

红树莓多酚提取物闪式 提取工艺优化及其抗氧化性

李康, 王希希, 崔晓瑞, 陈雷, 黄群, 宋洪波, 滕慧*

(福建农林大学食品科学院, 福建福州 350002)

摘要:对闪式提取红树莓总多酚的提取工艺进行研究,在单因素实验的基础上选取了溶剂体积分数、提取电压和提取时间为因素,以红树莓总多酚提取量为响应值,进行 Box-Behnken 中心组合实验设计,利用响应面分析法对提取条件进行优化,通过测定提取液对 DPPH·和·OH 清除能力,评价其抗氧化活性。结果表明,树莓总酚在四种溶剂中的提取效果顺序为:乙醇>水>石油醚>氯仿,最佳提取工艺参数为乙醇体积分数 48%、提取电压 150 V、提取时间为 57 s,红树莓总酚提取量为(52.24 ± 0.66) mg/g,此外,提取物对 DPPH·清除率达到 93.71% ± 0.70%,对·OH 清除率达到 84.13% ± 1.58%。

关键词:红树莓, 闪式提取, 多酚, 抗氧化性

Optimization of flash extraction process and antioxidant activity of polyphenol from red raspberry

LI Kang, WANG Xi-xi, CUI Xiao-ru, CHEN Lei, HUANG Qun, SONG Hong-bo, TENG Hui*

(College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The extraction processing of total polyphenols from red raspberry was performed and investigated. According to the result of single factor experiments, solvent concentration, extract time and voltage were further selected for Box-Behnken center design. The response surface methodology was applied to optimize the extraction conditions. The antioxidant activity was measured by *in vitro* DPPH and OH radical scavenging analysis. DPPH· and ·OH. The efficiency for extraction of total polyphenols from red raspberry in four solvents was in following order: ethanol > water > petroleum ether > chloroform. The optimal condition for extraction of total polyphenols were the solvent of ethanol, voltage 150 V, time 57 s. with the extract ratio of 48% and the yield of (52.24 ± 0.66) mg/g dry weight. In addition, the DPPH and OH radical inhibitory effects were 93.71% ± 0.70%, and 84.13% ± 1.58%, respectively.

Key words: red raspberry; flash extraction process; polyphenols; antioxidant activity

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2018)05-0197-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.05.038

红树莓, 又称莓托盘、红马林等, 因其富含多种人体必需的营养成分, 且具有多种医药疗效, 被列为世界第三代水果。红树莓果实中含有丰富黄酮、酚酸、鞣花酸等多酚类化合物, 许多关于红树莓功能性研究表明, 红树莓中的这些多酚类化合物对癌症、糖尿病、肥胖等疾病有抑制作用^[1-3], 因此已成为食品与保健品研究的焦点。

在研究多酚的提取工艺的过程中, 越来越多的新技术被引进, 如微波辅助提取法、超声波辅助提取法、超高压提取法等^[4-7], 但这些提取方法耗时长、效率低且操作繁琐, 且容易导致植物多酚在提取过程中发生降解。闪式提取技术是一种新型提取方法,

近年来该技术被广泛的应用在植物活性成分提取方面, 它利用高速机械剪切力和超动分子渗滤技术, 将物料组织迅速破碎至细微颗粒, 然后使物料组织内部的有效成分迅速进入溶剂中, 瞬间达到溶剂浓度的平衡, 通过与溶剂充分接触, 快速提取物料中的有效成分。闪式提取法具有提取时间短、提取效率高和操作简单等特点, 且很好的解决了植物多酚在提取过程中因时间过长导致温度过高引起降解的问题。近年来有文献报道了闪式提取技术应用在黄芪、肉苁蓉、山杏仁种皮等植物中活性成分的提取中^[8-10], 提取效果较好。目前闪式提取法在红树莓活性成分提取方面的研究较少。

收稿日期: 2017-07-26

作者简介: 李康(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程, E-mail: lkang193@163.com。

* 通讯作者: 滕慧(1985-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: tenghui850610@126.com。

基金项目: 福建省重大科技专项(2014NZ0002-1); 福建农林大学高水平大学建设项目(基金编号 612014042, 612014043)。

因此,本文意在探讨闪式提取法提取红树莓中总多酚的工艺,并对红树莓多酚提取液的抗氧化性进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红树莓 山东烟台,运输途中采用干冰保鲜,后立即储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冷库中备用;DPPH(1,1-二苯基-2-苦基肼自由基)、福林酚试剂、Trolox、没食子酸标准品 北京索莱宝科技有限公司;羟基自由基测定试剂盒 南京建成生物有限公司;无水碳酸钠、乙醇、石油醚、氯仿 国药集团化学试剂有限公司;其他试剂 均为分析纯。

EYEL4 型真空冷冻干燥机 上海爱朗仪器有限公司;JHBE-50T 型闪式提取器 河南智晶生物科技股份有限公司;SHZ-III 型循环水真空泵 上海亚荣生化仪器厂;SpectraMax i3x 型酶标仪 molecular debices;BSA124S 型电子天平 赛多利斯科学仪器北京有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 红树莓样品的处理 红树莓鲜果($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下迅速冻结) \rightarrow 真空冷冻干燥($-43\text{ }^{\circ}\text{C}$,12 h) \rightarrow 粉碎过筛(40 目) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

1.2.2 多酚提取的工艺流程 取4 g 红树莓样品粉末溶于150 mL 溶剂 \rightarrow 闪式提取 \rightarrow 抽滤得滤液 \rightarrow (95%乙醇)醇沉静置收集上层清液 \rightarrow 红树莓多酚粗提物。

准确称取4 g 红树莓样品粉末溶于150 mL 的溶剂中搅拌均匀,将混合的样品溶液利用闪式提取器在一定的提取电压(由于受闪提器自身的原因,实验电压参数只能在100~200 V 范围内设置)和提取时间下进行提取,将提取后的样品溶液进行抽滤,收集滤液,并将该滤液在95%的乙醇溶液中进行12 h 醇沉,收集上层溶液得红树莓多酚粗提物。

1.2.3 没食子酸标准曲线的绘制及多酚含量的计算 多酚含量测定参考李杰^[11]、Teng H 等^[12]方法,采用福林酚法测定,以没食子酸为基准物,得没食子酸标准曲线吸光值对浓度的线性回归方程为: $y = 3.7583x + 0.0603, R^2 = 0.9971$ 。根据没食子酸标准曲线回归方程计算树莓多酚含量。多酚提取量计算公式:

$$\text{多酚提取量 TPC (mg/g)} = (V \times C) / m \quad \text{式(1)}$$

式(1)中:m-样品质量,g;V-提取液的体积,mL;C-样品中多酚浓度,mg/mL。

1.2.4 单因素实验设计 选取溶剂类型、溶剂浓度、提取电压、提取时间为考察因素,以红树莓多酚提取量为指标进行单因素实验。

1.2.4.1 溶剂类型因素的影响 分别准确称取4 g 红树莓冻干物粉末,按料液比4 g:150 mL 各加入150 mL 超纯水、50%乙醇、无水乙醇、氯仿、石油醚,提取时间为60 s,电压120 V,提取液经过滤,定容,根据1.2.3 计算多酚提取量,每组重复3次平行实验。

1.2.4.2 溶剂浓度因素的影响 分别准确称取4 g 红树莓冻干物粉末,按料液比4 g:150 mL 各加入150 mL 超纯水、25%乙醇、50%乙醇、75%乙醇、无水乙醇,提取时间为60 s,电压120 V,提取液经过滤,定容,

根据1.2.3 计算多酚提取量,每组重复3次平行实验。
1.2.4.3 提取电压因素的影响 分别准确称取4 g 红树莓冻干物粉末,按料液比4 g:150 mL 各加入150、50 mL 50%乙醇溶液,提取电压分别设定为0、100、125、150、175、200 V,提取时间为60 s,提取液经过滤,定容,根据1.2.3 计算多酚提取量,每组重复3次平行实验。

1.2.4.4 提取时间因素的影响 分别准确称取4 g 红树莓冻干物粉末,按料液比4 g:150 mL 各加入50%乙醇,提取时间分别设定为20、40、60、80、100 s,提取电压为150 V,提取液经过滤,定容,测定计算,每组重复3次平行实验。

1.2.5 响应面实验设计 根据Box-Behnken 中心组合实验设计原理,参考宋思圆等^[13-16]方法并稍作修改,综合单因素实验结果,以乙醇溶液为提取剂,选取对树莓总多酚提取量影响较大的因素乙醇体积分数(A)、提取电压(B)和提取时间(C),进行中心组合实验。以多酚提取量(mg/g)为响应值,通过响应面分析得出闪式提取树莓中总多酚的最佳提取工艺条件。实验设计因素编码及水平见表1。

表1 响应面三因素三水平实验设计

Table 1 Factors and levels of response surface analysis

因素	水平		
	-1	0	1
A 乙醇体积分数(%)	25	50	75
B 提取电压(V)	125	150	175
C 提取时间(s)	40	60	80

1.2.6 红树莓多酚提取液抗氧化能力测定

1.2.6.1 对DPPH·清除能力 参考王毕妮^[17]等人方法并稍作修改。准确称取0.0039 g DPPH·粉末溶于无水乙醇定容至100 mL,室温下平衡2 h 备用。分别取1 mL 样品于试管中,加入9 mL DPPH·溶液,暗反应30 min 后测其在517 nm 处的吸光值,以乙醇为空白对照。Trolox 为阳性对照。重复3次平行实验。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A_s ,对照组吸光值; A_0 ,样品组吸光值。

1.2.6.2 对·OH 清除能力 参照试剂盒给定方法加样,将各组混匀,放置10 min,双蒸水调零,在520 nm 处测定各组对照管和测定管吸光值,以超纯水为空白对照。Trolox 为阳性对照。重复3次平行实验。

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A_s ,对照组吸光值; A_0 ,样品组吸光值。

1.2.7 数据处理 采用Microsoft excel 2003 软件及DPS 数据处理系统处理上述实验数据、作图和数据分析。

2 结果和分析

2.1 单因素对红树莓总多酚提取量的影响

2.1.1 溶剂对红树莓多酚提取量的影响 结果见图1。

由图1可知,不同类型的提取溶剂对不同种类

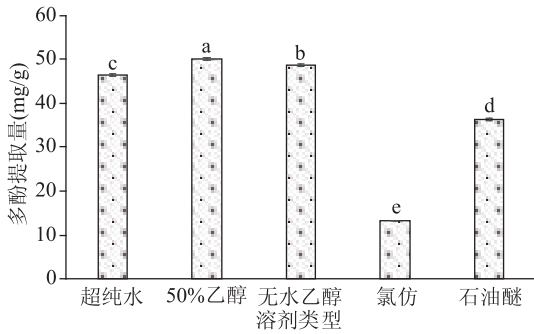


图1 溶剂类型对红树莓多酚提取量的影响
Fig.1 Effect of solvent types on extraction content of polyphenols from red raspberry

注:(a,b,c,d,e)不同字母代表各组间具有显著性差异。

的多酚具有不同的提取效果,五种溶剂对红树莓中多酚提取量分别为:超纯水(46.50 mg/g),50%乙醇(50.12 mg/g),无水乙醇(48.67 mg/g),氯仿(13.27 mg/g),石油醚(36.41 mg/g),与氯仿、石油醚相比,无水乙醇、50%的乙醇和纯水这三种溶剂对红树莓中多酚的提取量较高,且五种溶剂对红树莓多酚的提取效果存在显著性差异($p < 0.05$),水、无水乙醇、50%乙醇、氯仿及石油醚对红树莓中多酚提取效果的差异可能与红树莓中多酚的种类、分子结构、提取溶剂的极性有关^[18]。为了得到更高的多酚提取量,因此确定树莓提取物的提取溶剂为乙醇和超纯水的混合溶液。

2.1.2 乙醇体积分数对红树莓多酚提取量的影响 结果见图2。

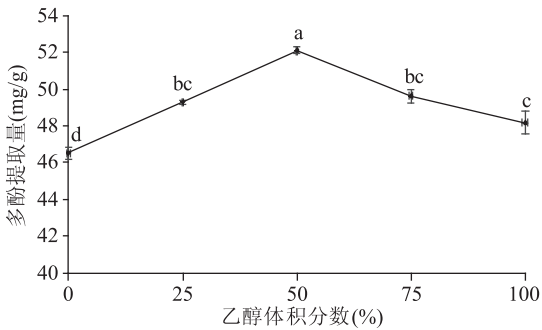


图2 乙醇体积分数对红树莓多酚提取量的影响
Fig.2 Effect of ethanol concentration on extraction content of polyphenols from red raspberry

由图2可知,在乙醇体积分数小于50%时,多酚提取量随着乙醇体积分数的增大而增加,当乙醇体积分数超过50%时总酚含量下降,这可能与红树莓中多酚物质以水溶性和非水溶性两种存在形式有关。非水溶性多酚多与蛋白质、多糖类物质以氢键和疏水键结合^[19]。旷慧等^[20]在醇法提取红树莓多酚工艺优化中表明:提高乙醇浓度能破坏红树莓中多酚与蛋白质、多糖类物质之间的共价键,从而提高多酚的释放量。当乙醇体积分数低于50%时,由于乙醇破坏细胞壁进入细胞内部,使得氢键断裂,酚类物质溶出,当乙醇体积分数超过50%时,乙醇会引起蛋白质变性阻碍酚类物质传质的过程,同时一些醇溶性类亲脂性强的成分溶出与多酚类物质竞争同溶剂

结合,使得多酚的提取量下降^[21];因此乙醇体积分数选择25%、50%、75%三个水平进行优化。

2.1.3 提取电压对红树莓多酚提取量的影响 结果见图3。

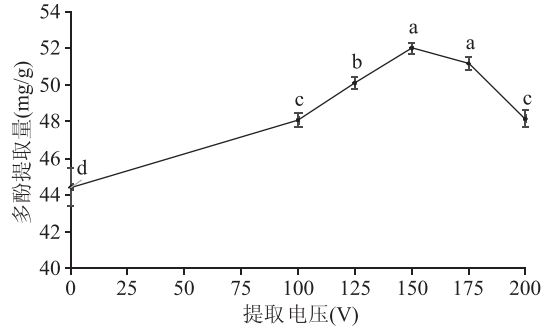


图3 提取电压对红树莓多酚提取量的影响
Fig.3 Effect of voltage on extraction content of polyphenols from red raspberry

由图3可知,与其他五组采用不同电压闪式提取相比,不采用闪式提取(即提取电压为0V时)的多酚的含量均低于采用闪式提取的含量;且在提取电压为150V之前,随着提取电压的增大而增加,提取电压超过150V之后含量下降,这可能是因为随着闪提电压的增大,闪提器刀头转速过快,使得树莓中有效成分的粒径变小,引起表面能增大被吸附在固体表面或是细微粒间相互粘连,使得不易溶解,导致多酚提取量降低^[22];因此提取电压选择125、150、175V三个水平进行优化。

2.1.4 提取时间对红树莓多酚提取量的影响 结果见图4。

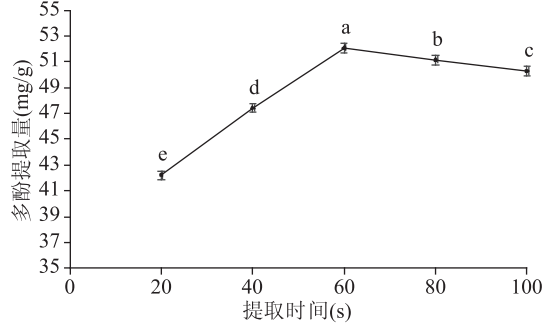


图4 提取时间对红树莓多酚提取量的影响
Fig.4 Effect of time on extraction content of polyphenols from red raspberry

由图4可知,多酚的提取量在提取时间为60s之前,随着提取时间的增加而增加,60s时多酚含量最大为51.10 mg/g,提取时间超过60s之后含量下降。这可能是因为随着闪提时间的延长,闪提器刀头能量的积攒而发热,引起多酚的分解导致多酚提取量降低^[23],因此提取时间选择40s、60s、80s三个水平进行优化。

2.2 响应面分析实验结果和数据分析

乙醇浓度(A)、提取电压(B)、提取时间(C)为自变量,以树莓果实中的多酚提取量(Y)为响应值设计响应面实验,利用Design Expert 8.2对实验数据进行了二次多项回归拟合,得到回归方程如下:

$$Y = 52.31 - 0.29A - 0.11B - 0.22C + 1.06AB + 1.08AC - 1.15BC - 2.71A^2 - 2.80B^2 - 1.26C^2 \quad \text{式(2)}$$

表2 响应面分析实验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of response surface analysis

实验号	A 乙醇体积分数(%)	B 提取电压(V)	C 提取时间(s)	多酚提取量(mg/g)
1	-1	-1	0	48.28
2	1	-1	0	45.66
3	-1	1	0	45.80
4	1	1	0	47.44
5	-1	0	-1	50.15
6	1	0	-1	47.33
7	-1	0	1	47.17
8	1	0	1	48.69
9	0	-1	-1	47.19
10	0	1	-1	49.39
11	0	-1	1	49.41
12	0	1	1	47.02
13	0	0	0	50.99
14	0	0	0	52.21
15	0	0	0	54.10
16	0	0	0	52.07
17	0	0	0	52.16

其中, Y 为树莓多酚提取量的预测值, A、B、C 分别为以上四个自变量的值。对上述方程进行方差分析, 结果如表 3 所示。

由方差分析结果可知, 模型的 $F = 13.59$, $p = 0.0012 < 0.01$, 说明实验模型高度显著。F 失拟 = 0.084, 失拟项 $p = 0.9655 > 0.05$, 失拟不显著。模型的决定系数 $R^2_{Adj} = 0.8763$, 说明模型能够解释 87.63% 的响应值变化, $R^2 = 0.9459$, 表明该模型的拟合程度较好, 可以用此模型来分析和预测闪式提取树莓多酚

的工艺条件。 $F_A = 0.85$ 、 $F_B = 0.13$ 、 $F_C = 0.51$, 可知各因素对树莓多酚的提取影响大小关系为乙醇体积分数 > 提取时间 > 提取电压。由表 3 还可以看出一次项 A、交互项 AB、AC、BC 及二次项 C^2 对提取效果影响显著 ($p < 0.05$), 二次项 A^2 、 B^2 对提取效果影响极显著 ($p < 0.01$), 其它因素影响不显著 ($p > 0.05$)。

2.3 响应面分析及优化

根据回归方程, 各因素间交互作用的三维曲面见图 5~图 7。三维曲面反映每两个影响因素之间的交互作用。

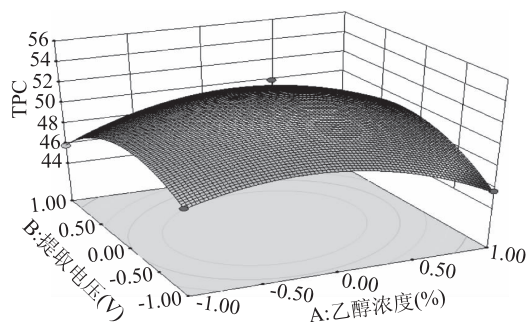


图5 乙醇浓度和提取电压对 TPC 的影响

Fig.5 The effect of ethanol concentration and extraction voltage on TPC

根据回归模型绘制出各因素间交互作用的响应面图, 通过响应面图可直观地发现各因素两两交互显著程度, 等高线越偏平说明交互作用越显著, 对多酚的提取效果越好。由图 5~图 7 可知, 三种因素两两交互作用的等高线图均呈现椭圆状, 这表明乙醇浓度、提取电压和提取时间之间存在较强的交互性。

由 Design Expert 8.2 软件得出模型预测闪式提取红树莓中多酚的最佳条件为: 乙醇体积分数 48%、提取电压 149.75 V、提取时间 57.6 s, 此条件下多酚提取量为 52.33 mg/g。

考虑到实际操作对上述模型预测最优条件进行

表3 多酚提取量(TPC)回归模型方差分析表

Table 3 Analysis of variance for the TPC fitted regression mod

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	93.50	9	10.39	13.59	0.0012	**
A	0.65	1	0.65	0.85	0.03873	*
B	0.099	1	0.099	0.13	0.7296	
C	0.39	1	0.39	0.51	0.4972	
AB	4.54	1	4.54	5.93	0.0450	*
AC	4.71	1	4.71	6.16	0.0421	*
BC	5.27	1	5.27	6.89	0.0342	*
A^2	31.02	1	31.02	40.57	0.0004	**
B^2	32.93	1	32.93	43.08	0.0003	**
C^2	6.65	1	6.65	8.70	0.0214	*
残差	5.35	7	0.76			
失拟性	0.32	3	0.11	0.084	0.9655	
纯误差	5.04	4	1.26			
总差	98.86	16				

注: $R^2 = 0.9459$; $R^2_{Adj} = 0.8763$; * 差异显著, $p < 0.05$; ** 差异极显著, $p < 0.01$, $p > 0.05$ 表示差异不显著。

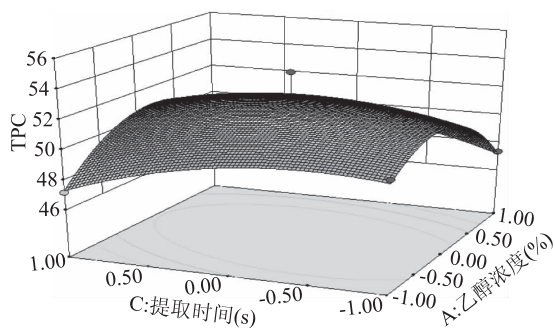


图6 乙醇浓度和提取时间对 TPC 的影响
Fig.6 The effect of ethanol concentration and extraction time on TPC

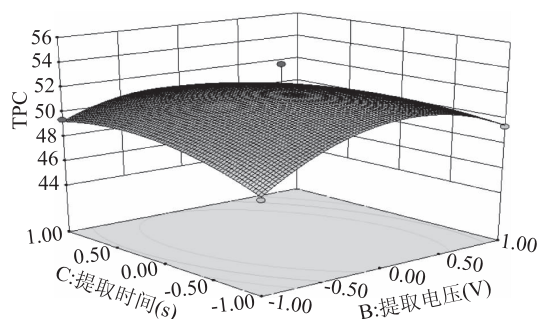


图7 提取电压和提取时间对 TPC 的影响
Fig.7 The effect of extraction voltage and extraction time on TPC

修正,最终总多酚优化条件为乙醇体积分数为 48%、电压 150 V、提取时间为 57 s,在此条件下进行 3 次平行实验验证,红树莓中多酚的提取量为 (52.24 ± 0.66) mg/g,与理论预测值 52.33 mg/g 极为接近,说明用该模型对红树莓中多酚的提取进行工艺优化具有一定的实际可操作性。

2.4 抗氧化能力分析

由图 8 可知,红树莓多酚提取液对 DPPH· 和 ·OH 有较强的清除效果,且随着红树莓多酚提取物浓度的增大,清除率越高。当红树莓多酚提取物浓度小于 104.32 μg/mL 时,清除 DPPH·、·OH 的效果提高较明显,当大于 104.32 μg/mL 之后清除效果变化缓慢,当添加量为 208.64 μg/mL 时,对 DPPH· 清除率达到 93.71%,对 ·OH 清除率达到 84.13%。这可能是因为红树莓多酚提取液中各成之间的含量存在差

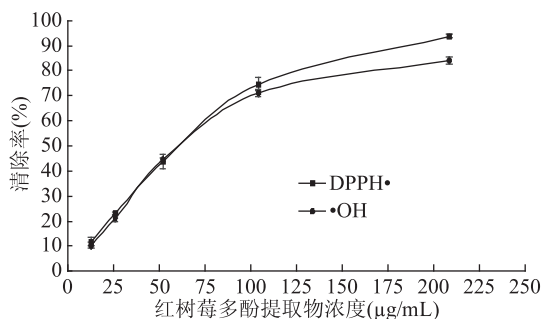


图8 提取物对 DPPH· 和 ·OH 清除能力
Fig.8 Scavenging effects of the extracts on DPPH and OH radical

异,且复杂的活性成分之间的相互协同或拮抗作用导致了所提取的 DPPH· 与 ·OH 的清除效果不同^[24]。由图 9 可知,Trolox 对 DPPH· 和 ·OH 有极强的清除效果,当 Trolox 的浓度达到 50 μg/mL 时,对 DPPH· 清除率达到 96.00%,对 ·OH 清除率达到 91.89%,略高于红树莓多酚提取物浓度为 208.64 μg/mL 时的清除率。

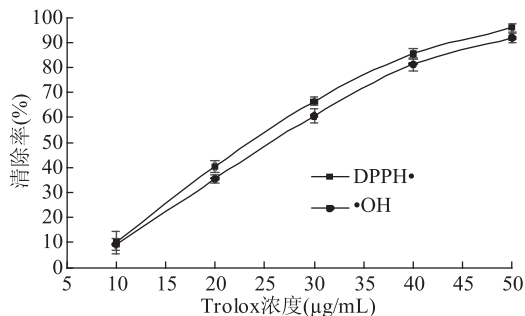


图9 Trolox 对 DPPH· 和 ·OH 清除能力
Fig.9 Scavenging effects of Trolox on DPPH and OH radical

3 结论

在本实验中,首先采用单因素实验分析了溶剂类型、溶剂体积分数和提取电压、提取时间四个因素分别对树莓中多酚提取量的影响,确定合适的提取条件,再利用响应面分析法优化提取条件,并以此得到红树莓多酚提取液进行抗氧化性研究。结果表明:树莓中多酚提取最佳工艺参数为:乙醇体积分数 48%、电压 150 V、提取时间 57 s,得到红树莓多酚提取量为 (52.24 ± 0.66) mg/g,同时红树莓多酚提取液对 DPPH· 和 ·OH 均有较强的清除效果,且清除率随多酚提取液添加量的增多而提高,本实验中浓度为 208.64 μg/mL 的红树莓多酚提取物对 DPPH· 和 ·OH 的清除效果略低于 50 μg/mL 的 Trolox,显示红树莓多酚提取物具有较强的体外抗氧化性。

但本文未能详细说明不同溶剂对红树莓多酚提取量与树莓中多酚种类两者之间的关系、抗氧化性与多酚成分之间的关系。本工艺与传统提取工艺相比,具有操作简单、提取时间短、提取率高等特点,是一种高效节能的新型的提取红树莓中多酚的方法,另外红树莓多酚也表现出较强的抗氧化性,具有一定的开发价值。

参考文献

[1] 孙红艳,孟军,吕安坤.国内外树莓体内研究现状[J].现代中西医结合杂志,2014(18):2038-2042.
[2] 司旭,陈芹芹,毕金峰,等.树莓主要功能性成分研究进展[J].食品工业科技,2015,36(4):376-381.
[3] 王海明,刘树英,刘洪章.红树莓中酚类化合物研究进展[J].北方园艺,2011(11):180-183.
[4] Galan A M, Calinescu I, Trifan A, et al. New insights into the role of selective and volumetric heating during microwave extraction: Investigation of the extraction of polyphenolic compounds from sea buckthorn leaves using microwave-assisted extraction and conventional solvent extraction [J]. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2017, 116:

