

樊琛,曾庆华,李燕,等. 石榴果皮中类黄酮的超声辅助提取及抗自由基检测[J]. 江苏农业科学,2020,48(23):200-204.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.23.041

石榴果皮中类黄酮的超声辅助提取及抗自由基检测

樊琛,曾庆华,李燕,王会,孙小凡,梁荣,郭兴峰,郑焕芹,冯成成

(聊城大学农学院,山东聊城 252000)

摘要:为了探讨石榴果皮废物资源化利用及其类黄酮抗自由基能力,以石榴果皮为原料,探讨超声次数、提取时间、温度、料液比及乙醇体积分数对石榴果皮中类黄酮提取效果的影响。NKA-2 大孔树脂纯化类黄酮提取物,以 IC_{50} 为指标检测纯化物清除羟自由基、超氧自由基、2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基($ABTS^{+ \cdot}$)及 1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH \cdot)的能力,并与维生素 C 抗自由基能力比较。结果表明,石榴果皮提取类黄酮的最佳条件为超声 10 次,持续时间 5 s/次,浸提温度 65 ℃,乙醇体积分数 35%,浸提时间 4 h,料液比 1 g:60 mL,类黄酮提取量为 21.34 mg/g。类黄酮纯化物清除上述 4 种自由基的 IC_{50} 分别为 1.22 mg/mL、0.061 mg/mL、0.16 mg/mL、1.37 μ g/mL,与维生素 C 的 IC_{50} (0.87 mg/mL、0.094 mg/mL、0.07 mg/mL、2.88 μ g/mL)接近。由此可见,石榴果皮可作为类黄酮提取原料,提高石榴果皮废物资源化利用。

关键词:石榴果皮;类黄酮;自由基

中图分类号: R282 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)23-0200-04

石榴是石榴科植物石榴(*Punica granatum* L.)的果实,在山东、江苏、河南等地皆有种植,其果实营养丰富。研究表明,石榴汁或其提取物能够有效清除多种自由基,对动脉粥样硬化、肿瘤、糖尿病、细菌感染等均具有一定的防治作用^[1-3]。但石榴果皮(包括外果皮、中果皮、内果皮)作为废弃物,浪费较大。石榴果皮厚 2~4 mm,质量占 45%~48%。石榴果皮主要活性成分有鞣质、类黄酮、有机酸及生物碱等^[3]。石榴果皮中的类黄酮化合物具有抗氧化活性^[3-6]。因此,本试验以石榴果皮为材料,采用单因素试验与 $L_9(3^4)$ 正交试验,探讨石榴果皮中类黄酮提取工艺,并以 NKA-2 型大孔树脂纯化粗提物提取量,检测石榴果皮类黄酮纯化物抗羟自由基($\cdot OH$)、超氧自由基、2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基($ABTS^{+ \cdot}$)和 1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH \cdot)的能力,旨在提高石榴果皮中类黄酮的提取量,并为类黄酮的提取和石榴产业深开发提供新的途径,实现废物资源化利用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 新鲜、完整的石榴,2018 年 10 月购于山东聊城当地市场。于聊城大学食品科学实验室去除石榴籽后,55 ℃烘干至恒质量,粉碎过筛。

1.1.2 试验试剂 无水乙醇、盐酸、水杨酸、EDTA、硫酸亚铁、Tris、邻苯三酚、2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基($ABTS^{+ \cdot}$)、1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH \cdot)、浓硫酸等,均为分析纯。

1.1.3 试验仪器 UV-1800 型紫外可见分光光度计,购自上海美谱达仪器有限公司;JY92-II 超声波细胞粉碎机,购自宁波新艺超声设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 类黄酮的测定 以芸香苷为标准样品,络合-分光光度计法测定类黄酮含量并绘制标准曲线^[4-7]。准确吸取 0.5 mL 提取液并稀释至 5 mL,按标准曲线步骤测定吸光度,查标准曲线后计算样液的类黄酮含量^[4-7]。

1.2.2 各因素对类黄酮提取量的影响 (1)超声次数。称取 0.4 g 石榴皮粉末,在料液比 1 g:40 mL、60%乙醇条件下分别超声(150 W)5、10、20、30、40 次,持续时间 5 s/次,40 ℃提取 3 h,过滤定容至 25 mL,测定类黄酮含量。

收稿日期:2020-03-20

基金项目:聊城大学博士科研启动基金(编号:31805)。

作者简介:樊琛(1978—),女,山东聊城人,博士,副教授,主要从事食品营养、食品安全研究。E-mail:fanchen7810@126.com。

(2) 料液比。量取 60% 乙醇溶液 20 mL, 按料液比 1 g : 20 mL、1 g : 30 mL、1 g : 40 mL、1 g : 50 mL、1 g : 60 mL 加入样品, 超声 10 次后 40 ℃ 提取 3 h, 过滤定容至 25 mL, 测定类黄酮含量。

(3) 乙醇体积分数。称取 0.4 g 样品, 按料液比 1 g : 40 mL 分别加入 0%、15%、30%、45%、60%、75%、90% 乙醇, 超声 10 次后 40 ℃ 提取 3 h, 过滤定容至 25 mL, 测定类黄酮含量。

(4) 提取时间。称取 0.4 g 样品, 料液比 1 g : 40 mL 加入 60% 乙醇, 超声 10 次后 40 ℃ 分别提取 20 min、1 h、3 h、6 h、12 h、18 h, 过滤定容至 25 mL, 测定类黄酮含量。

(5) 提取温度。称取 0.4 g 样品, 按料液比 1 g : 40 mL 加入 60% 乙醇水溶液, 超声 10 次后分别在 30、40、50、60、80 ℃ 下浸提 3 h, 过滤定容至 25 mL, 测定类黄酮含量。

(6) 正交试验。在单因素试验基础上, 进行提取温度、料液比、乙醇体积分数、提取时间的 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以提取液类黄酮含量为指标, 确定提取石榴果皮类黄酮的最佳工艺^[4-7]。

1.2.3 类黄酮的纯化 经预处理的 NKA-2 型大孔树脂静态分离纯化石榴果皮类黄酮, 45 ℃ 恒温振荡 21 h 吸附, 60% 乙醇于 25 ℃ 恒温振荡 24 h 解吸附, 获得石榴果皮类黄酮纯化液^[8-9]。

1.2.4 抗自由基检测 (1) 抗羟自由基。0.4 mL 0.15 mol/L FeSO_4 、2.0 mL 2 mmol/L 水杨酸、1.0 mL 6 mmol/L H_2O_2 以及样液 1.0 mL; 对照以蒸馏水代替样液。加入 H_2O_2 后 37 ℃ 水浴 1 h, 测 510 nm 处的吸光度, 计算清除率^[6,10]。

$$\text{清除率} = (D_0 - D_1) / D_0 \times 100\%$$

式中: D_1 为试验组吸光度; D_0 为对照组吸光度。

(2) 抗超氧阴离子自由基。A 液: pH 值为 8.20 的 0.1 mol/L Tris - HCl 缓冲溶液。B 液: 4.5 mmol/L 邻苯三酚盐酸溶液。25 ℃ 依次加入 A 液 2.35 mL、1.00 mL 蒸馏水、1.00 mL 样液及 0.15 mL B 液于比色管中, 立刻测定 325 nm 初始吸光度, 1 min 后再次测定吸光度。对照以蒸馏水代替样液。计算清除率^[11-12]。

$$\text{清除率} = (\Delta D_0 - \Delta D_1) / \Delta D_0 \times 100\%$$

式中: ΔD_0 为对照组吸光度差值; ΔD_1 为试验组吸光度差值。

(3) 抗 ABTS 自由基。待测液 2 mL 加入 7 mL ABTS 标准工作液振荡摇匀, 常温避光 10 min 后测吸

光度 D_1 。同时做对照测吸光度 D_0 , 计算清除率^[13]。

$$\text{清除率} = (D_0 - D_1) / D_0 \times 100\%$$

式中: D_1 为试验组吸光度; D_0 为对照组吸光度。

(4) 抗 DPPH 自由基。待测液 2 mL 加入 2 mL DPPH 溶液振荡摇匀, 密封避光 30 min, 517 nm 测吸光度 D_1 。同时做对照测吸光度 D_0 , 计算清除率^[13-15]。

$$\text{清除率} = (D_0 - D_1) / D_0 \times 100\%$$

式中: D_1 为试验组吸光度; D_0 为对照组吸光度。

1.3 数据统计与分析

类黄酮提取优化结果以正交设计助手 v3.1 分析。

2 结果与分析

2.1 芸香苷标准曲线

由图 1 可知, 回归方程: $y = 12.617x + 0.0096$, $r^2 = 0.9981$ 。式中: y 为吸光度; x 为质量体积浓度, mg/mL。

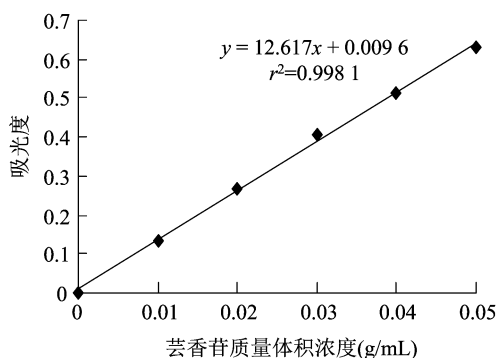


图1 芸香苷标准曲线

2.2 不同因素对石榴果皮类黄酮提取量的影响

2.2.1 超声次数的影响 由图 2 可知, 随超声次数增加, 石榴果皮中类黄酮提取量先增加后降低。超声次数为 10 次时, 提取量最高。超声时间过长可能会破坏类黄酮, 因此后续试验均采用超声 10 次, 持续时间 5 s/次。

2.2.2 料液比的影响 由图 3 可知, 类黄酮提取量随溶剂的比例增大而增高, 但在 1 g : 60 mL 之后增高不明显, 考虑节省成本, 选择料液比为 1 g : 50 mL ~ 1 g : 70 mL 进行正交试验。

2.2.3 浸提时间的影响 由图 4 可知, 类黄酮的提取量随浸提时间的延长先升高后下降, 3 h 时最高。由此推测, 浸提时间过长, 导致部分类黄酮分解。因此, 选择 2 ~ 4 h 进行正交试验。

2.2.4 浸提温度的影响 由图 5 可知, 随浸提温度

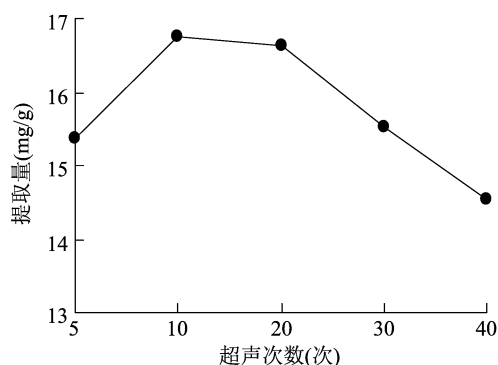


图2 超声提取次数对类黄酮提取率的影响

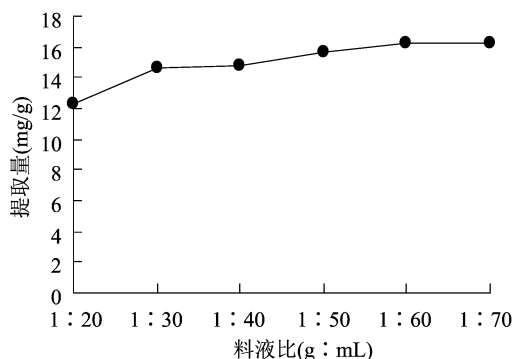


图3 料液比对类黄酮提取量的影响

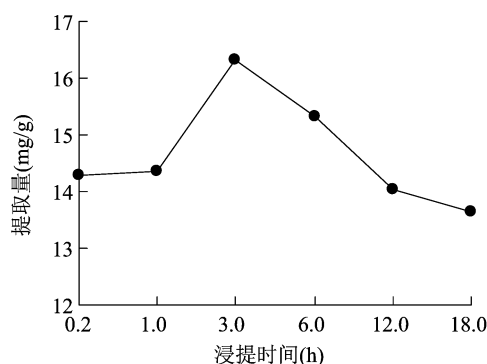


图4 浸提时间对提取量的影响

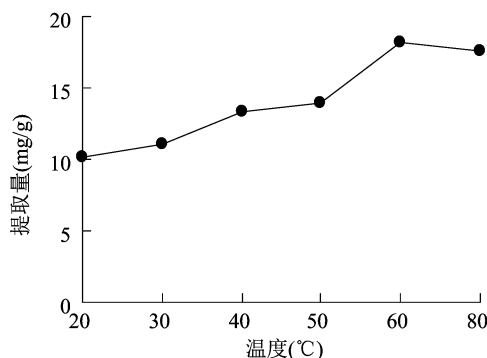


图5 浸提温度对类黄酮提取量的影响

增加,类黄酮提取量先增加后降低。当浸提温度为60℃时,类黄酮提取量最高。提高浸提温度有助于类黄酮物质溶出,但温度过高可能破坏类黄酮结

构,且对溶剂极性有影响,因此选择55~65℃进行正交试验。

2.2.5 乙醇体积分数的影响 由图6可知,随乙醇体积分数增加,类黄酮提取量先增加后降低,在30%时达到最高。因此选择25%~35%乙醇体积分数进行正交试验。

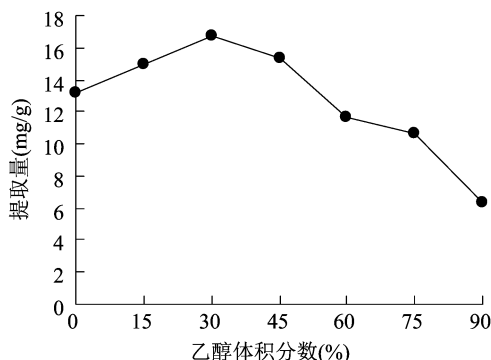


图6 乙醇体积分数对类黄酮提取率的影响

2.3 正交试验及验证结果

采用 $L_9(3^4)$ 正交试验确定石榴果皮中类黄酮的最佳提取工艺。由表1可知,4个因素对石榴果皮类黄酮提取影响的强弱依次为浸提温度>乙醇体积分数>浸提时间>料液比,根据均值确定最佳提取工艺为 $C_3A_3D_3B_2$,即最优提取条件为浸提温度65℃、乙醇体积分数35%、浸提时间4h、料液比1g:60mL。经验证试验,在此条件下,类黄酮提取量平均值为21.34mg/g,优于正交试验中所有组合。

2.4 石榴果皮类黄酮对4种自由基的清除能力

将NKA-2型大孔树脂纯化的类黄酮溶液及维生素C溶液分别逐级稀释,测定其对 $\cdot OH$ 、超氧自由基、 $ABTS^+$ 、 $DPPH\cdot$ 的清除能力,计算自由基清除 IC_{50} 。类黄酮纯化物与维生素C抗自由基 IC_{50} 比较,见表2。

由表2可知,石榴果皮中类黄酮纯化物对羟自由基、超氧自由基、 $ABTS^+$ 、 $DPPH\cdot$ 均具有清除能力。其中,类黄酮纯化物对羟自由基、 $ABTS^+$ 的清除能力略小于维生素C,纯化物对超氧自由基、 $DPPH\cdot$ 的清除能力略强于维生素C。但总体而言,石榴果皮中类黄酮纯化物的抗自由基与强抗氧化剂维生素C十分接近。石榴果皮类黄酮纯化物对4种自由基的清除能力大小依次为 $DPPH\cdot$ 、 $O_2^{\cdot -}$ 、 $ABTS^+$ 、 $\cdot OH$ 。

3 讨论与结论

宋薇薇在对石榴外果皮总黄酮的提取试验中

表 1 正交试验设计和结果

试验组	A:乙醇体积分数 (%)	B:料液比 (g : mL)	C:浸提温度 (℃)	D:浸提时间 (h)	类黄酮提取量 (mg/g)
1	1(25)	1(1 : 50)	1(55)	1(2)	17.818 2
2	1	2(1 : 60)	2(60)	2(3)	18.080 8
3	1	3(1 : 70)	3(65)	3(4)	19.180 0
4	2(30)	1	2	3	17.547 6
5	2	2	3	1	18.542 8
6	2	3	1	2	16.533 0
7	3(35)	1	3	2	19.400 0
8	3	2	1	3	18.535 5
9	3	3	2	1	18.620 0
k_1	18.360	18.255	17.629	18.327	
k_2	17.541	18.386	18.083	18.005	
k_3	18.852	18.111	19.041	18.421	
R	1.311	0.275	1.412	0.416	

表 2 石榴果皮类黄酮及维生素 C 抗自由基 IC_{50}

物质	IC_{50}			
	·OH (mg/mL)	超氧自由基 (mg/mL)	ABTS ⁺ · (mg/mL)	DPPH· (μg/mL)
类黄酮纯化物	1.22	0.061	0.16	1.37
维生素 C	0.87	0.094	0.07	2.88

采用乙醇提取微波辅助法,得出最佳提取工艺条件为乙醇体积分数 90%、微波功率 140 W、提取时间 60 s、料液比 1 g : 15 mL,此时总黄酮得率为 $(6.64 \pm 0.032)\%$ [3]。本试验选用超声辅助提取,试验材料石榴果皮选用的是外果皮和中果皮,最佳提取条件下的类黄酮提取量为 21.34 mg/g。获得的类黄酮提取效率低于宋薇薇微波辅助法的提取效率。植物因不同品种、不同产地、不同部位,其生理活性物质含量有所差异。由此推测,不同辅助预处理方式、石榴的产地、品种、选用部位等均会对石榴皮中类黄酮含量及类黄酮提取效率产生影响。石榴果皮全果皮或仅选用外果皮,类黄酮含量有差异,外果皮的类黄酮含量通常高于中果皮。本试验选用的材料包含外果皮和中果皮,有资料显示,不同石榴品种、不同部位对类黄酮提取物抗自由基能力存在差别。如云南玉溪产地的酸石榴其 DPPH·清除率的 IC_{50} 可达到 0.005 mg/mL。本试验中采用山东聊城产的石榴,其类黄酮纯化物清除 DPPH·的 IC_{50} 为 1.37 μg/mL,略强于云南玉溪产石榴。本试验检测了石榴果皮类黄酮对 4 种自由基的清除能力,石榴果皮的类黄酮纯化物对羟自由基、超氧自

由基、ABTS⁺·、DPPH·均具有清除能力,且与强抗氧化剂维生素 C 十分接近。笔者曾检测玫瑰花苞浸出液的抗自由基能力,结果表明玫瑰花苞浸出液对 DPPH·、ABTS⁺·的清除能力较强,对羟基自由基的清除能力较弱,这与本试验中石榴果皮类黄酮清除几种自由基的能力相似。本试验发现,未经大孔树脂纯化的类黄酮粗提液也具有清除自由基能力。石榴果皮粗提液中含有生物碱、多酚等多种成分。粗提液对羟自由基、ABTS⁺·、DPPH·的清除能力高于纯化液,但对超氧自由基的清除能力低于纯化液。这可能是由于不同物质对各种自由基的效应不同。

本试验采用石榴果皮(包括外果皮、中果皮)提取类黄酮,最佳条件为超声 10 次(持续时间 5 s/次)、浸提温度 65 ℃、乙醇体积分数 35%、浸提时间 4 h、料液比 1 g : 60 mL,类黄酮提取量为 21.34 mg/g。类黄酮纯化物清除羟自由基、超氧自由基、ABTS⁺·和 DPPH·的 IC_{50} 分别为 1.22 mg/mL、0.061 mg/mL、0.16 mg/mL、1.37 μg/mL,与维生素 C 的 IC_{50} (0.87 mg/mL、0.094 mg/mL、0.07 mg/mL、2.88 μg/mL)接近。这为石榴果皮作为类黄酮提取原料、提高石榴果皮废物资源化利用提供了试验依据。

参考文献:

- [1] 张文涛,蔡利. 微波辅助提取石榴果渣中单宁工艺研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2013,34(5):58-61.

韦克苏,蒋石香,颜 杭,等. 采收成熟度对提高上部烟叶可用性的影响——基于细支卷烟原料需求[J]. 江苏农业科学,2020,48(23):204–209.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.23.042

采收成熟度对提高上部烟叶可用性的影响 ——基于细支卷烟原料需求

韦克苏¹, 蒋石香², 颜 杭², 张建强³, 陈海清³, 李少鹏³, 涂永高¹, 王 伟³, 李 雨³

(1. 贵州烟草科学研究院/烟草行业山地品质与生态重点实验室, 贵州贵阳 550081;

2. 遵义市烟草公司, 遵义播州 563199; 3. 江苏中烟工业有限责任公司, 江苏南京 210015)

摘要:为提高上部烟叶工业可用性,满足细支卷烟对高香气、高满足感烟叶原料需求,以云烟 87 和 K326 为材料,以常规采收为对照,设置延迟采收 4、8 d 2 个成熟度处理,分析采收成熟度对上部烟叶外观质量、化学指标及感官质量的影响。结果表明:云烟 87 品种上部烟叶延迟采收 4 d,可以加深烟叶颜色,提高油分含量和色度,改善烟叶感官评吸质量,提高烟气圆润感、柔和程度,烟叶化学成分更加协调,更加符合细支卷烟对高香气、高满足感原料的需求;推迟 8 d 采收,烟叶工业可用性有降低趋势。K326 品种延迟采收,烟叶颜色加深,但烟叶理化品质、外观及内在评吸质量均随着采收时间延迟而下降,枯焦气、刺激性和干燥感增加。因此,适度提高云 87 的采收成熟度,可改善其上部烟叶香气,提高烟气的满足感,符合细支卷烟对烟叶原料需求方向。

关键词:细支卷烟;原料需求;采收成熟度;上部烟叶;可用性

中图分类号:TS44⁺1

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2020)23-0204-06

近年来,细支卷烟作为中式卷烟的重要组成部分,以其时尚时髦的造型迅速占领市场,得到相当

一部分消费者的青睐^[1-2]。但由于缺乏高香气高满足感烟叶原料,国内细支卷烟口感普遍偏淡,缺少普通烟支烟气醇厚的味道,即保障高香气高满足烟叶原料的供应成为我国细支卷烟进一步发展的瓶颈^[2-3]。我国上部烟叶因烟碱含量偏高、还原糖含量及糖碱比低、内在化学成分不协调等因素,导致上部烟叶普遍表现出烟气浓度大、劲头大、刺激性强、烟气粗糙等特点,从而影响了上部烟叶的可用性^[4-5]。然而,烟气浓度和劲头大的上部烟叶是高

收稿日期:2020-03-30

基金项目:江苏中烟科技项目(编号:Y040201815);贵州省科技项目(编号:黔科合支持[2016]2536号;贵州省烟草公司科技项目(编号:201812、201813)。

作者简介:韦克苏(1982—),男,广西宜州人,副研究员,主要从事烟叶调制研究。E-mail:151427994@qq.com。

通信作者:李 雨,农艺师,主要从事烟草基地建设工作。E-mail:liyu@jszygs.com。

[2]翟文俊,岳 红. 微波辅助提取石榴皮中单宁的研究[J]. 食品科技,2009,34(6):203–205.

[3]宋薇薇. 石榴皮总黄酮的提取及抗氧化活性和抑菌作用研究[D]. 成都:西华大学,2008.

[4]蒋华梅,石登红. 拟覆盆子叶总黄酮提取及抗氧化活性[J]. 贵州农业科学,2015,43(11):169–173.

[5]张 浩,叶 嘉,郝立华,等. 正交实验优化卷柏类黄酮提取工艺及其体外抗氧化作用[J]. 北方园艺,2017(21):134–139.

[6]林丹英,尤婷婷,黄锁义. 茼蒿总黄酮提取及对羟自由基清除作用[J]. 中国野生植物资源,2007,26(5):57–59.

[7]孙伟鹏,马 娜,党艳艳. 沙棘果渣中多种有效成分的提取及其抗氧化性能研究[J]. 食品工业,2018,39(6):151–155.

[8]杨希娟,党 斌,张 杰,等. 黑青裸麸皮结合态酚类物质大孔树脂分离纯化工艺优化[J]. 农业工程学报,2018,34(21):295–303.

[9]吕春茂,宋雨涵,孟宪军,等. 大孔树脂纯化寒富苹果渣多酚工艺优化[J]. 食品工业科技,2012,33(6):300–303, 308.

[10]樊 琛,李 燕,曾庆华,等. Fenton 羟自由基反应体系的修正[J]. 湖北农业科学,2015,54(21):5382–5386.

[11]徐宏化,程 慧,王正加,等. 美国山核桃总多酚与总黄酮含量及抗氧化活性[J]. 核农学报,2016,30(1):72–78.

[12]赵红宇,陈敦洪,邓 良,等. 桑葚果酒全渣发酵过程中生物活性物质及其抗氧化活性变化的研究[J]. 食品工业科技,2015,36(23):182–185, 189.

[13]魏 琳,樊 琛,崔晓茹,等. 山竹果皮花青素的提取及抗自由基检测[J]. 贵州农业科学,2018,46(12):127–131.

[14]孙海燕. 櫻桃核中类黄酮快速溶剂萃取工艺优化及抗氧化研究[J]. 食品工业,2017,38(8):106–109.

[15]梁红敏,高德艳,胡文效. 葡萄籽低聚原花青素体外抗氧化活性研究[J]. 中国酿造,2017,36(4):149–152.