

响应面法优化树莓鞣花酸提取工艺 及其体外抗氧化活性

崔珊珊, 毕凯媛, 吴 杰, 尚宏丽*

(锦州医科大学食品科学与工程学院, 辽宁省肉类加工
与质量安全控制工程技术研究中心, 辽宁锦州 121001)

摘 要:本研究旨在通过微波辅助提取法确定树莓鞣花酸的最佳提取工艺,并对其进行抗氧化活性进行研究。以红树莓为实验原料,使用乙醇提取溶剂,采用微波辅助溶剂法提取红树莓中鞣花酸,通过单因素试验与响应面法优化红树莓中鞣花酸提取工艺,利用高效液相色谱(HPLC)法对鞣花酸进行分析测定,并对其抗氧化性进行研究。结果表明:响应面法优化出最佳提取条件为:提取时间 1.8 min、提取温度 60 ℃、乙醇浓度 50%、液料比 19:1、微波功率 411 W,此条件下测得鞣花酸提取量为 (82.75 ± 1.05) mg/100 g,高于传统盐酸水解法在最佳提取条件下所测树莓鞣花酸提取量。实际结果与理论预测高度吻合,因此本实验得到的最优条件准确可靠有参考应用价值。微波辅助溶剂法所得鞣花酸对羟自由基清除能力、清除 DPPH 自由基能力都显著高于传统盐酸水解法所得鞣花酸对羟自由基清除能力,清除 DPPH 自由基能力,说明微波辅助溶剂提取法,不但提取时间短暂,提取溶剂用量少,而且更好的保护了树莓鞣花酸的抗氧化活性,可为树莓鞣花酸工业生产提供一定参考。

关键词:红树莓,鞣花酸,微波,响应面优化法,抗氧化性

Optimization of Extraction Technology and Antioxidative Activity of Ellagic Acid in Raspberry by Response Surface Methodology

CUI Shan-shan, BI Kai-yuan, WU Jie, SHANG Hong-li*

(School of Food Science and Engineering, Jinzhou Medical University, Meat Processing and Quality
Safety Control Engineering Technology Research Center of Liaoning Province, Jinzhou 121001, China)

Abstract: The aim of this study was to determine the optimal extraction process of raspberry ellagic acid by microwave-assisted extraction and study its antioxidant activity. Red raspberry was used as experimental material, ethanol extraction solvent was used, and ellagic acid was extracted from red raspberry by microwave-assisted solvent method. The extraction process of ellagic acid in red raspberry was optimized by single factor test and response surface test. The ellagic acid was analyzed by chromatography (HPLC) and its oxidation resistance was investigated. The results showed that the optimal extraction conditions were as follows: extraction time 1.8 min, extraction temperature 60 ℃, ethanol concentration 50%, liquid-to-liquid ratio 19:1, microwave power 411 W, the extraction amount of ellagic acid was (82.75 ± 1.05) mg/100 g under these conditions, which was higher than that measured by the traditional hydrochloric acid hydrolysis method under the optimal extraction conditions. The actual results were highly consistent with the theoretical predictions. Therefore, the optimal conditions obtained in this experiment were accurate and reliable and have reference application value. The ability of ellagic acid to scavenge hydroxyl radicals and scavenge DPPH free radicals by microwave assisted solvent method was significantly higher than that of hydroxy acid scavenging ability of ellagic acid obtained by traditional hydrochloric acid hydrolysis method, and the ability to scavenge DPPH free radicals, indicating microwave assisted solvent extraction. The method not only took a short extraction time, but also used less extraction solvent, and better protected the antioxidant activity of raspberry ellagic acid, which could provide a reference for the industrial production of raspberry ellagic acid.

Key words: red raspberry; ellagic acid; microwave; response surface optimization; anti-oxidation

中图分类号: TS201.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)01-0149-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.01.028

引文格式: 崔珊珊, 毕凯媛, 吴杰, 等. 响应面法优化树莓鞣花酸提取工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 149-155, 161.

收稿日期: 2018-05-07

作者简介: 崔珊珊(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品制造与保藏, E-mail: 15081595936@163.com。

* 通讯作者: 尚宏丽(1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 果蔬贮藏与生物技术, E-mail: shanghongli007@126.com。

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(2015020776); 国家自然科学基金项目(81703636)。

树莓,又名山抛子、覆盆子和托盘等,为蔷薇科悬钩子属灌木型植物,以东北分布较多。树莓含有丰富的鞣花酸、黄酮和水杨酸等多种生物活性成分,具有极高的开发和利用价值。鞣花酸是一种多酚二内酯,它是没食子酸的二聚衍生物,广泛分布于各种植物组织和果实中,呈游离形式或缩合形式。研究者从草莓、石榴、葡萄、树莓和板栗发现不同含量的鞣花酸,其中树莓中鞣花酸的含量在水果中堪称“之最”^[1-5]。树莓是最早一批被研究人员发现其含有天然鞣花酸的植物之一^[6]。鞣花酸具有抗菌^[7]、抗氧化^[8-9]、抗炎^[10]、镇痛^[11]等多种特性,在肿瘤方面也具有很高的应用价值^[12-13],堪称“癌症的天敌”。在国外,鞣花酸已被许多研究机构开发,广泛应用于食品、医药、化妆品等各个领域。而且在国际市场上鞣花酸的保健品比一般的保健品价位要高出很多,但国内对它的开发还处于研发阶段^[10]。

鞣花酸等多酚类化合物的提取方法,多集中于溶剂浸提法和超声波辅助提取,研究者利用超声波辅助溶剂浸提法^[14]、乙酸乙酯萃取法^[15]、酸水解法^[16]、分离沉淀法^[17]提取植物中鞣花酸等多酚类化合物。这些传统的方法提取多酚由于提取时间长,很容易使多酚化合物降解,影响其抗氧化活性。微波辅助提取技术,具有提取时间短暂,提取得率高等优点^[18],适合多酚及黄酮类化合物的提取。目前,关于微波辅助溶剂提取树莓鞣花酸实验还鲜见报道。

本实验以树莓为原料,利用微波辅助溶剂提取树莓鞣花酸,利用高效液相色谱(HPLC)测定提取量,通过响应面试验设计优化微波辅助提取树莓鞣花酸工艺,与传统盐酸水解法对比其体外抗氧化活性研究,为进一步深入研究树莓鞣花酸生物活性功能以及相关功能性食品开发提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红树莓(*Rubus idaeus* L. cv. Fertod Zamatos) 锦州七里河树莓种植基地,置于-80℃冰箱中冻存备用;鞣花酸标准品(纯度大于或等于98%) 武汉培安生物科技有限公司;甲醇(色谱纯) 上海安谱实验科技股份有限公司;磷酸(HPLC级)、邻苯三酚、无水乙醇、盐酸、硫酸亚铁、EDTA、30%过氧化氢(均为AR) 天津科密欧化学试剂有限公司;实验用水 自制实验室蒸馏水和去离子水;邻菲罗啉、DPPH(均为AR) 天津永大化工试剂有限公司;PBS缓冲液 北京索莱宝科技有限公司;Tris-HCl缓冲液 上海尔武实业有限公司。

Agilent1200液相色谱系统 G1315D型DAD检测器 安捷伦有限公司;COWB微波萃取设备 江阴辰欧微波能系统设备有限公司;FD-1A-50真空冷冻干燥机 上海豫明仪器有限公司;800Y高速多功能粉碎机(70~300目) 永康市铂欧五金制品有限公司;DM0412E低速离心机 江苏苏博生物医药股份有限公司;JM-BL电子分析天平 慈溪红钻衡器设备有限公司;数字恒温水浴锅(HH-6,常州市万丰仪器制造有限公司);RE-5250旋转蒸发器 巩义市英

峪高科仪器厂;722紫外可见分光光度计 佛山市涵宇骏仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理 红树莓鲜果在低温冷冻冰箱中经过预冷处理后,放入真空冷冻干燥机干燥48 h,之后用粉碎机粉碎,粉碎后过80目筛,在-20℃下保存备用。

1.2.2 微波辅助溶剂提取法提取树莓中鞣花酸工艺单因素试验 精确称量0.5 g树莓冻干粉置于25 mL锥形瓶中,按照一定的液料比(mL/g)加入一定浓度的乙醇溶液在一定提取温度下,利用一定的微波功率提取一定的时间后快速冷却,4500 r/min条件下25℃条件下离心20 min,残渣重复提取2次,与上清液合并。树莓鞣花酸粗提物用二甲亚砜(DMSO)定容在25 mL。样品用0.45 μm微孔滤膜过滤。用于HPLC检测分析滤液中鞣花酸。所有提取及检测均平行三次^[19]。

1.2.2.1 乙醇浓度对鞣花酸含量的影响 试验测定方法同1.2.2,只改变单因素项,其余固定不变。提取时间选择2 min,提取温度60℃,液料比20:1,微波功率400 W,乙醇浓度选用10%、30%、50%、70%、90%。

1.2.2.2 提取时间对鞣花酸含量的影响 乙醇浓度选择50%,控制其他反应条件同1.2.2.1,提取时间选用1、2、3、4 min。

1.2.2.3 提取温度对鞣花酸含量的影响 乙醇浓度选择50%,控制其他反应条件同1.2.2.1,提取温度选用40、50、60、70、80℃。

1.2.2.4 液料比对鞣花酸含量的影响 乙醇浓度选择50%,控制其他反应条件同1.2.2.1,液料比选用10:1、20:1、30:1、40:1。

1.2.2.5 微波功率对鞣花酸含量的影响 乙醇浓度选择50%,控制其他反应条件同1.2.2.1,微波功率选用200、300、400、500、600 W。

1.2.3 响应面试验 在单因素试验结果的基础之上,采用Box-Behnken设计响应曲面试验方案,以树莓鞣花酸提取量作为响应值,对乙醇浓度、提取时间、提取温度、料液比和微波功率五因素进行响应面法优化。各因素及水平编码见表1。

表1 因素及水平编码

Tabel 1 Factors and levels code

水平	因素				
	A 提取时间 (min)	B 提取温度(℃)	C 乙醇浓度 (%)	D 液料比	E 微波功率 (W)
-1	1	50	30	10:1	300
0	2	60	50	20:1	400
1	3	70	70	30:1	500

1.2.4 鞣花酸的HPLC测定 液相色谱条件:色谱柱为Zorbax Eclipse plus C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相:冰乙酸(A)-甲醇(B),梯度洗脱程序:0~4 min B由20%升到45%,维持6 min,10~

15 min B 由 45% 升到 70%, 15 ~ 20 min B 升至 100%, 维持 1 min; 柱温 30 ℃, 运行 60 min, 进样体积 10 μL, 在 280 nm 下检测。

鞣花酸标准曲线的绘制: 精确配制成 6 mg/mL 鞣花酸标准溶液, 精确吸取 0.5、1.0、2.5、3.5、5.0、6.5 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 分别配制成 30、60、150、210、300 和 390 mg/100 g 标准溶液, 用 DMSO 定容至刻度并摇匀, 取标准溶液各 10 μL 进样, 测定峰面积, 以标准样品浓度 (mg/100 g) 为横坐标, 以标准样品的峰面积为纵坐标, 绘制出鞣花酸标准曲线。

1.2.5 两种提取方法所得鞣花酸含量的比较 采用传统盐酸水解提取方法^[20], 方法略微修改, 精确称取 0.5 g 树莓冻干粉置于 50 mL 带盖锥形瓶中, 加入 10 mL 1 mol/L 盐酸混匀, 60 ℃ 水浴 1 h 后过滤收集滤液; 滤渣重复上述步骤提取 1 次, 合并滤液得鞣花酸粗品提取液; 滤液在 85 ℃ 下真空旋转干燥烘干水分, 测定鞣花酸含量, 与本研究利用响应面优化出最佳提取出的鞣花酸含量进行比较。

1.2.6 两种提取方法得到的鞣花酸中羟自由基清除能力的测定 将树莓鞣花酸提取物用蒸馏水配成浓度分别为 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL 的样品溶液。损伤管: 取 1.0 mL 的 75 mmol/L 邻二氮菲无水乙醇溶液加入 2.0 mL pH7.4 的 PBS 缓冲液和 0.5 mL 蒸馏水, 充分混匀后加入 1.0 mL 的 75 mmol/L 硫酸亚铁, 混匀后再加入 1.5 mL 0.01% (v/v) 的双氧水, 37 ℃ 水浴 60 min。未损伤管: 以蒸馏水代替双氧水^[21]。样品管: 以样品溶液代替蒸馏水。在 508 nm 处测定吸光值 A。清除率按下式计算:

$$R(\%) = \frac{A_a - A_b}{A_d - A_b} \times 100$$

式中: A_a: 样品吸光度; A_b: 损伤管吸光度; A_d: 未损伤管吸光度; R: 清除率 (%)。

1.2.7 两种提取方法得到的鞣花酸中 DPPH 自由基清除能力的测定 取 1.2.6 所配制的不同质量浓度的样品溶液 1 mL, 加入 3 mL DPPH 无水乙醇溶液 (0.04 g/L), 混匀后在室温下反应 30 min, 在 517 nm 下测定吸光度 A_i。空白组以无水乙醇溶液代替 DPPH 溶液, 对照组以蒸馏水代替样品溶液^[22]。清除率按下式计算:

$$I(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_0}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A₀: 对照组吸光度; A_i: 样品组吸光度; A_j: 空白组吸光度; I: 清除率 (%)。

1.3 数据处理

数据处理采用 SPSS 21.0 软件进行方差分析 (ANOVA), $p < 0.05$ 差异性显著。并采用 Design-Expert 7.0.0 进行响应面分析。

2 结果与分析

2.1 鞣花酸标准曲线

依据将不同浓度标准品溶液, 分别进样后, 所得色谱峰的位置如图 1 所示。标准样品浓度 (mg/100 g) 是横坐标, 标准样品的峰面积是纵坐标。绘制标准曲线, 计算线性回归方程。 $y = 32772x - 26328$, $R^2 =$

0.9999, 线性范围为 30 ~ 400 mg/100 g, 保留时间为 34.266 min。

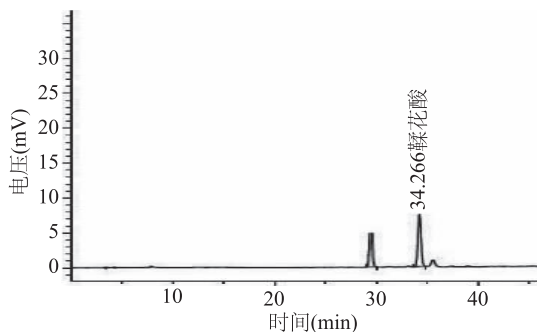


图 1 鞣花酸标准品色谱图

Fig.1 Chromatogram of ellagic acid standard

2.2 单因素实验

2.2.1 乙醇浓度对树莓鞣花酸提取量的影响 由图 2 可知, 在乙醇浓度 10% ~ 50% 时, 树莓鞣花酸提取量随着乙醇浓度的增大逐渐增大, 在乙醇浓度达到 50% 时, 树莓鞣花酸提取量达到峰值 78.93 mg/100 g, 随着乙醇浓度增多, 多酚提取量显著下降 ($p < 0.05$), 可能是因为少量鞣花酸析出, 过滤、离心时沉淀下来, 造成鞣花酸含量减少一小部分^[23], 所以选择 50% 的乙醇浓度为宜。

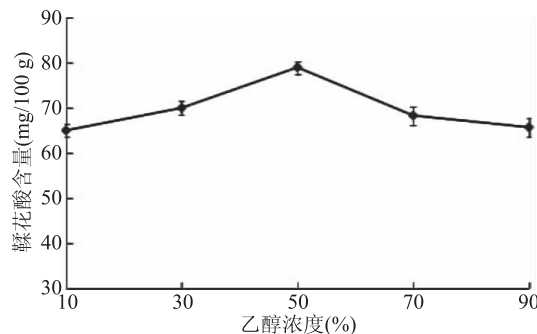


图 2 乙醇浓度对树莓鞣花酸提取量的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on the content of ellagic acid in raspberry

2.2.2 提取时间对树莓鞣花酸提取量的影响 由图 3 可以看出, 提取时间在 1 ~ 2 min 时, 提取时间为 2 min 时所得到的树莓鞣花酸提取量高于提取时间为 1 min 时所得到的树莓鞣花酸提取量; 当提取时间达到 2 min 时, 树莓鞣花酸提取量达到峰值为 82.33 mg/100 g, 随着提取时间的延长, 多酚提取量显著下降 ($p < 0.05$), 可能因为乙醇具有挥发性, 随着提取时间的延长乙醇的有效浓度降低, 致使鞣花酸提取量降低, 所以选择 2 min 进行后续研究。

2.2.3 提取温度对鞣花酸提取量的影响 从图 4 可以看出, 在 40 ~ 60 ℃ 时, 树莓鞣花酸提取量随着提取温度的升高而增加。当提取温度升高到 60 ℃ 时, 树莓鞣花酸提取量达到峰值 80.60 mg/100 g, 随着提取温度的继续升高, 树莓鞣花酸提取量显著下降 ($p < 0.05$), 可能是由于温度的过度增加对鞣花酸的结构造成一定破坏^[24], 所以选择提取温度为 60 ℃。

2.2.4 液料比对鞣花酸提取量的影响 从图 5 可以

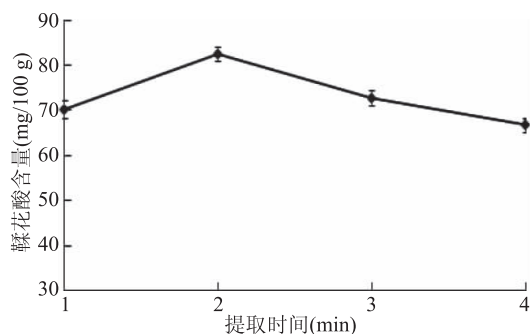


图3 提取时间对树莓鞣花酸提取量的影响

Fig.3 Effect of extraction time

on the content of ellagic acid in raspberry

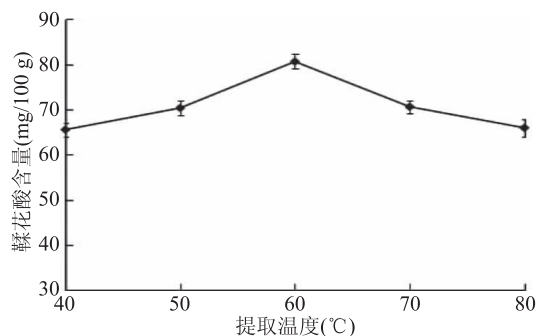


图4 提取温度对树莓鞣花酸提取量的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature

on the content of ellagic acid in raspberry

看出,液料比为20:1时所测得到的树莓鞣花酸提取量高于液料比为10:1时所测,这是因为液料比的扩大可以增大溶剂与物料的接触面积,能使更多的鞣花酸溶解出来;当液料比达到20:1时,树莓鞣花酸提取量达到峰值81.70 mg/100 g,随着液料比的继续升高,树莓鞣花酸提取量显著下降($p < 0.05$),说明鞣花酸溶解达到平衡,增加溶剂体积不能使鞣花酸继续溶解甚至减少,所以选择液料比20:1进行后续研究。

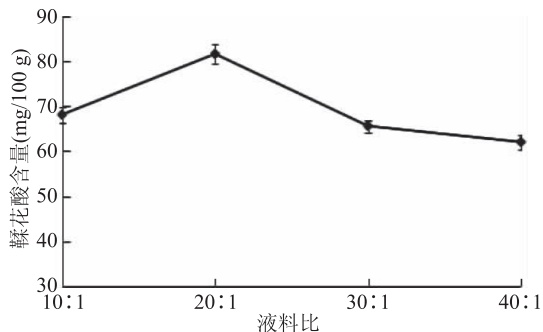


图5 液料比对树莓鞣花酸提取量的影响

Fig.5 Effect of liquid to material ratio

on the content of ellagic acid in raspberry

2.2.5 微波功率对鞣花酸提取量的影响 从图6可以看出,当微波功率在200~400 W时,树莓鞣花酸提取量随着微波功率的增大而增多,此时微波破坏树莓细胞壁的效果与微波功率成正比。当微波功率达到400 W时,树莓鞣花酸提取量达到峰值82.50 mg/100 g,随着微波功率的继续增大,树莓鞣花酸提取量显著下降($p < 0.05$),可能是因为微波功率过大会降解和

破坏鞣花酸^[25],所以选择微波功率为400 W适宜。

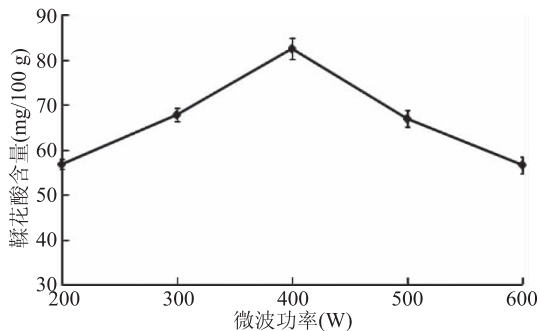


图6 微波功率对树莓鞣花酸提取量的影响

Fig.6 Effect of microwave power

on the content of ellagic acid in raspberry

2.3 响应面优化试验结果

2.3.1 树莓鞣花酸提取工艺响应面试验设计方案与结果 利用 Design-Expert 软件对表2数据进行多元回归拟合。得到鞣花酸提取量二次多项回归模型为:

$$Y = 84.00 - 1.64A + 0.27B + 0.16C - 1.14D + 1.79E + 2.09AB + 0.3AC - 2.00AD - 0.010AE + 0.25BC + 0.73BD - 0.84BE - 1.15CD - 1.00CE + 1.49DE - 4.79A^2 - 5.16B^2 - 11.80C^2 - 5.55D^2 - 8.49E^2$$

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface experiment design and results

试验号	A	B	C	D	E	鞣花酸提取量 (mg/100 mg)
1	0	0	0	0	0	85.232
2	-1	0	0	0	-1	70.345
3	0	1	1	0	0	66.678
4	0	0	1	1	0	63.563
5	1	0	0	-1	0	74.202
6	1	0	0	1	0	66.231
7	1	1	0	0	0	75.200
8	0	1	0	0	-1	71.222
9	-1	-1	0	0	0	77.243
10	0	0	-1	0	-1	60.220
11	0	0	1	0	1	66.001
12	0	0	-1	1	0	66.212
13	0	0	-1	0	1	67.009
14	0	0	-1	-1	0	65.788
15	0	0	0	1	1	73.016
16	0	0	0	0	0	84.211
17	0	1	0	1	0	72.229
18	1	0	0	0	-1	68.290
19	0	-1	0	0	-1	65.087
20	0	0	0	1	-1	65.888
21	0	1	-1	0	0	66.200
22	1	0	0	0	1	70.212
23	0	1	0	0	1	73.003
24	0	-1	0	1	0	74.260
25	-1	0	1	0	0	68.360

续表						
试验号	A	B	C	D	E	鞣花酸提取量 (mg/100 mg)
26	0	0	0	0	0	84.878
27	0	-1	1	0	0	67.000
28	-1	0	0	1	0	76.590
29	0	0	1	0	-1	63.206
30	0	0	0	0	0	82.769
31	0	-1	0	-1	0	76.981
32	0	0	0	-1	-1	70.910
33	1	0	1	0	0	68.368
34	0	0	1	-1	0	67.731
35	0	-1	0	0	1	70.228
36	-1	0	-1	0	0	68.319
37	1	0	-1	0	0	67.111
38	-1	1	0	0	0	75.116
39	0	1	0	-1	0	72.038
40	0	0	0	0	0	82.920
41	0	-1	-1	0	0	67.539
42	1	-1	0	0	0	68.961
43	-1	0	0	0	1	72.308
44	0	0	0	-1	1	72.059
45	-1	0	0	-1	0	76.569

从表 3 的方差分析,模型方程 $p < 0.0001$,说明以响应值(鞣花酸提取量)建立的回归模型极显著。相关系数 $R^2 = 0.9505$,修正系数 $R^2_{adj} = 0.9092$,表明模型的实测值与预测值吻合良好,失拟项 $p > 0.05$,失拟不显著,表明不可忽略的因素对试验结果没太大影响。提取时间和微波功率对鞣花酸含量的线性影响极显著($p < 0.01$),液料比对鞣花酸提取量的线性影响显著($p < 0.05$)。二次项中提取时间、提取温度、乙醇浓度、液料比和微波功率对鞣花酸提取量的曲面效应极显著($p < 0.01$)。在相互作用中,提取时间和提取温度显著($p < 0.05$),提取时间和液料比显著($p < 0.05$)。该方程与试验结果吻合较好,可用于鞣花酸提取试验的分析和预测。由 F 检验可知,影响 Y 的主要因素依次为微波功率 > 提取时间 > 液料比 > 提取温度 > 乙醇浓度。

2.3.2 因素的交互作用分析 利用 Design-Expert 7.0.0 软件对二次回归模型进行规范的分析,所得到的响应面及等高线图可以很好地反映两个因素的协同作用对鞣花酸提取量的影响。

从图 7、图 8 可以清楚的了解到各因素交互作用的响应面分析结果,从中可以直观的看出提取时间和提取温度的相互作用对鞣花酸提取影响显著,表现在其等高线图为椭圆形;同时提取时间和液料比的相互作用对鞣花酸的提取影响也显著。

表 3 拟合二次多项式模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the quadratic polynomial model

差异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	1510.98	20	75.55	23.04	<0.0001	**
A	43.15	1	43.15	13.16	0.0013	**
B	1.20	1	1.20	0.37	0.5504	
C	0.39	1	0.39	0.12	0.7321	
D	20.91	1	20.91	6.38	0.0186	*
E	51.37	1	51.37	15.67	0.0006	**
AB	17.50	1	17.50	5.34	0.0298	*
AC	0.37	1	0.37	0.11	0.7400	
AD	15.97	1	15.97	4.87	0.0371	*
AE	4.202×10^{-4}	1	4.202×10^{-4}	1.282×10^{-4}	0.9911	
BC	0.26	1	0.26	0.079	0.7813	
BD	2.12	1	2.12	0.65	0.4292	
BE	2.82	1	2.82	0.86	0.3628	
CD	5.27	1	5.27	1.61	0.2170	
CE	3.99	1	3.99	1.22	0.2810	
DE	8.94	1	8.94	2.73	0.1118	
A ²	186.54	1	186.54	56.89	<0.0001	**
B ²	216.48	1	216.48	66.02	<0.0001	**
C ²	1132.48	1	1132.48	345.38	<0.0001	**
D ²	250.73	1	250.73	76.47	<0.0001	**
E ²	586.43	1	586.43	178.85	<0.0001	**
残差	78.69	24	3.28			
失拟项	73.68	20	3.68	2.94	0.1525	
误差	5.01	4	1.25			
总和	1589.68	44				

注: * 差异显著($p < 0.05$), ** 差异极显著($p < 0.01$)。

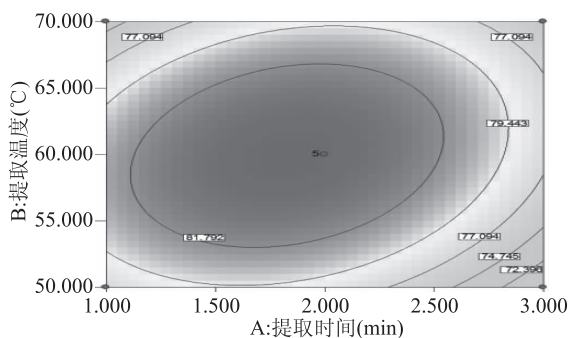


图7 提取时间和提取温度相互作用对树莓鞣花酸提取量的响应面与等高线图

Fig.7 Response surface and contour map manifesting the interactive results of extraction time and temperature on the extraction amount of raspberry ellagic acid

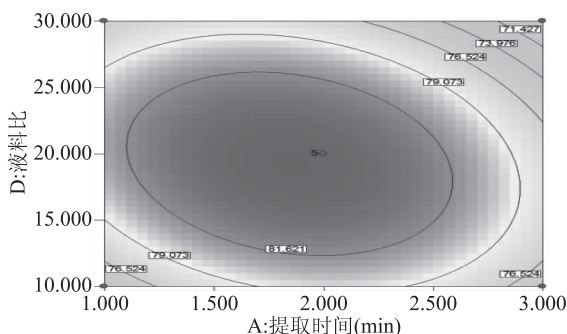
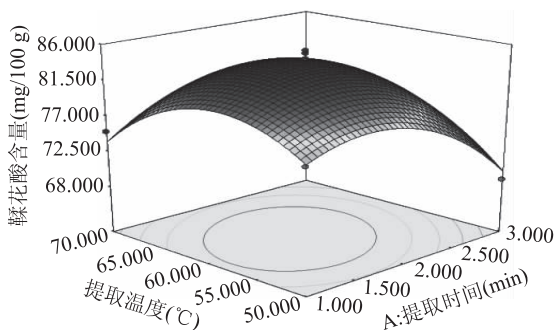
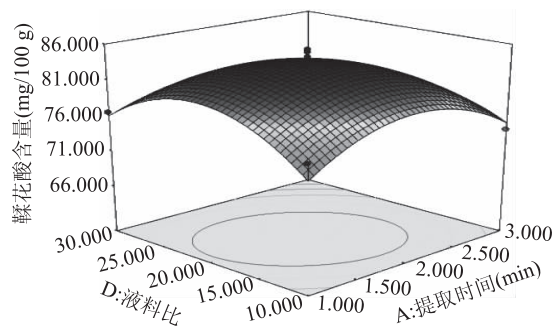


图8 提取时间和液料比相互作用对树莓鞣花酸提取量的响应面与等高线图

Fig.8 Response surface and contour map manifesting the interactive results of extraction time and liquid to material ratio on the extraction amount of raspberry ellagic acid



2.3.3 验证试验 根据响应面分析软件得出最佳工艺条件为:提取时间 1.84 min,提取温度 59.81 °C,乙醇浓度 50%、液料比 19.38:1、微波功率 410.08 W,此条件下,鞣花酸提取量为 84.26 mg/100 g。为了便于实验操作,提取条件设为:提取时间 1.8 min,提取温度 60 °C,乙醇浓度 50%,液料比 19:1,微波功率 411 W,在此条件下进行 3 组平行实验,鞣花酸提取量为 (82.75 ± 1.05) mg/100 g,由于鞣花酸的天然活性,因此具有重要的保健价值。相差百分率为 1.80%,实际结果与理论预测吻合度很高,因此本实验得到的最优条件准确可靠有参考应用价值。目前关于鞣花酸的测定方法有紫外分光光度法^[26]、高效毛细管电泳法^[27]、返滴定法等,本实验采用的高效液相色谱法(HPLC)具有许多特点,如简单、快速、准确^[28-30]。李晓平^[31]、张成涛等^[32]用高效液相色谱法得到的树莓鞣花酸的提取量分别为 223 mg/kg 和 43.5 mg/g,与本实验结果存在差异,可能是因为种植环境、品种、种植气候等的不同造成的。

2.4 不同提取方法鞣花酸提取量与抗氧化活性比较

微波辅助溶剂提取树莓鞣花酸量显著高于传统盐酸水解提取所得提取量($p < 0.05$),微波辅助溶剂提取树莓鞣花酸量为 (82.75 ± 1.05) mg/100 g,提高了 20.42% (图 9)。自由基与人体许多疾病的发生有关,当体内自由基过多时,自由基清除剂就显得非常重要,因而进一步比较其总还原能力、DPPH 自由基和羟自由基的清除能力结果见图 10 所示。微波辅助溶剂所提取到的树莓鞣花酸对羟自由基、DPPH 自

由基的清除能力显著高于传统盐酸水解($p < 0.05$)。这可能与两种不同提取方法所得到酚类成分有关,多酚单体之间抗氧化相互作用与混合物中多酚的结构类型、数量和比例有关^[33],因此表现出的抗氧化性能不同。同时微波提取的时间相对传统方法提取时间短暂,与传统盐酸水解提取法^[20]和超声辅助提取法^[14]相比,鞣花酸提取量高、提取溶剂用量少,更好地保护了树莓鞣花酸的抗氧化活性,为进一步深入树莓鞣花酸生物活性功能以及相关功能性食品开发提供了一定研究基础。

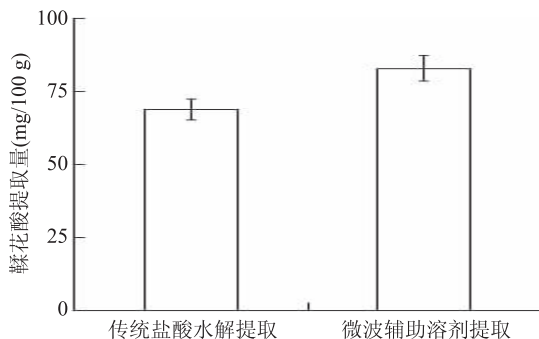


图9 不同提取方法提取的树莓鞣花酸提取量比较

Fig.9 Comparison of extraction amount of ellagic acid extracted by different extraction methods

3 结论

本研究利用微波辅助提取树莓鞣花酸,通过响应面试验设计对鞣花酸的提取条件进行优化,影响树莓鞣花酸的主要因素依次为微波功率 > 提取时间

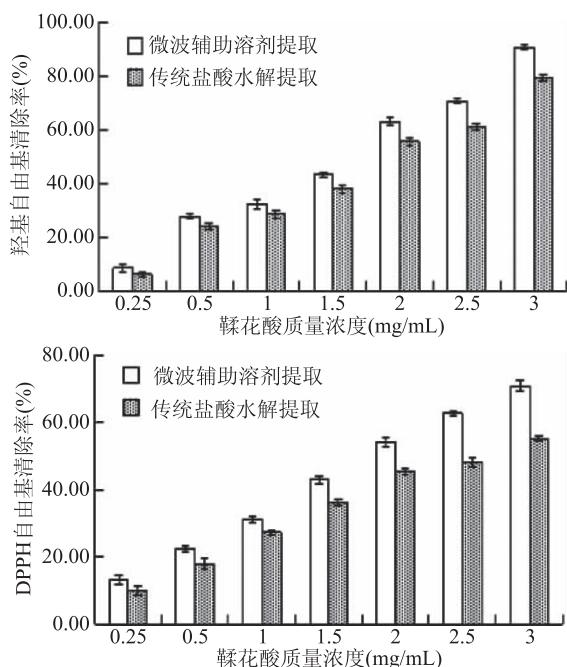


图10 不同提取方法提取的红树莓鞣花酸清除羟自由基和DPPH自由基能力比较

Fig.10 Comparison of scavenging activities of hydroxyl radicals and DPPH radicals extracted from ellagic acid extracted by different extraction methods

>液料比>提取温度>乙醇浓度。得出最佳提取工艺条件为:提取时间1.8 min,提取温度60℃,乙醇浓度50%,液料比19:1,微波功率411 W,得到鞣花酸提取量为 (82.75 ± 1.05) mg/100 g,高于传统盐酸水解法在最佳提取条件下所测树莓鞣花酸提取量,相差百分率为1.80%,实际结果与理论预测高度吻合,因此本实验得到的最优条件准确可靠有参考应用价值。通过微波辅助溶剂提取法较传统盐酸水解提取法树莓鞣花酸抗氧化活性对比发现,微波辅助溶剂法所得鞣花酸对羟自由基清除能力、清除DPPH自由基能力都显著高于传统盐酸水解法所得鞣花酸对羟自由基清除能力、清除DPPH自由基能力,说明微波辅助溶剂提取法,不但提取时间短暂,提取溶剂用量少,而且更好地保护了树莓鞣花酸的抗氧化活性,可为树莓鞣花酸工业生产提供一定参考。

参考文献

[1] Pintom D S, et al. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch.) [J]. Food Chemistry, 2008, 107(4): 1629–1635.
 [2] Vekari S A, et al. Extraction and determination of ellagic acid content in chestnut bark and fruit [J]. Food Chemistry, 2008, 110(4): 1007–1011.
 [3] Xiang L, Xing D M, Lei F, et al. Effects of season, variety, and processing method on ellagic acid content in pomegranate leaves [J]. Tsinghua Science and Technology, 2008, 13(4): 460–465.
 [4] Soong Y Y, Barlow P J. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on

antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2006, 97(3): 524–530.
 [5] 王佳慧, 于欣悦, 廖声玲, 等. 树莓中鞣花酸提取工艺的优化 [J]. 中国林副特产, 2017(4): 14–17.
 [6] Amakura Y, et al. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits [J]. J Chromatogr A, 2000, 896: 87–93.
 [7] Salih Eya, et al. Tannins, flavonoids and stilbenes in extracts of African savanna woodland trees *Terminalia brownii*, *Terminalia laxiflora* and *Anogeissus leiocarpus* showing promising antibacterial potential [J]. South African Journal of Botany, 2017, 108: 370–386.
 [8] Bakr Ro, et al. Profile of bioactive compounds in *Nymphaea alba* L. leaves growing in Egypt: Hepatoprotective, antioxidant and anti-inflammatory activity [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017, 17(1): 52.
 [9] Plaza M, et al. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study [J]. Food Chemistry, 2016, 211: 185–197.
 [10] 陆晶晶, 丁轲, 杨大进. 保健品功能因子鞣花酸研究进展 [J]. 食品科学, 2010, 31(21): 451–454.
 [11] 李付惠, 梁晓原. 滇产威灵仙中总酚提取工艺研究 [J]. 云南中医学院学报, 2007(6): 5–7.
 [12] Pajari Am, et al. Ellagitannin-rich cloudberry inhibits hepatocyte growth factor-induced cell migration and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT activation in colon carcinoma cells and tumors in Min mice [J]. Oncotarget, 2016, 7(28): 43907–43923.
 [13] Zhai J W, Gao C, Ma W D. Geraniin induces apoptosis of human breast cancer cells MCF-7 via ROS-mediated stimulation of p38 MAPK [J]. Toxicol Mech Methods, 2016, 26(5): 311–318.
 [14] 魏征, 赵雅娇, 黄羽, 等. 响应面法优化超声波辅助提取圆叶葡萄鞣花酸和总酚工艺 [J]. 食品科学, 2015, 36(12): 29–35.
 [15] Rikard Landberg, Estera Szwajczer dey, et al. Comparison of supercritical carbon dioxide and ethyl acetate extraction of alkylresorcinols from wheat and rye [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2007, 20(6): 123–127.
 [16] 杨笑笑, 邢晓平, 纪白慧, 等. 水解法制备石榴皮鞣花酸工艺研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(12): 284–288.
 [17] Alexandre Giacobbo, Margarida Oliveira, et al. Ultrafiltration based process for the recovery of polysaccharides and polyphenols from winery effluents [J]. Separation Science and Technology, 2013, 48(3).
 [18] 李旭, 刘停. 杜仲叶总黄酮微波辅助提取工艺的优化及其抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(4): 243–248.
 [19] 王根女, 苏平, 黄恺婷, 等. 响应面法优化微波提取紫苏叶多酚物质 [J]. 中国食品学报, 2009, 9(5): 87–92.
 [20] 王妙飞, 程庚金生, 张道英, 等. 水解法制取五倍子鞣花酸的研究 [J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 233–234.
 [21] Alder-nissen J. Enzymic Hydrolysis of food proteins [D]. London: Elsevier Applied Science, 1986.

(下转第161页)

[5] 吴钉红, 杨立伟, 苏薇薇. 野菊花化学成分及药理研究进展[J]. 中药材, 2009, 27(2): 142.

[6] Zheng C, Dong Q, Chen H, et al. Structural characterization of a polysaccharide from *Chrysanthemum morifolium* flowers and its antioxidant activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 130(4): 113–121.

[7] 梁军, 夏永刚, 杨炳友, 等. 5种植物多糖的部分酸水解特征[J]. 中草药, 2013, 44(9): 1101–1104.

[8] 徐春梅, 邬敏辰, 李剑芳, 等. 魔芋葡甘露聚糖的酶水解工艺条件[J]. 食品与生物技术学报, 2008(3): 120–124.

[9] 杜秉健, 李全宏. 南瓜多糖水解工艺优化研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(3): 232–236.

[10] 缪月秋, 张卫明, 顾冀平, 等. 葫芦巴中性多糖酸水解工艺优化的研究[J]. 食品科学, 2006(5): 134–137.

[11] 胡尧超, 郭华, 杨俊捷. 响应面法优化油茶籽粕酸水解糖化工艺条件[J]. 湖南农业科学, 2013(23): 87–92.

[12] Zheng C, Dong Q, Du Z, et al. Structural elucidation of a polysaccharide from *Chrysanthemum morifolium* flowers with anti-angiogenic activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 79: 674–680.

[13] 纵伟, 付玉洁, 张康逸, 等. 红枣多糖水解工艺优化及其产物吸湿性能、保湿性能研究[J]. 轻工学报, 2016, 31(1): 23–28.

[14] 李丹丹, 宋辉, 吴茂玉, 等. 植物多糖的水解及水解物结构的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(7): 165–170.

[15] 房海灵, 郭巧生, 申海进. 响应面法优化野菊花多糖含量测定的前处理条件[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(13): 1665–1667.

(上接第 155 页)

[22] Nuttall K L. Elemental selenium and glutathione reductase[J]. Med Hypotheses, 1985, 16(2): 155–159.

[23] 余淑娴, 熊世权, 郑娟娟, 等. 正交法优选玄参中多酚提取工艺[J]. 食品科技, 2008, 33(12): 201–204.

[24] 齐娜, 李涵, 张志宇, 等. 新疆红肉苹果多酚的超声波辅助提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2016, (9): 177–182.

[25] 刘卉, 杨国伟, 兰蓉, 马文志, 林峰. 树莓叶中鞣花酸提取工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(18): 55–58.

[26] 李燕虹, 王耀, 樊振江, 等. 草甘膦农药残留检测方法研究进展[J]. 农产品加工, 2017(17): 70–74.

[27] 鹿文慧. 分子印迹-分散固相萃取结合毛细管电泳测定水样中的酚类化合物[A]. 中国化学会. 中国化学会第30届学术年会摘要集-第二十三分会: 复杂样品分离分析[C]. 中国化学会: 2016: 1.

[28] Xi Zhou, Kunyan Cui, Feng Zeng, Shoucong Li, et al. A simple and selective method for determination of phthalate biomarkers in vegetable samples by high pressure liquid

[16] 黄家利, 张红梅, 徐秀泉. 正交设计法优化野菊花多糖的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 30.

[17] Zhao L, Dong Y, Chen G, et al. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 783–789.

[18] Wang Q H, Shu Z P, Xu B Q, et al. Structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Citrus aurantium* L[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 67(6): 112–123.

[19] 张泽志, 韩春亮, 李成未. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 河南教育学院学报: 自然科学版, 2011, 20(4): 34–37.

[20] Yoshida, T., Tsubaki, S., Teramoto, Y, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of carbohydrates from industrial waste of corn starch production using response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2010. 101(20), 7820–7826.

[21] 覃香香, 凌启泉, 周玉恒, 等. 响应面优化甘蔗糖蜜酸水解工艺研究[J]. 甘蔗糖业, 2013(5): 20–25.

[22] Thirugnanasambandham K, Sivakumar V, J Prakash M. Microwave-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 1–5.

[23] 陆颖, 任爱农, 李厚兵, 等. 野菊花多糖的分离纯化及化学组成研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 139–143.

[24] 金红英, 施松善, 王顺春, 等. 野菊花中性多糖 CIP-C 的分离纯化及结构解析[J]. 高等学校化学学报, 2012, 33(4): 755–760.

chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2016, 200.

[29] Dina N. Greene, et al. Comparison of Sebia Capillary Flex capillary electrophoresis with the BioRad Variant II high pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies[J]. Clinica Chimica Acta, 2012, 413(15–16).

[30] Michaela Moserová, et al. Analysis of benzo[a]pyrene metabolites formed by rat hepatic microsomes using high pressure liquid chromatography: Optimization of the method[J]. Interdisciplinary Toxicology, 2009, 2(4).

[31] 李小萍, 梁琪, 辛秀兰, 等. 高效液相色谱法测定红树莓中鞣花酸含量[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(24): 11345–11346.

[32] 张成涛, 万国盛, 赵余庆, 等. 红树莓果实中鞣花酸和树莓酮的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 140–143.

[33] 蒋晨凤. 水解对槟榔多酚抗氧化活性的影响及多酚协同抗氧化特性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016.