

韩建军, 宁娜, 郁建生, 等. 响应面优化微波协同酶法提取川芎阿魏酸的工艺[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(3): 284–288.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.081

响应面优化微波协同酶法提取川芎阿魏酸的工艺

韩建军¹, 宁娜^{1,2}, 郁建生¹, 邹宗尧², 牟少霞²

(1. 铜仁职业技术学院药学院, 贵州铜仁 554300; 2. 西南大学药学院, 重庆 400715)

摘要:利用响应面分析法对川芎阿魏酸的微波协同酶法提取工艺进行优化。在单因素试验基础上, 选取纤维素酶用量、酶解温度、酶解 pH 值以及酶解时间进行了 4 因素 3 水平的 Box-Behnken 中心组合研究, 通过响应面分析法对提取条件进行了优化, 确定微波协同酶法提取川芎中阿魏酸的最佳工艺。试验结果表明: 最佳酶解条件为纤维素酶用量 3.6 mg/g、酶解 pH 值 4.6、酶解时间 52 min、酶解温度 53 ℃, 在该条件下, 川芎阿魏酸的提取得率为 89.18%。

关键词:川芎; 阿魏酸; 纤维素酶; 微波法; 响应面; 提取; 优化

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0284-04

川芎为伞形科植物川芎 (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) 的干燥根茎, 临床上用于治疗跌扑肿痛、月经不调等^[1]。川芎含有挥发油类^[2]、多糖类^[3]、酚酸类^[4]等多种化学成分, 其中阿魏酸是川芎药材的质控成分^[1]。体内药理试验研究表明, 阿魏酸具有抗菌^[5]、抗抑郁^[6]、降压^[7]等活性。

目前已报道的川芎中阿魏酸的提取方法主要有微波法^[8]、回流法^[9]、超高压提取法^[10]等。其中微波法是通过微波能加热与药材相接触的溶剂, 将目标成分从药材中转移至溶剂中的一个过程, 具有高效、节能、污染低的特点^[11]。生物酶解技术通过酶解作用可使植物细胞壁疏松、破裂, 从而降低传质阻力, 促进有效成分的溶出, 提高有效成分提取率, 因而被越来越多地用于中药有效成分的提取中^[12]。本研究采用微波协同酶法提取川芎中阿魏酸, 通过响应面法优化酶解条件, 以期对川芎中阿魏酸的开发利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

川芎, 购买于重庆市中药材市场, 经铜仁职业技术学院梁玉勇教授鉴定为川芎 (*Ligusticum chuanxiong* Hort.); 阿魏酸标准品, 购于中国食品药品检定研究院; 纤维素酶, 购自天津利华酶制剂技术有限公司, 酶活力为 10 000 U/g; 水为重蒸水; 甲醇为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

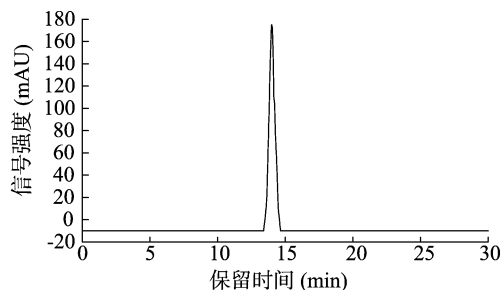
仪器: LC-20AT 高效液相色谱仪 (自动进样器、在线脱气机、二元泵、DAD 检测器和 LC-solution 色谱工作站, 日本岛津公司); LWMC-201 型微波化学反应器 (南京旋光科技有限公司); AB-135S 十万分之一电子天平 (德国梅特勒公司); RE-2000A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); PHS-

25 型酸度计 (杭州亚美电子仪器厂); KS-600D 超声清洗机 (宁波科生仪器厂); 电热恒温水浴锅 (北京科伟永鑫实验仪器设备厂)。

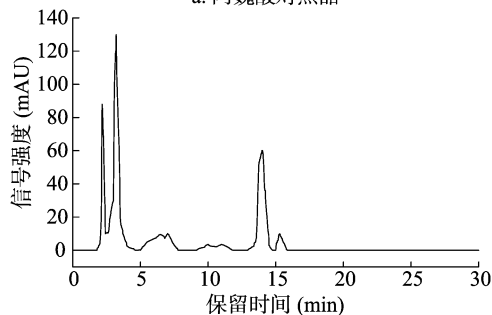
1.2 试验方法

1.2.1 阿魏酸的含量测定

1.2.1.1 色谱条件^[1] Kromasil-C₁₈ 柱 (5 μm, 4.6 mm × 150.0 mm); 流动相: 甲醇-1% 乙酸溶液 (体积比 30:70); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 321 nm; 进样量: 10 μL。该色谱条件下理论塔板数以阿魏酸峰计算不低于 4 000, 该色谱条件下测定阿魏酸标准品及川芎药材得到的色谱结果见图 1。



a. 阿魏酸对照品



b. 川芎药材

图1 川芎阿魏酸的高效液相色谱

1.2.1.2 标准曲线的绘制 精确称取 10.5 mg 阿魏酸对照品置于 25 mL 棕色容量瓶中, 并用 70% 甲醇定容, 摇匀, 得 0.42 mg/mL 阿魏酸标准溶液。精确移取 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1 mL 阿魏酸对照品溶液至 10 mL 棕色容量瓶中, 并用

收稿日期: 2015-01-21

基金项目: 国家科研平台建设项目 (编号: 发改高技[2013]2064 号); 贵州省高层次人才科研条件特助经费 (编号: 黔人领发[2012]3 号); 贵州省铜仁市科技局科研计划 (编号: 铜仁市研[2012]62 号)。

作者简介: 韩建军 (1979—), 男, 山西祁县人, 硕士, 副教授, 主要从事药用资源利用开发。E-mail: hjat123@163.com。

70% 甲醇定容。精确吸取所配制的不同浓度的对照品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,按照“1.2.1.1”节中的色谱条件测定峰面积,并以峰面积为纵坐标(y)、进样量(x)为横坐标绘制标准曲线: $y = 5\,312x - 1.034$, $r = 0.999\,9$,线性范围:0.042 ~ 0.420 μg 。

1.2.1.3 阿魏酸含量的测定 取经干燥至恒质量的浸膏适量置于 10 mL 棕色容量瓶中,并用 70% 甲醇溶解,所得溶液用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,取续滤液 10 μL 按照“1.2.1.1”节的色谱条件进行测定,并根据峰面积计算阿魏酸的提取得率。阿魏酸提取得率按照如下公式进行计算:

阿魏酸提取得率 = [提取得到的阿魏酸含量(g)/川芎药材中阿魏酸的含量(g)] $\times 100\%$ 。

1.2.2 川芎中阿魏酸的提取工艺流程 川芎中阿魏酸的提取工艺流程:川芎→干燥、粉碎成粗粉(过 24 目筛)→酶解→微波提取→合并提取液→减压回收溶剂→浸膏→干燥至恒质量→测定阿魏酸含量,并计算阿魏酸提取得率。其中微波提取条件的工艺参数为:8 倍量的 50% 乙醇、微波功率为 150 W、提取次数为 2 次、提取时间为 2 min/次。

1.3 酶解条件的单因素试验

1.3.1 纤维素酶用量对阿魏酸提取率的影响 准确称取 10 g 川芎粗粉置于装有 100 mL 蒸馏水的锥形瓶中,在酶解温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 、酶解 pH 值为 4.5、酶解时间为 60 min 的条件下,考察不同纤维素酶用量(1、2、3、4、5 mg/g)对阿魏酸提取率的影响。

1.3.2 酶解时间对阿魏酸提取率的影响 准确称取 10 g 川芎粗粉置于装有 100 mL 蒸馏水的锥形瓶中,在酶解 pH 值为 4.5、纤维素酶用量为 3 mg/g、酶解温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,考察不同酶解时间(30、40、50、60、70 min)对阿魏酸提取率的影响。

1.3.3 酶解 pH 值对阿魏酸提取率的影响 准确称取 10 g 川芎粗粉置于装有 100 mL 蒸馏水的锥形瓶中,在纤维素酶用量为 3 mg/g、酶解温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 、酶解时间为 60 min 的条件下,考察不同酶解 pH 值(3.5、4.0、4.5、5.0、5.5)对阿魏酸提取率的影响。

1.3.4 酶解温度对阿魏酸提取率的影响 准确称取 10 g 川芎粗粉置于装有 100 mL 蒸馏水的锥形瓶中,在纤维素酶用量为 3 mg/g、酶解 pH 值为 4.5、酶解时间为 60 min 的条件下,考察不同酶解温度(35、40、45、50、55 $^{\circ}\text{C}$)对阿魏酸提取率的影响。

1.4 响应面法优化试验

根据单因素试验结果,以阿魏酸的提取得率为响应值,用 Design - Expert 8.0 软件的 Box - Behnken 中心组合试验设计原理对所选变量进行响应面设计。通过对数据进行回归分析,预测微波协同酶法提取川芎中阿魏酸的最佳工艺参数。

2 结果与分析

2.1 酶解川芎药材的单因素试验结果

2.1.1 纤维素酶用量对川芎中阿魏酸提取得率的影响 由图 2 可知,酶用量在 1 ~ 3 mg/g 时,阿魏酸提取率随着酶用量的增加而明显升高;当纤维素酶用量继续增加时,阿魏酸提取得率增加缓慢。因此,纤维素酶用量宜选在 3 mg/g 左右。

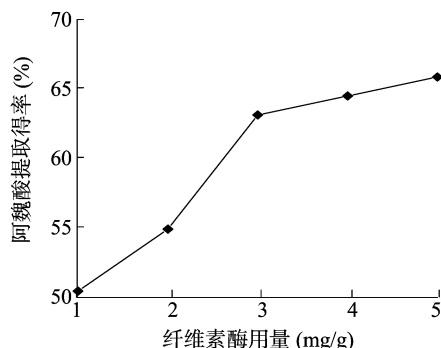


图2 纤维素酶用量对川芎中阿魏酸提取得率的影响

2.1.2 酶解时间对川芎中阿魏酸提取得率的影响 由图 3 可知,阿魏酸提取得率随着酶解时间的增加而升高;当酶解时间超过 50 min 后,阿魏酸提取得率增加趋于平缓。因此,酶解时间宜选择在 50 min 左右。

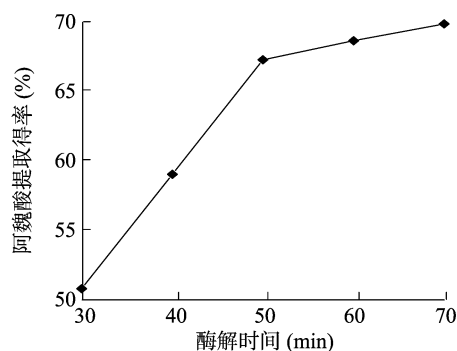


图3 酶解时间对川芎中阿魏酸提取得率的影响

2.1.3 酶解 pH 值对川芎中阿魏酸提取得率的影响 由图 4 可知,当酶解 pH 值为 4.5 时,阿魏酸提取得率最高。由于 pH 值过低或者过高都会影响纤维素酶活力,最终影响有效成分的提取,因此最佳酶解 pH 值选在 4.5 左右。

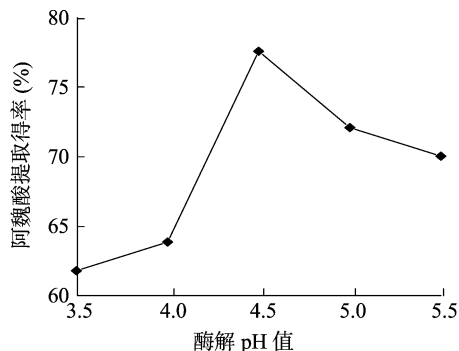


图4 酶解 pH 值对川芎中阿魏酸提取得率的影响

2.1.4 酶解温度对川芎中阿魏酸提取得率的影响 由图 5 可知,在酶解温度为 35 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,阿魏酸提取得率随着酶解温度的升高而增加;当酶解温度超过 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,阿魏酸提取得率有所下降,这是由于随着温度的不断升高,纤维素酶活性不断增强,但是当温度过高即超过了纤维素酶的最适温度时,则会引起纤维素酶失活。因此,酶解温度宜选择在 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右。

2.2 川芎阿魏酸提取工艺响应面法优化分析

根据上述单因素试验结果,以纤维素酶用量(X_1)、酶解时间(X_2)、酶解 pH 值(X_3)和酶解温度(X_4)4 个因素为变量,以阿魏酸提取得率(Y)为响应值,根据 Box - Behnken 的

中心组合设计原理进行 4 因素 3 水平试验。具体的试验因素及水平见表 1, 响应面分析方案及结果见表 2。

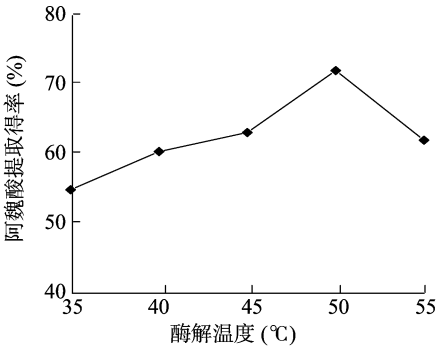


图5 酶解温度对川芎中阿魏酸提取率的影响

表 1 响应面分析因素与水平

水平	因素			
	X ₁ :纤维素酶用量 (mg/g)	X ₂ :酶解时间 (min)	X ₃ :酶解 pH 值	X ₄ :酶解温度 (°C)
-1	2	40	4.0	45
0	3	50	4.5	50
1	4	60	5.0	55

表 2 Box - Behnken 设计方案及试验结果

试验号	X ₁ :纤维素酶用量	X ₂ :酶解时间	X ₃ :酶解 pH 值	X ₄ :酶解温度	Y:阿魏酸提取率 (%)
1	-1	-1	0	0	77.86
2	1	-1	0	0	83.35
3	-1	1	0	0	80.33
4	1	1	0	0	86.92
5	0	0	-1	-1	72.64
6	0	0	1	-1	80.88
7	0	0	-1	1	77.31
8	0	0	1	1	83.90
9	-1	0	0	-1	75.52
10	1	0	0	-1	79.23
11	-1	0	0	1	76.76
12	1	0	0	1	86.24
13	0	-1	-1	0	71.54
14	0	1	-1	0	82.12
15	0	-1	1	0	84.04
16	0	1	1	0	81.43
17	-1	0	-1	0	73.05
18	1	0	-1	0	80.74
19	-1	0	1	0	81.29
20	1	0	1	0	86.37
21	0	-1	0	-1	75.80
22	0	1	0	-1	78.00
23	0	-1	0	1	77.31
24	0	1	0	1	84.45
25	0	0	0	0	88.57
26	0	0	0	0	88.43
27	0	0	0	0	88.02
28	0	0	0	0	87.88
29	0	0	0	0	87.88

由 Design - Expert 8.0.6 软件对表 2 中数据进行回归拟合得到的二元多项回归方程为: $Y = 88.16 + 3.17X_1 + 1.95X_2 + 3.38X_3 + 1.99X_4 + 0.28X_1X_2 - 0.65X_1X_3 + 1.44X_1X_4 - 3.30X_2X_3 + 1.23X_2X_4 - 0.41X_3X_4 - 3.00X_1^2 - 3.56X_2^2 - 4.54X_3^2 - 5.45X_4^2$ 。

该模型回归方程的方差分析结果见表 3, 可以看出, 模型极显著 ($P < 0.0001$), 失拟项 ($P = 0.053$) 不显著, 表明回归方程拟合度和可信度较高、试验误差较小, 可用于指导阿魏酸提取试验设计。模型中 R^2 为 0.9912, R_{Adj}^2 为 0.9824, 表明响应值 98.24% 的变化来源于所选变量; 模型的变异系数为 0.83% ($< 10\%$), 表明试验有良好的稳定性; 模型的信噪比为 34.315 (> 4), 表明该模型适用于川芎阿魏酸提取工艺的优化。该回归方程中的一次项中, X_3 对阿魏酸提取率的影响显著, X_1 、 X_2 、 X_4 对阿魏酸提取率的影响极显著; 交互项中 X_1X_4 、 X_2X_3 、 X_2X_4 对阿魏酸提取率的影响极显著; 二次项中 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 均对阿魏酸提取率的影响极显著。根据回归方程中的各项系数及表 3 中回归方程结果可知, 在所选因素范围内, 各个因素对阿魏酸提取率的影响顺序为: 酶解 pH 值 $>$ 纤维素酶用量 $>$ 酶解温度 $>$ 酶解时间。

表 3 回归模型方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	722.65	14	51.62	112.40	< 0.0001	**
X ₁	120.59	1	120.59	262.58	< 0.0001	**
X ₂	45.44	1	45.44	98.93	< 0.0001	**
X ₃	136.76	1	136.76	297.78	< 0.0001	*
X ₄	47.60	1	47.60	103.65	< 0.0001	**
X ₁ X ₂	0.30	1	0.30	0.66	0.4306	
X ₁ X ₃	1.70	1	1.70	3.71	0.0747	
X ₁ X ₄	8.32	1	8.32	18.12	0.0008	**
X ₂ X ₃	43.49	1	43.49	94.71	< 0.0001	**
X ₂ X ₄	6.10	1	6.10	13.28	0.0027	**
X ₃ X ₄	0.68	1	0.68	1.48	0.2436	
X ₁ ²	58.33	1	58.33	127.02	< 0.0001	**
X ₂ ²	82.33	1	82.33	179.26	< 0.0001	**
X ₃ ²	133.85	1	133.85	291.45	< 0.0001	**
X ₄ ²	192.76	1	192.76	419.73	< 0.0001	**
残差	6.43	14	0.46			
失拟项	6.01	10	0.60	5.76	0.053	
纯误差	0.42	4	0.10			
总和	729.08	28				

注: $R^2 = 0.9912$, $R_{Adj}^2 = 0.9824$, 变异系数 0.83%, 信噪比 34.315; “**”表示极显著 ($P < 0.01$); “*”表示显著 ($P < 0.05$)。

所考察的 4 个因素 (纤维素酶用量、酶解时间、酶解 pH 值和酶解温度) 两两交互作用对川芎中阿魏酸提取率的影响见图 6, 响应曲面的坡度越陡峭, 则表明因素交互作用对响应值的影响越显著。由图 6 可以看出, 在所选的 4 个因素的交互作用中, 酶解温度与纤维素酶用量的交互作用、酶解 pH 值与酶解时间的交互作用以及酶解时间与酶解温度的交互作用均对川芎中阿魏酸的提取率有显著影响, 其中以酶解 pH 值与酶解时间的交互作用对阿魏酸提取率的影响最为显著。以上对响应面图的分析结果与表 3 的分析结果一致。

经过 Design Expert 8.0.6 软件的分析, 得到川芎中阿魏

酸酶解的最佳工艺条件为:纤维素酶用量 3.58 mg/g、酶解时间 52.35 min、酶解 pH 值 4.62、酶解温度 52.77 ℃,在此条件下,阿魏酸理论提取的得率为 89.97%。为验证方法的可行性,采用上述酶解条件对川芎进行微波-酶法提取阿魏酸的

试验,为方便操作,将上述优化的条件调整为纤维素酶用量 3.6 mg/g、酶解时间 52 min、酶解 pH 值 4.6、酶解温度 53 ℃,在优化条件下做 3 组平行试验,测得阿魏酸平均提取率为 89.18%,试验结果与模型预测相对误差仅为 0.88%。

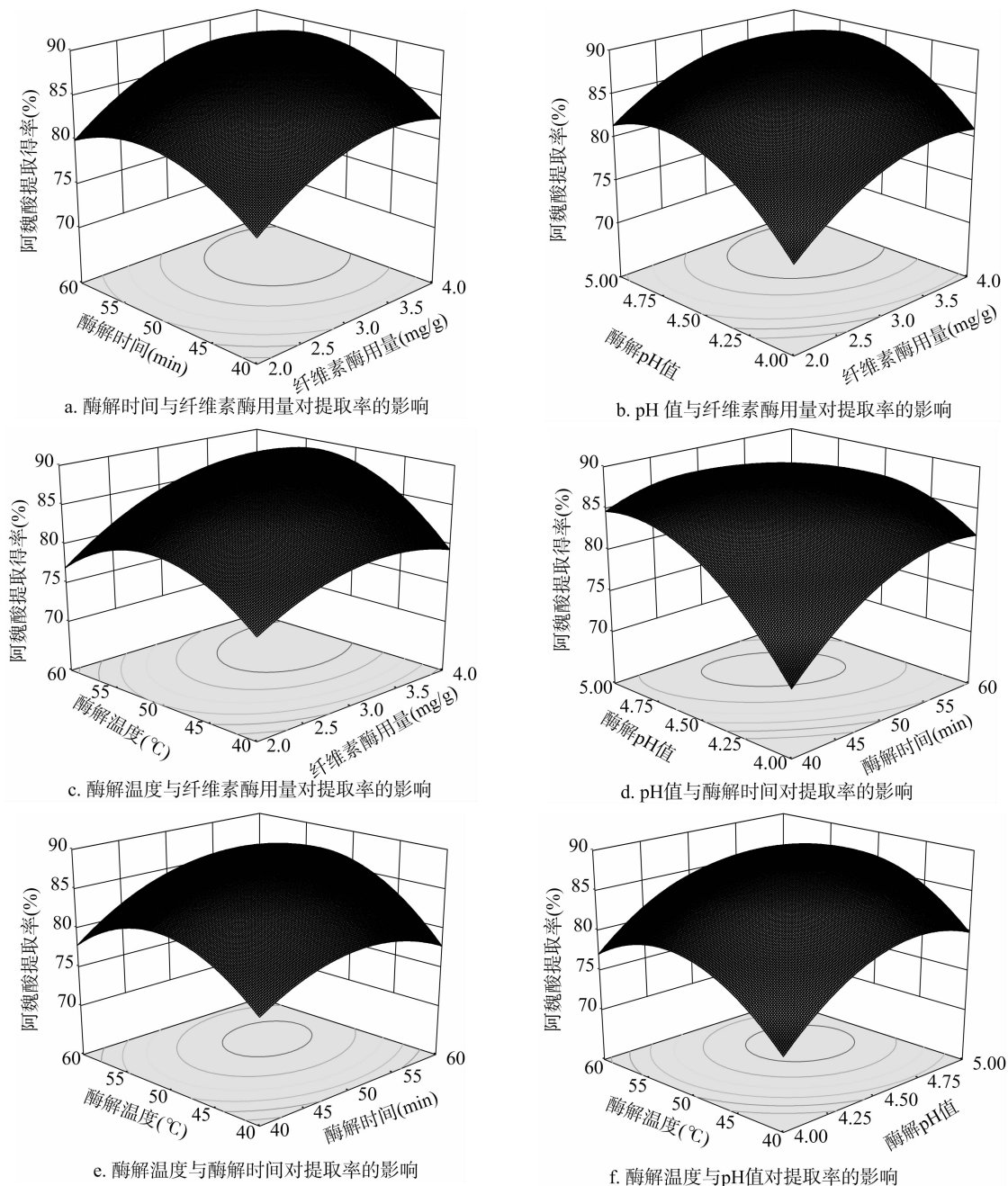


图6 两两因素交互作用对阿魏酸提取率的影响

3 结论

本研究以川芎中阿魏酸提取得率为指标,通过单因素试验对纤维素酶用量、酶解时间、酶解 pH 值以及酶解温度进行了考察。在此基础上,采用 Design - Expert 8.0.6 软件的 Box - Behnken 的中心组合试验设计响应面试验进而建立了数学模型,得到优化的酶解处理川芎药材的工艺条件,即纤维素酶用量为 3.6 mg/g、酶解时间为 52 min、酶解 pH 值为 4.6、酶解温度为 53 ℃,在该条件下川芎中阿魏酸的提取率达到

89.18%。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2010 版. 北京:中国医药科技出版社,2010:38.
- [2] Zhang C, Qi M L, Shao Q L, et al. Analysis of the volatile compounds in *Ligusticum chuanxiong* Hort. using HS - SPME - GC - MS[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 44 (2): 464 - 470.

闵婷,郑梦林,李阳,等.高体积分数 CO_2 处理对柿果实褐变的影响[J].江苏农业科学,2016,44(3):288-290.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.082

高体积分数 CO_2 处理对柿果实褐变的影响

闵婷¹,郑梦林¹,李阳¹,殷学仁²,陈昆松²,易阳^{1,3},王宏勋^{1,3}

(1.武汉轻工大学食品科学与工程学院,湖北武汉 430023;2.浙江大学果树科学研究所,浙江杭州 310058;

3.湖北省生鲜食品工程技术研究中心,湖北武汉 430023)

摘要:涩柿果实采收后须经人工脱涩才能用于鲜食,其中高体积分数 CO_2 脱涩处理应用最广泛。经高体积分数 CO_2 处理后,柿果实贮藏过程中也会发生褐变。多酚氧化酶PPO作为酶促褐变最关键的基因,在各种果蔬中的研究较多,而关于PPO基因是否参与涩柿果实脱涩后褐变的研究尚未见报道。以“恭城水柿”为材料,经95% CO_2 处理2 d后切片,通过可溶性单宁含量测定、褐变程度观察、PPO基因克隆与表达分析研究 CO_2 处理对“恭城水柿”褐变的影响。结果表明,经95% CO_2 处理后,柿果实的可溶性单宁含量明显下降,柿果实完成脱涩。脱涩后的柿鲜切片于20℃下放置12 h后发生明显褐变。本研究克隆获得PPO基因部分片段序列,聚类分析表明,该PPO基因与苹果PPO基因较同源;基因表达分析显示,该PPO基因在 CO_2 处理后的鲜切柿片中的表达量比对照低,表明该PPO基因可能与柿子脱涩后的褐变无相关性。

关键词:恭城水柿;脱涩;褐变;PPO

中图分类号:TS255.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)03-0288-03

柿(*Diospyros kaki*)属于柿科(Ebenaceae)柿属(*Diospyros*),起源于东亚,主要分布于中国、日本、韩国等东亚国家^[1]。不同于其他水果,柿果实的独特之处在于其能累积大量单宁,其中可溶性单宁可导致涩味。柿果实根据其天然脱涩的能力分为甜柿和涩柿。甜柿能在树上自然完成脱涩,采收后可直接食用;涩柿果实成熟时可溶性单宁含量仍较高,采收后须经人工脱涩方能鲜食^[2]。我国栽培的品种多为涩柿,涩柿的脱涩技术较为成熟,包括乙烯处理、 CO_2 处理^[3]、温水浸泡、交替冻融^[4]等,其中高体积分数 CO_2 处理应用最为广

泛。然而,高体积分数 CO_2 处理柿果实后,果实在贮藏过程中也会发生褐变,且处理时间越长则褐变程度越深^[5],使柿果实贮藏和货架期的果实品质下降。

褐变是果实品质劣变最明显的特征之一,不仅影响果实的营养、外观、风味,并已成为果蔬贮藏加工的主要障碍^[6]。果蔬褐变多以酶促褐变为主,与酶促褐变密切相关的酶类主要为多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO),多酚类物质在PPO的作用下氧化成醌,醌再聚合生成黑色或褐色的色素沉淀,组织表现为褐变。随着分子生物学的发展,马铃薯^[7]、梨^[8]、甘薯^[9]、蘑菇^[10]、莲藕^[11]等植物的PPO基因相继被克隆,而关于柿果实中PPO酶活性及其特性的报道较少。

以“恭城水柿”为材料,经95% CO_2 处理2 d后切片,通过可溶性单宁含量分析、褐变程度观察、PPO基因克隆与表达分析研究 CO_2 处理对“恭城水柿”褐变的影响,并进行PPO基因的克隆、进化树分析、基因表达分析,以期阐明柿果实脱涩后褐变的生物学机制。

收稿日期:2015-09-21

基金项目:湖北省教育厅科学研究计划(编号:B2015007)。

作者简介:闵婷(1987—),女,博士,讲师,主要从事果蔬精深加工研究。E-mail: minting1323@163.com。

通信作者:王宏勋,博士,教授,主要从事生鲜食品加工与安全研究。E-mail: 119075816@qq.com。

[3] Yuan J F, Zhang Z Q, Fan Z C, et al. Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(4): 822-827.

[4] Zhao Y X, Ding M Y, Liu D L. Phenolic acids analysis in *Ligusticum chuanxiong* using HPLC [J]. Journal of Chromatographic Science, 2005, 43(8): 389-393.

[5] Borges A, Ferreira C, Saavedra M J, et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria [J]. Microbial Drug Resistance, 2013, 19(4): 256-265.

[6] Chen J L, Lin D, Zhang C, et al. Antidepressant-like effects of ferulic acid: involvement of serotonergic and norepinephrine systems [J]. Metabolic Brain Disease, 2014, 30(1): 129-136.

[7] Alam M A, Sernia C, Brown L. Ferulic acid improves cardiovascular

and kidney structure and function in hypertensive rats [J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2013, 61(3): 240-249.

[8] 范宋玲, 张建军, 熊带水, 等. 川芎微波提取工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 46-48.

[9] 白海波, 王剑飞, 宋子荣. 川芎提取工艺的优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(4): 8-10.

[10] 侯丽丽, 陈洪海, 张守勤. 川芎中阿魏酸超高压提取工艺的优化 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(9): 2133-2135, 2139.

[11] 王赛君, 伍振峰, 杨明, 等. 中药提取新技术及其在国内的转化应用研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1360-1367.

[12] 宋成英. 酶解技术在中药提取中的应用研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(8): 1934-1935.