

神秘果种子多酚超声双水相复合提取工艺及其抗氧化活性

Ultrasonic-assisted two-phase aqueous extraction and antioxidant activity of polyphenols from the seed of *Synsepalum dulcificum*

马艺丹¹ 刘红^{1,2} 廖小伟¹ 闫瑞昕¹ 戚金玲¹

MA Yi-dan¹ LIU Hong^{1,2} LIAO Xiao-wei¹ YAN Rui-xin¹ QI Jin-ling¹

(1. 海南师范大学化学与化工学院, 海南海口 571127; 2. 热带特色药食同源植物
研究与开发重点实验室, 海南海口 571127)

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hainan Normal University, Haikou, Hainan 571127, China; 2. Key Laboratory of Research and Development on Topical and Special Medicine and Edible Plant, Haikou, Hainan 571127, China)

摘要:利用超声波与双水相体系复合提取神秘果种子多酚, 研究不同条件下提取的多酚的抗氧化能力。分别考察丙酮浓度、硫酸铵用量、超声波温度、超声波时间、料液比对神秘果种子多酚提取率的影响; 采用单因素试验及响应面设计, 优化神秘果种子多酚提取工艺。结果表明, 最佳提取工艺条件为: 丙酮浓度 50%、硫酸铵用量 0.22 g、超声波温度 60 °C、超声波时间 100 min、液料比 1:20(m:V), 多酚理论提取率为 11.54%。该条件下神秘果种子多酚的平均提取率为 11.56%。该体系提取的多酚纯度为 87.85%, 优于单独采用超声波提取, 可实现初步纯化。抗氧化性试验结果表明, 神秘果种子多酚提取物对 DPPH· 的清除能力和还原能力较强, 且还原力和 DPPH· 清除率与总多酚含量呈正比关系; 其抗氧化活性强于抗坏血酸。

关键词:神秘果种子; 多酚; 超声波提取; 双水相; 抗氧化性

Abstract: The seed of *Synsepalum dulcificum* was ultrasonified in the acetone-(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase system to extract total polyphenols and different conditions for extraction of polyphenols antioxidant activity was investigated. Acetone was chosen as the best extraction solvent for this research. The acetone concentration, amount of the (NH₄)₂SO₄, the ultrasonic time, extraction temperature, ratio of water to solid were discussed by the single factor experiment. The optimal extraction conditions were found to be: the con-

centration of acetone solution 50%, ultrasonic time 100 min and extraction temperature 60 °C, ratio of water to solid 20:1(V:m). The maximum extraction yield of total polyphenols was 11.54% in the optimum conditions. Under the optimum conditions, through duplicated experiment the yield of polyphenols was 11.56%, it indicated that the extraction rate of polyphenols was extremely stable. The purity of polyphenols extracted with this system is 87.85%, superior to only use ultrasonic, preliminary purification can be realized. The results of the experiment on different conditions for extraction of polyphenols antioxidant activity showed that it has strong ability of removing DPPH free radical and reducing power and to the polyphenol content. The maximum DPPH scavenging rate by polyphenols was up to 62%, higher than that by ascorbic acid.

Keywords: *Synsepalum dulcificum* seed; polyphenol; ultrasound extraction; two-phase aqueous; antioxidant activity

神秘果(*Synsepalum dulcificum*)为山榄科神秘果属, 四季常绿的植物。原产于西非热带地区, 如今在中国海南、云南、广西等省份也有大面积种植^[1]。神秘果含有一种变味蛋白酶(又称神秘果素), 吃过任何酸的食物再吃神秘果都会变甜, 可以作为天然且安全的食品。研究^[2]表明, 神秘果除了具有能改变味觉功能外, 其种子还可以促进胰岛素分泌, 是用于治疗糖尿病、高血压的天然药物。神秘果中含有大量多酚, 具有较好的抗氧化性^[3]。因此, 可作为抗氧化药物的潜在资源, 在制药与食品工业中具有良好的应用前景。植物多酚在抗氧化、抗辐射、抑菌、抗癌和预防心脑血管疾病等方面具有显著功效^[4]。因此, 受到越来越多人的关注和研究^[5]。

常用于提取多酚的方法有: 溶剂浸提法、微波辅助提取法、超临界流体萃取法、超声波提取法等^[6]。其中超声波提

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:2166009); 海南省省级创新训练项目(编号:2013116580); 海口市应用技术与开发项目(编号:2014-90); 海南师范大学大学生科研项目(编号:XSKY201512)

作者简介:马艺丹(1990—), 女, 海南师范大学在读硕士研究生。
E-mail: ml18789195535@163.com

通讯作者:刘红

收稿日期:2015-07-09

取法是最常用的,其主要是利用超声波的空化效应,可以在较短的时间内,使所提取的物质大量溶出且不会破坏其活性^[7],从而大大增加了提取率。双水相萃取技术是目前一种较为先进的分离技术,它的特点是设备简单、反应条件温和、可以在短时间内使目标成分的提取率达到最高^[8]。目前,此技术已广泛应用于食品、化工,以及天然产物活性成分的分离。

研究^[9]表明,醇—无机盐型双水相体系优于传统聚合物—盐双水相体系,其优点是价廉、溶剂易回收及后续处理简单,且体系极性较大,适用于极性物质的提取与分离。但尚未见此法用于提取神秘果种子多酚的相关报道。因此,本试验拟通过丙酮—硫酸铵双水相体系与超声波复合提取神秘果种子多酚,并在单因素试验的基础上,采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析,确定最佳提取工艺参数,同时研究不同条件下提取的神秘果种子多酚对 DPPH 的清除能力和还原力,为深度开发利用神秘果种子资源提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

神秘果种子:采摘于海南省保亭县;

没食子酸标准品:分析纯,上海金穗生物科技有限公司;

福林酚试剂:分析纯,美国 Sigma 公司;

无水碳酸钠、丙酮、石油醚:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

超声波清洗仪:XO-5200DTS 型,南京先欧仪器制造有限公司;

双光束紫外可见分光光度计:i8 型,济南海能仪器股份有限公司;

实验室纯水机:Unique-R10(UV+UF) 型,厦门锐思捷科学仪器有限公司;

电子天平:TP-214 型,丹佛仪器北京有限公司;

数显恒温水浴锅:HH-1 型,江苏智博瑞仪器制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 神秘果种子多酚提取工艺

神秘果种子→粉碎过筛(60 目)→石油醚脱脂→双水相体系一次超声浸提→静置分层→上层为浸提液→经 X-5 大孔吸附树脂纯化→冷冻干燥→神秘果种子多酚粉末

1.2.2 神秘果种子的脱脂预处理 将充分干燥的神秘果种子粉碎,过 60 目筛,加入 3 倍体积的石油醚超声脱脂 3 次,每次 50 min,抽滤后挥干石油醚。脱脂后的种子粉末 40 ℃ 烘干至恒重,置于干燥器中备用。

1.2.3 多酚标准曲线的建立 参照文献^[10],并根据实际情况摸索后调整如下:精密称取没食子酸对照品 0.1 g,用蒸馏水溶解,配制 100 μg/mL 的标准液。准确量取 0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 mL 于 8 个 10 mL

容量瓶,分别精确移取 2 000, 1 950, 1 900, 1 850, 1 800, 1 750, 1 700, 1 650 μL 蒸馏水于 8 个容量瓶中,摇匀,分别加 2 mol/L 福林试剂 1.0 mL,静置 6 min 后分别加入 10% 的碳酸钠溶液 1.0 mL,置于 25 ℃ 水浴中避光静置 2 h,测定溶液在 765 nm 处的吸光值(A_{765})。

1.2.4 提取溶剂的选择 精确称取 4 份 1.0 g 神秘果种子粉末于带塞锥形瓶中,在超声波功率为 200 W,超声时间为 100 min,超声波槽内温度为 60 ℃,料液比为 1:20($m:V$)的条件下,分别加入(50% 甲醇、50% 乙醇、50% 丙酮、超纯水)进行提取,提取 1 次,提取液离心 15 min。取上清液 30 μL 按照标准曲线操作,测定 765 nm 吸光值,并计算总多酚含量以及提取率。比较不同溶剂对神秘果种子多酚提取率的影响。

1.2.5 丙酮—硫酸铵双水相体系 在带塞锥形瓶中加入浓度分别为 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 的丙酮溶液,并控制硫酸铵用量为 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20, 0.22, 0.24, 0.28 g 使之形成双水相体系^[11]。

1.2.6 神秘果种子多酚的提取及提取率测定 精确称取 1.0 g 预处理好的神秘果种子样品,置于 100 mL 带塞锥形瓶中,按不同的料液比加入不同浓度的丙酮和硫酸铵形成双水相体系,浸泡 30 min,按不同的超声时间和提取温度提取 1 次,超声波功率为 200 W,趁热抽滤,滤液于分液漏斗中静置分层,取上层丙酮相 30 μL 按照 1.2.3 的操作,在 765 nm 波长下测定吸光值,根据回归方程计算提取液中多酚的含量,并按式(1)计算神秘果种子总多酚提取率。

$$R = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R ——神秘果种子多酚的提取率(以没食子酸计), %;

m_1 ——提取的多酚的质量, g;

m_2 ——神秘果种子的质量, g。

1.2.7 单因素试验设计

(1) 丙酮浓度和硫酸铵的比例对多酚提取率的影响:固定料液比为 1:20($m:V$),超声波时间为 40 min,超声波槽内温度为 50 ℃。考察不同浓度(40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%)的丙酮溶液和不同质量(0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20, 0.22, 0.24, 0.28 g)的硫酸铵形成双水相体系时的比例对多酚提取率的影响。

(2) 超声波温度对多酚提取率的影响:固定丙酮浓度为 50% 和硫酸铵用量为 0.22 g,料液比为 1:20($m:V$),超声时间为 40 min。考察不同温度(30, 40, 50, 60, 70, 80 ℃)对多酚的提取率的影响。

(3) 超声波时间对多酚提取率的影响:固定丙酮浓度为 50% 和硫酸铵用量为 0.22 g,超声波温度为 60 ℃,料液比为 1:20($m:V$)。考察不同超声波时间(40, 60, 80, 100, 120, 140 min)对多酚的提取率的影响。

(4) 料液比对多酚提取率的影响:固定丙酮浓度为 50% 和硫酸铵用量为 0.22 g,超声波温度为 60 ℃,超声波时间为 100 min,考察不同料液比(1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:

50, 1:60, $m:V$)对多酚的提取率的影响。

1.2.8 响应曲面法试验设计 以单因素试验的结果为基础,采用统计分析软件 Design-Expert 8.0 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理设立响应面试验,以丙酮浓度、超声温度、超声时间 3 个因素为试验因子,以神秘果种子多酚提取率为评价指标,建立 3 因素 3 水平的响应面分析法,进行二次多项回归方程拟合及其优化分析。

1.2.9 神秘果种子多酚的纯化及纯度的测定 采用最佳提取工艺提取神秘果种子多酚类成分,经过大孔树脂 X-5 柱层析进一步纯化,用 70% 的乙醇洗脱,将洗脱液减压旋转蒸发,浓缩液用冷冻干燥机真空冻干,得神秘果种子多酚样品粉末,备用。分别称取一定量的未经大孔树脂纯化的粗多酚粉末和纯化后的多酚粉末,配制制成水溶液,采用 Folin-Ciocalteu 法^[12]测定多酚含量,并按式(2)计算多酚的纯度。

$$P = \frac{m_3}{m_4} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

P ——多酚的纯度(以没食子酸计), %;

m_3 ——多酚的质量, g;

m_4 ——多酚粉末的质量, g。

1.2.10 神秘果种子多酚抗氧化性

(1) 清除 DPPH· 能力测定:参照文献[13]修改如下:精确称量 DPPH· 粉末,避光,用乙醇溶液配制,浓度为 1.0144×10^{-4} mol/L。以抗坏血酸为对照,经试验测得抗坏血酸的半数抑制浓度为 0.23 mg/g。不同提取条件下的提取液浓缩冷冻干燥成粉末后,加蒸馏水配制成浓度均为 0.23 mg/g 的样液。分别向试管中加入各样品 1 mL 及 3 mL DPPH· 的乙醇溶液,混合均匀后于室温下避光放置 30 min,以 1 mL 丙酮和 3 mL 乙醇的混合液作为参比测定 517 nm 处测定吸光值,记为 A_1 样品;同法,用等体积的无水乙醇代替提取液,测定吸光值,记为 A_2 对照;以及 1 mL 不同条件提取液与 3 mL 无水乙醇混合液,测定吸光值,记为 A_0 空白。平行试验 3 次,取平均值。DPPH· 清除率(y_{DPPH})按式(3)计算:

$$y_{DPPH} = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

(2) 还原能力的测定:采用铁氰化钾法^[14]。取 10 mL 洗净干燥的试管,先分别加入 1 mL 提取液,再加入 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液(pH 6.6)和 1% (m/V) $K_3Fe(CN)_6$ 各 2.5 mL。混合后,于 50 °C 恒温水浴避光反应 20 min,之后加入 2.5 mL 10% (m/V) 的三氯乙酸,1 000 r/min 离心 10 min。取 2.5 mL 上清液,加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% (m/V) $FeCl_3$,充分混合后于 700 nm 处测定吸光值 A 。

2 结果与分析

2.1 多酚标准曲线的确定

通过对不同质量浓度的没食子酸吸光值的测定,得到没食子酸质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)与吸光值 Y 之间的线性回归方程为 $Y = 0.01392X + 0.03692$ ($R^2 = 0.9995$),说明线性关系较好。

2.2 溶剂的选择

采用中等浓度的溶剂提取,测定时会减少脂类物质的干扰,便于比较和筛选最佳溶剂。因此,分别以浓度 50% 的甲醇、乙醇、丙酮溶液以及超纯水进行超声波辅助提取试验,提取率依次为丙酮(11.56%)、乙醇(10.40%)、甲醇(9.81%)、超纯水(5.35%)。故本试验以丙酮为溶剂提取神秘果种子多酚。同时,丙酮浓度对提取率也会有所影响,且不同浓度的丙酮与硫酸铵形成的最佳双水相体系时硫酸铵的用量也不同。因此,将同时考虑丙酮浓度和硫酸铵用量对多酚提取率的影响。

2.3 单因素试验结果分析

2.3.1 丙酮浓度和硫酸铵用量对多酚提取率的影响 由图 1 可知,在不同浓度的丙酮与硫酸铵形成的双水相体系中,多酚的提取率均随着硫酸铵用量的增大呈先上升后下降的趋势。同时不同浓度的丙酮形成的双水相对多酚提取率的影响很大,这是由于浓度过大,使亲脂性物质大量溶出,从而使通透性下降,干扰因素也随之增大。虽然 60% 丙酮和 0.18 g 硫酸铵体系的提取率也较高,但会造成有机溶剂的浪费。因此,选择 50% 的丙酮作为提取溶剂,并加 0.22 g 硫酸铵使多酚提取率达到最大。

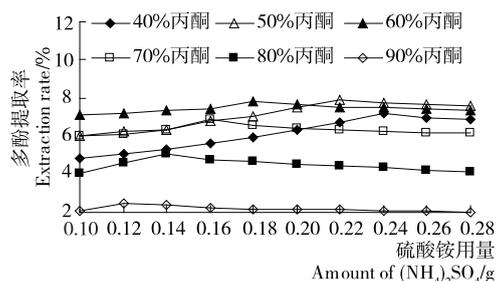


图 1 丙酮浓度和硫酸铵用量对多酚提取率的影响

Figure 1 Effects of acetone concentration and amount of $(NH_4)_2SO_4$ on extraction yield

2.3.2 超声温度对多酚提取率的影响 由图 2 可知,多酚的提取率随超声温度的升高呈先增大后减小的趋势。在 60 °C 时,提取率达到最大值为 8.92%。这可能是由于在一定温度范围内,升高温度使传速率增大从而使多酚更容易浸出;若温度过高,多酚易发生降解和部分氧化。因此,选择超声温度为 60 °C。

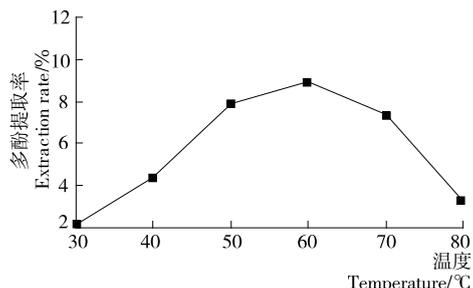


图 2 超声温度对多酚提取率的影响

Figure 2 Effects of ultrasonic temperature on extraction yield

2.3.3 超声时间对多酚提取率的影响 由图3可知,超声时间在40~100 min时,随着时间延长多酚提取率也随之增加;当超声时间为100 min时,多酚提取率达到最大为11.49%;继续延长超声时间,多酚提取率反而减少。这是由于开始时多酚含量较大,延长时多酚很容易溶出且速率较快。延长超声时间,总多酚含量越来越少,且更多的多酚被氧化,导致多酚提取率降低^[15]。因此,选择超声时间为100 min。

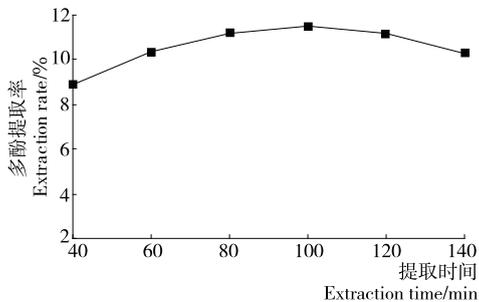


图3 超声时间对多酚提取率的影响

Figure 3 Effects of ultrasonic time on extraction yield

2.3.4 液料比对多酚提取率的影响 由图4可知,料液比在1:10~1:20(m:V)时,随着液料比增大,提取率随之增大;当液料比达到1:20(m:V)时,多酚提取率达到最大;继续加大液料比,多酚提取率基本保持平缓且略有下降。这是由于提取过程中,溶液用量越大相应的传质动力就越大,酚类物质更易溶出。但是,在产生相同热量的同时,增大溶剂的用量使提取温度相对降低,固相和液相之间的平衡降低,导致提取率的降低。综合考虑经济因素,选择料液比为1:20(m:V)。

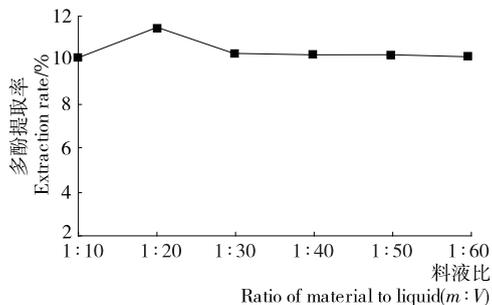


图4 料液比对多酚提取率的影响

Figure 4 Effect of ratio of material to liquid on extraction yield

2.4 响应面法优化试验结果与分析

2.4.1 响应面法优化方案设计与试验结果 在单因素试验中,料液比过高或过低对提取率变化不明显。因此,将其固定为1:20(m:V)。其它因素与水平设计见表1。

2.4.2 响应曲面模型的建立与分析 通过 Design expert 软件对表2数据进行多次线性拟合,建立神秘果种子多酚提取率与丙酮浓度、提取温度、超声时间3个因素的二次多项回归模型方程:

$$Y=11.498\ 00+0.262\ 50X_1-0.035\ 00X_2-0.032\ 50X_3+0.072\ 50X_1X_2-0.032\ 50X_1X_3+0.082\ 50X_2X_3-0.412\ 75X_1^2-1.277\ 75X_2^2-0.297\ 75X_3^2 \quad (4)$$

表1 试验因素与水平设计

Table 1 Levels of factors in response surface methodology

水平	X ₁ 丙酮浓度/%	X ₂ 提取温度/°C	X ₃ 超声时间/min
-1	40	50	80
0	50	60	100
1	60	70	120

由表3可知,该模型极显著(P<0.000 1),失拟项不显著(P>0.05),R²=0.995 6,R_{Adj}²=0.989 9,说明该模型拟合度较好,可用以分析并预测试验结果。因此,可以采用此二次回归模型确定神秘果种子多酚的最佳提取工艺。

表2 Box-Behnken 试验设计和结果分析

Table 2 Design of experiment of Box-Behnken and results

编号	X ₁	X ₂	X ₃	提取率
1	1	1	0	10.09
2	1	0	-1	11.19
3	0	1	-1	9.78
4	0	0	0	11.54
5	0	0	0	11.45
6	0	0	0	11.56
7	0	0	0	11.48
8	0	-1	-1	10.01
9	1	0	1	10.94
10	-1	0	-1	10.57
11	-1	1	0	9.45
12	1	-1	0	10.02
13	0	0	0	11.46
14	-1	-1	0	9.67
15	0	-1	1	9.90
16	0	1	1	10.00
17	-1	0	1	10.45

表3 二次响应面回归模型方差分析[†]

Table 3 Analysis of mean square

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	9.120	9	1.010	175.86	<0.000 1	**
X ₁	0.550	1	0.550	95.68	<0.000 1	**
X ₂	9.8×10 ⁻³	1	9.8×10 ⁻³	1.70	0.233 4	
X ₃	8.45×10 ⁻³	1	8.45×10 ⁻³	1.47	0.265 2	
X ₁ X ₂	0.021	1	0.021	3.65	0.097 7	
X ₁ X ₃	4.225×10 ⁻³	1	4.225×10 ⁻³	0.73	0.420 2	
X ₂ X ₃	0.027	1	0.027	4.73	0.066 2	
X ₁ ²	0.720	1	0.720	124.50	<0.000 1	**
X ₂ ²	6.870	1	6.870	1 193.16	<0.000 1	**
X ₃ ²	0.370	1	0.370	64.79	<0.000 1	**
残差	9.680×10 ⁻³	7	5.761×10 ⁻³			
失拟项	0.031 3	3	0.010	4.22	0.098 9	不显著
纯误差	9.680×10 ⁻³	4	2.420×10 ⁻³			

[†] **表示0.01水平上显著。

由表 3 还可知,二次回归模型中 X_1 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对提取效果的曲面效应极显著($P < 0.0001$);各因素对神秘果种子多酚提取率的影响程度,从大到小依次为:丙酮浓度 > 提取温度 > 超声时间。

2.4.3 各因素交互作用分析 图 5 可以直观地看出, $X_1 X_2$ 和 $X_2 X_3$ 交互作用的曲面较为陡峭, $X_1 X_3$ 交互作用的曲面较为平滑。结合表 3 中 P 值可知, $X_1 X_2$ 、 $X_2 X_3$ 和 $X_1 X_3$ 的交互作用均不显著($P > 0.01$),两因素交互作用对神秘果种子多酚提取率的影响程度,从大到小依次为: $X_2 X_3 > X_1 X_2 > X_1 X_3$ 。

2.4.4 验证实验 将优化后的模型通过 Design expert 软件分析得到的最佳工艺条件:丙酮浓度 50.32% 与 0.22 g 硫酸铵形成的双水相体系,提取温度 59.99 °C,超声时间 99.93 min。此时的预测提取率为 11.54%。为简化操作,选丙酮浓度 50%,提取温度 60 °C,超声时间 100 min,平行实验验证 3 次,多酚提取率分别为 11.57%,11.58%,11.53%,平

均值为 11.56%,与模型预测值相差极小,重复性高,进一步验证了该数学模型的合理性。

2.5 大孔树脂纯化前后多酚纯度的测定

采用福林酚法测得超声波辅助丙酮—双水相体系提取多酚纯度为 87.85%,再经 X-5 大孔树脂纯化后神秘果种子多酚纯度为 92.42%,前期试验以丙酮为溶剂超声波提取得到的多酚纯度为 74.43%。因此,采用双水相体系可实现初步纯化,其效果优于单独采用超声波提取。

2.6 不同提取条件下神秘果种子多酚抗氧化性比较

2.6.1 不同浓度丙酮提取的多酚 DPPH·清除率和还原能力的比较 由图 6 可知,随着丙酮浓度的增大,对 DPPH·的清除率和还原能力均呈先增大后减小的趋势,当丙酮浓度为 50% 和 60% 时,对 DPPH·清除率分别达到 59% 和 55%。经试验, V_c 对 DPPH·的半数抑制浓度为 0.23 mg/g(即清除率为 50% 时所需 V_c 的浓度),且试验时均以此浓度多酚为样品。说明当丙酮浓度为 50% 和 60% 时,神秘果种子多酚化合物的 DPPH·清除率优于抗坏血酸。同时由于提取剂浓度的高低不同,导致提取液中各有效成分的含量差异对 DPPH·的清除能力的影响很大^[16],而不仅仅与总多酚含量有关。

2.6.2 不同提取温度提取的多酚 DPPH·清除率和还原能力的比较 由图 7 可知,当温度为 60 °C 时, DPPH·清除能力和还原力同时达到最强。温度过高或过低丙酮提取物清除 DPPH·的能力和还原能力很差。这是因为温度过低,酚类

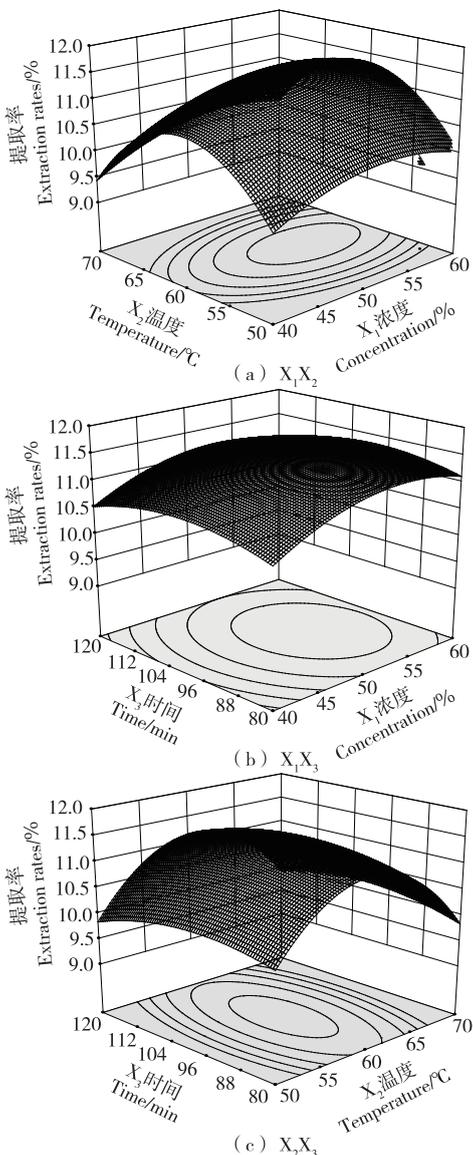


图 5 两因素交互作用对神秘果种子总多酚提取率的响应曲面图

Figure 5 Response surface plots for operating parameters on total yield from *Synespalum dulcificum* seed

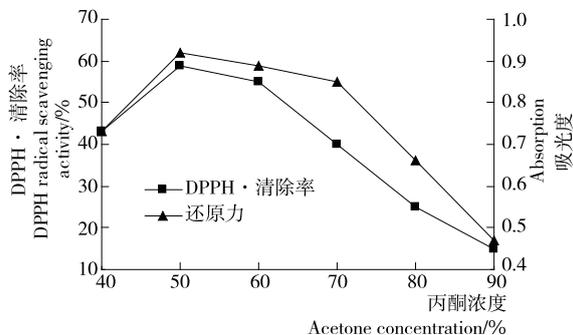


图 6 不同浓度丙酮提取的多酚 DPPH·清除率和还原能力的比较

Figure 6 DPPH· scavenging rate and reducing power for different acetone concentration

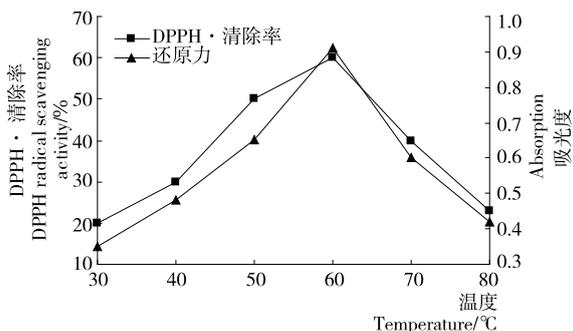


图 7 不同温度提取的多酚 DPPH·清除率和还原能力的比较

Figure 7 DPPH· scavenging rate and reducing power for different extraction temperature

化合物不能完全溶出,导致多酚含量很低,不能充分发挥清除 DPPH· 能力和还原力。而温度过高部分多酚化合物发生分解,使多酚含量大大降低,同时清除 DPPH· 的能力和还原力也随之大幅度下降。

2.6.3 不同提取时间提取的多酚 DPPH· 清除率和还原力的比较 由图 8 可知,随着时间的延长,DPPH· 的清除率先增加后减少的趋势,在 100 min 时,清除率达到最大为 62%,同时,还原力也表现为同样的趋势。进一步说明,神秘果种子多酚具有一定的清除 DPPH· 能力和还原力的。

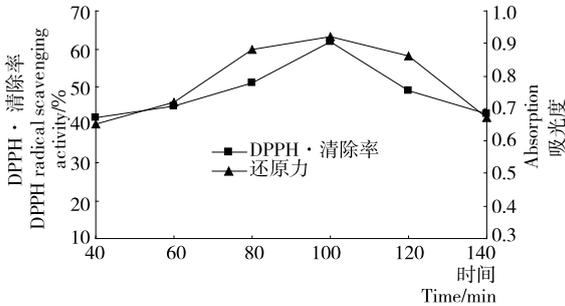


图 8 不同时间提取的多酚 DPPH· 清除率和还原能力的比较

Figure 8 DPPH· scavenging rate and reducing power for different extraction time

2.6.4 不同料液比提取的多酚 DPPH· 清除率和还原力的比较 由图 9 可知,料液比为 1:10($m:V$)时,清除 DPPH· 的能力和还原能力都较差;1:20($m:V$)时,DPPH· 清除率和还原力同时达到最强,继续加大料液比,DPPH· 清除率先大幅度下降后慢慢降低。还原力也基本保持与 DPPH· 清除率同样的趋势。

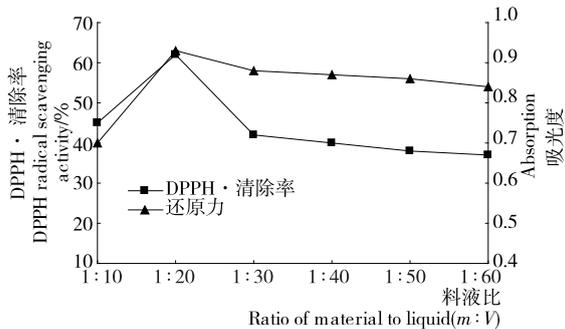


图 9 不同料液比提取的多酚 DPPH· 清除率和还原能力的比较

Figure 9 DPPH· scavenging rate and reducing power for different ratio of material to liquid

3 结论

(1) 本试验采用超声波与双水相复合提取神秘果种子多酚,多酚存在于丙酮—硫酸铵双水相体系的丙酮相中,水溶性杂质则分配到盐相中,得到的多酚纯度为 87.85%。前期试验以丙酮为溶剂超声波提取得到的多酚纯度为 74.43%。说明此双水相体系初步实现了多酚与杂质分离,进而大大提高了多酚的纯度。响应面法优化神秘果种子多酚最佳提取工艺为:丙酮浓度 50%与 0.22 g 硫酸铵形成双水相体系,提取温度 60 °C,超声时间 100 min。实际提取率

为 11.56%与预测理论数值(11.54%)接近,说明该模型可以为神秘果种子多酚提取提供预测和理论依据。

(2) 抗氧化性试验表明,神秘果种子多酚具有较强的抗氧化性和还原能力,且还原能力和 DPPH· 清除率与单因素试验中多酚提取率具有相同趋势,说明其还原能力与对 DPPH· 清除能力总多酚的含量呈正相关。当总多酚含量相同时,不同条件提取物对 DPPH· 清除能力相差较大,可能是酚类化合物具有多样性且与提取物中其他的抗氧化组分协同作用,而不同条件提取物中各有效成分含量存在差异。因此,下一步将对不同提取条件下提取的多酚化合物的分子结构和含量进行深入研究。

参考文献

- George E L, Chen Die-jun. Contents of phenolics and flavonoids and antioxidant activities in skin, pulp, and seeds of miracle fruit [J]. Food Science, 2011, 2(106): 479~482.
- 卢圣楼. 神秘果叶营养价值和挥发油化学成分分析及其总黄酮提取纯化与药理学评价[D]. 海口:海南师范大学,2013.
- 钟剑珊,欧阳伟,袁晓清. 神秘果叶对小鼠高尿酸血症模型影响观察[J]. 亚太传统医药,2013,9(8):9~10.
- 游凤,黄立新,张彩虹,等. 超声波辅助减压提取枣皮多酚的研究[J]. 林产化学与工业,2014,34(1):107~112.
- Lee L-S, Lee N, Kim Y H, et al. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic antioxidants from green tea using response surface methodology[J]. Molecules, 2013, 18: 13 530~13 545.
- 魏银花,申迎宾,王立. 紫米多酚提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械,2013,29(3):113~115.
- 周晔,王伟,陶冉,等. 超声波提取核桃内种皮多酚的响应面优化及其抗氧化研究[J]. 林产化学与工业,2013,33(4):73~78.
- 马立然,黄亮,李安平,等. 超声波辅助双水相体系提取橡胶实仁多酚的研究[J]. 食品工业科技,2012,33(3):191~194.
- 马永强,荆丽荣,刘晓飞,等. 双水相超声波法辅助提取甜玉米芯多酚及抑菌性研究[J]. 食品科学,2013,34(24):61~64.
- Mohsen S M, Ammar A S M. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts[J]. Food Chemistry, 2009, 112(3): 595~598.
- 卢俊彩,崔岩岩,陈火林,等. 丙酮—硫酸铵双水相体系分离纯化红花红色素[J]. 化学研究与应用,2007,19(6):679~682.
- 陈亮,李医明,陈凯先,等. 植物多酚类成分提取分离研究进展[J]. 中草药,2013,44(11):1 501~1 507.
- Sabir S M, Ahmad S D, Hamid A, et al. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds [J]. Food Chemistry, 2012, 131(3): 741~747.
- Dorman H J D, Hitunen R. Fe(III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Saturejahortensis* L.) extract and subfractions[J]. Food Chemistry, 2004, 88(2): 193~201.
- 金寒冰,方丽,赖蓓蕾,等. 苦苣多酚超声辅助提取及抗氧化研究[J]. 食品与机械,2014,30(5):211~215.
- Chen Yang, Zhang Hao, Tian Xi, et al. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents [J]. Food Chemistry, 2008, 109(3): 484~492.