

Extraction of Resveratrol from Peanut Bud with Combining Microwave Irradiation and Ultrasonic Wave

Ning Qin^{1,2}, Qing Min^{1*}, Mixia Ma^{2,3}, Junjun Zhang^{1,2}, Yuting Bai¹, Kaiyuan Shao², Wenxiang Hu^{2,3,4*}

¹School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei

²Jingdong Xianghu Microwave Chemistry Union Laboratory, Beijing Excalibur Space, Military Academy of Medical Sciences, Beijing

³Wuhan Institute of Technology, Wuhan Hubei

⁴Space Systems Division, Strategic Support Troops, Chinese People's Liberation Army, Beijing

Email: *baimin0628@163.com, *huwx66@163.com

Received: Jul. 2nd, 2018; accepted: Jul. 17th, 2018; published: Jul. 24th, 2018

Abstract

In this paper, Resveratrol plant extract was extracted from Peanut buds by the combination extraction method of microwave irradiation and ultrasonic wave, and the content of resveratrol was determined by HPLC. Based on the constant microwave power of 600 W and ultrasonic wave power of 1500 W, the main and secondary influencing factors of ethanol concentration, action time and extraction temperature were investigated through the orthogonal test of L₁₆ (4³). The results show that the combination of microwave irradiation and ultrasonic wave has high efficiency in extracting resveratrol from peanut buds. With the extraction method combined microwave irradiation and ultrasonic wave, the ethanol concentration is the main influencing factor, then the extraction temperature, and finally the action time. The optimal extraction process is 40% ethanol of the extract solvent, 3 min of the action time, and 65°C of the extracting temperature.

Keywords

Peanut Bud, Resveratrol, Extraction with Microwave Irradiation, Ultrasonic Waves Extraction, Orthogonal Test, HPLC

花生芽中白藜芦醇的微波和超声波组合提取研究

秦宁^{1,2}, 闵清^{1*}, 马密霞^{2,3}, 张军军^{1,2}, 白育庭¹, 邵开元², 胡文祥^{2,3,4*}

*通讯作者。

文章引用: 秦宁, 闵清, 马密霞, 张军军, 白育庭, 邵开元, 胡文祥. 花生芽中白藜芦醇的微波和超声波组合提取研究[J]. 微波化学, 2018, 2(2): 50-55. DOI: 10.12677/mc.2018.22008

¹湖北科技学院药学院, 湖北 咸宁

²北京神剑天军医学科学院京东祥鹤微波化学联合实验室, 北京

³武汉工程大学, 湖北 武汉

⁴中国人民解放军战略支援部队航天系统部, 北京

Email: *baimin0628@163.com, *huwx66@163.com

收稿日期: 2018年7月2日; 录用日期: 2018年7月17日; 发布日期: 2018年7月24日

摘要

本文采用微波和超声波组合法从花生芽中提取白藜芦醇浸膏, 并以HPLC法测定所得到的浸膏中白藜芦醇含量。在恒定微波功率600 W和超声波功率1500 W基础上, 通过L₁₆ (4³)正交试验, 考察了乙醇浓度、作用时间和提取温度三个因素对提取效果的影响。优选花生芽在微波和超声波组合作用条件下的最佳提取工艺, 并考察该提取法提取白藜芦醇的效果。研究表明, 微波和超声波组合作用对于花生芽中提取白藜芦醇具有较高的效率。采用这种组合作用的提取方法, 乙醇浓度为主要影响因素, 然后是提取温度, 最后是作用时间。最优的提取工艺是提取溶剂为40%乙醇、微波和超声波作用时间为3 min和提取温度为65℃。

关键词

花生芽, 白藜芦醇, 微波提取, 超声波提取, 正交试验, HPLC

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

花生芽是花生种子发芽后在一定时间内长成的以子叶和茎为主的一种具有丰富营养的可食用植物, 也称长寿芽。其中含有丰富的维生素、钾、钙、铁、锌等矿物质及人体所需的各种氨基酸和微量元素。花生芽中生物活性物质含量最高的是一种叫做白藜芦醇的化学物质, 有研究发现花生芽中的白藜芦醇含量比花生种子高 100 倍。据有关报道, 白藜芦醇具有一定的抗衰老、抗癌、抗疲劳、助消化、降血脂、排毒养颜等综合食疗保健功效[1] [2] [3]。但白藜芦醇对于健康的实际作用效能, 目前还缺乏足够的证据。然而白藜芦醇作为一种多羟基芪类物质, 是天然的抗氧化剂。这类物质具有抗氧化、抗自由基作用功能。它主要通过清除或抑制自由基生成, 抑制脂质过氧化、调节抗氧化相关酶活性等机制发挥抗氧化作用。

白藜芦醇(resveratrol, Res)是具有芪类结构的一种非黄酮类多酚化合物, 又称为芪三酚, 化学名称为:(E)-3,5,4-三羟基二苯乙烯(见图 1)。本品为无色针状结晶, 难溶于水, 易溶于乙醚、氯仿、乙醇等有机溶剂[4]。综合考虑到实验操作的安全性与所用试剂的经济性, 选择含水乙醇为提取溶剂为宜。白藜芦醇在碱性(pH > 10 时)和光照条件下, 稳定性较差。即使是在避光条件下, 高纯度白藜芦醇的乙醇溶液也仅能稳定数天。因此, 在进行白藜芦醇含量分析时, 对照品溶液和样品溶液要求随用随配。

许多植物中都包含有天然的白藜芦醇, 主要存在于葡萄、虎杖、花生、桑椹等植物中。植物中白藜芦醇主要以反式结构形式存在。研究表明, 反式异构体的生理活性强于顺式异构体。

目前, 白藜芦醇提取方法主要有溶剂提取法(醇提法、水提法、薄层色谱法、超声波辅助提取法、微

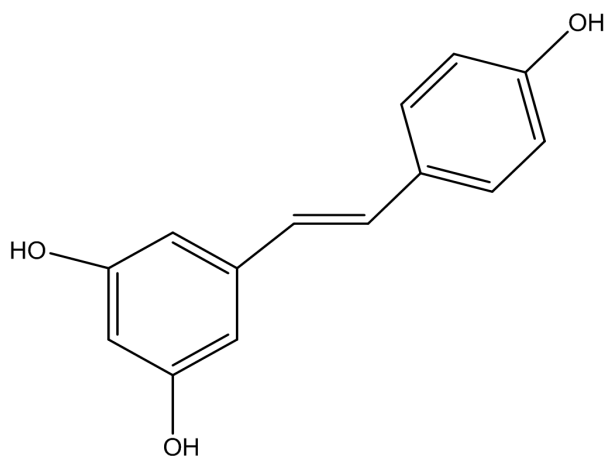


Figure 1. The molecular structure of 5-[(E)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl] benzene-1,3-diol (resveratrol)

图 1. (E)-5-[2-(4-羟苯基)-乙烯基]-1,3-苯二酚(白藜芦醇)的分子结构

波辅助提取法等)、酶提取法(复合酶:纤维素酶 + 阿魏酸酯酶)、超临界流体萃取法三类。

在参考文献的基础上[5] [6],本文结合北京祥鹤科技发展有限公司的 XH-300UL 电脑微波超声波紫外光组合催化合成仪,采用超声波与微波组合方法从花生芽中分离提取白藜芦醇。通过 $L_{16} (4^3)$ 正交试验,优选花生芽的最佳提取工艺,并考察超声波和微波组合提取法提取白藜芦醇的效果。

2. 仪器与试剂

2.1. 仪器

XH-300UL 电脑微波超声波紫外光组合催化合成仪(北京祥鹤科技发展有限公司),旋转蒸发器 RE-52 (上海亚荣生化仪器厂),RIGOL L-3000 高效液相色谱仪(北京普源精电科技有限公司),RIGOL 高压恒流泵,紫外可变波长检测器,Ultra 色谱工作站,KQ-5200 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),恒温磁力搅拌器,HG-9076A 型温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),电子天平,异形三口瓶(250 ml),量筒,烧杯,酒精计等。

2.2. 试剂与药材

无水乙醇,95%乙醇,乙腈,甲醇(以上试剂均为分析纯),双蒸水,蒸馏水,花生芽(批号:20180401,湖南长沙)等。

3. 提取方法与结果

3.1. 花生芽的预处理

本实验购买到的花生芽是冷藏的鲜品,因含有大量的水分,因此首先对其进行解冻干燥。从冰箱中取出花生芽,放入 2000 ml 加有水的烧杯中,清洗干净后,放入鼓风干燥箱中,于 60°C 条件下烘 24 h,烘干后,粉碎,过 60 目筛,得花生芽粉,装袋记录批号(20180405)。

3.2. 花生芽中白藜芦醇提取的正交试验

3.2.1. 实验步骤

本实验考察了提取溶剂[7]乙醇的浓度(A)、反应时间(B)和反应温度(C)三个因素在四个水平上对花生

芽中白藜芦醇提取效果的影响。具体实验操作为：称取花生芽粉(批号：20180405) 3.0 g 于 250 ml 的异形三口瓶中，加入相应浓度的含水乙醇 100 ml，搅拌均匀后，室温静置 20 min，然后在 XH-300UL 电脑微波超声波紫外光组合催化合成仪中，设置微波恒定功率为 600 W，超声波恒定功率为 1500 W，提取温度和提取时间按照正交表进行[8] [9] [10]。因素水平表见表 1，正交试验结果表见表 2。

Table 1. Table of factors for the extraction of resveratrol in peanut buds

表 1. 花生芽中白藜芦醇提取的因素水平表

水平	因素		
	乙醇浓度 A (%)	提取时间 B (min)	提取温度 C (°C)
1	40	3.0	65
2	50	3.5	70
3	60	4.0	75
4	70	4.5	80

Table 2. Orthogonal test results of resveratrol extraction from peanut buds

表 2. 花生芽中白藜芦醇提取的正交试验结果

试验号	因素			浸膏重量(g)	浸膏得率(%)	浸膏得率评分	白藜芦醇含量(%)	白藜芦醇含量评分	综合评分
	A	B	C						
1	1	1	1	0.90	30.00	22.64	0.4977	60.00	82.64
2	1	2	2	1.59	53.00	40.00	0.2932	35.35	75.35
3	1	3	3	0.76	25.33	19.12	0.2819	33.98	53.10
4	1	4	4	0.97	32.33	24.40	0.0378	4.56	28.96
5	2	1	2	0.87	29.00	21.89	0.0328	3.95	25.84
6	2	2	1	0.80	26.67	20.13	0.0225	2.71	22.84
7	2	3	4	1.25	41.67	31.45	0.0348	4.20	35.64
8	2	4	3	1.26	42.00	31.70	0.0076	0.92	32.61
9	3	1	3	1.33	44.33	33.46	0.0259	3.12	36.58
10	3	2	4	1.12	37.33	28.18	0.0060	0.72	28.90
11	3	3	1	1.03	34.33	25.91	0.0486	5.86	31.77
12	3	4	2	1.00	33.33	25.16	0.0247	2.98	28.13
13	4	1	4	1.06	35.33	26.67	0.0281	3.39	30.05
14	4	2	3	0.68	22.67	17.11	0.0900	10.85	27.96
15	4	3	2	0.97	32.33	24.40	0.0193	2.33	26.73
16	4	4	1	0.95	31.67	23.90	0.0860	10.37	34.27
K ₁	60.01	43.78	42.88						
K ₂	29.23	38.76	22.29						
K ₃	31.35	36.81	37.56						
K ₄	29.75	30.99	30.89						
R	30.78	12.79	20.59						

3.2.2. 浸膏得率

以含水乙醇为提取溶剂，从花生芽中提取到的药液，用减压抽滤得到滤液，将滤液用旋转蒸发仪回收溶剂，浓缩至适量的药液，倒入干燥至恒重的蒸发皿中，置水浴锅上蒸干后，放冷，称量记录数据。得到的每份浸膏重占每份原药材总重的百分率即为浸膏得率。公式为：浸膏得率 = (每份浸膏重/每份花生芽粉重) × 100%。

3.2.3. 白藜芦醇含量测定的色谱条件

色谱分析柱：迪马 C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm)；流动相：乙腈 - 水，紫外检测波长：315 nm；流速：1 mL/min；柱温为 30℃，采集时间为 20 min，梯度洗脱如表 3 所示[11] [12]。

3.2.4. 花生芽中提取白藜芦醇的评分

在从花生芽中提取白藜芦醇的工艺优选中，对正交试验中的 2 个评价指标采用综合评分法进行数据分析。浸膏内除了含有白藜芦醇外，还含有其它多种有一定药理作用的化学成分，但以白藜芦醇的药效作用研究最为明确可靠。因此本实验设定花生芽的浸膏得率和白藜芦醇含量 2 个评价指标，并评估了两个指标对于本文的重要性，拟设定它们的权重系数分别为 0.4 和 0.6。

综合评分计算公式：

$$Y = \sum_{i=1}^n [\alpha_i X_i / \text{Max}(X_i)]$$

Y 为综合评分值； n 为试验评价指标项数； α_i 为某项试验评价指标的评分权重，其中 $\sum_{i=1}^n \alpha_i = 1$ ； X_i 为某项试验评价指标值， $\text{Max}(X_i)$ 为某项最大试验评价指标值。

文中， $n = 2$ ，浸膏权重 $\alpha_1 = 0.4$ ，含量权重 $\alpha_2 = 0.6$ ； $X_1 =$ 浸膏得率， $X_2 =$ 白藜芦醇含量。最大浸膏得率 $\text{Max}(X_1) = 53.00$ ；最大含量 $\text{Max}(X_2) = 0.4977$ 。

试验结果：由以上正交试验结果表可以得到影响花生芽提取得到浸膏和从花生芽中提取得到的白藜芦醇含量的综合评分大小的因素间关系为： $A > C > B$ ，最优组合为： $A_1 B_1 C_1$ 。由此可知，提取溶剂乙醇浓度对花生芽提取评分的大小具有显著影响，其次是提取温度对提取结果的影响较大，提取时间对提取评分的影响较小，用直观分析的方法根据影响的主次因素得出花生芽的最佳的提取工艺为： $A_1 B_1 C_1$ ，为正交试验 1 号，即 40%乙醇为提取溶剂、提取时间为 3 min，提取温度为 65℃。

4. 讨论

在植物中，一般具有生物活性的物质常常是被包裹在细胞或液泡内。细胞壁主要是由许多纤维构成的，而细胞膜则镶嵌有蛋白质的磷脂，通常情况下破壁和破膜都比较困难[13]。微波场是一种高频交互磁场电场，具有很强的穿透性，可以瞬间致使细胞壁纤维变形，细胞发生破裂，使得包裹在细胞内的有效成分溶出。另一方面，在微波辐射下，细胞膜中的蛋白质分子被极化，迅速吸收微波能升温变性，蛋白

Table 3. Gradient elution table
表 3. 梯度洗脱表

时间(min)	乙腈(%)	水(%)	总流速(mL/min)
0	28	72	1.0
7	72	28	1.0
9	72	28	1.0
20	28	72	1.0

质化学结构遭受到破坏,引起细胞膜破裂,导致膜内有效成分破膜溶出[14]。因此,微波辐射具有快速破壁和破膜功能,微波提取植物中的有效成份[15]就是利用了这种“细胞破壁理论”。

超声波的提取原理主要是利用超声波的机械作用和空化作用性质。超声波作用于植物组织,可以促进组织中的物质做剧烈的强迫运动,产生了一种单向力,可以促使物质之间的扩散、传递等作用;另一方面超声波作用于细胞及其胞内的有效成分,瞬间产生大量小气泡,使得细胞膜和液泡局部出现拉应力,这种强大的拉应力把液体“撕开”成一空洞,即空化作用,导致破壁破膜。因此,超声波提取植物中的有效成分具有保持有效成分性质、高效、快速等优点[16]。

微波和超声波共同作用下,既加速了细胞壁和细胞膜破裂又可将膜内的有效成分迅速地扩散并溶解于提取溶剂中。因此,一般情况下,只要功率的大小合适,在微波和超声波共同作用下,将会导致细胞完全破裂,可一次性完成提取任务,不必像单纯热效应那样需要多次提取,或者采用索氏提取器长时间的连续提取,从而,大大地提高了植物提取效率,而且简便、快速、节省提取剂用量,比加热回流提取 100 min [13]节省时间 33 倍。

5. 结论

在恒定微波功率 600 W 和超声波功率 1500 W 条件下,从花生芽中提取白藜芦醇的效率主要影响因素是提取液乙醇的浓度,其次是提取温度,最后是提取时间。实验结果表明,40%乙醇为提取溶剂、提取时间为 3 min,提取温度为 65℃,是最佳的提取工艺条件。

本研究通过正交试验设计和综合评分法优选出的花生芽中微波超声波组合提取白藜芦醇的工艺,具有快速、高效、简便易行,且稳定可靠的特点,可以为进一步研究开发花生芽中的白藜芦醇提供参考价值。

参考文献

- [1] 张俊, 郜海燕, 葛林梅, 等. 花生根、茎中白藜芦醇含量影响因素[J]. 农业工程学报, 2009(S1): 251-254.
- [2] 于丽娜, 张初署, 毕洁, 等. 不同花生品种制作花生芽及营养成分分析[J]. 食品工业科技, 2017, 38(14): 304-309.
- [3] 单辉君, 张名位, 张瑞芬, 等. 花生根中白藜芦醇提取工艺的优化[J]. 农业机械学报, 2008, 39(2): 93-97.
- [4] 李先宽, 李赫宇, 李帅, 等. 白藜芦醇研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(14): 2568-2578.
- [5] 吴艳敏. 微波辅助提取葡萄籽中白藜芦醇的研究[J]. 黑龙江科技信息, 2008(5): 9.
- [6] 陶志杰, 王改玲, 项蕊, 等. 花生芽茎白藜芦醇的酶解辅助提取工艺[J]. 蚌埠学院学报, 2018, 7(2): 14-18.
- [7] 李婷, 李胜, 张青松, 等. 酶法提取葡萄皮渣中白藜芦醇工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 194-197.
- [8] 陈琼玲, 刘红芝, 刘丽, 等. 高压-微波法提取花生根中白藜芦醇[J]. 食品科学, 2013, 34(20): 43-48.
- [9] 谭属琼, 谢勇武. 超声波辅助酶法优选花生芽中白藜芦醇提取工艺[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2016, 34(4): 68-74.
- [10] 刘仁旺, 滕增辉, 张邦乐, 等. 虎杖中白藜芦醇和白藜芦醇苷的提取及含量测定[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(3): 197-199.
- [11] 周春山, 向海艳, 肖建波, 等. 高效液相色谱法测定虎杖中白藜芦醇及其苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2005(5): 534-536.
- [12] 王利敏, 刘兵兵. 高效液相色谱法测定复方虎杖紫草油中虎杖苷和白藜芦醇的含量[J]. 海峡药学, 2011, 23(12): 79-81.
- [13] 周慧恒. 花生芽白藜芦醇减压热回流提取及薄层分析[J]. 饮料工业, 2017, 20(1): 13-16.
- [14] 喻博伦, 黄莉, 邱西克, 等. 花生种子白藜芦醇含量 QTL 定位分析[J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(1): 35-41.
- [15] 韩谢, 吴元欣, 邵开元, 胡文祥. 微波萃取技术在天然产物提取中的应用[J]. 微波化学, 2017, 1(1): 3-7.
<https://doi.org/10.12677/mc.2017.11002>
- [16] 刘婷, 欧阳梦云, 王燕, 等. 刺葡萄酒渣中白藜芦醇的超声辅助提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 160-164.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：mc@hanspub.org