

何婷婷,柴军红,金志民,等. 软枣猕猴桃多糖、黄酮提取工艺的优化及抗氧化活性[J]. 江苏农业科学,2017,45(21):199-201.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.056

软枣猕猴桃多糖、黄酮提取工艺的优化及抗氧化活性

何婷婷,柴军红,金志民,宛春雷,张 蕾

(牡丹江师范学院生命科学与技术学院,黑龙江牡丹江 157011)

摘要:以提高软枣猕猴桃中的总黄酮、多糖提取为目标,经过提取方法对比及正交设计试验,优化总黄酮、多糖的提取工艺,研究其抗氧化活性。结果表明,影响提取工艺的因素由高到低为复合酶浓度>提取时间>料液比>提取功率,最佳工艺参数为 0.5% 纤维素+0.4% 果胶复合酶浓度、料液比 1 g:15 mL、提取时间 10 min、微波功率 300 W,此时其加权收率为 6.754 3,并经验证具有较好的稳定性;提取物浓度超过 0.8 mg/mL 时,对羟基自由基、超氧阴离子自由基的清除率在 70.00% 以上。

关键词:软枣猕猴桃;总黄酮;多糖;提取工艺;优化条件;抗氧化;稳定性

中图分类号:TS201.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)21-0199-03

软枣猕猴桃 (*Actinidia arguta*) 为猕猴桃科猕猴桃属植物,果实多汁,富含维生素 C、维生素 B、胡萝卜素及衍生物、皂苷、黄酮、多糖等多种药理活性成分^[1-2],对高血压、心绞痛、高血脂、肿瘤等有一定疗效,其中多糖物质对胃肿瘤有显著抑制作用,抑制率高达 96.4%^[3],此外软枣还具有一定的降血糖、抗病毒、改善视力、提高耐力等作用^[4]。现代药理研究表明,软枣猕猴桃的药理作用与其含有黄酮、多糖等成分有密切关系,因此进一步加强软枣猕猴桃黄酮、多糖的提取工艺研究,加快其资源开发利用很有必要。

现阶段,软枣猕猴桃的黄酮、多糖提取主要集中在单指标工艺研究,不能很好地评价其提取工艺优劣,且未系统研究各种提取方法之间的差异。本研究以黑龙江省牡丹江市横道河地区生产、经牡丹江师范学院于爽教授鉴定的软枣猕猴桃(标本现存于牡丹江师范学院标本室)为材料,比较常规提取法、闪式提取法、超声波提取法、酶促-微波提取法等对软枣猕猴桃中总黄酮、多糖的提取效果,并采用含量加权法、正交试验法优化工艺参数,进行体外抗氧化研究,以期对软枣猕猴桃

桃的开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

葡萄糖,由上海国药集团生产;浓硫酸,由天津市晶科化工有限公司;三氯甲烷、乙酸乙酯,均由天津大茂化学试剂厂生产;芸香苷标准品,纯度>99%,由贵州迪大生物技术公司生产;乙醇、甲醇、盐酸、苯酚,均由沈阳试剂五厂生产;果胶酶、纤维素酶 R-10,由日本 Wolsen 生产。

1.2 主要仪器

T6 紫外可见分光光度计,由北京普析通用仪器公司生产;BT25S 电子天平,由德国赛多利斯集团生产;R210 旋转蒸发仪,由瑞士 Buchi 生产;SL-2010N 超声波提取器,由江苏省南京顺流设备有限公司生产;MCR-3 型实验微波提取器,由广东省广州予华设备有限公司生产;JHBE-50T 闪式提取器,由江苏省南京庚辰科学仪器有限公司生产。

1.3 提取总黄酮和多糖的对比试验

1.3.1 提取溶剂 精确称取软枣猕猴桃 200 g,分别以三氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇、甲醇及水等作为提取溶剂,料液比 1:10(g/mL),超声波法提取 30~40 min;回收溶剂,浓缩,乙醇沉淀,冷冻干燥即获得多糖。将醇沉后的溶液回收乙醇,浓缩,干燥,测定总黄酮。多糖含量测定以葡萄糖为对照品,采用硫酸-苯酚显色法,采用紫外可见分光光度计测定波长为 490 nm 的吸光度,计算多糖含量;总黄酮测定以芸香苷为对

收稿日期:2016-05-26

基金项目:牡丹江师范学院国家级课题培育项目(编号:GP201609);

牡丹江师范学院国家预研项目(编号:GY201307);黑龙江省牡丹江市科技攻关(编号:G2014d1509,G2012d1082)。

作者简介:何婷婷(1983—),女,黑龙江牡丹江人,博士,讲师,从事药用植物学研究。E-mail:swxhtt@126.com。

[7]温升南,程燕锋,杜 冰. 不同杀菌处理方法对菠萝汁理化性质的影响[J]. 现代食品科技,2008,24(10):977-980.

[8]Olmez H, Kretschmar U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact[J]. LWT - Food Science and Technology, 2009,42(3):686-693.

[9]方 婷,严志明,赵 剪. 不同杀菌方式对鲜橙汁品质的影响及其感官评价[J]. 北华大学学报(自然科学版),2008,9(1):75-79.

[10]Lee J S, Huber D J, Watkins C B, et al. Influence of wounding and

aging on 1-MCP sorption and metabolism in fresh-cut tissue and cell-free homogenates from apple fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2012,67(1):52-58.

[11]张 静,肖 建,杨新涛,等. 高密度 CO₂ 和常压处理对哈密瓜汁浊度、色度、褐变度变化的研究[J]. 中国酿造,2009,28(2):43-46.

[12]Cliff M A, Toivonen P M A, Forney C F, et al. Quality of fresh-cut apple slices stored in solid and micro-perforated film packages having contrasting O₂ headspace atmospheres[J]. Postharvest Biology and Technology, 2010,58(1):254-261.

照品,采用亚硝酸钠-硝酸铝法,采用紫外可见分光光度计测定波长为 505 nm 的吸光度,测定总黄酮含量。多糖对照品在 2.3 ~ 23 μg/mL 范围内线性关系良好,其回归方程为 $y = 0.0175x + 0.0176 (r^2 = 0.9993)$;芸香苷对照品在 0.1103 ~ 0.6618 mg/mL 范围内线性关系良好,其回归方程为 $y = 0.5811x + 0.0149 (r^2 = 0.9992)$ 。

1.3.2 提取方法 软枣猕猴桃 200 g,去杂、-20℃ 冰箱预冻 12 h,打浆机破碎,低温烘干,备用;采用浸提法、回流提取法、索氏连续提取法等常规提取法、超声波辅助法、闪式提取法、微波辅助法^[5-8]等提取方法,略有改动,分别提取软枣猕猴桃多糖和总黄酮,料液比均为 1:10 g/mL。

浸提法:料液浸泡 2 d,浓缩干燥,备用。回流提取法:料液回流时间 2~4 h,提取 2~3 次,合并滤液,浓缩干燥,备用。索氏提取法:料液提取 6~12 h,浓缩干燥。超声波辅助法:料液提取时间 30~40 min,温度 35~40℃,功率 100 W,频率 20 kHz。微波辅助法:料液提取时间 10 min,功率 300 W。酶促+微波法:料液中加入 0.5% 果胶酶和 0.2% 纤维素酶(以软枣猕猴桃计),37℃ 处理 2 h;微波辅助法提取 10 min,功率 300 W。闪式提取法:料液提取温度 30℃,时间 3 min,pH 值为 7.5,转速 5 000 r/min。酶促+浸提法:料液中加入 0.5% 果胶酶和 0.2% 纤维素酶(以软枣猕猴桃计),37℃ 处理 2 h;料液浸泡 2 d,浓缩干燥。酶促+闪式提取法:料液中加入 0.5% 果胶酶和 0.2% 纤维素酶(以软枣猕猴桃计),37℃ 处理 2 h;料液提取温度 30℃,时间 3 min,pH 值为 7.5,转速 5 000 r/min。酶促+超声波法:料液中加入 0.5% 果胶酶和 0.2% 纤维素酶(以软枣猕猴桃计),37℃ 处理 2 h;料液提取时间 30~40 min,温度 35~40℃,功率 100 W,频率 20 kHz。重复 3 次,取平均值。

1.4 软枣猕猴桃总黄酮和多糖提取工艺的优化及其稳定性验证

在前期单因素试验的基础上,以复合酶添加量、微波功率、提取时间、料液比等为试验因子,以总黄酮、多糖提取率为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验(表 1)优化其提取工艺。以最佳工艺进行 3 次重复,以验证其工艺稳定性。

1.5 活性成分的测定

1.5.1 总黄酮 采用亚硝酸钠-硝酸铝法^[9]测定,即取适量提取浸膏,少量甲醇超声溶解,100 mL 容量瓶 70% 甲醇定容;移取上清 0.5~1.0 mL,测定总黄酮含量。

表 1 软枣猕猴桃总黄酮和多糖提取工艺条件 正交试验因素与水平				
水平	A:时间 (min)	B:料液比 (g:mL)	C:功率 (W)	D:果胶+纤维素酶添加量 (%)
1	5	1:10	300	0.5+0.2
2	8	1:15	400	0.5+0.3
3	10	1:20	500	0.5+0.4

1.5.2 多糖 采用 5% 苯酚-硫酸显色法^[10]测定,即将提取液回收溶解,浓缩至原体积的 1/10~1/6;加无水乙醇至 60% 以上,静置 12 h;离心,冷冻干燥;取适量热水超声溶解,100 mL 容量瓶定容,移取上清 0.5~1.0 mL,测定多糖含量。

1.6 提取物体外抗氧化活性

最佳工艺条件提取总黄酮和多糖,将提取液浓缩,40℃

干燥,备用。参考文献[10]的方法并略有改变,测定提取物对超氧阴离子自由基的清除能力,依据文献[11]的方法测定提取物对羟基自由基的清除能力。

2 结果与分析

2.1 总黄酮和多糖提取的对比试验

2.1.1 提取溶剂 由表 2 可见,醇类物质作为提取剂对总黄酮和多糖的提取效果相对较好,提取率相对较高。考虑毒性、成本等因素,本试验采用乙醇:水=6:4 作为提取溶剂。

表 2 不同提取溶剂对总黄酮和多糖的提取效果		
溶剂	提取率(%)	
	总黄酮	多糖
水	1.02	0.65
乙醇+水(6:4)	1.89	1.34
甲醇+水(7:3)	1.84	1.65
乙酸乙酯	1.57	0.27
三氯甲烷	1.08	0.10

2.1.2 提取方法 由表 3 可见,传统提取法从提取时间、效率等与超声波法、微波法等存在差异,浸提法总黄酮、多糖的提取率分别为 0.28%、0.15%,不足微波+酶促法的 10%。闪式提取法对软枣猕猴桃总黄酮、多糖有较好的提取效果,具有快速、温度低等优势,具有很好发展潜力;由于软枣猕猴桃果实中的果胶吸附作用和阻碍传质原因,浆果对活性物质的提取往往会产生不利影响,通过酶促作用,可明显提高对黄酮及多糖的提取率。本试验采用酶促+微波法以提取软枣猕猴桃的总黄酮、多糖。

表 3 不同提取方法对总黄酮和多糖的提取效果		
提取方法	提取率(%)	
	总黄酮	多糖
浸提法	0.28	0.15
回流提取法	2.36	1.46
索氏提取法	2.68	1.79
超声波辅助法	2.09	1.93
微波辅助法	2.98	2.01
闪式提取法	2.64	1.82
酶促+浸提法	1.43	1.07
酶促+闪式提取法	2.74	1.91
酶促+超声波法	2.35	1.97
酶促+微波法	3.01	1.98

2.2 软枣猕猴桃总黄酮和多糖的提取工艺

2.2.1 提取工艺优化 为更好地评价提取工艺,参考文献[12],以提取率的算数平均值比值为系数,对多糖及总黄酮提取率进行加权处理。经计算,多糖(T)系数为 1.75,总黄酮(F)系数为 1.00,其总指标计算公式为:

$$\text{总指标} = 1.75 \times T + 1.00 \times F。$$

由表 4 可见,影响提取工艺的因素由高到低为复合酶浓度>提取时间>料液比>提取功率,最佳工艺条件为 $A_3B_2C_1D_3$,即复合酶(纤维素酶+果胶酶)浓度 0.5%+0.4%、料液比 1:15 g/mL、提取时间 10 min、功率在 300 W,其加权收率为 6.7543%。依据 k 值,最佳组合 $A_2B_2C_1D_3$ 不在正交设计表范围内,须进一步验证以获得最佳工艺。将 $A_2B_2C_1D_3$ 组合依据试验方法进行提取,获得多糖、总黄酮的

提取率分别为 1.876%、2.89%，其结果低于组合 $A_3B_2C_1D_3$ 。因此，软枣猕猴桃多糖、总黄酮最佳提取工艺为 $A_3B_2C_1D_3$ 。

2.2.2 最佳提取工艺稳定性验证 试验结果表明，软枣猕猴桃总黄酮、多糖 3 次提取率分别为 3.197%、3.201%、3.190%

表 4 软枣猕猴桃总黄酮和多糖提取的正交试验结果

试验号	提取因子				提取率 (%)		总指标
	A: 提取时间 (min)	B: 料液比 (g : mL)	C: 提取功率 (W)	复合酶浓度 (%)	总黄酮	多糖	
1	5	1 : 10	300	0.5 + 0.2	2.19	1.231	4.344 2
2	5	1 : 15	400	0.5 + 0.3	2.74	1.397	5.184 8
3	5	1 : 20	500	0.5 + 0.4	2.26	1.429	4.760 8
4	8	1 : 10	400	0.5 + 0.4	3.07	1.801	6.221 8
5	8	1 : 15	500	0.5 + 0.2	2.73	1.551	5.444 3
6	8	1 : 20	300	0.5 + 0.3	2.65	1.686	5.600 5
7	10	1 : 10	500	0.5 + 0.3	2.14	1.083	4.035 3
8	10	1 : 15	300	0.5 + 0.4	3.27	1.991	6.754 3
9	10	1 : 20	400	0.5 + 0.2	2.45	1.230	4.605 2
k_1	4.763	4.867	5.566	4.798			
k_2	5.756	5.794	5.337	4.940			
k_3	5.132	4.989	4.747	5.912			
R	0.933	0.927	0.819	1.114			

2.3 活性成分抗氧化试验

由图 1、图 2 可见，软枣猕猴桃提取物具有良好的羟基自由基、超氧阴离子自由基清除效果，提取物浓度为 0.8 mg/mL 时其清除率在 70.00% 以上。

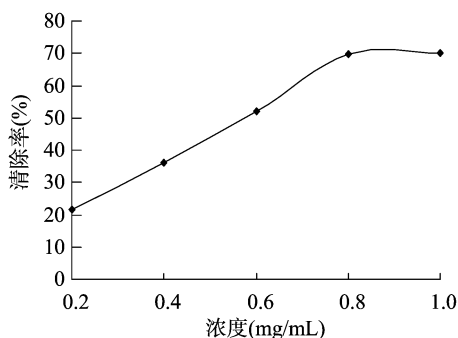


图1 提取物对超氧阴离子自由基的清除作用

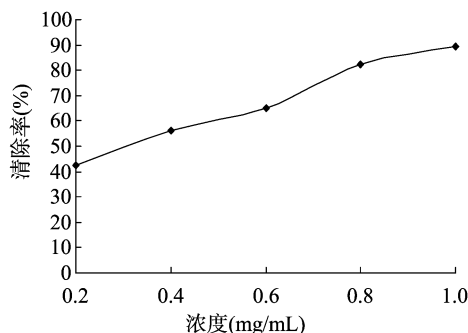


图2 提取物对羟基自由基的清除作用

3 结论

乙醇：水 = 6：4 作为提取剂，对软枣猕猴桃总黄酮、多糖的提取效果相对较好，其提取率分别为 1.89%、1.34%，虽然甲醇：水的提取效果也较好，但考虑毒性和操作性，所以本试验采用乙醇：水。微波法提取软枣猕猴桃总黄酮、多糖有良好的操作性，通过正交试验优化和加权分析，微波法在软枣

和 1.982%、1.998%、2.011%，平均值分别为 3.196%、1.997%，相对标准差分别为 0.18%、0.73%，在 1.0% 以内，另考虑试验误差，说明本试验最佳提取工艺较为稳定。

猕猴桃总黄酮及多糖提取上具有提取时间短、料液比适中、耗能相对较低的特点，在最佳提取工艺复合酶（纤维素酶 + 果胶酶）浓度 0.5% + 0.4%、料液比 1 g : 15 mL、提取时间 10 min、功率在 300 W 条件下，其多糖提取率平均为 1.997%，总黄酮提取率平均为 3.196%。软枣猕猴桃提取物在 0.8 mg/mL 以上时，对羟基自由基、超氧自由基的清除率在 70.00% 以上，具有较好的抗氧化活性。最佳提取工艺经试验验证，标准差在 1.0% 内，具有较好的稳定性。

参考文献：

- [1] 史彩虹, 李大伟, 赵余庆. 软枣猕猴桃的化学成分和药理活性研究进展[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(3): 203 - 207.
- [2] 朴一龙, 赵兰花. 软枣猕猴桃研究进展[J]. 北方园艺, 2008(3): 76 - 78.
- [3] 张强, 李曼玲, 康琛, 等. 中药藤梨根研究概况[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(11): 101 - 103.
- [4] 王菲, 许金光, 刘长江. 软枣猕猴桃中的功能保健成分及其在食品加工中的应用[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8): 421 - 423.
- [5] 柴军红, 何婷婷, 杨春文, 等. 狼爪瓦松中活性成分提取工艺的优化[J]. 贵州农业科学, 2015, 43(10): 188 - 190.
- [6] 谢捷, 李红娟, 朱兴一, 等. 响应面法优化闪式提取牛蒡苷的工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 33 - 36.
- [7] 谢捷, 周萍萍, 朱兴一, 等. 竹叶黄酮的闪式提取及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2010, 26(5): 194 - 198.
- [8] 李德海, 孙常雁, 孙莉洁, 等. 微波辅助法提取滑菇多糖的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(4): 226 - 228.
- [9] 旷春桃, 李湘洲, 汪玉霞, 等. 大叶冬青叶中总黄酮测定方法和提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(6): 49 - 51.
- [10] 郭雪峰. 毛竹与铺地竹竹叶黄酮类化学成分及其生物活性的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007.
- [11] 陈佳, 徐怀德, 米林峰, 等. 洋葱皮总黄酮纤维素酶法提取及抗氧化研究[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 37 - 41.
- [12] 柴军红, 何婷婷, 金志民, 等. 花楸叶活性成分提取工艺的优化[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(3): 23 - 27.