

复合酶协同超声波法提取香椿老叶总黄酮工艺研究

刘玉梅, 张家俊, 吴浪

(铜仁职业技术学院, 中兽药国家民委重点开放实验室, 贵州铜仁 554300)

摘要: 本文研究了香椿老叶中总黄酮的提取工艺, 提取液中总黄酮的得率以芦丁为对照品进行校正。先利用复合酶水解香椿老叶中的纤维素和果胶, 探究出最佳酶解条件为复合酶2(果胶酶:纤维素酶=2:1), 酶用量为2.00%(W/V), 酶解时间40 min, 酶解温度45 ℃, 上清液中总黄酮得率为2.49%。再进行超声辅助提取, 采用通过单因素实验和Box-Behnken实验对乙醇体积比、超声功率、超声时间、超声温度4个条件进行优化, 各项方差分析表明影响香椿老叶中总黄酮得率的顺序依次为: 超声功率>乙醇体积分数>提取温度>提取时间, 再根据回归方程预测最佳提取条件。在采用乙醇体积分数60%、超声功率227 W、提取温度53.00 ℃、提取时间51 min条件下, 香椿老叶总黄酮得率为3.85%, 与预测值仅相差0.03%, 表明工艺参数准确可靠。

关键词: 香椿; 总黄酮; 酶解; 超声波; 响应面

文章编号: 1673-9078(2019)11-223-230

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.11.031

Extraction of Total Flavonoids from *Toona sinensis* Old Leaves by Complex Enzymolysis Assisted with Ultrasound

LIU Yu-mei, ZHANG Jia-jun, WU Lang

(Key Open Laboratory of Chinese Veterinary Medicine of State Ethnic Affairs Commission, Tongren Polytechnic College, Tongren 554300, China)

Abstract: In this work, the extraction method of total flavonoids from old leaves of *Toona sinensis* was studied. Firstly, cellulose and pectin in the old leaves of *Toona sinensis* were hydrolyzed by complex enzymes, and the optimal enzymatic hydrolysis condition was found to be complex enzyme 2 (pectinase: cellulase=2:1), with an enzyme dosage of 2.00% (W/V), enzymatic hydrolysis time of 40 min, enzymatic hydrolysis temperature of 45 ℃, and the total flavonoids yield in the supernatant was 2.49%. Ultrasonic assisted extraction was performed later. The single factor experiment and the Box Behnken were used to optimize the ethanol volume ratio, ultrasonic power, ultrasonic time, ultrasonic temperature. The variance analysis showed that the yield of total flavonoids from old leaves of *Toona sinensis* was affected by following: the ultrasonic power > ethanol concentration > extraction temperature > extracting time. According to the regression equation, the best extraction conditions were predicted. Under the conditions of ethanol volume fraction of 60%, ultrasonic power of 227 W, extraction temperature of 53.00 ℃ and extraction time of 51 min, the total flavonoids yield of old leaves of *Toona sinensis* was 3.85%, which was only 0.03% different from the predicted value, indicating that the process parameters were accurate and reliable.

Key words: *Toona sinensis*; flavonoid; enzymatic hydrolysis; ultrasonic; response surface method

香椿 (*Toona sinensis*) 是楝科香椿属多年生落叶乔木, 因其嫩芽有特殊的香味而成为人们广为喜爱的一种木本蔬菜。研究表明其种子、老叶、根皮、杆皮中都含有大量的黄酮、生物碱、皂苷等生物活性成分^[1-5], 其中黄酮类化合物是香椿的主要药效成分, 现代

收稿日期: 2019-07-16

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2014]2160); 铜仁市科技局科技计划项目(铜市科研(2013)10-13)

作者简介: 刘玉梅(1981-), 女, 副教授, 研究方向: 中药质量控制、天然产物开发与应用

通讯作者: 张家俊(1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中药有效成分与质量研究、天然产物开发与应用

药理研究证明香椿黄酮具有抗氧化^[6]、抑菌^[7]、降糖^[8,9]、降尿酸^[10]等药理作用。

目前已有的文献表明香椿中总黄酮的提取方法^[11]有乙醇提取法、复合酶提取法、超声辅助提取、微波辅助提取等工艺。高文秀^[12]等用复合酶解法协同超声波法提取山楂中总黄酮, 其通过优化后得出复合酶酶解1.5 h, 乙醇体积分数为70%, 料液比为1:40 g/mL, 40 ℃超声提取30 min中总黄酮提取量为85.5 mg/g。相对超声波提取总黄酮提高了46.10%, 比单纤维素酶酶解辅助超声波法提取总黄酮量提高了27.60%。李思阳^[13]比较了乙醇回流提取法和超声提取法对香椿子总黄酮提取量的影响, 发现超声提取法提取效果显著

优于乙醇回流提取法。杨京霞^[14]研究了微波提取中温度、微波频率、萃取溶剂、样品基质等对太和香椿中黄酮类成分含量的影响,结果表明微波提取黄酮类物质相比于有机溶剂提取具有提取率高、产品纯度高、能耗小、操作费用少等优点。目前采用复合酶酶解再进行超声辅助提取香椿老叶中总黄酮的方法未见报道,因此本实验工艺具有一定的创新性。

酶解提取法是将合适浓度的酶加到中草药提取液中以降低提取条件,提高得率的一种方法。在传统提取液的基础上,加入一定量的酶可将构成药材细胞壁和细胞间质的果胶、纤维素、半纤维素等大分子化合物破坏,从而减小细胞壁和细胞间质对有效化学成分的溶出阻力,加快有效成分的溶出速率,降低提取温度,缩短提取时间,提高有效成分的得率^[15]。超声波的空化效应、热效应和机械效应同时作用于香椿老叶中,促进黄酮类物质溶出,提高其得率^[16]。香椿老叶中总黄酮含量高,被废弃不但造成了环境污染,还浪费了宝贵自然资源^[17],因此本实验拟结合已有文献报道,采用两步法提取香椿老叶中的总黄酮,先通过复合蛋白酶破碎香椿老叶中的纤维素和果胶,加速黄酮类物质溶出,再通过超声辅助乙醇二次提取,旨在为香椿资源的综合利用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

香椿老叶采自铜仁市万山区谢桥街道石竹村,60℃烘箱干燥过夜,粉碎后过60目筛,-20℃冰箱保存待用。芦丁标准品购自中国食品药品检定研究院纯度≥98%;果胶酶(50000 U/g)购自南宁庞博生物工程有限公司;纤维素酶(100000 U/g)购自和氏璧生物工程有限公司;无水乙醇购自西安化玻试剂有限公司。

1.2 主要仪器设备

VS-65UE 恒温超声波提取机购自无锡沃信仪器有限公司;紫外可见分光光度计(型号为TU-1901)购自北京普析通用仪器有限公司;纯水仪(型号为New human power I)购自韩国Human公司;电子天平(型号为CPA225D)购自赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;离心机(型号为TDZ4-WS)购自湖南赫西仪器装备有限公司;鼓风干燥箱(型号为DHG-9030A)购自上海慧泰仪器制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 总黄酮得率测定方法

1.3.1.1 供试品的制备

精密称取0.2 g香椿老叶样品于50 mL圆底离心管中,加入适量混合酶溶液提取一段时间后90℃灭活酶10 min,再加入适量无水乙醇配制成不同浓度的乙醇溶液,在一定时间和温度下超声提取。提取液于4000 r/min离心10 min取上清液备用。

1.3.1.2 总黄酮得率计算

精密称取芦丁对照品10.00 mg至50 mL容量瓶中,50%乙醇溶解并定容。即得质量浓度为0.2 mg/mL的芦丁对照品溶液。分别精密吸取该对照品溶液1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL于25 mL容量瓶中,分别加入2 mL 0.5 mol/L AlCl₃溶液,摇匀,静置15 min使其充分显色,用pH=5.8的乙酸/乙酸钠缓冲溶液定容至刻度,超声波震荡5 min,静置15 min,得5个浓度的芦丁测定液。取其中一个浓度的芦丁测定液于紫外可见分光光度计上进行光谱扫描,确定最大吸收波长。将5个测定浓度的芦丁测定液于最大吸收波长处测定吸光度,绘制芦丁标准曲线^[18]。

总黄酮得率(%) = 测得的总黄酮质量(g) / 生药材质量(g) × 100%

1.3.2 酶法辅助提取工艺优化

精密称取0.2 g香椿老叶粉末5份于50 mL圆底离心管中,加入5 mL酶溶液,先后考察酶的种类(果胶酶、纤维素酶、复合酶1、复合酶2、复合酶3),酶用量(0.50%、1.00%、1.50%、2.00%、2.50%, W/V),酶解时间(25 min、30 min、35 min、40 min、45 min),酶解温度(35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃)对香椿老叶总黄酮得率的影响,以总黄酮得率为响应值。

1.3.3 超声辅助乙醇提取的单因素实验

以确定好的酶解辅助提取条件作为前提,进行后续超声辅助乙醇提取。单因素实验分别探究乙醇体积分数(40%、50%、60%、70%、80%),超声功率(100 W、150 W、200 W、250 W、300 W),提取温度(30℃、40℃、50℃、60℃、70℃),提取时间(40 min、50 min、60 min、70 min、80 min)这4个因素对黄酮得率的影响,以提取液中总黄酮得率为指标,探究较佳的参数水平,进行后续响应面优化。

1.3.4 响应面优化设计

在单因素实验基础上,以香椿老叶总黄酮得率为响应值,采用Design-Expert 8.0.6软件中的Box-Behnken的中心组合实验,进一步考察乙醇体积分数、超声功率、超声温度、提取时间对总黄酮得率的影响,优化提取工艺。响应面实验因素与水平设计见表1。

表1 Box-Behnken 中心组合实验设计

Table 1 Design of combined test of Box-Behnken

水平	因素			
	乙醇体积 分数 A/%	超声功 率 B/W	提取温 度 C/℃	提取时 间 D/min
-1	55	150	45	45
0	60	200	50	50
1	65	250	55	55

1.3.5 数据处理

以上数据均重复测量三次取平均值, 采用 Microsoft Excel 2007、SPSS 16.0、Design Expert 8.0 对实验数据进行统计分析和处理。

2 结果与讨论

2.1 芦丁标准曲线

芦丁经 AlCl_3 显色后经光谱扫描得最大吸收波长为 415 nm, 标准曲线回归方程为 $Y=31.72X-1.05$ ($R^2=0.9963$), 可知其在 8~40 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.2 酶辅助提取优化

不同酶对香椿老叶总黄酮得率的影响见图 1a, 可以发现复合酶水解后总黄酮得率比单酶高, 分析其原因可能是两种酶之间具有协同作用, 可以更好地使香椿老叶细胞壁和细胞间质的果胶、纤维素、半纤维素等大分子化合物破坏, 从而可以加快有效成分的溶出速率^[19]。比较实验结果可以发现复合酶 2 对香椿老叶总黄酮得率达到最大, 因此在后续实验中, 我们选用复合酶 2, 果胶酶:纤维素酶=2:1 进行实验。

酶用量对香椿老叶总黄酮得率的影响见图 1b, 随着酶的加入, 得率不断上升, 当复合酶 2 用量达到 2.00% 时得率最高, 随后随着酶的增加得率缓慢下降, 当复合酶 2 浓度高于 2.00% 后, 得率迅速下降。可能原因是当酶浓度过大时, 酶和部分酶解的纤维素将香椿老叶粉末包裹起来, 反而不利于有效成分的溶出, 因此得率降低^[20]。为了保证香椿老叶的纤维素和果胶能尽可能的被降解同时不影响总黄酮物质溶出, 因此后续采用 2.00% 的复合酶 2 进行实验。

酶解时间对香椿老叶总黄酮得率的影响见图 1c, 当时间在 40 min 之前, 随着酶解时间的延长, 得率逐渐升高, 但当酶解时间大于 40 min 后, 随着酶解时间的延长总黄酮的得率没有明显增加, 可能是因为此时大部分的纤维素和果胶已经被酶解完全, 再增加酶解时间也不会提高总黄酮得率。为了节约实验资源, 我

们后续选择 40 min 作为复合酶 2 酶解时间。

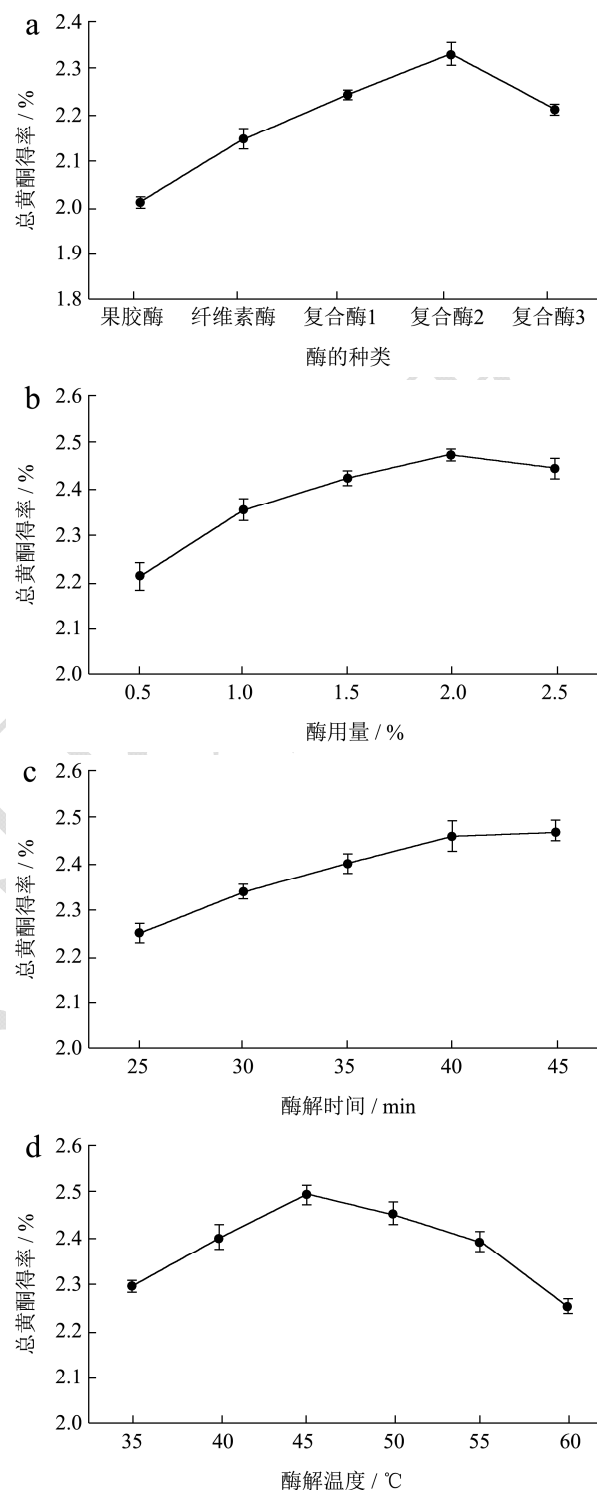


图1 酶解条件对香椿老叶总黄酮得率的影响

Fig.1 Effect of enzymatic hydrolysis conditions on total flavonoids yield in old leaves of *Toona sinensis*

注: 其中复合酶 1 为果胶酶:纤维素酶=1:1、复合酶 2 为果胶酶:纤维素酶=2:1、复合酶 3 为果胶酶:纤维素酶=1:2。

酶解温度对香椿老叶总黄酮得率的影响见图 1d。从图中可以看出, 随着温度的升高, 得率逐渐上升, 当温度达 45 $^{\circ}\text{C}$ 时得率达到最高, 之后随着温度升高

总黄酮得率降低。可能原因是复合酶 2 水解香椿老叶纤维素、果胶的最佳温度就在 45 ℃ 左右, 因此后续采用 45 ℃ 进行实验。

本实验通过单因素实验确定了香椿老叶中果胶、纤维素、半纤维素等大分子化合物酶解的最适宜条件为: 复合酶 2(果胶酶:纤维素酶=2:1), 酶用量为 2.00%, 酶解时间 40 min, 酶解温度 45 ℃, 此时提取液中总黄酮得率最高, 达到 2.49 %。

2.3 单因素实验结果

2.3.1 乙醇体积分数的影响

采用不同浓度的乙醇溶液进行总黄酮的第二步提取, 提取温度为 30 ℃, 超声功率为 200 W, 提取时间为 60 min。乙醇体积分数对香椿老叶总黄酮得率的影响见图 2, 从图中可以看出随着提取液中乙醇体积分数逐渐增加, 得率也逐渐升高, 当乙醇体积分数增至 60% 时, 得率达到 3.58%, 随着乙醇体积分数增大到 80%, 得率下降至 3.08%。推测其原因为香椿老叶中总黄酮在乙醇体积分数为 60% 时溶解度最大。为确定最佳乙醇体积分数, 在响应面优化实验中, 我们将乙醇体积分数设定为 55%、60%、65%。

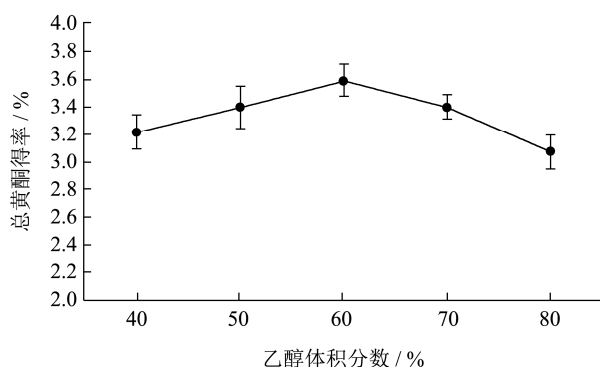


图 2 乙醇体积分数对香椿老叶总黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on extraction rate of total flavonoids from *Toona sinensis* old leaves

2.3.2 超声功率的影响

改变提取过程中超声的功率(100 W、150 W、200 W、250 W、300 W), 提取温度为 30 ℃, 乙醇体积分数为 60%, 提取时间为 60 min。超声功率对香椿老叶总黄酮得率的影响见图 3。从图 3 中可以看出随着超声功率的增加, 得率也逐渐升高, 当超声功率达到 200 W 时, 得率达到 3.67%。随着超声功率继续增大到 250 W, 得率为 3.59%, 无明显上升。这可能是因为当超声功率较低时, 超声对细胞膜的破坏作用较小, 分子运动也不剧烈, 故黄酮浸出率不高; 随着超声功率不断增加, 分子运动加剧, 细胞膜破碎程度加大; 黄酮浸出率也随着升高; 但当超声功率太大时, 细胞膜

并不会无限制破碎, 一些易溶于水的物质先被溶出, 从而造成黄酮得率的降低^[21]。为确定最佳超声功率, 在响应面优化实验中, 我们将超声功率设定为 150 W、200 W、250 W。

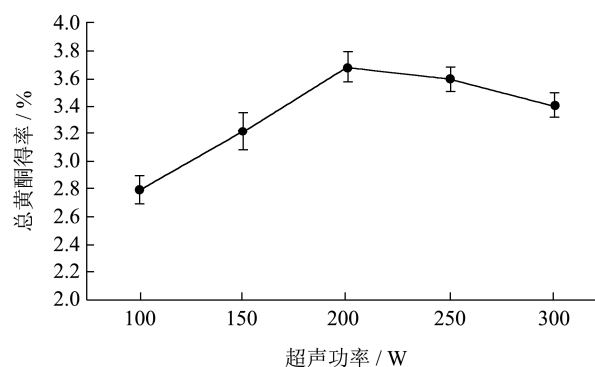


图 3 超声功率对香椿老叶总黄酮得率的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic power on extraction rate of total flavonoids from *Toona sinensis* old leaves

2.3.3 提取温度的影响

改变提取过程中温度(30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃), 乙醇体积分数为 60%, 超声功率为 200 W, 提取时间为 60 min。提取温度对香椿老叶总黄酮得率的影响见图 4。在实验探究的超声温度范围内(30 ℃~70 ℃), 香椿叶黄酮的得率随着初始升温得率提高特别明显, 在 50 ℃ 时得率最高为 3.57%, 之后随着提取温度升高到 60 ℃, 香椿叶中总黄酮的得率降低至 3.52%。推测出现这种现象的原因是黄酮属于热敏性物质, 提取过程中提取温度过高可能会破坏分子结构, 导致得率降低^[22], 因此, 超声温度不宜过高。为确定最佳提取温度, 在响应面优化实验中, 我们将提取温度设定为 45 ℃、50 ℃、55 ℃。

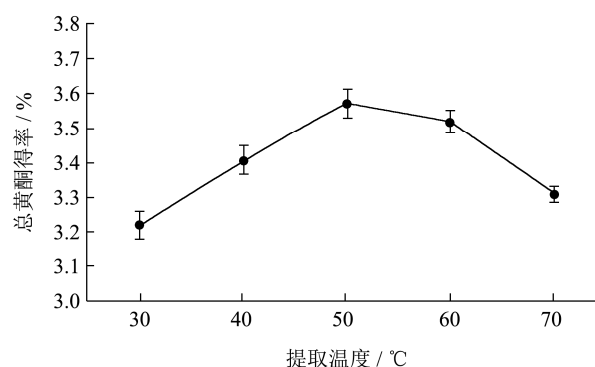


图 4 提取温度对香椿老叶总黄酮得率的影响

Fig.4 Effect of temperature on extraction rate of total flavonoids from *Toona sinensis* old leaves

2.3.4 提取时间的影响

改变提取过程中时间(40 min、50 min、60 min、70 min、80 min), 乙醇体积分数为 60%, 超声功率为 200 W, 提取温度为 30 ℃。提取时间对香椿老叶总黄

酮得率的影响见图 5。从图 5 中可以看出随着提取时间的增加, 得率呈现先上升后平缓的趋势, 在提取时间为 60 min 时总黄酮得率为 3.64%, 推测其原因可能是在实验条件下提取时间变化不大, 因而对香椿老叶总黄酮的得率影响不大, 香椿老叶中的黄酮可以在 60 min 内迅速溶出并达到稳定, 长时间提取不仅无助于得率的提高, 而且增加成本及能源消耗, 对于活性物质的结构也可能产生不良影响^[23]。为确定最佳提取时间, 在响应面优化实验中, 我们将提取时间设定为 45 min、50 min、55 min。

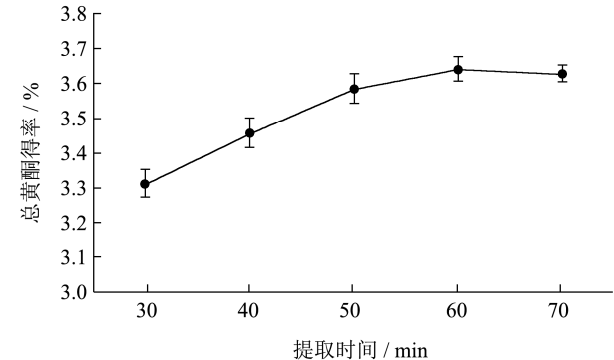


图 5 提取时间对香椿老叶总黄酮得率的影响

Fig.5 Effect of ethanol concentration on extraction rate of total flavonoids from *Toona sinensis* old leaves

2.4 响应面优化提取工艺条件

在单因素实验的基础上, 选取乙醇体积分数(A)、超声功率(B)、超声温度(C)、提取时间(D)4 个因素为变量, 以香椿老叶总黄酮得率为响应值, 采用 Box-Behnken 中心组合设计进行了四因素三水平实验 (表 1), 实验结果及方差分析结果分别见表 2 和表 3。

采用 Design Expert 8.0 软件对表 2 和表 3 中的实验结果进行拟合分析, 得到黄酮提取工艺参数回归模型, 其回归方程为:

$$Y=3.70+0.097A+0.32B+0.069C+0.061D-0.020AB-0.095AC-0.12AD+0.10BC+0.000BD+0.012CD-0.14A^2-0.30B^2-0.10C^2-0.12D^2。$$

从表 3 可知, 黄酮提取工艺参数回归模型的 P 值为 0.0005, 达到极显著水平($p<0.01$), 且失拟项 P 值=0.1441($p>0.05$), 方程与实验拟合度较好, 可用于香椿老叶总黄酮提取的分析与预测。回归方程各项方差分析表明, 4 个影响因素对香椿老叶总黄酮得率影响的大小顺序为: 超声功率>乙醇体积分数>提取温度>提取时间, 各因素两两交互作用对黄酮得率影响的 3D 响应曲面图如图 6。响应面坡度越陡峭且颜色变化越剧烈, 说明因素之间交互作用越明显, 对总黄酮得率影响也越大, 相反则表明因素间交互作用不明显^[24]。

从图 6 可知, 乙醇体积分数和超声功率、提取温度和超声功率、提取时间和超声功率之间的响应面坡度最陡, 超声时间和超声温度几因素的响应面坡度陡峭且颜色变化明显, 而超声温度和乙醇体积分数、提取温度和提取时间两因素之间响应面坡度比较平坦, 交互作用不显著。上述结果与回归方程方差分析结果一致。根据回归模型最优组合分析, 优化的提取工艺参数为: 乙醇体积分数 60.05%、超声功率 227.45 W、提取温度 52.94 °C、提取时间 50.32 min、总黄酮得率预测值为 3.82%。

表 2 Box-Behnken 实验设计及结果
Table 2 Box-Behnken experimental design and corresponding results

编 号	因素				总黄酮 得率/%
	乙醇体 积分数 A/%	超声功 率 B/W	提取温 度 C/°C	提取时 间 D/min	
	分数 A/%	率 B/W	度 C/°C	间 D/min	
1	0	1	1	0	3.82
2	0	0	0	0	3.73
3	-1	0	1	0	3.62
4	0	1	-1	0	3.49
5	0	-1	0	1	2.87
6	0	0	-1	-1	3.43
7	0	1	0	1	3.56
8	0	0	1	-1	3.44
9	-1	-1	0	0	2.68
10	1	-1	0	0	3.22
11	0	0	0	0	3.55
12	0	0	0	0	3.70
13	0	1	0	-1	3.52
14	-1	0	0	1	3.69
15	0	0	0	0	3.82
16	1	0	0	-1	3.57
17	0	0	-1	1	3.49
18	1	0	0	1	3.56
19	0	0	0	0	3.68
20	1	0	-1	0	3.32
21	-1	0	-1	0	3.17
22	0	0	1	1	3.55
23	1	0	1	0	3.39
24	0	-1	1	0	3.02
25	1	1	0	0	3.80
26	-1	1	0	0	3.34
27	0	-1	0	-1	2.83
28	-1	0	0	-1	3.20
29	0	-1	-1	0	3.11

表 3 Box-Behnken 实验方差分析

Table 3 Variance analysis of Box-Behnken experiment

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Model	2.2251	14	0.15893	6.6890	0.0005	**
A-乙醇体积分数	0.11213	1	0.11213	4.7193	0.0475	*
B-超声功率	1.2033	1	1.2033	50.6446	< 0.0001	**
C-提取温度	0.057408	1	0.057408	2.4161	0.1424	
D-提取时间	0.044408	1	0.044408	1.8690	0.1931	
AB	0.0016	1	0.0016	0.067339	0.7990	
AC	0.0361	1	0.0361	1.51934	0.2380	
AD	0.0625	1	0.0625	2.6304	0.1271	
BC	0.0441	1	0.0441	1.8560	0.1946	
BD	0	1	0	0	1.0000	
CD	0.000625	1	0.000625	0.026304	0.8735	
A ²	0.12729	1	0.12729	5.3571	0.0363	*
B ²	0.593881	1	0.59388	24.9946	0.0002	**
C ²	0.069933	1	0.069933	2.9433	0.1083	
D ²	0.095493	1	0.095493	4.0190	0.0647	
残差	0.33265	14	0.023760			
失拟项	0.29453	10	0.029453	3.0905	0.1441	
纯误差	0.03812	4	0.00953			
总回归	2.5577	28				

注: **表示 $p<0.01$, 极显著; *表示 $p<0.05$, 显著。

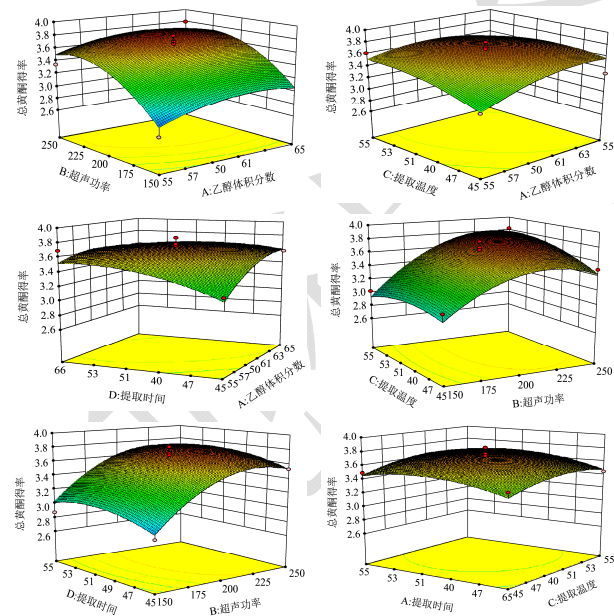


图 6 各因素交互作用对总黄酮得率的影响

Fig.6 Interaction of various factors on the extraction rate of flavonoids

2.5 验证实验

以回归方程预测的最优工艺组合进行香椿老叶总黄酮提取,乙醇体积分数 60.05%、超声功率 227.45 W、

提取温度 52.94 ℃、提取时间 50.32 min。为便于操作选用乙醇体积分数 60%、超声功率 227 W、提取温度 53.00 ℃、提取时间 51 min,实际测得的黄酮得率为 3.85%,与预测值相差仅 0.03%。说明采用 Box-Behnken 组合设计优化得到的香椿老叶总黄酮提取工艺参数准确可靠,可用于实际生产。

3 结论

3.1 本研究采用复合酶协同超声波提取香椿老叶中的总黄酮,总黄酮得率为 3.85%,有效的利用了废弃资源,也为香椿资源的综合利用提供了一定的技术支持。本实验先探究了酶法提取香椿老叶中总黄酮的工艺,通过四个单因素实验确定了最佳酶解条件为采用复合酶 2(果胶酶:纤维素酶=2:1),酶用量为 2.00%,酶解时间 40 min,酶解温度 45 ℃,此时提取液中总黄酮得率最高,达到 2.49%。

3.2 本实验进一步探究了酶解后溶液协同超声辅助提取的工艺,先通过单因素实验研究乙醇体积分数、超声功率、提取温度、提取时间的影响,确定四因素三水平的 Box-Behnken 中心组合实验设计,通过响应面各项方差分析表明,4 个影响因素对香椿老叶总黄酮得率影响的大小顺序依次为: 超声功率>乙醇体积

分数>提取温度>提取时间,通过预测方程确定最佳提取条件为:乙醇体积分数 60.05%、超声功率 227.45 W、提取温度 52.94 °C、提取时间 50.32 min,总黄酮得率预测值为 3.82%。为便于操作选用乙醇体积分数 60%、超声功率 227 W、提取温度 53.00 °C、提取时间 51 min 进行验证实验,实际测得的黄酮得率为 3.85%,与预测值相差仅 0.03%,表明实验工艺可靠。

3.3 本实验通过两步法测得的香椿老叶总黄酮得率比酶解提取法高,进一步优化了实验工艺。本实验所需设备简单、耗时短、提取温度低、耗能低且得率高,非常适合香椿老叶中总黄酮的提取,为香椿老叶的资源利用提供了一个可行的方向。

参考文献

- [1] 赵艳霞,刘常金,宛红颖.香椿老叶中黄酮与皂苷的含量测定[J].食品研究与开发,2016,37(21):137-141
ZHAO Yan-xia, LIU Chang-jin, WAN Hong-ying. Determination of flavonoids and saponins in old leaves of *Toona sinensis* [J]. Food Research and Development, 2016, 37(21): 137-141
- [2] 刘智峰.酶法-超声波辅助提取香椿叶中总黄酮及抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2015,36(20):314-319
LIU Zhi-feng. Study on enzymatic-ultrasonic assisted extraction of total flavonoids from *Tone sinensis* and its anti-oxidation activities [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(20): 314-319
- [3] HSEU You-cheng, CHANG Wen-hui, CHEN Cheeshan, et al. Antioxidant activities of *Toona sinensis* leaves extracts using different antioxidant models [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(1): 105-114
- [4] 丁世洪,刘兵,赵淑伟,等.香椿子多糖提取工艺及体外抗氧化活性研究 [J].中国中医药信息杂志,2016,23(3):96-99
DING Shi-hong, LIU Bing, ZHAO Shu-wei, et al. Study of extraction process of polysaccharide from seeds of *Toona sinensis* and antioxidant activity *in vitro* [J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2016, 23(3): 96-99
- [5] 孙小祥,杨娅娅,盛玉青,等.香椿叶中多酚类成分的研究[J].中成药,2016,38(9):1974-1977
SUN Xiao-xiang, YANG Ya-ya, SHENG Yu-qing. Polyphenols from the leaves of *Toona sinensis* [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2016, 38(9): 1974-1977
- [6] 王晓敏,杨慧,张乐,等.香椿废弃组织中总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2016,37(11):232-237
WANG Xiao-min, YANG Hui, ZHANG Le, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from the abandoned branches of *Toona sinensis* and antioxidant activities evaluation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(11): 232-237
- [7] 王振恒,林丽,牛新迈,等.香椿子总黄酮体外抑菌作用研究 [J].中兽医医药杂志,2014,33(2):51-54
WANG Zhen-heng, LIN Li, NIU Xin-mai, et al. *In vitro* antibacterial activity of total flavonoids from fructus *Toonae sinensis* [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2014, 33 (2): 51-54
- [8] 任美萍,李春红,李蓉.香椿总黄酮对糖尿病小鼠及正常小鼠血糖的影响[J].泸州医学院学报,2012,35(3):261-262
REN Mei-ping, LI Chun-hong, LI Rong, et al. Effect of total flavonoid from *Toona sinensis* on blood glucose of diabetic and normal mice [J]. Journal of Luzhou Medical College, 2012, 35 (3): 261-262
- [9] 张典,姜凤良,黄黎,等.香椿叶总黄酮对糖尿病小鼠血糖的影响[J].西北药学杂志,2011,26(4):270-271
ZHANG Dian, JIANG Feng-liang, HUANG Li, et al. Effects of total flavonoid of *Toona sinensis* leaves on the blood glucose of diabetes mice [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2011, 26 (4): 270-271
- [10] 王昌禄,李贞景,江慎华,等.香椿叶总黄酮对高尿酸血症小鼠影响研究[J].辽宁中医杂志,2011,38 (10):1933-1935
WANG Chang-lu, LI Zhen-jing, JIANG Shen-hua, et al. Hypouricemic action of total flavonoids from *Toona sinensis* leaves [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2011, 38 (10): 1933-1935
- [11] 孟繁姝.香椿叶黄酮类化合物酶法转化条件的研究[D].天津:天津科技大学,2010
MENG Fan-shu. Enzymatic transformation of flavonoids from Chinese *Toona sinensis* leaves [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2010
- [12] 高文秀,杨艳艳,赵文卓,等.复合酶解法协同超声波法提取山楂中总黄酮的工艺条件优化[J].食品工业科技,2014, 35(2):175-178,182
GAO Wen-xiu, YANG Yan-yan, ZHAO Wen-zhuo, et al. Optimization of technological conditions for extraction of total flavonoids from hawthorn by combined enzymatic hydrolysis and ultrasonic method [J]. Food Industry Science and Technology, 2014, 35(2): 175-178, 182
- [13] 李思阳,孔庆新,庄润泽,等.香椿子中总黄酮提取工艺的优化和比较[J].中成药,2017,39(10):2178-2182
LI Si-yang, KONG Qing-xin, ZHUANG Run-ze, et al. Optimization and comparison of extraction technology of

- total flavonoids from the seeds of *Toona sinensis* [J]. Chinese Patent Medicine, 2017, 39(10): 2178-2182
- [14] 杨京霞,张鹏鹏.微波提取太和香椿黄酮类物质的研究[J]. 黑龙江农业科学,2015,12:127-129
YANG Jing-xia, ZHANG Peng-peng. Microwave extraction of flavonoids from *Toona sinensis* [J]. Heilongjiang Agricultural Science, 2015, 12: 127-129
- [15] 王晓,李林波,马小来,等.酶法提取山楂叶中总黄酮的研究[J].食品工业科技,2002,23(3):37-38
WANG Xiao, LI Lin-bo, MA Xiao-lai, et al. Enzymatic extraction of total flavonoids from hawthorn leaves [J]. Food Industry Science and Technology, 2002, 23(3): 37-38
- [16] 孙娜,王华,朱秀娟,等.响应面法优化野生五叶草莓总黄酮提取工艺[J].四川理工学院学报(自然科学版),2019, 32(3):1-6
SUN Na, WANG Hua, ZHU Xiu-juan, et al. Optimization of extraction process of flavonoids from wild five-leaf strawberry by response surface method [J]. Journal of Sichuan University of Technology (Natural Science Edition), 2019, 32(3): 1-6
- [17] 赵雷,张美娟,田野,等.香椿老叶中黄酮的提取工艺研究[J].煤炭与化工,2016,39(8):60-62,67
ZHAO Lei, ZHANG Mei-juan, TIAN Ye, et al. Study on extraction technology of flavonoids from old leaves of *Toona sinensis* [J]. Coal and Chemical Industry, 2016, 39(8): 60-62, 67
- [18] 任顺成,丁霄霖.玉米须黄酮类测定方法的研究[J].食品科学,2004,3(24):139-142
REN Shun-cheng, DING Xiao-lin. Determination of flavonoids in corn whisker [J]. Food Science, 2004, 3(24): 139-142
- [19] Meriem Bensmira, Bo Jiang. Effect of some operating variables on the microstructure and physical properties of a novel Kefir formulation [J]. Journal of Food Engineering, 2012, 108: 579-584
- [20] 穆易君,陈洋,孙晶,等.纤维素酶-超声联合提取菠菜中总黄酮及其成分分析[J/OL].食品工业科技:1-16[2019-07-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.ts.20190604.1411.006.html>
MU Yi-jun, CHEN Yang, SUN Jing, et al. Cellulose enzyme - ultrasound combined extraction of total flavonoids in spinach and its component analysis [J/OL]. Food industry science and technology: 1-16 [2019-07-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.ts.20190604.1411.006.html>
- [21] 孟志芬,谷永庆,张伟钢.香椿叶总黄酮的微波提取工艺[J].光谱实验室,2008,6:1095-1098
MENG Zhi-fen, GU Yong-qing, ZHANG Wei-gang. Microwave extraction process of total flavonoids from Chinese *Toona sinensis* leaves [J]. Spectroscopic Laboratory, 2008, 6: 1095-1098
- [22] 蔡春芳,庞海霞.超声提取香椿叶中黄酮的工艺优化[J].皮革与化工,2018,35(3):12-16
CAI Chun-fang, PANG Hai-xia. Optimization of ultrasonic extraction of flavonoids from Chinese *Toona sinensis* leaves [J]. Leather and Chemical Industry, 2008, 35(3): 12-16
- [23] Wang KJ, Yang CR, Zhang YJ. Phenolic antioxidants from Chinese *Toona sinensis* (fresh young leaves and shoots of *Tonna sinensis*) [J]. Food chemistry, 2007, 101(1): 365-371
- [24] 李欣燃,朱淼,韩世明,等.刺梨叶总黄酮超声辅助提取工艺优化[J].食品研究与开发,2019,40(12):189-193
LI Xin-ran, ZHU Miao, HAN Shi-ming, et al. Ultrasonic assisted extraction process optimization of total flavonoids in leaves of *Rosa roxburghii* Tratt [J]. Food Research and Development, 2019, 40(12): 189-193

(上接第 125 页)

- [23] Chalmers M, Careche M, Mackie IM. Properties of actomyosin isolated from cod (*Gadus morhua*) after various periods of storage in ice [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1992, 58(3): 375-383
- [24] Macé S, Joffraud J J, Cardinal M, et al. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (*Salmo salar*) fillets stored under modified atmosphere packaging [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 160(3): 227-238
- [25] Macé S, Cardinal M, Jaffrès E, et al. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled cooked whole tropical shrimp (*Penaeus vannamei*) stored under modified atmosphere packaging [J]. Food Microbiology, 2014, 40(2): 9-17
- [26] 刘爱芳,谢晶,钱韻芳.冷藏金枪鱼优势腐败菌致腐败能力[J].食品科学,2018,19(3):7-14
LIU Ai-fang, XIE J, QIAN Yun-fang. Spoilage potential of dominant spoilage bacteria from chilled tuna (*Thunnus obesus*) [J]. Food Science, 2018, 19(3): 7-14