提时间41min,在此条件下黑灵芝SDF得率为1.08%,IDF得率为88.68%。

关键词:黑灵芝,可溶性膳食纤维,不可溶性膳食纤维,响应面分析

Extraction of dietary fiber from *Ganoderma atrum* with response surface optimization

YIN Peng-fei, LI Chang, NIE Shao-ping, WANG Jun-qiao, DAI Jun, XIE Ming-yong*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Response surface methodology was applied to optimize the extraction conditions of soluble dietary fiber (SDF) and insoluble dietary fiber (IDF) from *Ganoderma atrum*. Effects of enzymolysis temperature, reaction time and material-liquid ratio on the yield of SDF and alkaline extraction pH, temperature and time on the yield of IDF were investigated. Results exhibited that the optimum extraction conditions were as follows: enzymolysis temperature and reaction time was 98℃ and 103min, solid-liquid ratio was 1:32, alkaline extraction pH, temperature and time was 10, 48℃, 41min. The yield of SDF and IDF was 1.08% and 88.68%, respectively, under optimized conditions.

Key words: *Ganoderma atrum*; insoluble dietary fiber; soluble dietary fiber; response surface analysis

中图分类号: TS202.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)14-0228-05

随着物质生活水平的提高,三高食品和精细食品在人们日常饮食的比例不断加大,高血脂、肥胖症、脂肪肝、胆结石、糖尿病及肠癌等“文明病”呈递增趋势增加^[1],因此吃出健康的饮食口号已经得到了人们的认可。基于此,膳食纤维(Dietary Fiber, DF)的在人体内不提供能量、不提供营养辅助因子,并伴有调节胃肠道消化功能,调节人体血糖、血脂水平^[2-3]等生理功能越来越受到大众的重视。目前,膳食纤维已被列为“第七类营养素”^[4],而且已有大量关于膳食纤维的生理功能^[5-7]和提取工艺优化的研究^[8-10]。灵芝作为一类典型的菌类,其膳食纤维(主要是功能性多糖)在降血糖^[11]、抗衰老^[12]、抗肿瘤^[13]、调节免疫力^[14]等功效作用方面得到广泛的关注和研究。本文通过响

应面软件优化黑灵芝中可溶性膳食纤维(SDF)、不可溶性膳食纤维(IDF)的提取工艺,操作方法简单,环节易于控制,可以为黑灵芝的综合开发与利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑灵芝 产自江西赣州安远县,含氮量2.1%,灰分含量2.6%,水分含量12.5%,脂肪含量0.9%;耐高温α淀粉酶 酶活力20000U/mg,杰能科中国生物工程有限公司;中性蛋白酶 酶活力5000U/mg,无锡市雪梅酶制有限公司;三羟甲基氨基甲烷TRIS、2-(N-吗啉代)-磺酸基乙烷(MES) 纯度>99%;盐酸、氢氧化钠、无水乙醇、丙酮、95%乙醇 分析纯试剂。

数显恒温水浴锅 金坛市城西春兰实验仪器厂;AL 104型电子天平 上海梅特勒-托利多仪器有限公司;RE-52AA型旋转蒸发器、循环水真空泵 上海亚荣生化仪器厂;pH计 德国Sartorius;TDL-5-A型离心机 上海飞鸽系列离心机;DZG-6050型真空干燥箱 上海森信实验仪器有限公司;ALPHA1-2型

收稿日期:2013-01-24 * 通讯联系人

作者简介:殷鹏飞(1987-),男,硕士研究生,研究方向:食物资源开发与利用。

基金项目:十二五科技支撑计划(2012BAD33B06);国家自然科学基金重点项目(31130041);国家自然科学基金(21265011)。

展[J]. 贵州农业科学,2011,39(2):161-164.

[16] 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.

[17] Wu N, Fu K, Fu Y J, et al. Antioxidant activities of extracts and main components of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves[J]. Molecules, 2009, 14(3): 1032-1043.