

荸荠皮多酚的提取及脂质抗氧化活性

郭艳华, 李艾华, 张玉敏

(江汉大学 化学与环境工程学院, 湖北 武汉 430056)

摘要: 采用超声方法提取荸荠皮多酚, 通过单因素试验和正交试验确定其最佳提取工艺条件, 同时研究了荸荠皮多酚粗提物对亚油酸脂质过氧化体系的抑制作用。结果表明: 提取剂为60%的乙醇, pH为3.5, 料液比为1:30(W/V), 超声时间为50 min。在此条件下, 荸荠皮多酚得率1.8%, 且有较强的脂质抗氧化活性。

关键词: 荸荠皮; 超声波法; 多酚; 脂质抗氧化活性

中图分类号: TQ351.0 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-0143(2012)06-0024-05

酚类是天然化合物中的一个大类, 广泛存在于不同结构、不同种类的植物中, 其中一些酚类化合物是众所周知的抗氧化剂。近年来研究发现, 一些农业、食品工业副产品(如茶叶、花生壳、柑橘类果皮、果汁残渣等)的提取物中也含有丰富的多酚类物质, 其中有些提取物中多酚含量很高。因此来自农业和食品工业副产品的植物多酚将成为保健食品、医药、化妆品等行业的重点开发研究对象^[1-3]。至今, 对荸荠的加工副产品荸荠皮中多酚的研究未见报道。本文研究超声优化荸荠皮多酚的提取工艺, 并研究其粗提物的脂质抗氧化作用, 为天然生物废弃资源的深度开发和利用提供科学信息。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料和试剂 原料: 荸荠皮(收集于武汉市鄂城墩集贸市场)。

试剂: 焦性没食子酸、茶多酚、 β -胡萝卜素等为生化试剂; 无水乙醇、 MnO_4^- 、 $FeCl_3$ 、溴水、硫代巴比妥酸(TBA)、NaOH(固体)、浓盐酸、石油醚、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、Tween-40、亚油酸等均为分析纯。

1.1.2 主要仪器 721分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; UV-2401紫外可见分光光度

计, 日本岛津公司; RE-52旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; ST-02A多功能粉碎机, 永鑫市帅通工具有限公司; SHB-III循环水式多用真空泵, 巩义市予华仪器有限公司; DF110型电子分析天平, 中国轻工业机械总公司常熟衡器公司; KQ-250型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 荸荠皮多酚的提取方法 将荸荠皮破碎, 过60目筛, 粉碎后加入约10倍体积的石油醚浸提12 h脱脂, 室温下干燥至恒质量。以提取多酚含量作为指标, 进行初步的单因素实验。在单因素提取实验中, 超声波辅助提取时间为50 min时多酚含量最为突出, 故提取时间单因素不必作为正交因素水平, 在单因素实验中即可确定提取时间为50 min。综合考虑其它单因素水平乙醇浓度、液料比和提取液的酸度, 设计正交实验因素水平表(见表1), 以确定最佳提取条件。单因素实验的结果: 提取剂酸度pH为3.5, 提取剂乙醇浓度为60%, 料液比为1:20(g:mL)。

表1 正交实验因素水平表

因素与水平	提取剂酸度(pH)	提取剂浓度/%	料液比/g:mL
1	3.0	50	1:10
2	3.5	60	1:20
3	4.0	70	1:30

收稿日期: 2012-09-16

基金项目: 武汉市科技计划项目(201150699189-13)

作者简介: 郭艳华(1960—), 教授, 研究方向: 天然产物化学和无机及分析化学。

根据正交实验最佳条件提取荸荠皮多酚,过滤后减压浓缩至膏状,根据测定的需求浓度用要求的溶剂定容,即为荸荠皮多酚提取物。

1.2.2 酚类物质的显色鉴定 取少量荸荠皮的提取液,分别加入①溴水、②KMnO₄溶液、③FeCl₃溶液,进行检测。

1.2.3 紫外-可见光谱的测定 称取1.00 g荸荠皮粉于锥形瓶中,根据正交实验最佳条件取荸荠皮多酚提取物1 mL于比色管中,用50%乙醇稀释至刻度,用1 cm的比色皿测其紫外吸收光谱,结果如图1所示。

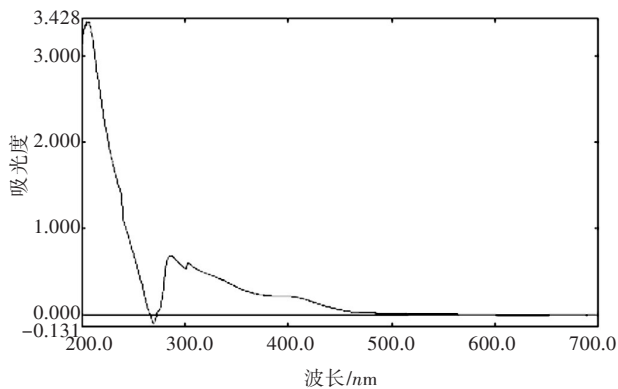


图1 荸荠皮提取液的吸收光谱

1.2.4 多酚含量的测定 (1) 没食子酸标准曲线的绘制。利用没食子酸标准溶液和Folin试剂等测定并制作没食子酸标准曲线^[4]。以吸光度 A 为横坐标,总酚浓度 C (mg/mL)为纵坐标建立标准曲线,回归方程: $C = 7.923 4A - 0.015 7$,相关系数 $R = 0.999 9$ 。(2) 荸荠皮多酚提取物中总酚含量的测定。以提取液代替没食子酸标准溶液按照制作标准曲线的方法测定提取物中的总酚含量。

1.2.5 荸荠皮多酚提取物脂质抗氧化活性的测定

(1) 对亚油酸/ β -胡萝卜素实验。采用 β -胡萝卜素褪色实验测定荸荠皮提取物抗油脂氧化能力^[5]。以1.0 mL氯仿溶解0.5 mg β -胡萝卜素,加入200 mg Tween-40和25 μ L亚油酸,均匀混合后蒸干。加入100 mL蒸馏水,振荡均匀。取4 mL上述混合液,加入200 μ L提取物样品溶液,于50 $^{\circ}$ C加热3 h。以常用抗氧化剂BHT和茶多酚作对照实验。测定反应前后样品在波长490 nm处的吸光度。抗氧化能力按下式进行计算:

$$\text{抑制率}/\% = [1 - (A_0 - A_t) / (A_0' - A_t')] \times 100,$$

式中: A_0 , A_0' 分别为初始样品和对照组的吸光度; A_t , A_t' 分别为3 h后样品和对照组的吸光

度。抑制率越大,对亚油酸脂质氧化的抑制作用越强。

(2) 对Fe²⁺催化亚油酸脂质过氧化体系的抗氧化作用测定。在pH = 7.4的10 mL 0.2 mol/L的磷酸钠缓冲液中,加入2.5%的亚油酸乙醇液4.2 mL,蒸馏水4.8 mL,再加入Fe²⁺ ([Fe²⁺] = 2.54 \times 10⁻³ g/L)溶液1 mL,使Fe²⁺催化亚油酸形成底物溶液。加入底物质量浓度为0.05%、0.10%和0.15%的荸荠皮乙醇提取物、茶多酚和BHT,混合后在40 $^{\circ}$ C的生化培养箱中反应16 h,取出,迅速加入25%的三氯乙酸混匀。然后加入0.67%的TBA,在沸水浴中加热15 min。取出冷却,加入4 mL正丁醇,混匀,离心15 min,取正丁醇液于532 nm比色,同时测定不加抗氧化物的吸光度。

研究表明:亚油酸氧化的起始反应很慢,但微量的过渡金属离子可起催化作用。当向亚油酸中加入Fe²⁺时,除了可以加速起始反应外,还可与脂质过氧化的中间产物脂质过氧化物(LOOH)反应,使其分解产生烷氧基(LO \cdot)和脂质过氧自由基(LOO \cdot),从而加速脂质氧化反应的进行。亚油酸的氧化产物过氧化物可分解产生二级产物丙二醛,丙二醛与硫代巴比妥酸作用生成有色染料,最大吸收波长为532 nm。由吸光值的大小可判断丙二醛产生的多少,并评估各样品在催化条件下的抗氧化效果。抗氧化样品加入可清除自由基,抑制丙二醛的产生,吸光度越小,抗氧化活性越强。清除率计算公式如下:

$$\text{清除率}/\% = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100\%,$$

其中: A_0 为不加样品的吸光度值, A_t 为加样品后的吸光度值。

(3) 对Fenton反应催化亚油酸脂质过氧化体系的抗氧化作用测定。在pH = 7.4的10 mL 0.2 mol/L的磷酸钠缓冲液中,加入2.5%的亚油酸乙醇液4 mL,蒸馏水4.4 mL,再加入Fe²⁺ ([Fe²⁺] = 2.54 \times 10⁻³ g/L)溶液1 mL和0.5 mL 0.01%的H₂O₂催化亚油酸形成底物溶液。其余方法同1.2.5的方法(2)。

1.2.6 荸荠皮多酚提取物脂质抗氧化活性与多酚含量的关系测定 将超声辅助法最佳提取物溶液通过旋转蒸发器蒸干,配制系列荸荠皮多酚含量不同的溶液,然后测定对亚油酸/ β -胡萝卜素实验的抑制率。

2 结果与分析

2.1 超声波法提取荸荠皮多酚的正交实验结果

超声波法提取荸荠皮多酚的正交实验结果见表2。由表2可以看出,在3个因子中,以提取剂浓度对提取率的影响最大;各因子对提取率的影

响依次为提取剂浓度、提取剂酸度、料液比。确定最佳工艺条件为60%乙醇,提取剂酸度pH=3.5,料液比为1:30(g/mL),提取时间为单因素实验确定的50 min,此条件提取的多酚得率1.8%。查得 $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.00$,由表3可知,3种影响因素均为不显著性影响因子。

表2 L_93^3 正交表和实验结果

编号	A 提取剂酸度	B 提取剂浓度	C 料液比	吸光度	多酚含量%
1	3.0	50	1:20	0.118	1.2433
2	3.0	60	1:10	0.145	1.6789
3	3.0	70	1:30	0.120	1.2656
4	3.5	50	1:10	0.090	0.9322
5	3.5	60	1:30	0.172	1.8433
6	3.5	70	1:20	0.079	0.8100
7	4.0	50	1:30	0.103	1.0767
8	4.0	60	1:20	0.141	1.4989
9	4.0	70	1:10	0.094	0.9767
T_1	4.1878	3.2522	3.5878		
T_2	3.5855	5.0211	3.5522		
T_3	3.5523	3.0523	4.1856		
T	0.6355	1.9688	0.6334		

表3 正交实验方差分析

变异原因	偏差平方和	自由度	均方	F值	显著
物料比A	0.0853	2	0.0426	1.9206	
提取温度B	0.7828	2	0.3914	17.633	
提取时间C	0.0844	2	0.0422	0	
误差	0.0444	2	0.0222	1.9017	
SS_T	0.9969	8			

2.2 荸荠皮多酚的显色反应结果

按照1.2.2的方法进行试验,得到酚类物质定性初步鉴定结果(表4)。根据酚类物质的显色反应特征,说明荸荠皮提取物中含酚类物质^[7-8]。

表4 酚类物质显色反应结果

显色剂	提取液	结论
溴水	溴水褪色并且产生沉淀	
$KMnO_4$ 溶液	高锰酸钾溶液褪色	含酚类物质
$FeCl_3$ 溶液	有褐色的化合物生成	

2.3 紫外—可见吸收光谱的测定

按1.2.3实验方法测得荸荠皮多酚粗提液紫外—可见吸收光谱见图1。

荸荠皮粗提液的吸收光谱中有3个吸收峰,峰I为303.00 nm,峰II为286.50 nm,峰III为205.00 nm,而在可见区无明显吸收,这正是植物

中多酚类物质的吸收光谱特征^[9]。

2.4 荸荠皮多酚提取物脂质抗氧化活性测定结果

2.4.1 对亚油酸/ β -胡萝卜素实验结果与分析
由图2得知,在亚油酸/ β -胡萝卜素自氧化体系中,荸荠皮多酚提取物、茶多酚、BHT均有明显的抑制作用,荸荠皮多酚提取物和茶多酚抑制能力相当,但不如BHT。在10~80 mg/L浓度范围内,三者的抑制能力明显增大,而当浓度为100~300 mg/L浓度范围内,抑制作用缓慢增大。

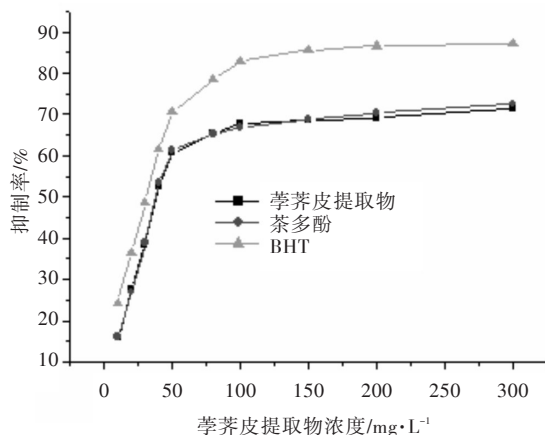


图2 荸荠皮提取物对亚油酸/ β -胡萝卜素自氧化体系的抑制作用

2.4.2 对 Fe^{2+} 催化亚油酸脂质过氧化体系的抗氧化作用的测定结果 由表5可知,荸荠皮提取物对催化条件下亚油酸的脂质过氧化物有抗氧化作用,且随提取物浓度的增强抗氧化性增强,荸荠皮提取物的抗氧化作用强于同浓度的天然抗氧化剂茶多酚,但不及同浓度的合成抗氧化剂BHT。

表5 荸荠皮提取物在 Fe^{2+} 催化条件下的抗氧化作用/%

荸荠皮提取物 含量	清除率	茶多酚 含量	清除率	BHT 含量	清除率
0.02	43.54	0.02	39.23	0.02	62.85
0.06	57.38	0.06	54.79	0.06	68.26
0.10	68.62	0.10	63.82	0.10	77.81

2.4.3 对Fenton反应催化亚油酸脂质过氧化体系的抗氧化作用的测定结果 此反应体系中, Fe^{2+} 除了催化起始反应,与过氧化物形成 $\text{LO}\cdot$ $\text{LOO}\cdot$ 自由基外,还可以与 H_2O_2 反应,产生高活性的氢氧自由基 $\cdot\text{OH}$,加速氧化反应的进行。提取物对Fenton反应催化下脂质过氧化的抑制作用结果见表6。可见荸荠皮提取物对该体系也有一定的抗氧化作用,与茶多酚的能力接近。

表6 荸荠皮提取物在Fenton反应
催化条件下的抗氧化作用 %

荸荠皮提取物 含量	清除率	茶多酚 含量	清除率	BHT 含量	清除率
0.02	13.72	0.02	13.23	0.02	29.67
0.06	19.45	0.06	18.95	0.06	40.96
0.10	28.64	0.10	28.90	0.10	52.55

2.5 荸荠皮多酚提取物脂质抗氧化活性与多酚含量的关系测定

按1.2.6实验测定的结果见图3。结果表明:荸荠皮提取物的抗脂质过氧化能力与其提取物中多酚含量有一定关联性,但并未呈完全关联性,说明其中还有其它种类的物质具有抗氧化作用,有待于今后进一步研究。

3 结论

1) 超声辅助提取荸荠皮中多酚的最佳条件是:提取剂乙醇浓度为60%,提取剂酸度 $\text{pH}=3.5$,料液比为1:30(g/mL),提取时间为50 min。

2) 经显色反应和紫外可见吸收光谱的测定,荸荠皮提取物显色反应和紫外可见吸收光谱具有

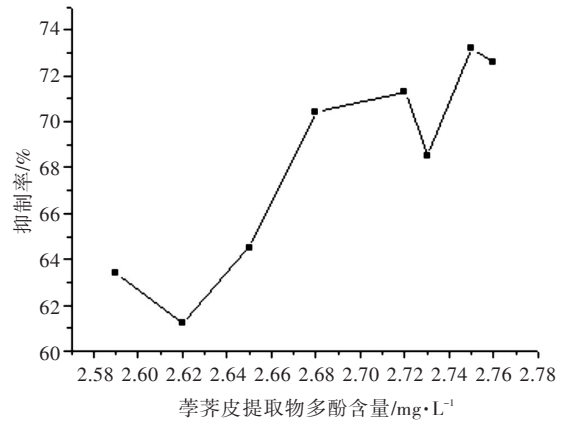


图3 荸荠皮提取物的脂质抗氧化活性与多酚含量的关系
多酚的特征,初步可判断荸荠皮提取物中含有多酚类物质。

3) 荸荠皮多酚提取物具有较强的脂质抗氧化活性,在对亚油酸的不同体系中,抗氧化能力强于或接近于茶多酚,弱于合成的抗氧化剂BHT。

4) 荸荠皮是食品加工废弃生物资源,研究表明其中含有较强的抗氧化性物质,是值得开发利用的新资源。

参考文献:

- [1] 马福波. 从桔皮中提取柑桔黄、桔油、果胶的技术研究[J]. 贵州化工, 1996(3): 40-43.
- [2] 任平, 岳淑宁, 李忠玲, 等. 石榴皮中单宁化合物的提取研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(1): 149-150, 153.
- [3] 王青山, 邓放明. 柚、柑桔副产物利用的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 28(7): 182-186.
- [4] 张婷, 糜漫天, 唐勇, 等. 光皮木瓜多酚类的提取和清除DPPH的抗氧化活性[J]. 营养学报, 2007, 29(5): 485-489.
- [5] 王宏. 苹果渣中多酚物质的提取、分离及抗氧化活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2005.
- [6] Kishida E, Tokumaru S, Ishitani Y, et al. Compariso of the formation of mal on dialdehyde and thiobarbituric acid reactive substances from autoxidized fatty acids based on oxygen consumption [J]. Agric Food Chem, 1993(41): 1598-1599.
- [7] 王福来. 有机化学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2001: 270-285.
- [8] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 19.
- [9] 陈业高. 植物化学成分[M]. 北京, 化学工业出版社, 2004: 223-239.

Extraction of Eleocharis Tuberosa Peel Polyphenols and Its Lipid Antioxidant Activity

GUO Yan-hua, LI Ai-hua, ZHANG Yu-min

(School of Chemistry and Environmental Engineering, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei, China)

Abstract: Ultrasonic method extraction was used to extract the eleocharis tuberosa peel polyphenols. And the suitable extract conditions was obtained by single factor experiments and orthogonal test, then inhibitory action of eleocharis tuberosa peel polyphenol crude extraction on linoleic acid lipid peroxidation system was studied. The results showed that extractant was 60 % ethanol, pH 3.5, feed liquid ratio was 1:30 (W/V), ultrasonic time was 50 min, on these conditions, eleocharis tuberosa peel polyphenols yield was 1.8 %, and have strong lipid antioxidant activity.

Key words: eleocharis tuberosa peel; ultrasonic method; polyphenols; lipid antioxidant activity

(责任编辑: 叶 冰)

(上接第 9 页)

参考文献:

[1] 余国胜. 常利率 Erlang(2) 风险模型的破产时刻罚金折现期望值[J]. 江汉大学学报: 自然科学版, 2012, 40(1): 17-19.

[2] Dickson D C M, Hipp C. On the time to ruin for Erlang (2) risk processes [J]. Insurance: Mathematics and Economics, 2001, 29: 333-344.

[3] 程宗毛. 破产时刻罚金折现期望值[J]. 应用概率统计, 1999, 15(3): 225-233.

Laplace Transform of Expected Value of Discounted Penalty at Ruin in Case of Erlang(2) Risk Model Under No Interest Rate

YU Guo-sheng

(School of Mathematics and Computer Science, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei, China)

Abstract: Considers the Erlang(2) risk model under no interest rate, in which the Laplace transform of the expected value of discounted penalty at ruin is obtained, the expression of the Laplace transform is given.

Key words: no interest rate; Erlang(2) risk model; expected value of discounted penalty at ruin; Laplace transform

(责任编辑: 强士端)