

青冈栎果壳多酚超声波辅助提取工艺优化及体外抗氧化能力研究

Optimization on ultrasonic-assisted extraction of polyphenols from *Cyclobalanopsis glauca* shells by response surface methodology and study on its antioxidant activity *in vitro*

茹月蓉^{1,2}张之杨^{1,2}杨金梅^{1,2}何斌^{1,2}RU Yue-rong^{1,2} ZHANG Zhi-yang^{1,2} YANG Jin-mei^{1,2} HE Bin^{1,2}阚欢^{1,2} 刘云^{1,2} 王振兴^{1,2} 张雪春^{1,2}KAN Huan^{1,2} LIU Yun^{1,2} WANG Zhen-xing^{1,2} ZHANG Xue-chun^{1,2}

(1. 西南林业大学生命科学学院, 云南 昆明 650224; 2. 西南林业大学森林食品研究院, 云南 昆明 650224)

(1. Forest Food Research Institute, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China;

2. College of Life Sciences, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China)

摘要:采用超声波辅助法提取青冈栎果壳多酚,考察乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数对多酚得率的影响,并对其最佳提取工艺条件进行优化;以铁还原能力和氧自由基吸收能力为指标,评估青冈栎果壳提取物的体外抗氧化活性。结果表明:青冈栎果壳多酚的最佳提取条件为乙醇体积分数50%、提取时间25 min、料液比1:40 (g/mL)、提取次数5次,此条件下的多酚得率为3.13%。青冈栎果壳提取物具有较强的体外抗氧化能力,其铁还原能力为 (984.44 ± 123.15) mg FeSO₄/g · DW,氧自由基吸收能力为 (200.15 ± 23.24) mg Trolox/g · DW,均高于商用抗氧化剂BHT,表明青冈栎果壳可作为天然抗氧化剂资源。

关键词:青冈栎果壳;多酚;超声波辅助提取;体外抗氧化活性

Abstract: The ultrasound-assisted extraction was applied to the extraction of polyphenols from the *Cyclobalanopsis glauca* fruit shells. The effects of the concentration of ethanol, solid-liquid ratio, ultrasonic time, and number of extraction cycles on the yield

of phenolic yield were studied, and the extraction process was optimized by response surface methodology (RSM). Then the *in vitro* antioxidant activities of *Cyclobalanopsis glauca* shell fruit extract (CGSE), including ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC), were evaluated. Results: The optimal extraction process were as followed: volume fraction of ethyl alcohol 50%, extracting time 25 min, solid-liquid ratio 1:40, extraction times 5. Under condition, the maximum extraction yield was 3.13%. The *Cyclobalanopsis glauca* Shells Extracts (CGSE) showed higher antioxidant activity with FRAP values of (984.44 ± 123.15) mg FeSO₄/g · DW, and ORAC values of (200.15 ± 23.24) mg Trolox/g · DW, which was higher than the commercial antioxidant 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT). The above results suggest that the *Cyclobalanopsis glauca* fruit shell might be a natural antioxidant resource.

Keywords: *Cyclobalanopsis glauca* shells; polyphenols; response surface; ultrasound-assisted extraction; *in vitro* antioxidant

基金项目:云南省农业基础研究联合专项青年项目(编号:2017FG001[—078]);云南省教育厅科学研究基金项目(编号:2016ZZX150);云南省重大科技专项计划(编号:2018ZG004)

作者简介:茹月蓉,女,西南林业大学在读硕士研究生。

通信作者:张雪春(1981—),女,西南林业大学副教授,博士。

E-mail: xuechun_zhang@163.com

收稿日期:2020-02-15

青冈栎(*Cyclobalanopsis glauca*)别名青冈树、青栲、铁稠等,为壳斗科青冈属常绿阔叶林树种,具有较高的生态价值和经济价值^[1]。青冈栎果实是青冈栎树的种子,由种仁和果壳组成,种仁中含有较高含量的淀粉、油脂、蛋白质等营养成分,可酿酒、榨油和加工成浆纱、粉条、糕点、酒精和饲料等,属于绿色食品原料^[2-3];其含有丰富的多酚类物质,具有抗氧化^[4]、抗炎^[5]、抗癌^[6]等功能活

性。青冈栎果壳作为青冈栎果实的主要副产物,往往被丢弃,而有关其成分和功能活性的相关研究未见报道。基于许多壳斗科植物如板栗^[7]、甜槠^[8]等,除种仁外,其外壳、根、叶也含有大量的植物多酚。植物多酚又名单宁,是植物的复杂酚类次生代谢产物,具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌、抗动脉硬化以及防治冠心病等多种功能活性^[9-10]。

目前提取植物中活性成分的方法主要有超声波辅助提取、超临界流体萃取、加速溶剂萃取、微波辅助提取等方法^[11]。其中超声波技术可有效破坏原料细胞壁,加速溶剂扩散和溶质流出,且对原料中化合物的结构和活性的破坏较小,具有环境友好、成本低、高效率、耗时短的特点,适用于青冈栎果壳等外壳坚硬的物料提取^[12-13]。试验拟以青冈栎果壳为原料,采用响应面法优化超声波辅助提取其多酚类物质的工艺条件,并评估提取物的体外抗氧化能力,以期为青冈栎的进一步开发提供依据。

1 材料与设备

1.1 材料和试剂

青冈栎果实:江苏省宿迁市沐阳县;

乙醇、没食子酸、三吡啶三吡嗪(TPTZ)、盐酸、抗坏血酸(V_C)、三氯化铁、乙酸、磷酸、磷酸氢二钾、乙酸钠、硫酸亚铁、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)、奎诺二甲基丙烯酸酯(Trolox)、过硫酸钾:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;

Folin-Ciocalteus 试剂、2,2'-偶氮-双-(2-脒基丙烷)氯化二氢(AAPH)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris-HCl)、三羟甲基氨基甲烷(THAM)、邻苯三酚、荧光素钠(FL):北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

数显恒温水浴锅:HH-6 型,上海力辰邦西仪器仪器有限公司;

电子天平:AX224ZH 型,奥豪斯仪器(常州)有限公司;

超声波清洗器:SG5200HDT 型,上海冠特超声仪器有限公司;

循环水真空泵:SH2-D(III)型,邦西仪器科技有限公司;

酶标仪:SynergyH1 型,美国伯腾仪器有限公司;

旋转蒸发仪:N-1001 型,日本东京理化器械有限公司;

紫外—可见分光光度计:722N 型,上海菁华科技仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 超声波辅助提取青冈栎果壳多酚 青冈栎果实晒

干后取壳,粉碎,过 60 目筛,45 ℃ 恒温箱中烘干至恒重。准确称取青冈栎果壳粉末,按料液比 1:30 (g/mL)加入 40% 的乙醇水溶液,超声功率 240 W,提取 20 min,过滤,残渣重复提取 2 次,合并上清液,将上清液 4 000 r/min 离心 30 min,弃去沉淀,再将上清液反复抽滤至澄清透亮,得青冈栎果壳多酚提取液。将多酚提取液于 50 ℃ 下真空旋干,即得青冈栎果壳多酚提取物(CGSE)。

1.3.2 多酚得率的测定 根据文献^[14]的方法并修改。准确移取 1 mL 青冈栎果壳多酚提取液,与 1 mL Folin-Ciocalteu 试剂充分混匀,反应 5 min,加入 10 mL 质量分数为 8% 的碳酸钠溶液,摇匀,避光反应 30 min,用蒸馏水做对照,于 765 nm 处测定其吸光度,按式(1)计算青冈栎果壳多酚得率。

$$R = \frac{V \times C \times N}{1\,000 \times W} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R ——多酚得率,%;

V ——提取液体积,mL;

C ——提取液中多酚浓度,mg/mL;

N ——稀释倍数;

W ——样品质量,g。

1.3.3 单因素试验设计

(1) 乙醇体积分数对多酚得率的影响:固定提取时间 20 min,料液比 1:30 (g/mL),提取次数 3 次,考察乙醇体积分数(0%,20%,30%,40%,50%,60%,80%,95%)对多酚得率的影响。

(2) 提取时间对多酚得率的影响:固定乙醇体积分数 40%,料液比 1:30 (g/mL),提取次数 3 次,考察提取时间(5,10,15,20,25,30 min)对多酚得率的影响。

(3) 料液比对多酚得率的影响:固定乙醇体积分数 40%,提取时间 20 min,提取次数 3 次,考察料液比[1:10,1:20,1:30,1:40,1:50,1:60 (g/mL)]对多酚得率的影响。

(4) 提取次数对多酚得率的影响:固定乙醇体积分数 40%,提取时间 20 min,料液比 1:30 (g/mL),考察提取次数(1,2,3,4,5,6 次)对多酚得率的影响。

1.3.4 响应面优化 根据单因素试验结果和 Box-Behnken 原理,设计四因素三水平中心组合试验。利用 Design-Expert 8.0 软件进行响应面优化。

1.3.5 青冈栎果壳提取物铁还原能力的测定 参照文献^[15]的方法并稍作改进。准确移取 20 μ L CGSE 溶液与 300 μ L FRAP 工作液于 96 孔酶标板中,混合均匀,于 37 ℃ 恒温水浴锅中反应 10 min,测定 593 nm 处的吸光值,以不同浓度的 $FeSO_4$ 代替样品进行反应,测定其吸光度值并绘制标准曲线,以 V_C 、BHT 为阳性对照。

1.3.6 青冈栎果壳提取物氧自由基吸收能力的测定 参

照文献[16]的方法并稍作改进,准确吸取 25 μL CGSE 溶液与 150 μL 荧光素钠(FL)稀释液至 96 孔荧光板中,振荡 5 min,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中温育 15 min,加入 25 μL AAPH 溶液,然后采用酶标仪测定其荧光值,激发波长 485 nm,发射波长 535 nm,测定间隔 1.5 min。绘制荧光衰变曲线并计算其曲线面积。以 V_c 、BHT 为阳性对照。

1.3.7 数据分析 采用软件 SPSS 22.0 和 Design-Expert 8.0 软件进行数据分析。所有试验重复 3 次,结果以(平均值 $\pm$ 标准偏差)表示。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

由图 1 可知,乙醇体积分数对多酚得率影响较大,当乙醇体积分数为 40%时,多酚得率最高,说明此时溶剂的

极性与青冈栎果壳中酚类物质的极性较为接近,有助于活性物质的溶出。乙醇体积分数过大,溶剂极性差异增大,会使一些醇溶型杂质和大极性的成分溶出,导致得率下降^[17]。料液比对多酚得率的影响呈先增大后趋于平衡的趋势,当料液比为 1 : 30 (g/mL)时,多酚得率最高,说明在此比例下多酚溶出已趋于饱和,继续增加溶剂会促进其他物质溶出,影响多酚类物质的提取效果^[18]。当提取时间为 20 min 时,多酚得率最高,继续延长提取时间,部分多酚类物质被轻度氧化或分解,多酚结构被破坏,导致其得率下降^[19]。当提取次数为 4 次时,多酚得率最高,继续增加提取次数,长时间的超声波作用会使原料细胞破裂程度加大,增加杂质溶出,甚至破坏酚类物质的化学结构^[20]。

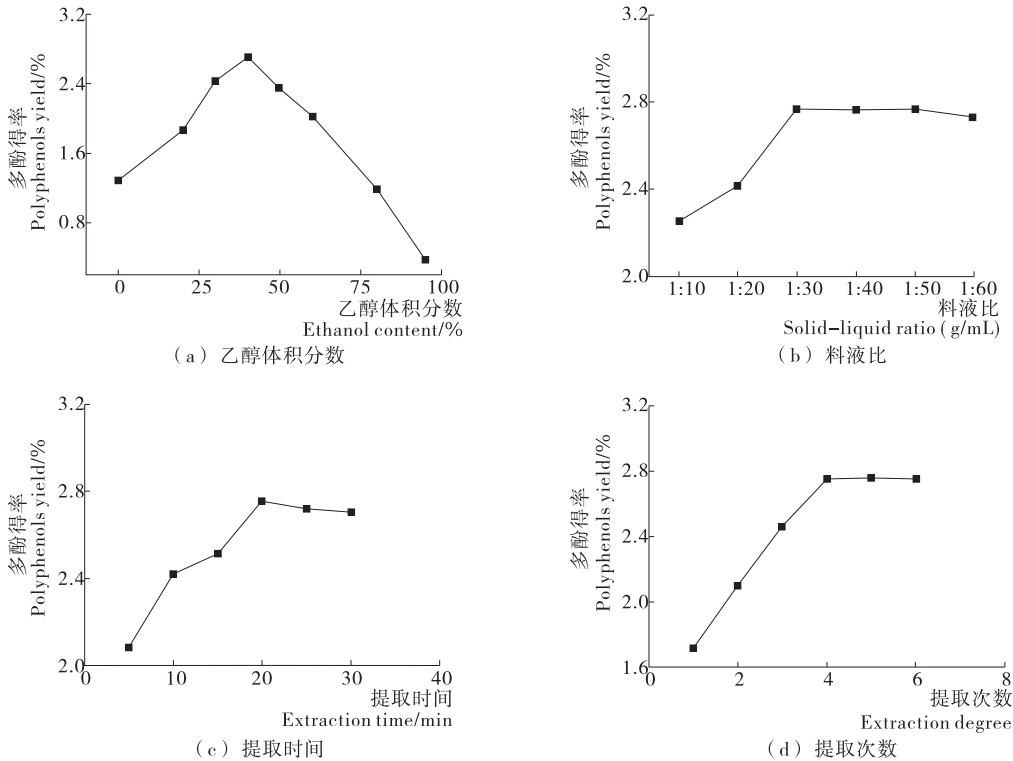


图 1 各因素对多酚得率的影响

Figure 1 Effects of each factor on the yield of polyphenols

2.2 响应面分析与优化

2.2.1 响应面试验设计 以乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取次数为影响因素,以多酚得率为响应值,根据 Box-Behnken 原理设计四因素三水平中心组合试验,试验因素与水平表见表 1,试验结果见表 2。

通过对响应面试验结果进行回归拟合分析,并剔除方程中不显著变量,得优化后的回归方程:

$$Y = 3.06 + 0.002\ 5A + 0.036\ 2B + 0.012\ 5C + 0.042\ 5D + 0.027\ 5AC - 0.140\ 0AD + 0.122\ 5BC -$$

$$0.115\ 0BD - 0.072\ 5CD - 0.135\ 8A^2 - 0.090\ 8B^2 - 0.119\ 6C^2 - 0.157\ 1D^2. \quad (2)$$

表 1 响应面试验因素与水平表

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken test

水平	A 乙醇体积分数/%	B 提取时间/min	C 料液比 (g/mL)	D 提取次数
1	30	15	1 : 20	3
0	40	20	1 : 30	4
-1	50	25	1 : 40	5

表 2 响应面试验设计结果
Table 2 BBD and polyphenols yield results

编号	A	B	C	D	Y 多酚得率/%	编号	A	B	C	D	Y 多酚得率/%
1	0	1	0	1	2.65	16	0	0	1	-1	2.81
2	-1	-1	0	0	2.85	17	0	-1	1	0	2.69
3	0	0	1	1	2.72	18	-1	0	0	-1	2.71
4	0	1	-1	0	2.76	19	0	1	1	0	2.97
5	-1	0	0	1	2.91	20	-1	0	-1	0	2.91
6	0	0	0	0	3.04	21	1	1	0	0	2.75
7	0	-1	0	1	2.93	22	0	0	0	0	3.08
8	1	0	-1	0	2.79	23	0	-1	-1	0	2.97
9	1	0	0	-1	2.90	24	0	0	0	0	3.06
10	0	0	0	0	3.08	25	0	0	0	0	3.04
11	-1	1	0	0	2.78	26	1	0	1	0	2.80
12	0	0	-1	1	2.86	27	-1	0	1	0	2.81
13	0	0	-1	-1	2.66	28	0	1	0	-1	2.97
14	0	-1	0	-1	2.79	29	1	-1	0	0	2.87
15	1	0	0	1	2.54						

由表 3 可知,回归模型极显著($P<0.000\ 1$),失拟项不显著($P>0.05$),表明该回归模型与试验值拟合较好,误差较小,能很好地反映各影响因素与响应值间的关系。 $R^2=0.977\ 5$, $R^2_{Adj}=0.942\ 8$,表明该回归模型试验值与预测值接近,有较好的相关性,可解释 97.75%的响应值。因此,可用该模型对青冈栎果壳多酚的提取进行分析和

预测。各因素对多酚得率的影响大小为提取次数>提取时间>料液比>乙醇体积分数。二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 及交互项 AD、BC、BD 对多酚得率影响极显著($P<0.01$),一次项 D 与交互项 CD 对多酚得率影响显著($P<0.05$),其他因素均不显著。

2.2.2 响应面分析 由图2可知,乙醇体积分数与料液

表 3 回归模型方差分析和系数显著性检验[†]
Table 3 Variance analysis and significance test of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.539 6	17	0.031 7	28.17	< 0.000 1	* *
A	0.000 0	1	0.000 0	0.02	0.884 3	
B	0.010 5	1	0.010 5	9.33	0.011 0	*
C	0.001 9	1	0.001 9	1.66	0.223 5	
D	0.014 4	1	0.014 4	12.82	0.004 3	* *
AC	0.003 0	1	0.003 0	2.68	0.129 6	
AD	0.078 4	1	0.078 4	69.57	< 0.000 1	* *
BC	0.060 0	1	0.060 0	53.27	< 0.000 1	* *
BD	0.052 9	1	0.052 9	46.94	< 0.000 1	* *
CD	0.021 0	1	0.021 0	18.66	0.001 2	* *
A^2	0.119 7	1	0.119 7	106.20	< 0.000 1	* *
B^2	0.053 5	1	0.053 5	47.49	< 0.000 1	* *
C^2	0.092 8	1	0.092 8	82.31	< 0.000 1	* *
D^2	0.160 1	1	0.160 1	142.03	< 0.000 1	* *
残差	0.012 4	11	0.001 1			
失拟项	0.010 8	7	0.001 5	3.86	0.105 0	不显著
净误差	0.001 6	4	0.000 4			
总离差	0.552 0	28				

[†] * * 表示差异极显著($P<0.01$), * 表示差异显著($P<0.05$); $R^2=0.977\ 5$, $R^2_{Adj}=0.942\ 8$ 。

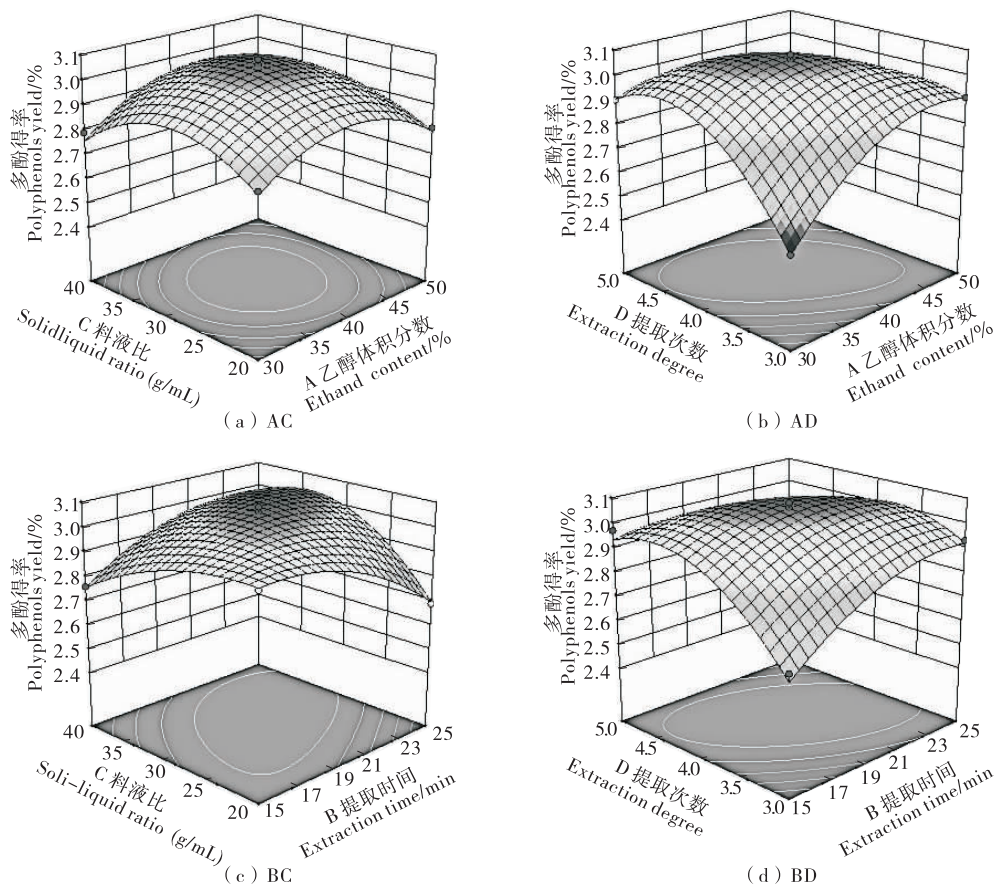


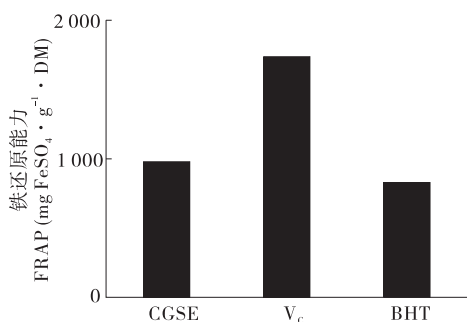
图2 各因素对总酚得率的交互作用

Figure 2 Interaction of various factors and total phenol yield

比的交互作用影响不显著,乙醇体积分数与提取次数,提取时间与料液比,提取次数与提取时间的交互作用影响显著,与回归方程分析结果一致。利用已建立的数学模型在试验范围内优化出最优条件为乙醇体积分数 50%、提取时间 25 min、料液比 1:40 (g/mL)、提取次数 5 次,此条件下的青冈栎果壳多酚得率为 3.13% ($n=3$),与理论预测值 3.08% 相差较小,说明该模型可行,优化结果可靠。

2.3 青冈栎果壳提取物的体外抗氧化能力

2.3.1 铁还原能力 由图3可知,CGSE的FRAP值为

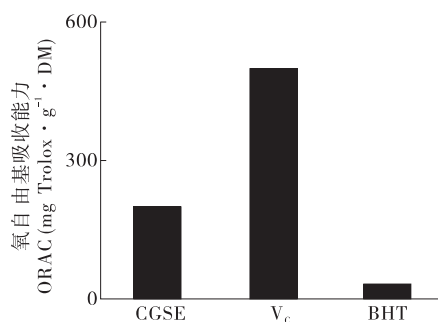
图3 CGSE、V_c与BHT的FRAP值Figure 3 The FRAP value of CGSE, V_c and BHT

(984.44 ± 123.15) mg FeSO₄/g · DW, 低于 V_c 的, 但高于 BHT 的, 表明 CGSE 具有较好的铁还原能力。

2.3.2 氧自由基吸收能力 由图4可知,CGSE的ORAC值为(200.15 ± 23.24) mg Trolox/g · DW, 低于 V_c 的, 但显著高于 BHT 的, 表明 CGSE 能较好的抑制活性氧自由基对荧光物质的淬灭。

3 结论

采用超声波辅助溶剂提取青冈栎果壳多酚,通过单

图4 CGSE、V_c与BHT的ORAC值Figure 4 The ORAC value of CGSE, V_c and BHT

因素试验和响应面优化试验,得出 CGSE 的最佳提取条件为乙醇体积分数 50%、提取时间 25 min、料液比 1:40 (g/mL)、提取次数 5 次,此条件下的多酚得率最高为 3.13%,显著高于张俞等^[21]的结论。体外抗氧化试验结果表明,CGSE 具有较好的铁还原能力,同时能很好地抑制活性氧自由基对荧光物质的淬灭。虽然 CGSE 的铁还原能力和氧自由基吸收能力弱于商业常用抗氧化剂 Vc,但均显著高于 BHT,表明 CGSE 具有较好的体外抗氧化能力,可作为一种优良的天然抗氧化剂植物资源。试验未对青冈栎果壳多酚的其他功能活性和作用机制进行深入探究,后续可对其细胞和体内抗氧化能力进行研究并探讨其作用机制,同时评估其他方面的功能活性。

参考文献

- [1] 周伟,夏念和.我国壳斗科植物资源:尚待开发的宝库[J].林业资源管理,2011(2):93-96.
- [2] 刘仁林,王娟,廖为明.10 种壳斗科植物果实主要营养成分比较分析[J].江西农业大学学报,2009,31(5):901-905.
- [3] 黄建琴,徐奔鼎,王辉军,等.安徽省橡实资源及其开发利用[J].安徽林业科技,2008(增刊 1):27-28.
- [4] 王亚凤,黄永林,刘金磊,等.壳斗科植物种子的多酚类含量及抗氧化能力[J].广西科学,2016,23(2):180-183.
- [5] 周磊,许敏,杨崇仁,等.壳斗科植物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(2):260-273.
- [6] 甘耀坤,陈旭健,韦敏,等.青冈栎果实抗癌活性的实验研究[J].食品科技,2010,35(3):227-229.
- [7] 王敏,田珍燕,王蔚新.板栗壳多酚的提取及其抗氧化性能的研究[J].食品研究与开发,2018,39(22):66-72.
- [8] 庞闹,王亚凤,何瑞杰,等.甜槠化学成分研究(I)[J].中药材,2018,41(9):2116-2119.
- [9] OGAWA K, HIROSE S, NAGAOKA S, et al. Interaction between tea polyphenols and bile acid inhibits micellar cholesterol solubility[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(1):204-209.
- [10] 王娟,郭阳,包怡红,等.仙人掌多酚超声辅助醇提工艺优化及抗氧化、降脂能力分析[J].食品与机械,2019,35(8):

177-182.

- [11] 阮冲,肖小华,李攻科.天然产物有效成分提取分离制备方法研究进展[J].化学试剂,2014,36(3):193-200.
- [12] 刘远方,李萌萌,刘远晓,等.功率超声波及其在食品工业中的降解应用研究进展[J].食品与发酵工业,2018,44(10):283-289.
- [13] PISOSCHI A M, POP A, CIMPEANU C, et al. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 2016:9130976.
- [14] MANNINO G, PERRONE A, CAMPOBENEDETTO C, et al. Phytochemical profile and antioxidative properties of *Plinia trunciflora* fruits: A new source of nutraceuticals[J]. Food Chemistry, 2020, 307:125515.
- [15] BHOLAH K, RAMFUL-BABOOLALL D, NEERGHEEN-BHUIJUN V S. Antioxidant activity of polyphenolic rich *Moringa oleifera* Lam. extracts in food systems[J]. Journal of Food Biochemistry, 2015, 39(6):733-741.
- [16] RODRIGUES C A, NICÁCIO A E, BOEING J S, et al. Rapid extraction method followed by a d-SPE clean-up step for determination of phenolic composition and antioxidant and antiproliferative activities from berry fruits[J]. Food Chemistry, 2020, 309:125694.
- [17] 秦永剑,张加研,杨兆勋.响应面优化油菜籽皮中原花青素的提取工艺[J].现代农业科技,2012(20):316-317.
- [18] 马金魁,黄晓辰,张佳仪,等.响应面法优化辣木叶总黄酮提取工艺及其抑菌性研究[J].食品研究与开发,2019,40(15):57-65.
- [19] HOFMANN T, NEBEHAJ E, ALBERT L. The high-performance liquid chromatography/multistage electrospray mass spectrometric investigation and extraction optimization of beech (*Fagus sylvatica* L.) bark polyphenols[J]. Journal of Chromatography A, 2015, 1393:96-105.
- [20] 苏适,王双侠.响应曲面优化超声波辅助提取无花果总黄酮的工艺研究[J].食品研究与开发,2019,40(9):101-106.
- [21] 张俞,刘婷婷,刘洋,等.蒙古栎种壳多酚的超声辅助提取及抗氧化能力[J].植物研究,2010,30(5):623-628.

(上接第 147 页)

- [23] RAJABZADEH S, SANO R, ISHGAMI T, et al. Preparation of hydrophilic vinyl chloride copolymer hollow composite membranes with antifouling properties [J]. Applied Surface Science, 2015, 324:718-724.
- [24] 唐正弦,贺玉婷.温度和甘油对海藻酸钠/羧甲基纤维素钠膜阻隔性的影响[J].轻工科技,2015(1):25-27.
- [25] LEE H J, CHO E J, KIM Y G, et al. Pervaporative separation of bioethanol using a polydimethylsiloxane/polyetherimide composite hollow-composite membrane [J].

Bioresource Technology, 2012, 109(4):110-115.

- [26] 许晶翠,张传禹,葛天舒,等.海藻酸钠-醋酸纤维素复合薄膜的制备及除湿性能测试[J].化工学报,2016,68(1):256-263.
- [27] 吴先辉,林浚,王丽霞.魔芋胶/威兰胶复合膜的制备及性能[J].食品研究与开发,2016,37(15):19-24.
- [28] ZHANG Fan, LI Jian-bin, LIANG Xin-quan, et al. Properties of konjac glucomannan's modified compound membrane[J]. Food Research and Development, 2016, 37(6):6-8.
- [29] 王钦德,杨坚.食品试验设计与统计分析[M].北京:中国农业大学出版社,2003:330-361.