

DOI:10.12171/j.1000-1522.20200030

低共熔溶剂提取马尾松松针抗氧化成分的研究

傅 钰¹ 史 璇¹ 张道明¹ 张锡宇¹ 符 群^{1,2}

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:【目的】马尾松松针富含多酚、黄酮类化合物, 具有多种活性功能。通过对马尾松松针的低共熔溶剂(DES)提取物的制备及其抗氧化活性进行研究, 深度开发林下资源, 获得与传统提取方式相比更加绿色环保、活性优良并且高效的制备方法。【方法】采用超声波技术辅助低共熔溶剂提取马尾松松针中活性成分, 首先通过对比提取效果对 3 种低共熔溶剂进行了筛选, 进一步在选定的低共熔溶剂(氯化胆碱/葡萄糖)基础上, 进行液料比、超声温度、超声时间、超声功率对提取效果影响的单因素试验。在单因素试验基础上, 以多酚、黄酮得率为指标, 响应面法优化主要工艺参数, 对比提取物与传统醇提物对 DPPH·、ABTS⁺ 的清除能力以及还原能力的差异。【结果】马尾松松针提取物的最佳提取工艺为: 液料比为 10 mL/g, 超声温度为 48 ℃, 超声时间为 60 min, 超声功率为 300 W。在此条件下, 多酚得率为 7.387%, 黄酮得率为 10.377%, 回归模型拟合良好, 与醇提物相比, 低共熔溶剂提取物的抗氧化活性整体优于醇提物。【结论】采用超声波技术辅助低共熔溶剂提取的马尾松松针提取物的得率显著高于普通醇提法, 通过显著性分析比较得出 DES 提取物抗氧化活性显著优于醇提物。该方法绿色环保, 可实现高效提取马尾松松针成分, 并充分保持其生物活性, 在提升马尾松的资源利用方面具有一定的意义。

关键词: 马尾松; 低共熔溶剂; 黄酮; 多酚; 抗氧化

中图分类号: TQ352; S791.248 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2021)07-0149-10

引文格式: 傅钰, 史璇, 张道明, 等. 低共熔溶剂提取马尾松松针抗氧化成分的研究 [J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(7): 149-158. Fu Yu, Shi Xuan, Zhang Daoming, et al. Antioxidant activities in extracts from *Pinus massoniana* needles by deep eutectic solvents[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2021, 43(7): 149-158.

Antioxidant activities in extracts from *Pinus massoniana* needles by deep eutectic solvents

Fu Yu¹ Shi Xuan¹ Zhang Daoming¹ Zhang Xiyu¹ Fu Qun^{1,2}

(1. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China;

2. Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: [Objective] The pine needles of *Pinus massoniana* are rich in polyphenols and flavonoids with multiple active functions. In this paper, the preparation and antioxidant activity of the deep eutectic solvents (DES) extract of pine needles of *P. massoniana* were studied to deepen the exploitation of the undergrowth resources under tree crowns and to provide a more environmentally-friendly extraction method of active ingredients with more activities and higher efficiencies compared with traditional ways. [Method] Active ingredients were extracted from *P. massoniana* needles by ultrasonic technology under the assistance of DES. Firstly, three kinds of DES were screened by comparing the extraction effect. Then, based on the selected DES-choline chloride/glucose, a single factor test was conducted on the effect of liquid-solid ratio, ultrasonic temperature, ultrasonic time and ultrasonic power on the extraction effect. Based on single factor

收稿日期: 2020-01-21 修回日期: 2020-09-06

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFC0500307-07)。

第一作者: 傅钰。主要研究方向: 农产品加工。Email: 354071803@qq.com 地址: 150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和兴路 26 号东北林业大学林学院。

责任作者: 符群, 博士, 高级工程师。主要研究方向: 天然产物分离与制备及功能性质研究。Email: nefufuqun@163.com 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

experiments, different capacities between DES extract and conventional ethanol extract to scavenge and reduce DPPH $\cdot$, ABTS $^{+}\cdot$ was compared with the yield of polyphenols and flavonoids taken as indexes and response surface method as the optimization of main process parameter. [Result] The optimal process to produce *P. massoniana* needle extract was: ratio of liquid to solid 10 mL/g, ultrasonic temperature 48 $^{\circ}\text{C}$, ultrasonic time 60 min, ultrasonic power 300 W, yield of polyphenol in the above condition 7.387%, yield of flavonoids in the above condition 10.377%, regression model fits well. The antioxidant activity of DES extract was overall better than that of the conventional ethanol extract. [Conclusion] Ultrasonic technology under the assistance of DES has higher yield of the *P. massoniana* needles extract compared with conventional extraction methods, and it has significant effect on the antioxidant activity compared with ethanol extraction method. So this method can provide efficient extraction of *P. massoniana* needles ingredients while fully maintaining the biological activity. So this method can provide efficient extraction of *P. massoniana* needles ingredients while fully maintaining the biological activity. It will be significant in the resource utilization of the *P. massoniana*.

Key words: *Pinus massoniana*; deep eutectic solvent; flavonoid; polyphenol; antioxidant

马尾松(*Pinus massoniana*)为松属乔木,在我国分布甚广,从华东、华南到华中、西南均有分布,是一种重要的荒山造林树种。马尾松松针是主要药用部位,与其他松科植物相比,富含黄酮及多酚类化合物,此外还含有多糖、挥发油、木脂素、莽草酸等成分,具有抗氧化、抑菌防腐、降糖降血脂、抗癌和护肝的功效,多用于食品工业和医药领域^[1-2]。

目前,松科植物活性成分的提取方法为有机溶剂浸提、以微波、超声波等辅助提取,乙醇为常用溶剂。徐丽珊等^[3]通过对水提法和醇提法进行比较,发现水提法对提取松针黄酮类化合物的影响优于醇提法。张霞^[4]以超声波辅助乙醇提取油松松针中的类黄酮,最高提取率为3.66%。战英等^[5]通过微波辅助乙醇提取红松(*Pinus koraiensis*)松针总黄酮提取率为3.37%。王冉等^[6]利用超声波辅助乙醇提取红松松针总黄酮,得率约为5.82%。赵玉红等^[7]对樟子松(*Pinus sylvestris*)树皮中的松多酚进行提取,对比了有机溶剂提取法、超声波-复合酶法和超声辅助提取法对提取效果的影响,研究发现:目前的提取方法普遍存在溶剂消耗量大、提取效率低和提取物纯度低等问题,如水提后的粗提取物中除含有目标产物黄酮类化合物外,还会混入一些可溶物,如氨基酸、多糖、蛋白质等,会大大影响产物的纯度。因此,探索一种选择性强、绿色高效的提取方法来实现松针中黄酮类和多酚类的快速提取十分必要。

Abbott等^[8]于2003年在离子液体之后首次提出一种新型绿色溶剂——低共熔溶剂(deep eutectic solvent, DES),它保有离子液体的大部分优势,而且克服了其高毒性,高成本,生物降解性差等弊端。DES主要由氢键供体和氢键受体通过较强的分子间氢键作用相结合,使其具备特殊的理化性质,如可忽

略的挥发性和黏度的可调整能力。此外,在提取天然产物的过程中,DES可以与目标物形成较强作用力的分子间氢键,使其具有优于传统溶剂的选择性和萃取能力,并且可提高不稳定的生物活性成分的稳定性^[9-10]。刘珊等^[11]以金钱草(*Lysimachia christinae*)为原料,通过共晶溶剂与超声结合提取黄酮,最终得到的黄酮提取率为7.198 mg/g。因此,在本实验中,采用超声辅助低共熔溶剂法在单因素和响应面优化设计实验的基础上,进一步调整和优化了马尾松针叶中黄酮类和多酚类化合物的提取工艺,以确定最佳提取条件;测试了从马尾松松针中提取的黄酮和多酚的抗氧化作用;同时,比较了乙醇提取法与超声辅助低共熔溶剂法提取能力的差异,为松针中活性物质的提取提供了一定的理论依据和实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料

所用马尾松松针采集于2019年8月,湖南省祁阳县大江林场。DPPH $\cdot$ 、ABTS $^{+}\cdot$ 、芦丁、没食子酸为标准品,纯度大于98%,其余所用试剂均为分析纯。

1.2 研究方法

1.2.1 原料处理

将鲜马尾松松针通过清洗去杂,干净的原料经自然风干及低温干燥,破碎为80目粉末,冷藏备用。

1.2.2 没食子酸标准曲线绘制与多酚得率计算

取10.0 mg没食子酸标准品配制成1 g/L的母液,分别取0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 mL上述配制好的母液置于5个25 mL容量瓶中,用蒸馏水定容,得到0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 g/L溶液。取上述5种溶液各1.00 mL,以1.00 mL蒸馏水作空白对

照,再分别加入 5.00 mL 的 0.2 mol/L 福林酚溶液,摇匀,静置 5 min 后,再分别加入 4.00 mL 的 10% 碳酸钠溶液,摇匀后置于 45 ℃ 水浴 15 min。使用紫外分光光度计(北京普析通用),在波长为 765 nm 下测定上述溶液的吸光值,以没食子酸质量浓度(g/L)为横坐标(X_1),吸光值(A)为纵坐标(Y_1),绘制标准曲线^[12]。得到线性回归方程: $Y_1 = 115.76X_1 + 0.001\ 8$, $R_1^2 = 0.999\ 2$ 。

对提取液使用蒸馏水稀释,并按照上述方法进行多酚含量的测定,将测得的吸光度值带入回归方程,得到多酚质量浓度,并按照式(1)计算提取液中多酚得率:

$$y_1 = \frac{c_1 v_1 D_1}{1\ 000 m_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中: y_1 为多酚得率,%; c_1 为回归方程计算出的提取液中多酚质量浓度, g/L; v_1 为提取前溶液体积, mL; m_1 为提取前松针质量, g; D_1 为提取液稀释倍数。

1.2.3 芦丁标准曲线绘制与黄酮得率计算

取 5.0 mg 芦丁标准品配置成 0.1 g/L 的母液,分别取 2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 mL 上述配置好的母液置于容量瓶中,加入相应量 70% 乙醇使各容量瓶溶液总体积为 10 mL。以 70% 乙醇作空白对照。再分别加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.00 mL,摇匀后静置 6 min,再加入 10% 硝酸铝溶液 1.00 mL,摇匀后静置 6 min 后加入 10% 氢氧化钠溶液 10.00 mL,摇匀后加入 70% 乙醇定容,摇匀静置 15 min。在波长为 510 nm 下测吸光值,以芦丁质量浓度(g/L)为横坐标(X_2),吸光值(A)为纵坐标(Y_2),绘制标准曲线^[13]。得到线性回归方程: $Y_2 = 12.654X_2 - 0.000\ 9$, $R_2^2 = 0.999\ 7$ 。

对提取液使用乙醇稀释,并按照上述方法进行黄酮含量的测定,将测得的吸光度值带入回归方程,得到黄酮质量浓度,并按照式(2)计算提取液中黄酮得率:

$$y_2 = \frac{c_2 v_2 D_2}{1\ 000 m_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中: y_2 为黄酮得率,%; c_2 为回归方程计算出的提取液中黄酮质量浓度, g/L; v_2 为提取前溶液体积,

mL; m_2 为提取前松针质量, g; D_2 为提取液稀释倍数。

1.2.4 低共熔溶剂的制备和选择

3 种低共熔溶剂配制方案如表 1,在恒温水浴锅中,保持温度在 60 ~ 62 ℃,磁力搅拌 1 h,冷却至室温。分别使用 3 种低共熔溶剂与马尾松松针以液料比 10 mL/g 混合,在 300 W、44 ℃ 的超声条件下 56 min,对黄酮和多酚进行提取。

1.2.5 超声波辅助低共熔溶剂提取马尾松松针活性成分的工艺研究

准确称取 0.900 0 g 马尾松松针粉于指形管中,以马尾松松针中多酚、黄酮得率为评价指标进行单因素试验,分别考察低共熔溶剂类型(DES-1、DES-2、DES-3)、液料比(8、10、12、14、16、18 mL/g),超声功率(240、270、300、330、360、390 W)、超声时间(30、45、60、75、90、105、120 min)、超声温度(30、35、40、45、50、55 ℃)对提取物得率的影响。

根据单因素实验结果,采用 Box-Behnken 试验设计方法,利用 Design-Expert 8.0.6 trial 设计 4 因素 3 水平的响应面工艺优化试验,对超声波辅助低共熔溶剂提取马尾松松针提取物的工艺参数进行优化。

1.2.6 松针提取物的抗氧化活性研究

1.2.6.1 DPPH · 自由基清除率测定

在 96 孔板的孔中依次加入不同质量浓度梯度的样液 50 μ L 以及稀释好的 DPPH · 溶液 200 μ L,充分混匀于 517 nm 波长下测定吸光值 A_i 。用 200 μ L 95% 乙醇代替 DPPH · 溶液,测定吸光度值 A_j 。用 50 μ L 95% 乙醇代替不同质量浓度梯度的样液,使用全波长酶标仪(BioTek Instruments, Inc.)测定吸光度值 A_0 ^[14]。根据式(3)计算活性物质对 DPPH · 清除率:

$$k_1 = \frac{A_0 - A_i + A_j}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中: k_1 为 DPPH · 清除率; A_i 为样品液的吸光度值; A_j 为样品空白管的吸光度值; A_0 为空白对照管的吸光度值。

1.2.6.2 ABTS⁺ · 自由基清除率测定

将 7.4 mmol/L ABTS⁺ · 溶液与 2.6 mmol/L 过硫酸钾溶液按体积比 1:1 混合,室温避光静置 12 ~ 14 h,用 pH7.4 的 PBS 溶液稀释至在 734 nm 处吸光

表 1 不同类型低共熔溶剂配制方案

Tab. 1 Different types of deep eutectic solvents

低共熔溶剂 Deep eutectic solvent	溶剂体系构成 Composition of solvent system			摩尔比 Mole ratio
	氢受体 Hydrogen acceptor	氢供体 Hydrogen bond donors	水 Water	
DES-1	氯化胆碱 Choline chloride	丙三醇 Glycerol	水 Water	1:1:4
DES-2	氯化胆碱 Choline chloride	葡萄糖 Glucose	水 Water	1:1:4
DES-3	氯化胆碱 Choline chloride	尿素 Carbamide	水 Water	1:1:4

度值为 (0.70 ± 0.02) , 备用。在 96 孔板中依次加入 30 μL 不同质量浓度梯度的样液, 270 μL ABTS^+ 溶液, 静置 6 min, 在 734 nm 处测吸光度值, 得到 A_1 。用 30 μL pH7.4 的 PBS 溶液代替样液, 测定吸光度值, 得到 A_0 。用 270 μL pH7.4 PBS 溶液代替 ABTS^+ 溶液, 测定吸光度值, 得到 A_2 ^[14]。根据式(4)计算活性物质对 ABTS^+ 清除率 k_2 :

$$k_2 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中: k_2 为 ABTS^+ 清除率, %; A_0 为空白对照吸光度值; A_1 为样液吸光度值; A_2 为样液空白管吸光度值。

1.2.6.3 总还原力的测定

在 5 mL 离心管中依次加入 0.5 mL 不同质量浓度的样液, 0.5 mL 0.2 mol/L pH6.6 磷酸盐缓冲液, 0.5 mL 1% 铁氰化钾溶液, 摇匀, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min 后, 迅速冷却, 再依次加入 0.5 mL 10% 三氯乙酸溶液, 摇匀, 在 4 000 r/min 条件下离心 10 min。在 96 孔板中依次加入 150 μL 上述离心后不同质量浓度的上清液, 150 μL 蒸馏水, 30 μL 0.1% 氯化铁溶液, 混匀, 静置 10 min, 在 700 nm 处测吸光度值^[15]。

2 结果与分析

2.1 低共熔溶剂种类的选择

以液料比 10 mL/g、超声功率 300 W、超声温度

44 $^{\circ}\text{C}$ 、超声波辅助提取 56 min 作为多酚、黄酮的提取条件, 3 种不同低共熔溶剂对多酚、黄酮的得率的影响如表 2 所示。

表 2 提取溶剂对多酚、黄酮得率的影响

Tab. 2 Effects of extraction solvent on yield of polyphenol and flavone

低共熔溶剂种类 Types of deep eutectic solvents	多酚得率 Polyphenol yield/%	黄酮得率 Flavone yield/%
DES-1	7.66AB	10.11A
DES-2	8.07A	10.05A
DES-3	7.38B	9.15A

注: 同列数值后不同大写字母表示差异显著($P < 0.05$)。Note: values in the same column followed by different capital letters mean that the difference is significant at $P < 0.05$ level.

由表 2 可知 DES-2 对多酚的提取效果最佳, 这是由于 DESs 与多酚类化合物之间的氢键作用力^[16], 当氯化胆碱为氢受体, 氢供体分别为多糖、多元醇类、酰胺类等化合物时, 多糖类对马尾松松针中的多酚结构更适合提取^[17]; DES-1 对黄酮的提取效果最佳, 而 DES-2 与 DES-1 提取黄酮的得率接近, 且该溶剂体系重复性良好, 利于实验的重复进行。综上, 选择 DES-2 即氯化胆碱和葡萄糖制备的低共熔溶剂作为对马尾松松针提取物的最佳提取溶剂。

2.2 提取单因素试验结果及分析

不同液料比、超声功率、超声时间、超声温度对马尾松松针提取物得率的影响, 结果见图 1。

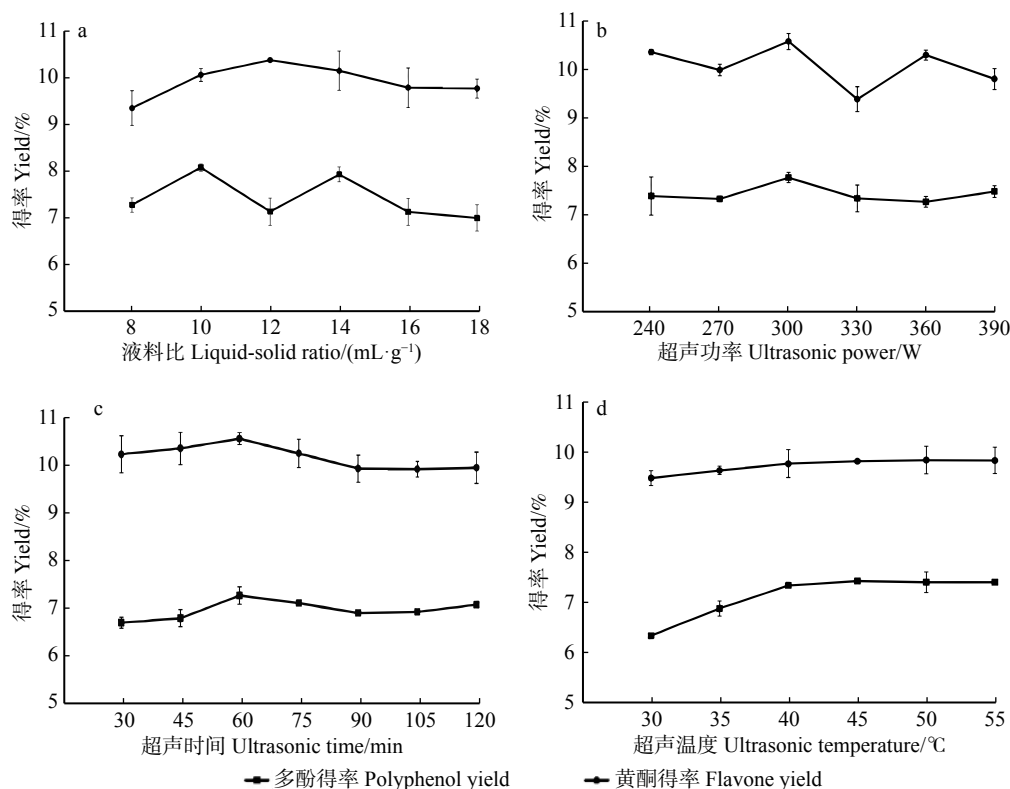


图 1 不同单因素对提取物得率的影响

Fig. 1 Effects of different single factors on extract yield

由图 1 可知,随着液料比、超声功率、超声时间和超声温度的逐渐增加,松针提取物的得率总体趋势相似,先上升后下降,这可能是因为随着提取溶剂的增加,增大了原料与溶剂的接触面积,促使马尾松松针中的活性成分不断溶出并扩散至溶剂中,得率呈上升趋势;而前期实验增加超声功率和超声时间,则可以更充分地对马尾松松针组织的细胞壁进行破坏,与此同时温度的升高,也增加了马尾松松针中活性物质的溶出量。但当超声功率大于 300 W,超声时间超过 60 min 和液料比大于 10 mL/g 时,继续改变因素水平值,提取物得率呈下降趋势或变化不显著,这可能是在超声时间较长或超声功率过高的情况下,组织的细胞壁不能够进一步被破坏,与此同时,

已溶出的物质被破坏,导致得率降低。超声功率增加到 330 W 左右时,马尾松松针组织内的某些物质与黄酮类化合物一同被溶出,干扰黄酮含量测定,而后又被破坏,导致黄酮得率值未随功率的改变而呈现出规律性变化;当溶剂增加到一定程度时,萃取剂已将提取物充分提出,再继续增加溶剂可能导致提取物重新吸附到待提取物中,导致得率下降。

2.3 响应面实验结果及分析

2.3.1 响应面结果与方差分析

根据单因素的实验结果,分别以马尾松松针中多酚、黄酮得率为响应值,以液料比,超声功率,超声时间,超声温度为自变量,进行响应面分析实验,实验方案及结果如表 3 所示。

表 3 响应面实验方案及结果
Tab. 3 Response surface design and experimental results

试验号 Experiment No.	液料比 Liquid-solid ratio/(mL·g ⁻¹)	超声时间 Ultrasonic time/min	超声温度 Ultrasonic temperature/℃	超声功率 Ultrasonic power/W	多酚得率 Polyphenol yield/%	黄酮得率 Flavone yield/%
1	10	60	35	270	6.367	9.132
2	8	60	55	300	6.186	9.919
3	12	60	35	300	6.459	9.773
4	10	75	45	330	6.465	9.126
5	8	75	45	300	6.628	9.071
6	10	60	55	330	6.828	9.593
7	10	60	35	330	6.569	9.303
8	8	60	45	330	6.361	8.892
9	10	45	45	270	6.465	9.889
10	8	60	45	270	6.485	8.691
11	12	60	55	300	6.922	10.184
12	10	60	45	300	7.571	10.548
13	10	45	35	300	6.027	9.830
14	10	60	55	270	6.511	10.120
15	10	60	45	300	7.617	10.245
16	10	45	55	300	6.655	9.633
17	10	60	45	300	7.513	10.364
18	8	60	35	300	6.204	8.633
19	10	75	35	300	6.454	8.316
20	8	45	45	300	5.969	9.771
21	10	75	55	300	6.897	9.303
22	12	60	45	330	6.127	9.694
23	10	75	45	270	6.741	9.600
24	12	75	45	300	6.279	9.979
25	10	60	45	300	7.686	10.390
26	10	45	45	330	6.384	9.936
27	12	60	45	270	6.721	9.109
28	10	60	45	300	7.277	10.054
29	12	45	45	300	5.636	10.192

多酚得率的变幅为 5.636% ~ 7.686%, 黄酮得率的变幅为 8.316% ~ 10.548%, 对实验数据进行回归拟合, 得到马尾松松针多酚得率的回归方程 y_3 、黄酮得率的回归方程 y_4 和方差分析表(表 4 和表 5)。

表 4 多酚方差分析表

Tab. 4 Anova for response surface quadratic model of polyphenol

方差来源 Variance source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性 Significance
模型 Model	6.360	14	0.450	6.90	0.000 4	**
<i>A</i>	8.060×10^{-3}	1	8.060×10^{-3}	0.12	0.731 7	
<i>B</i>	0.450	1	0.450	6.86	0.020 2	*
<i>C</i>	0.310	1	0.310	4.66	0.048 7	*
<i>D</i>	0.026	1	0.026	0.39	0.541 8	
<i>AB</i>	6.400×10^{-5}	1	6.400×10^{-5}	9.718×10^{-4}	0.975 6	
<i>AC</i>	0.058	1	0.058	0.88	0.364 6	
<i>AD</i>	0.055	1	0.055	0.84	0.375 3	
<i>BC</i>	8.556×10^{-3}	1	8.556×10^{-3}	0.13	0.723 9	
<i>BD</i>	9.506×10^{-3}	1	9.506×10^{-3}	0.14	0.709 7	
<i>CD</i>	3.306×10^{-3}	1	3.306×10^{-3}	0.05	0.825 9	
A^2	3.180	1	3.180	48.28	< 0.000 1	**
B^2	2.510	1	2.510	38.13	< 0.000 1	**
C^2	1.240	1	1.240	18.84	0.000 7	**
D^2	1.280	1	1.280	19.44	0.000 6	**
残差 Residual	0.920	14	0.066			
失拟项 Lack of fit	0.820	10	0.082	3.37	0.126 5	不显著 Not significant
纯误差 Pure error	0.098	4	0.024			
总和 Total	7.290	28				

注: **为差异极显著($P < 0.01$), *为差异显著($P < 0.05$)。下同。Notes: ** means highly significant difference ($P < 0.01$), * means significant difference ($P < 0.05$). The same below.

表 5 黄酮方差分析表

Tab. 5 Anova for response surface quadratic model of flavone

方差来源 Variance source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性 Significance
模型 Model	7.580	14	0.540	4.45	0.004 2	**
<i>A</i>	1.300	1	1.300	10.72	0.005 5	**
<i>B</i>	1.240	1	1.240	10.19	0.006 5	**
<i>C</i>	1.180	1	1.180	9.72	0.007 6	**
<i>D</i>	7.500×10^{-7}	1	7.500×10^{-7}	6.169×10^{-6}	0.998 1	
<i>AB</i>	0.059	1	0.059	0.49	0.496 4	
<i>AC</i>	0.19	1	0.190	1.57	0.230 1	
<i>AD</i>	0.037	1	0.037	0.30	0.590 5	
<i>BC</i>	0.350	1	0.350	2.88	0.111 6	
<i>BD</i>	0.068	1	0.068	0.56	0.467 3	
<i>CD</i>	0.120	1	0.120	1.00	0.333 8	
A^2	1.080	1	1.080	8.91	0.009 8	**
B^2	0.650	1	0.650	5.34	0.036 6	*
C^2	1.200	1	1.200	9.86	0.007 2	**
D^2	1.700	1	1.700	13.96	0.002 2	**
残差 Residual	1.700	14	0.120			
失拟项 Lack of fit	1.570	10	0.160	4.64	0.076 3	不显著 Not significant
纯误差 Pure error	0.140	4	0.034			
总和 Total	9.280	28				

$$y_3 = 7.53 + 0.026A + 0.19B + 0.16C - 0.046D - 4.000 \times 10^{-3}AB + 0.12AC - 0.12AD - 0.046BC - 0.049BD + 0.029CD - 0.70A^2 - 0.62B^2 - 0.44C^2 - 0.44D^2$$

式中: A 为液料比(mL/g), B 为超声时间(min), C 为超声温度($^{\circ}\text{C}$), D 为超声功率(W)。

$$y_4 = 10.32 + 0.33A - 0.32B + 0.31C + 2.500 \times 10^{-4}D + 0.12AB - 0.22AC + 0.096AD + 0.30BC - 0.13BD - 0.17CD - 0.41A^2 - 0.32B^2 - 0.43C^2 - 0.51D^2$$

该回归模型的 $P = 0.0004 < 0.01$, 有极显著差异, 失拟项为 $0.1265 > 0.05$, 差异不显著, 模型稳定性较好, 相关系数 $r = 0.8735$, $R_{\text{adj}}^2 = 0.7469$, 说明拟合度良好; 残差由随机误差引起, 残差越小表明回归模型的拟合精度越高, 由表4可知, 该模型的残差为0.92, 说明该模型有较好的拟合程度; 纯误差越小表明实验过程中误差越低, 该模型的纯误差为0.098, 表明实验误差基本可忽略不计, 可用于马尾松松针总多酚提取实验预测及结果分析。对回归模型显著性分析可知, 因素 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对多酚得率影响极显著($P < 0.01$), 因素 B 、 C 对多酚得率影响显著($0.01 < P < 0.05$), 因素 A 、 D 和交互项 AB 、 AC 、 AD 、 BC 、 BD 、 CD 因素相互交互作用对多酚得率的影响不显著($P > 0.05$)。由表4模型的分析方差可得 A 、 B 、 C 、 D 4 个因素对多酚得率的影响顺序为 B (超声时间) $> C$ (超声温度) $> D$ (超声功率) $> A$ (液料比)。

该回归模型的 $P = 0.0042 < 0.01$, 有极显著差异, 失拟项为 $0.0763 > 0.05$, 差异不显著, 模型稳定性较好, 相关系数 $r = 0.8166$, $R_{\text{adj}}^2 = 0.6332$, 说明拟合度较好, 残差为1.70, 纯误差为0.14, 表明该模型的拟合程度较高且实验误差可忽略不计, 可用于马尾松松针总黄酮提取实验预测及结果分析。对回归模型显著性分析可知, 因素 A 、 B 、 C 、 A^2 、 C^2 、 D^2 对黄酮得率影响极显著($P < 0.01$), B^2 对黄酮得率影响显著($0.01 < P < 0.05$), 交互项 AB 、 AC 、 AD 、 BC 、 BD 、 CD 因素的交互作用对黄酮得率的影响不显著($P > 0.05$)。由表5模型的方差分析, 可以得出 A 、 B 、 C 、 D 4 个因素对黄酮得率的影响顺序为: A (液料比) $> B$ (超声时间) $> C$ (超声温度) $> D$ (超声功率)。

2.3.2 最佳条件确定和回归模型验证试验结果

通过响应面分析得到超声波辅助低共熔溶剂提取马尾松松针中多酚、黄酮最佳工艺条件为: 液料比 10.284 mL/g, 超声时间 59.87 min, 超声温度 47.65 $^{\circ}\text{C}$, 超声功率 298.63 W, 在此条件下, 多酚得率为 7.539%, 黄酮得率为 10.406%, 为实际操作中更便于控制, 调整最佳工艺为: 液料比 10 mL/g, 超声时间 60 min, 超声温度 48 $^{\circ}\text{C}$, 超声功率 300 W。在此条件下进行最优工艺的验证, 计算出多酚得率为 7.387%, 黄酮得

率为 10.377%, 实际得率与模型预测值的误差分别为 2.0% 和 0.2%, 证明模型理论预测值与实际值拟合效果良好。

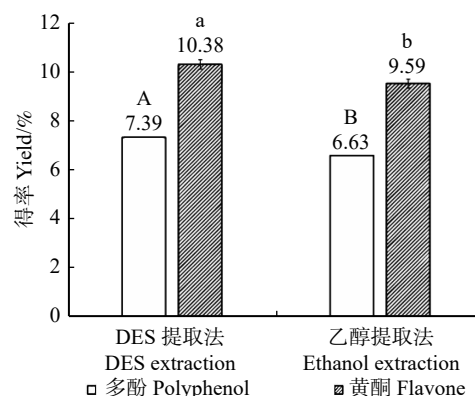
2.4 两种不同提取方法的松针提取物比较

2.4.1 醇提法制备马尾松松针提取物

精密称取 1.0000 g 马尾松松针粉, 按照液料比 50 mL/g 加入 60% 乙醇, 搅拌均匀, 恒温水浴, 50 $^{\circ}\text{C}$ 浸提 60 min。抽滤, 得到浸提液, 再将浸提液旋转蒸发、冻干, 得到醇提物冻干粉, 冷藏, 备用。

2.4.2 两种提取方法提取得率的评价

按照 1.2.2 和 1.2.3 的方法, 对低共熔溶剂提取物和乙醇提取物进行多酚和黄酮得率的测定, 结果如图2所示。由图2可知: 在相同提取时间和提取温度条件下, 低共熔溶剂和乙醇提取松针中多酚得率分别为 7.39%、6.63%, 黄酮得率分别为 10.38%、9.59%。采用低共熔溶剂进行提取可得到更多的活性物质, 溶剂用量少, 价格低, 可获得更高的得率, 降低了制备成本, 与乙醇溶剂提取相比, 多酚和黄酮的得率分别提高了 11% 和 8%。



标有不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Different capital letters mean very significant difference ($P < 0.01$), different lowercase letters mean significant difference ($P < 0.05$).

图2 不同提取方法活性物质的得率对比

Fig. 2 Contrast of the yield of active substances by different extraction methods

2.4.3 两种松针提取物的抗氧化能力评价

2.4.3.1 DPPH·自由基清除能力

低共熔溶剂提取物和醇提物对 DPPH·清除能力对比曲线如图3所示。由图3可知: 低共熔溶剂提取物和醇提物中活性成分对 DPPH·的清除能力的剂量效应趋势差异不显著($P > 0.05$)。低共熔溶剂提取物和乙醇提取物中多酚的 IC_{50} 值分别为 3.200、3.368 mg/L; 黄酮的 IC_{50} 值分别为 4.950、5.197 mg/L, 低共熔溶剂提取物对 DPPH·自由基清除作用略高于乙醇提取物。

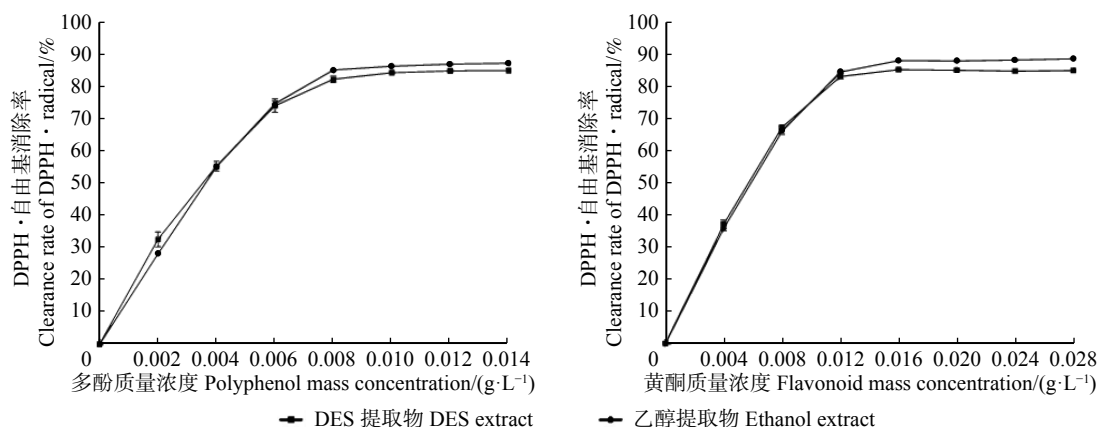


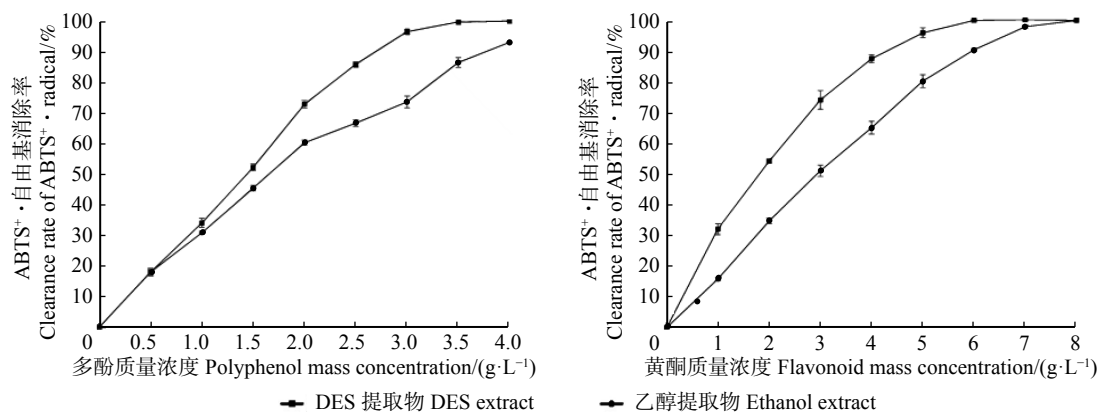
图3 松针活性成分对 DPPH· 自由基清除率的影响

Fig. 3 Effects of active components in pine needles on DPPH· radical scavenging

2.4.3.2 ABTS⁺· 自由基清除能力

低共熔溶剂提取物和醇提取物对 ABTS⁺· 清除能力对比曲线如图 4。由图 4 可知: 在试验质量浓度范围内, 随着多酚、黄酮质量浓度的增加, 清除率逐渐提升至平稳, 且低共熔溶剂提取物中的活性成分清

除能力更强, 存在显著剂量-效应关系。通过计算, 低共熔溶剂提取物和乙醇提取物中多酚的 IC₅₀ 值分别为 1.217、1.506 mg/L; 黄酮的 IC₅₀ 值分别为 1.634、2.598 mg/L。综上, 低共熔溶剂提取物对 ABTS⁺· 自由基清除效果显著优于乙醇提取物。

图4 松针活性成分对 ABTS⁺· 自由基清除的影响Fig. 4 Effects of active components in pine needles on ABTS⁺· radical scavenging

2.4.3.3 总还原力

低共熔溶剂提取物和醇提取物总还原能力对比曲线如图 5。还原力是评价物质抗氧化能力的重要指

标, 还原力越强, 说明其清除自由基能力越强。由图 5 可知: 在相同浓度梯度条件下, 随着活性物质质量浓度提高, 吸光度值所反映出来的还原能力越强,

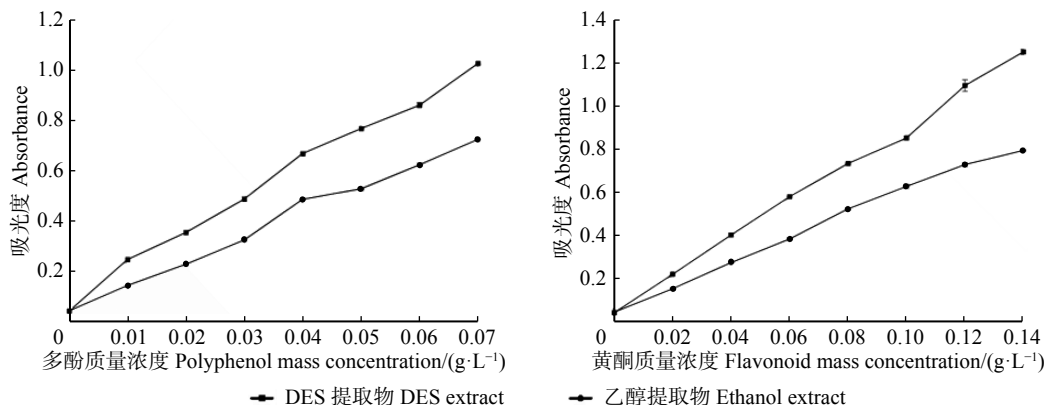


图5 不同溶剂提取物中活性成分总还原能力对比

Fig. 5 Comparison of total reducing power of active components in different solvent extracts

且低共熔溶剂提取物的还原能力均显著强于乙醇提取物($P < 0.05$)。

3 结 论

低共熔溶剂作为绿色环保的提取溶剂,具有提取效率高、构成简单、易采购、成本低、环保性和食品安全性良好的优势。本研究采用超声波辅助低共熔溶剂提取马尾松松针中多酚类化合物和黄酮类化合物,通过响应面优化出最佳工艺为:氯化胆碱-葡萄糖-水(摩尔比为1:1:4)、液料比10 mL/g、超声时间60 min、超声功率300 W、超声温度48 ℃。在此条件下,多酚得率为7.387%,黄酮得率为10.377%,较相同条件下的乙醇提取法,两种活性成分得率分别提高了11%和8%,溶剂使用量减少了5倍。

低共熔溶剂提取法能够良好保持提取物活性,通过与乙醇提取物对比DPPH·和ABTS⁺·的清除能力以及总还原能力,结果表明:低共熔溶剂提取物对自由基的清除能力和还原能力均强于醇提取物,总还原能力和ABTS⁺·清除能力达到显著差异水平($P < 0.05$)。这说明低共熔溶剂提取有效活性成分的能力更强,且对活性物质具有良好的保护性,不易破坏结构。

综上所述,低共熔溶剂作为一种可生物降解的新型绿色溶剂,由于黏度大、熔点高,在实践推广中还存在一定限制,本研究筛选的低共熔溶剂能实现较高的提取效率,黏度相对适宜,且提取物可采取树脂吸附方式实现纯化和脱溶,具备工业可实现性。马尾松松针中含有丰富的活性物质,且具有较强的抗氧化能力,在食品和药用方面具有很好的利用价值。采用新型提取方法制备的马尾松松针活性物质得率高,活性好,成本低,为马尾松资源的综合利用,开发高附加值产品,以及产业转化提供理论依据和研究基础。

参 考 文 献

- [1] 潘忻,陈顺伟,庄晓伟.不同提取方式马尾松松针抗氧化能力研究[J].食品工业科技,2009,30(8):108-110.
Pan X, Chen S W, Zhuang X W. Study on antioxidant activities in extracts from dry *Pinus massoniana* needles by different methods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(8): 108-110.
- [2] 杨丽华.马尾松松针抗氧化活性研究及其抗氧化功能饮料研制[D].广州:广州医科大学,2014.
Yang L H. Research on antioxidant activity and antioxidant functional beverage of Masson pine needles[D]. Guangzhou: Guangzhou Medical University, 2014.
- [3] 徐丽珊,张萍华,张瑜.松针总黄酮的提取工艺优化研究[J].浙江师范大学学报(自然科学版),2009,32(2):207-211.
Xu L S, Zhang P H, Zhang Y. Study on optimum process for extraction of flavonoids from pine needles[J]. Journal of Zhejiang Normal University (Natural Science), 2009, 32(2): 207-211.
- [4] 张霞.油松松针黄酮的分离提纯及其抗氧化活性研究[D].北京:北京林业大学,2010.
Zhang X. Extraction and purification of flavonoids from pine needles and antioxidative activity of the extract[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2010.
- [5] 战英,陈丽娜,石矛.微波辅助提取红松松针总黄酮工艺优化[J].食品研究与开发,2015,36(16):69-72.
Zhan Y, Chen L N, Shi M. Optimization of process in extracting total flavonoids assisted by microwave from Korean pine needles[J]. Food Research and Development, 2015, 36(16): 69-72.
- [6] 王冉,李健,黎晨晨,等.响应面法优化东北红松针总黄酮的超声辅助乙醇提取工艺[J].食品工业科技,2018,39(4):143-149.
Wang R, Li J, Li C C, et al. Optimization of ultrasonic-assisted ethanol extraction of total flavonoids from *Pinus koraiensis* needles by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(4): 143-149.
- [7] 赵玉红,翟亚楠,王振宇.樟子松树皮中松多酚的提取工艺研究及提取方法比较[J].食品工业科技,2013,34(4):304-309.
Zhao Y H, Zhai Y N, Wang Z Y. Extraction of polyphenols from *Pinus sylvestris* L. and comparison of extraction method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(4): 304-309.
- [8] Abbott A P, Capper G, Davies D L, et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures[J]. Chemical Communications, 2003, 9(1): 70-71.
- [9] Dai Y T, Verpoorte R, Choi Y H. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*) [J]. Food Chemistry, 2014, 159: 116-121.
- [10] Dai Y T, Rozema E, Verpoorte R, et al. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1434: 50-56.
- [11] 刘珊,李德慧,孙科,等.新型绿色低共熔溶剂用于金钱草总黄酮的提取研究[J].时珍国医国药,2019,30(6):1312-1314.
Liu S, Li D H, Sun K, et al. The research of new deep eutectic solvent extract total flavone from desmodium[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2019, 30(6): 1312-1314.
- [12] 胡文杰,李阁,李冠喜.马尾松松针挥发油化学成分及抗氧化活性研究[J].中国粮油学报,2018,33(12):42-48.
Hu W J, Li G, Li G X. Study on chemical constituents and antioxidant activity of volatile oil from *Pinus massoniana* pine needles[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association,

- 2018, 33(12): 42–48.
- [13] 彭映林, 谢丹, 李媛, 等. 黑茶中茶多酚的提取及其含量测定方法的研究进展[J]. 广东化工, 2019, 46(19): 110–111, 138.
- Peng Y L, Xie D, Li Y, et al. Research progress on extraction and determination methods of tea polyphenols in dark tea[J]. Guangdong Chemical Industry, 2019, 46(19): 110–111, 138.
- [14] 郭海欢. 刺玫果提取物化学成分分离及黄酮苷元的制备 [D]. 吉林: 吉林化工学院, 2017.
- Guo H H. Study on component separation of the *Rosa davurica* Pall. extracts and flavonoid aglycones preparation[D]. Jilin: Jilin Institute of Chemical Technology, 2017.
- [15] Farvin K H S, Andersen L L, Nielsen H H, et al. Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: in vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion[J]. *Food Chemistry*, 2014, 149: 326–334.
- [16] 倪玉娇, 赵春建, 李春英, 等. 超声辅助低共熔溶剂提取沙棘籽粕多酚的工艺优化[J]. *植物研究*, 2017, 37(3): 474–480.
- Ni Y J, Zhao C J, Li C Y, et al. Process optimization of ultrasonic assisted deep eutectic solvents (DESs) extraction of polyphenols from *Hippophae rhamnoides* seed meal[J]. *Plant Research*, 2017, 37(3): 474–480.
- [17] 谭婷. 低共熔溶剂的制备及其在一些食品和中药分析中的应用研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- Tan T. Preparation of deep eutectic solvent and their applications in the analysis of some food and Chinese herbs[D]. Nanchang: Nanchang University, 2016.

(责任编辑 赵 勃 吴 娟
责任编辑 许 凤)