

马超,刘杰凤,周天,等.黄皮果多糖提取工艺优化及抗氧化性研究[J].江苏农业科学,2013,41(8):290-292.

黄皮果多糖提取工艺优化及抗氧化性研究

马超,刘杰凤,周天,范芳,曾霞,马宁宁,麦雪萍

(广东石油化工学院化学与生命科学学院,广东茂名 525000)

摘要:以黄皮果(*Clausena lansium*)为原料,对黄皮果粗多糖提取的影响因素及最佳工艺条件进行了探讨,并对黄皮果多糖的抗氧化性进行了初步研究。结果表明,料液比是影响黄皮果粗多糖提取得率的最主要因素,浸提温度次之,再次为浸提时间,最后是加入乙醇倍数;确定黄皮果粗多糖提取的最佳工艺条件为料液比 1 g : 30 mL、浸提温度 90 ℃,浸提时间 1 h,加入乙醇倍数 1 倍,在该条件下黄皮果粗多糖提取率可达 28.35%。黄皮果多糖对动物油和植物油的抗氧化性试验结果表明,黄皮果多糖对动物油的抗氧化能力较对植物油强,当多糖添加量为 0.08% 时,12 d 后抗氧化性表现明显。

关键词:黄皮;多糖;正交试验;抗氧化性;提取工艺

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0290-03

黄皮(*Clausena lansium*)为芸香科黄皮属热带、亚热带常绿果树^[1],黄皮果具有较高的营养价值,用途非常广泛。果实富含糖、有机酸、果胶、维生素 C、挥发油、黄酮苷等。黄皮不但可以生津止渴、消食健胃,民间也喜欢拿水煎黄皮叶来防治感冒,或者用黄皮树根来治气痛。黄皮的果皮和果核也都是入药良材,有利尿消肿、行气止痛等功效^[2]。我国黄皮资源丰富,而广东黄皮在国内大市场具有明显的优势,年产量占全国(除台湾外)黄皮产量的 48.39%,如广东省茂名市 2010 年就有黄皮面积 5.2 万 hm^2 ,产量 4.66 万 hm^2 ,产值 27.48 亿元。因此,广东省茂名市黄皮市场广阔,而且黄皮的食用、药用价值极高。目前对黄皮的研究开发主要集中在黄皮的生产和粗加工上,如黄皮酒、黄皮饮料、黄皮干等,而对黄皮的生物活性研究还很少,尤其对黄皮中多糖的提取及生物活性的研究报道甚少^[2-4]。本试验以黄皮果为原料,对黄皮果粗多糖提取的影响因素及最佳工艺条件进行了探讨,并对黄皮果粗多糖的抗氧化性进行了初步研究,旨在为开发新型黄皮果多糖生物活性提供参考数据,为黄皮果多糖的综合利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄皮果,购于茂名市水果市场,新鲜,无霉变腐烂,无病虫害。动物油、植物油,购于广东省茂名市明湖商场。

仪器:PHS-3C 型酸度计、DK-S24 型电热恒温水浴锅、博迅 YXQ-LS-50A 立式压力蒸汽灭菌锅等。

1.2 试验方法

收稿日期:2013-05-05

基金项目:广东石油化工学院青年创新人才基金(编号:511001);广东省高等学校“千百十工程”计划。

作者简介:马超(1980—),男,安徽淮北人,博士研究生,讲师,主要从事微生物生物技术及生物工程方面的教学科研工作。E-mail: mch6302003@163.com。

通信作者:周天,博士,教授,主要从事微生物生态修复技术及生物资源利用开发的研究。E-mail: zhoutian6688@126.com。

1.2.1 黄皮果多糖的提取——水浸提法 选用成熟市售黄皮果,放入干燥箱干燥至恒重,再用研磨机粉碎成粉末,称取干燥的黄皮果粉末 90 g,加入石油醚、乙醚(60~90 ℃) 250 mL 提取 1 h 脱脂。粉末挥发干燥后,平均分成 2 份,加水 900 mL,于 80 ℃ 水浴浸提 2 次,每次 1.5 h,趁热过滤,滤液浓缩至 200 mL,然后加入 3 倍体积的无水乙醇醇析,沉淀过滤,干燥,即得黄皮粗多糖。

1.2.2 多糖的含量测定——苯酚-硫酸法^[3] 精确称取标准品(分析纯无水葡萄糖,105 ℃干燥至恒重)10.0 mg,用蒸馏水溶解后定容到 10.0 mL,精确量取 1.0 mL,用蒸馏水稀释定容至 10.0 mL,得标准溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)。取 8 支试管,分别加入 1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3 mL 蒸馏水,再分别加入 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL 标准溶液,然后在每支试管中加入 1.0 mL 0.5% 苯酚水溶液,摇匀后再加入 5.0 mL 浓 H_2SO_4 ,放置 10 min,摇匀,静置 20 min 后于 490 nm 处测吸光度,以多糖浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,得葡萄糖标准曲线。

将粗多糖溶于 3 L 的蒸馏水,准确量取 30 mL 置于分液漏斗中,加入提取液体积的 1/5 量的 Sevag 试剂,振荡,静置,分离,直到没有乳白色变性蛋白质析出为止;收集上清液,加足量活性炭,摇匀,恒温 30 min,过滤;取 0.5 mL 脱色后的粗多糖溶液,然后测定 490 nm 处的吸光度,同时根据标准曲线计算出黄皮粗多糖的得率。

1.2.3 多糖提取条件的单因素试验

1.2.3.1 料液比 准确称量一定量的黄皮果粉末 5 份,固定浸提温度为 70 ℃,浸提时间为 2.0 h,提取 1 次,分别选用料液比 1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30(g : mL),按照上述提取粗多糖的方法操作,测出吸光度,比较不同料液比对多糖得率的影响,并确定最佳料液比。

1.2.3.2 浸提时间 准确称量一定量的黄皮果粉末,固定料液比为 1 g : 20 mL,浸提温度 70 ℃,提取 1 次,分别提取 0.5、1.0、1.5、2.0 h,按照提取粗多糖的方法操作,测出吸光度,比较不同浸提时间对多糖得率的影响,并确定最佳浸提时间。

1.2.3.3 浸提温度 准确称取黄皮果粉末 5 份,固定料液比

为 1 g : 20 mL, 分别在 75、80、85、90、95 ℃ 条件下提取 1 次, 浸提时间为 1.0 h, 测出吸光度, 比较不同浸提温度对多糖得率的影响, 并确定最佳浸提温度。

1.2.3.4 乙醇体积倍数 准确称取黄皮果粉末 4 份, 固定料液比为 1 g : 20 mL, 浸提温度为 80 ℃, 浸提时间为 1 h, 提取 1 次, 分别加入无水乙醇 1、2、3、4 倍体积, 测出吸光度, 比较不同乙醇添加量对多糖得率的影响, 并确定最适宜的乙醇体积倍数。

1.2.4 多糖提取优化正交试验 根据上述单因素试验确定的条件范围设计正交试验, 正交试验的因素水平见表 1。

表 1 黄皮果多糖提取正交试验的因素水平

水平	因素			
	A: 料液比 (g : mL)	B: 浸提温度 (℃)	C: 浸提时间 (h)	D: 乙醇 体积倍数
1	1 : 10	70	1	1
2	1 : 20	80	2	2
3	1 : 30	90	3	3

1.2.5 黄皮果多糖抗氧化性的测定 分别取精炼猪油和花生油 50 g, 置于 250 mL 三角瓶中, 分别加入 0.02%、0.04%、0.06%、0.08% 黄皮果粗多糖, 每组 2 个平行样, 同时设空白对照组。各样品充分搅拌后, 置于 (60 ± 0.5) ℃ 的恒温箱中保存, 每隔 12 h 分别摇匀搅拌 3 min, 并放在恒温箱中加速其氧化。每隔 3 d 测 1 次抗氧化性^[5]。

准确称取 2.0 g 混匀的油样置于 250 mL 三角瓶中, 加入 30 mL 氯仿 - 冰乙酸混合液 (体积比 2 : 3)、1.00 mL 10% KI 溶液, 小心振荡 30 s, 暗处放置 3 min 后, 取出加水 50 mL, 摇匀后用 0.01 mol/L Na₂S₂O₃ 标准溶液滴定至浅黄色; 加入 0.5% 淀粉指示剂 1.00 mL, 继续用标准溶液滴定至蓝色刚好消失。重复试验 2 次, 结果取平均值。

$$POV = (V_1 - V_2) \times N \times 1\,000 / (m \times 2)$$

式中: *POV* 为过氧化值 (mmol/kg); *V*₁ 为油样消耗 Na₂S₂O₃ 标准溶液的体积 (mL); *V*₂ 为空白消耗 Na₂S₂O₃ 标准溶液的体积 (mL); *N* 为 Na₂S₂O₃ 标准溶液的浓度 (mol/L); *m* 为油样重量 (g)。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖的标准曲线 (苯酚 - 硫酸法)

在吸光度 490 nm 处, 测得不同浓度葡萄糖溶液的吸光度, 据此绘制标准曲线, 得标准曲线方程为 $y = 2.153\,6x + 0.001\,8$, $r^2 = 0.998\,7$ 。本试验多糖含量据此进行计算。

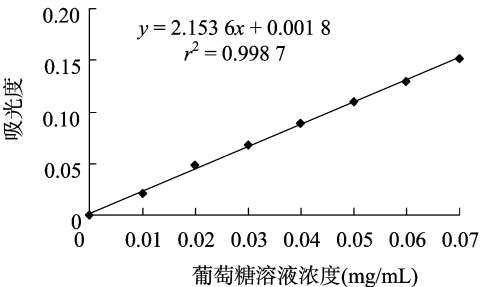


图1 葡萄糖溶液的标准曲线

2.2 单因素试验结果

2.2.1 料液比对多糖得率的影响 由图 2 可知, 料液比对多

糖提取有较大影响, 从 1 g : 10 mL 到 1 g : 20 mL, 多糖得率随着提取剂增多而明显增大, 表明料液比对提取效果影响明显; 而从 1 g : 20 mL 到 1 g : 30 mL, 多糖得率逐渐下降, 表明料液比 1 g : 20 mL 提取效果最好。

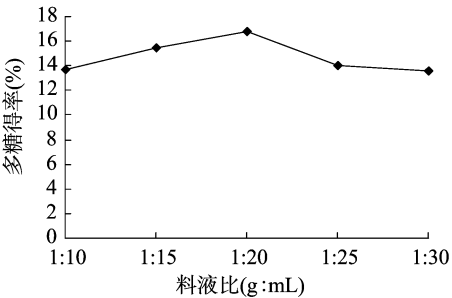


图2 料液比对多糖得率的影响

2.2.2 浸提时间对多糖得率的影响 由图 3 可知, 随着浸提时间从 0.5 h 延长到 1.5 h, 多糖得率明显增大, 表明浸提时间对多糖提取效果影响较大; 而从 1.5 h 到 2.5 h, 吸光度波动下降, 但波动范围不大, 多糖得率变化不大, 表明浸提时间 1.5 h 提取效果最好。

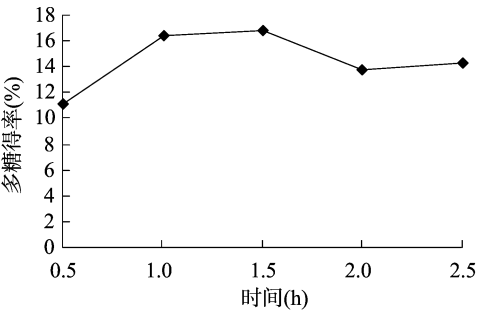


图3 浸提时间对多糖得率的影响

2.2.3 浸提温度对多糖得率的影响 由图 4 可知, 浸提温度对提取效果影响较明显, 多糖得率随着温度的升高而明显增大, 考虑到过高的浸提温度会破坏多糖结构、使多糖发生降解而影响其生物活性以及实际成本问题, 浸提温度不宜超过 100 ℃, 因此选择 90 ℃ 为最适浸提温度。

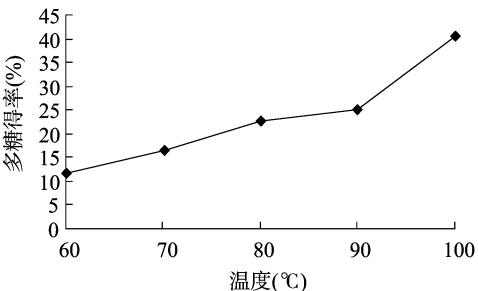


图4 浸提温度对多糖得率的影响

2.2.4 乙醇体积倍数对多糖提取的影响 由图 5 可知, 随着乙醇体积倍数增大, 多糖得率增加, 但加入乙醇体积超过 3 倍后, 多糖得率反而下降。综合考虑, 乙醇体积倍数不宜超过 3 倍。

2.3 正交试验结果

在单因素试验的基础上, 选取料液比、浸提温度、浸提时间和加入乙醇体积倍数 4 个因素进行正交试验, 试验安排及结果见表 2。

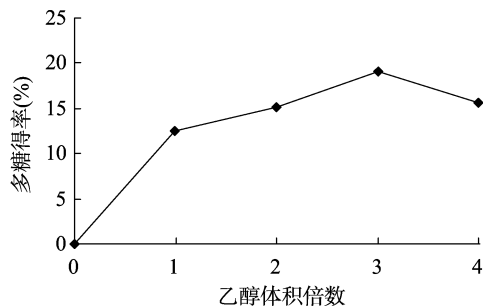


图5 乙醇体积倍数对多糖得率的影响

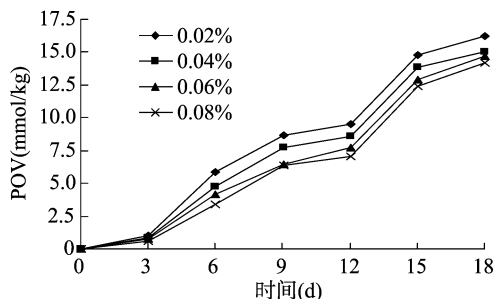


图6 花生油样品的POV值变化

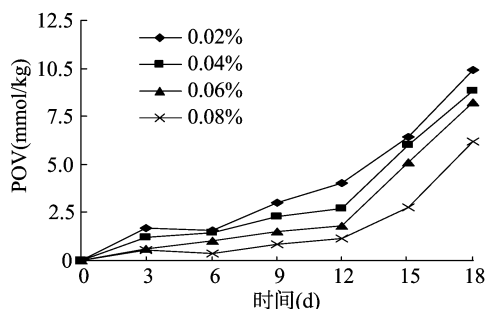


图7 猪油样品的POV值变化

表2 黄皮果多糖提取正交试验结果

序号	A:料液比	B:浸提温度	C:浸提时间	D:乙醇体积倍数	多糖得率 (%)
1	1	1	1	1	21.60
2	1	2	2	2	20.35
3	1	3	3	3	15.46
4	2	1	2	3	7.85
5	2	2	3	1	18.39
6	2	3	1	2	25.21
7	3	1	3	2	20.85
8	3	2	1	3	27.44
9	3	3	2	1	27.21
k_1	19.14	16.77	24.75	22.40	
k_2	17.15	22.06	18.47	22.14	
k_3	25.17	22.63	18.23	16.92	
R	8.02	5.86	6.52	5.48	
优水平	A_3	B_3	C_1	D_1	

由表2可知,黄皮多糖提取的最佳工艺条件为 $A_3B_3C_1D_1$,即料液比为1 g : 30 mL,浸提温度为90℃,浸提时间为1 h,乙醇体积倍数为1倍。在影响提取得率的因素中,料液比对多糖提取影响最大,其次是浸提时间,浸提温度次之,加入乙醇体积倍数对多糖提取也有一定影响,主次顺序依次为 $A > C > B > D$ 。

根据正交试验的最佳提取条件进行多糖提取的验证性试验,多糖得率可达28.35%,因此判断选择该最优条件是合适的。

2.3 黄皮果多糖的抗氧化性

为了测定提取出的黄皮果多糖的抗氧化性,分别选用2种类型的食用油进行对比试验,其中植物油采用花生油样品,动物油采用猪油样品。

由图6、图7可知,黄皮果多糖对植物油和动物油都有一定的抗氧化作用,并且随着多糖添加量增加,其过氧化值(POV)逐渐降低。这表明黄皮果多糖对油脂样品的抗氧化能力有剂量-效应关系。随着时间的推移,0.08%的多糖用量对猪油表现出较好的抗氧化作用,在试验进行到12 d后,多糖对油脂的抗氧化能力表现明显,因此建议添加量为0.08%。此外,本试验结果表明黄皮果多糖对猪油的抗氧化能力优于对花生油的抗氧化能力。

3 结论与讨论

提取多糖时首先要根据多糖的存在形式及提取部位决定在提取之前是否做预处理。预处理方法有很多,有微波加热

处理、超声波处理、加酸处理、加碱处理、加盐处理等^[5]。本试验先进行了石油醚、乙醚处理,然后采用乙醇醇析结合加热处理,经过预处理的黄皮果多糖提取得率有所提高,说明预处理是有一定效果的。

大量药理和临床研究表明,多糖类化合物具有多种生物活性^[6],抗氧化性就是其中一种。食品抗氧化剂是食品添加剂的一种,它能阻止或延迟食品氧化,以提高食品的稳定性和保存期。近年来,从植物中寻找安全、高效的抗氧化剂成为抗氧化剂研究的热点^[7]。本试验用动物油(猪油)和植物油(花生油)作为基质,加入不同浓度的黄皮果多糖作为抗氧化剂,发现过氧化值的变化量随着多糖浓度升高而降低,加入了多糖的油脂比未加的油脂过氧化值小,表明黄皮果多糖具有一定的抗氧化能力,而且具有剂量-效应关系。黄皮果实中富含多糖等活性成分,可以作为功能性食品的基料。

参考文献:

- [1] 张瑞明,万树青,赵冬香. 黄皮的化学成分及生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(1):118-123,88.
- [2] 李芳,罗秀珍,谢忱. 黄皮化学成分研究[J]. 科技导报,2009,27(10):82-86.
- [3] 翁德宝,顾娟娟. 黄皮种子黄酮类化合物和多糖的提取与测定研究[J]. 江苏教育学院学报:自然科学版,2010,26(1):29-32.
- [4] 许文举,唐小荷,庄丽. 黄皮果水提物总糖含量与体外抗氧化活性的研究[J]. 中国医药指南,2012,10(11):112-114.
- [5] 何新益,刘仲华. 苦瓜多糖的改良苯酚-硫酸法测定和提取工艺[J]. 食品与机械,2007,23(4):72-75.
- [6] 苏秀芳,甘海妹,黄智想. 微波辅助法提取细叶黄皮果仁总黄酮及其清除羟自由基活性的测定[J]. 精细化工,2010,27(12):1184-1186,1212.
- [7] 李翔,上官新晨,蒋艳,等. 紫红薯多糖的提取纯化及抗氧化作用研究[J]. 江西农业大学学报,2011,33(4):823-829.