

青橄榄浸膏的提取及其抗氧化活性研究

张玲^{1,2}, 黄健文², 吴晓颖², 李春海^{1,2*}, 杨立权², 史煜宇², 李雯²

¹广东石油化工学院 广东省岭南特色果蔬加工及应用工程技术研究中心, 广东普通高校食品科学创新团队, 广东高校果蔬加工与贮藏工程技术开发中心;² 广东石油化工学院 生物与食品工程学院, 茂名 525000

摘要:为优化青橄榄浸膏提取工艺,并探讨其抗氧化性。以茂名盛产的青橄榄为原料,采用超声波辅助乙醇提取法,以总黄酮和总多酚得率为评价指标,考察各因素对青橄榄浸膏提取效果的影响。采用邻苯三酚自氧化法、结晶紫法和 DPPH 清除能力评价青橄榄浸膏的抗氧化活性。结果显示,浸膏的最佳提取工艺为:乙醇体积分数 70%, 料液比 1:18 (g:mL), 超声提取温度 50 °C, 时间 6 min (超声提取阶段); 单纯有机溶剂提取温度 60 °C, 时间 45 min (有机溶剂浸提阶段); 此条件下总黄酮得率为 1.76%, 总多酚得率为 15.53%。终产物浸膏在 0.3 mg/mL 浓度下对超氧阴离子自由基抑制率为 22.74%, 相当于同等质量浓度的抗坏血酸抑制效果的 23.47%; 在 0.02 mg/mL 浓度下对羟基自由基的清除率为 67.32%, 相当于同等质量浓度的抗坏血酸清除效果的 112.58%; 在 0.2 mmol/mL 的 DPPH 溶液体系中, 0.15 mg/mL 的浸膏对 DPPH 的清除率为 95.40%, 相当于同等质量浓度的抗坏血酸清除效果的 140.83%; 总体来讲, 浸膏具有良好的抗氧化能力, 虽然对超氧阴离子自由基抑制率弱于抗坏血酸, 但羟基自由基的清除率及 DPPH 清除率均优于抗坏血酸。

关键词:青橄榄浸膏; 总黄酮; 总多酚; 超声波; 得率; 抗氧化

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)1-0147-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.1.023

Extraction and antioxidant activity of *Canarium album* extractum

ZHANG Ling^{1,2}, UANG Jian-wen², WU Xiao-ying², LI Chun-hai^{1,2*}, YANG Li-quan², SHI Yu-yu², LI Wen²

¹Technology Research Center for Lingnan Characteristic Fruits & Vegetables Processing and Application Engineering of Guangdong Province, Food Science Innovation Team of Guangdong Higher Education

Institutes, Development Center of Technology for Fruit & Vegetable Storage and Processing Engineering, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000, China; ² College of Biological and Food Engineering, Guangdong Institute of petroleum and chemical industry, Maoming 525000, China

Abstract: In order to optimize extraction of extractum from *Canarium album* and investigate its antioxidant activity. *Canarium album* from Maoming was used as raw material to prepare extractum from fruit pulp by ultrasonic assisted ethanol. Taking the total flavonoids and total polyphenols yield as evaluation indexes, the effects of various factors on the extraction of olive extractum were studied. The antioxidant activity of olive extractum was evaluated by the method of ortho three phenol autoxidation, crystal violet and DPPH scavenging capacity. The results showed that the optimum extraction process of extractum was as follows: ethanol volume fraction 70%, solid-liquid ratio at 1:18 (g:mL), ultrasonic extraction temperature 50 °C, time 6 min (ultrasonic extraction stage), pure organic solvent extraction temperature 60 °C, time 45 min (organic solvent extraction stage). Under this condition, total flavonoids yield was 1.76%, and total polyphenols yield was 15.53%. The inhibition rate of the superoxide anion radical of the final product under 0.3 mg/mL concentration was 22.74%, equivalent to 23.47% of the same mass concentration of ascorbic acid, and the clearance rate of hydroxyl radical at 0.02 mg/mL concentration was 67.32%, equivalent to 112.58% of the scavenging effect of the same mass concentration of anti blood acid; in 0.2 mmol/mL In

收稿日期: 2018-06-25 接受日期: 2018-12-28

基金项目: 广东省岭南特色果蔬加工关键技术及应用工程技术研究中心项目(粤科函产学研[2015]1487号); 广东普通高校食品科学创新团队项目(2016KCXTD020); 广东高校果蔬加工与贮藏工程技术开发中心项目(2012gczxB001); 广东石油化工学院 2017 年大学生创新创业培育计划(2017pyC006)

* 通信作者 Tel: 86-013929729915; E-mail: gdm0808@126.com

the DPPH solution system, the clearance rate of 0.15 mg/mL extract to DPPH was 95.40%, equivalent to 140.83% of the scavenging effect of the same mass concentration of ascorbic acid. Therefore, in general, the extractum has a good antioxidant activity, although the inhibition rate of superoxide anion radical was weaker than that of ascorbic acid, the clearance rate of hydroxyl radical and DPPH was better than that of ascorbic acid.

Key words: *Canarium album* extractum; total flavonoids; total polyphenols; ultrasonic wave; yield; antioxidant activity

青橄榄(*Canarium album*),又名青果,为芸香目芸香亚目橄榄科橄榄属乔木类植物果实,是我国著名的亚热带特色水果,除了含有丰富的蛋白质、脂肪、碳水化合物等营养物质和丰富的维生素C、胡萝卜素、视黄醇、维生素B₁、维生素B₂、膳食纤维和尼克酸等营养素以及一些矿物质微量元素如:钙、铁、铬、锰、铝等^[1]。橄榄是传统的药食同源水果,现代研究发现其富含黄酮及多酚类天然活性物质,具有良好的抑菌和抗氧化功能。橄榄风味独特,为多数人喜爱,具有良好的食药开发前景,而当前对于青橄榄浸膏的相关研究报道却很少。研究青橄榄浸膏对今后橄榄进一步开发利用有很好的指导作用。早些年,提取浸膏的原料主要为中药,研究热点主要为不同中药材浸膏的提取工艺、成分分析及功能性研究,包括体外及动物实验^[2-5]。近年来,提取浸膏逐渐发展到利用一些具有独特风味和芳香性的原料。陈凡等^[6]对番石榴果浸膏提取工艺条件进行优化并分析其成分;张玲等^[7,8]对菠萝蜜芳香浸膏、橄榄浸膏提取工艺进行优化;毕晓丹等^[9]提取干茉莉花浸膏实验、周富臣等^[10]提取刺槐花浸膏实验以及赵风云等^[11]提取香蓼浸膏实验均是以浸膏得率作为评价指标。这类研究中多数采用的是单纯有机溶剂提取浸膏,而超声波辅助有机溶剂法在浸膏提取工艺中较少被使用。本文以青橄榄为原材料,采用超声波辅助乙醇提取浸膏,以总黄酮和总多酚得率共同作为评价指标考查工艺,采用正交试验优化了提取条件,并以超氧阴离子自由基抑制率、羟基自由基清除率以及DPPH自由基清除率考查了浸膏的抗氧化活性,相比目前已有的同类研究报道,具有一定的新意及实用价值,可为茂名青橄榄深加工提供新途径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

青橄榄(购自茂名高州东方市场),食用成熟度(八九成熟),色泽均匀,表皮无损光润,新鲜无腐烂。

没食子酸标准品(纯度 $\geq 98\%$)、芦丁标准品

(纯度 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物技术有限公司;过氧化氢(30%)、无水乙醇、氢氧化钠购自天津市百世化工有限公司;抗坏血酸、三氯化铝、硫酸亚铁、柠檬酸购自天津市大茂化学试剂厂;硝酸钠、三羟甲基氨基甲烷购自天津市永大化学试剂有限公司;DPPH(纯度 $\geq 98\%$)购自TCI;结晶紫、焦性没食子酸购自天津市光复精细化工研究所;除标记试剂,其余均为分析纯。

JB-0868 数控超声波清洗仪 诚洋生物科技(北京)有限公司;LS型紫外/可见分光光度计 上海精密仪器仪表有限公司;UV-5100B 紫外分光光度计 上海元析仪器有限公司;JA3003 型电子分析天平 上海舜宇恒平科学仪器有限公司;DZF-6050 真空干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司;RE-52 系列旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;30BIV 型粉碎机 湖北南大北方科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 青橄榄粉的制备

新鲜青橄榄,木锤锤烂去核,于60℃下真空干燥至脆,粉碎后过60目筛,备用。

1.2.2 青橄榄浸膏的提取

称取10g青橄榄粉,以一定体积分数的乙醇水溶液为提取液,按照适当的料液比,采用超声波辅助提取一段时间,再进行单纯有机溶剂浸提,抽滤,对所得溶液进行总黄酮、总多酚含量测定,并计算总黄酮、总多酚得率;将提取液于65℃进行旋转蒸发至蒸馏头无液滴形成为止,脱去乙醇以及大部分水分,得到棕黄色、粘稠的青橄榄浸膏。

1.2.3 青橄榄浸膏提取工艺的单因素试验

以总黄酮、总多酚得率为指标,分别考查超声处理温度(40、50、60、70、80℃),超声处理时间(2、4、6、8、10min),单纯有机溶剂提取温度(30、40、50、60、70℃),有机溶剂提取时间(15、30、45、60、75min),乙醇体积分数(60、70、80、90、100%)以及料液比(1:9;1:14;1:18;1:24;1:20mg/mL)六个单因素对青橄榄浸膏提取效果的影响。

1.2.4 青橄榄浸膏提取工艺的正交试验

根据单因素实验结果选择各因素中对总黄酮及

总多酚得率起主要影响作用的水平进行正交试验,选取超声处理温度(A)、超声处理时间(B)、单纯有

机溶剂提取温度(C)、单纯有机溶剂提取时间(D)进行 $L_9(3^4)$ 正交优化试验,因素水平安排如表1。

表1 正交优化实验因素水平表

Table 1 Experimental design factors and the level of values

水平 Level	A 超声处理温度 Ultrasonic treatment temperature ($^{\circ}\text{C}$)	B 超声处理时间 Ultrasonic processing time (min)	C 单纯有机溶剂提取温度 Extraction temperature of pure organic solvent ($^{\circ}\text{C}$)	D 单纯有机溶剂提取时间 Extraction time of pure organic solvent (min)
1	40	2	40	45
2	50	4	50	60
3	60	6	60	75

1.2.5 青橄榄浸膏抗氧化性质测定

用蒸馏水将最佳提取工艺条件下得到的浸膏分别配制成0.3 mg/mL和1.0 mg/mL的浸膏溶液备用,以同一浓度的抗坏血酸溶液作为对照物,进行抗氧化试验^[12-14]。

1.2.5.1 清除超氧阴离子自由基能力的测定

根据李君珂^[15]的方法稍作修改,在缓冲溶液中加入邻苯三酚前先加入1.5 mL的浸膏(抗坏血酸)溶液和2.5 mL蒸馏水,在325 nm处在2~6 min内每分钟测定一次吸光值;以10.0 mmol/L盐酸溶液作为空白对照^[16]。超氧阴离子自由基的抑制率按照公式(1)进行。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{V_0 - V_s}{V_0} \times 100\% \quad (1)$$

其中, V_0 为邻苯三酚自氧化反应速率; V_s 为加入抑制剂后邻苯三酚自氧化反应速率。

1.2.5.2 清除羟基自由基能力测定

由李君珂^[15]的方法稍作修改,在加入 H_2O_2 之前分别加入0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mL的浸膏(抗坏血酸)溶液(1.0 mg/mL),测定其吸光值^[17],羟自由基的产生量可以用下式表示: $\Delta A = A_0 - A_b$,则样液对羟自由基的清除率按照公式(2)进行。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_s - A_b}{A_0 - A_b} \times 100\% \quad (2)$$

其中, A_b 为不加入样品时反应体系的吸光值; A_0 为不加双氧水时体系的吸光值; A_s 为加入样品后体系的吸光值。

1.2.5.3 DPPH 自由基清除能力的测定

根据陈晨等^[18]的方法稍作修改,分别取0.5、0.75、1.0、1.5、2.0 mL浸膏(抗坏血酸)溶液,再相对应加入1.5、1.25、1.0、0.5、0.0 mL蒸馏水进行稀

释,最后加入2.0 mL DPPH乙醇溶液(0.2 mmol/L),混匀,避光放置30 min,测定其吸光度 A_t ;则样品对DPPH自由基的清除率^[19]按照公式(3)进行。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_t - A_b}{A_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

其中, A_0 为不加入样品时反应体系的吸光值; A_b 为样品溶液自身吸光值。

1.2.6 总黄酮、总多酚得率的计算

1.2.6.1 芦丁、没食子酸标准曲线的绘制

根据张玲等^[20]的方法稍作修改,分别取0.0、0.50、1.0、2.0、3.0、4.0和5.0 mL的芦丁标准溶液置于25 mL的比色管中,用体积分数60%的乙醇溶液稀释至10.0 mL,再加入1.0 mL的5%的亚硝酸钠溶液,静置6 min后加入1.0 mL的10%三氯化铝溶液,静置6 min再加入4.0 mL的10%氢氧化钠溶液,用60%乙醇溶液定容至刻度。放置15 min后,在505 nm波长下测定吸光值,得到芦丁浓度 c 与吸光值 A 关系曲线的回归方程式。

分别配制浓度分别为25、20、12.5、8.33、4.17、2.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的没食子酸标准溶液,在235 nm波长下测定吸光值,得到没食子酸溶液的浓度 c 和吸光值 A 关系曲线的回归方程式。

1.2.6.2 总黄酮得率的计算

准确移取1.00 mL浸膏提取液置于25 mL比色管中,按上述步骤操作,以不加浸膏提取液的样品为空白对照,测定其吸光值。根据芦丁标准曲线,求得提取液中黄酮含量。根据公式(4)计算总黄酮得率。

$$y = \frac{ncv}{1000m} \times 100\% \quad (4)$$

式中: y 为总黄酮的得率,%; c 为经吸光度计算得出的总黄酮浓度, mg/mL ; n 为样品提取液测定时的稀

释倍数; m 为橄榄粉的质量, g ; v 为提取液的体积, mL ; 1000 为 mg 单位转化为 g 单位的转换值。

1.2.6.3 没食子酸得率的计算

将提取液进行适度稀释后,在 235 nm 波长处测定其吸光值,并根据没食子酸标准曲线计算出提取液中总多酚浓度,根据公式(5)计算出总多酚得率。

$$y = \frac{ncv}{1000m \times 1000} \times 100\% \quad (5)$$

式中, y 为总多酚得率, $\%$; c 为经吸光值计算出的多酚浓度, $\mu g/mL$; v 为提取液的总体积, mL ; n 为样品提取液测定时的稀释倍数; m 为橄榄粉的质量, g ; 1000 为 μg (mg) 单位转化为 mg (g) 单位的转换值。

1.2.7 平行实验及数据分析

以上实验均平行进行三次,取均值;采用 SPSS20.0 统计分析软件对数据进行方差分析;采用 origin 8.5 绘图。

2 结果与分析

2.1 芦丁及没食子酸标准曲线的绘制

以芦丁、没食子酸质量浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线,用最小二乘法进行回归,得到芦丁、多酚质量浓度与吸光值关系曲线的回归方程式(见图1)。由图1可知,芦丁浓度在 $0 \sim 0.02\text{ mg/mL}$ 范围内与吸光值的线性关系良好,没食子酸浓度在 $0 \sim 25\text{ }\mu g/mL$ 范围内与吸光值的线性关系良好。

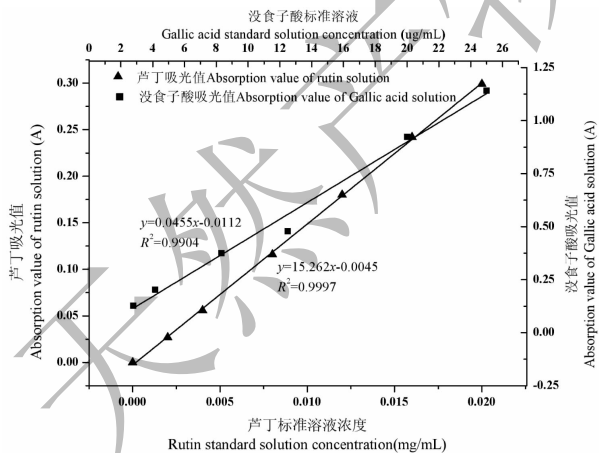


图1 芦丁与没食子酸标准曲线

Fig. 1 The standard curves of rutin and gallic acid

2.2 单因素试验

2.2.1 超声处理温度对浸膏总黄酮及总多酚提取得率的影响

图2显示的超声波处理温度对浸膏总黄酮、总

多酚得率的影响。由图2可知,在乙醇浓度为 60% ,料液比为 $1:18$,超声提取 4 min 的固定条件下,在 $40 \sim 80\text{ }^\circ\text{C}$ 范围内,总黄酮及总多酚得率均随温度的上升呈先增加后减小的现象。 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 时总黄酮及总多酚得率均达到最大值。这可能是由于升高温度有利于加速分子热运动,加快总黄酮与总多酚的浸出。但温度不断提高后,黄酮与多酚易受高温破坏,使其得率下降。故超声提取最适温度取 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 。

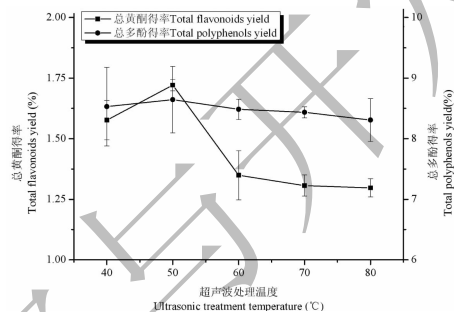


图2 超声处理温度对浸膏总黄酮及总多酚得率的影响

Fig. 2 The effect of ultrasonic treatment temperature on yield of total flavonoids and total polyphenols

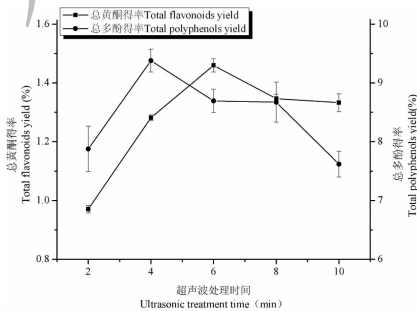


图3 超声处理时间对浸膏总黄酮及总多酚得率的影响

Fig. 3 The effect of ultrasonic treatment time on the yield of total flavonoids and total polyphenols

2.2.2 超声处理时间对浸膏总黄酮及总多酚提取得率的影响

总黄酮及总多酚得率随超声处理时间的变化如图3所示。在乙醇浓度为 60% ,料液比为 $1:18$,超声提取温度为 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 的固定条件下,超声处理 $2\text{ min} \sim 10\text{ min}$ 内,总黄酮及总多酚得率随时间的延长而呈现先增加后减小的现象。其中,总黄酮得率在 6 min 时达到最大,总多酚得率在 4 min 时达到最大。这可能是随着超声时间的延长增加了使橄榄粉颗粒及细胞的破碎程度,使其与溶剂充分接触,增大了总黄酮及总多酚的提取得率。但长时间的超声处理会使产物受到不同程度的破坏,使得率下降。结合

考虑,总黄酮在 4 min 时得率仍较高,而总多酚在 6 min 时得率下降较快,因此,认为超声处理时间以 4 min 为宜。

2.2.3 单纯有机溶剂提取温度对浸膏总黄酮及总多酚提取得率的影响

总黄酮及总多酚得率随单纯有机溶剂提取温度的变化如图 4 所示。在乙醇浓度为 60%,料液比为 1:18,50 ℃ 超声提取 4 min 的固定条件下,单纯有机溶剂提取温度在 30~70 ℃ 范围内,二者得率均随提取温度的升高而呈现先增加后减小的现象,并均在 50 ℃ 时达到最大值。究其原因应与超声提取温度的影响相同。选择单纯有机溶剂提取温度为 50 ℃ 为宜。

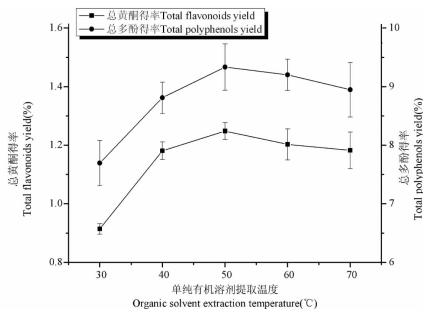


图 4 单纯有机溶剂提取温度对总黄酮及总多酚得率的影响

Fig. 4 The effect of extraction temperature on total flavonoids and total polyphenols yield

2.2.4 单纯有机溶剂提取时间对浸膏总黄酮及总多酚得率的影响

总黄酮及总多酚得率随单纯有机溶剂提取时间的变化见图 5。在乙醇浓度为 60%,料液比为 1:18,50 ℃ 超声提取 4 min、单纯有机溶剂提取温度为 50 ℃ 的固定条件下,单纯有机溶剂提取时间在 15~

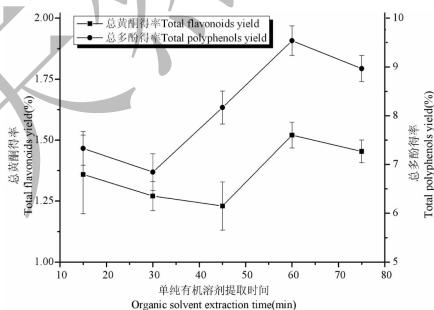


图 5 单纯有机溶剂提取时间对浸膏总黄酮及总多酚得率的影响

Fig. 5 The effect of extraction time on total flavonoids and total polyphenols yield

75 min 范围内,二者得率随时间的增加而呈现先增加后减小的趋势,并均在 60 min 时达到最大值。其原因类似于超声提取阶段时间对产物得率的影响。选择单纯有机溶剂浸提时间为 60 min 左右为宜。

2.2.5 乙醇体积分数对浸膏总黄酮及总多酚提取得率的影响

总黄酮及总多酚得率随乙醇体积分数的变化见图 6。在料液比为 1:18,50 ℃ 超声提取 4 min、单纯有机溶剂提取温度为 50 ℃,提取时间为 60 min 的固定条件下,在乙醇体积分数 60%~100% 范围内,二者得率随乙醇体积分数的增加均呈现先增加后减小再增加的趋势,但变化幅度不大。总黄酮得率在乙醇体积分数为 100% 时达到最大,总多酚得率在乙醇体积分数为 80% 时达到最大。这是因为黄酮与多酚成分在不同浓度的乙醇浓度中的溶解度不同。考虑总黄酮得率在乙醇体积分数为 100% 时和 70% 时较为相近,而当乙醇体积分数为 80% 时,总黄酮下降较多;而总多酚得率在乙醇体积分数为 80% 时和 70% 时较为相近,为了节省成本并保证提取效果,认为乙醇体积分数为 70% 时左右最好。

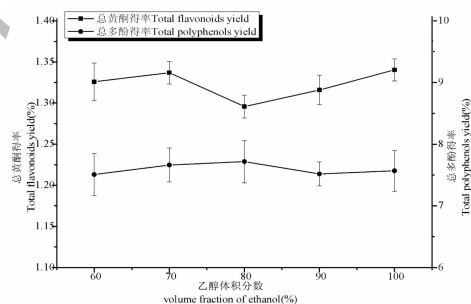


图 6 乙醇体积分数对浸膏总黄酮及总多酚提取得率的影响

Fig. 6 The effect of ethanol volume fraction on extraction rate of total flavonoids and total polyphenols

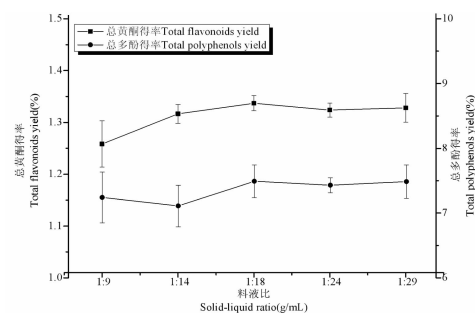


图 7 料液比对浸膏总黄酮及总多酚提取得率的影响

Fig. 7 The effect of solid-liquid ratio on extraction yield of total flavonoids and total polyphenols

2.2.6 料液比对浸膏总黄酮及总多酚提取得率影响

总黄酮及总多酚得率随料液比的变化如图 7。由图 7 可知,在乙醇体积分数为 70%,50 ℃ 超声提取 4 min、单纯有机溶剂提取温度为 50 ℃,提取时间为 60 min 的固定条件下,在料液比 1:9、1:14、1:18、1:24、1:29 (g: mL) 范围内,二者得率随料液比的变

化均呈现先增加后基本不变的现象,但变化幅度不大,并且均在料液比 1:18 时达到最大值。因为随着料液比的增大,橄榄粉中的黄酮与多酚成分在乙醇中的溶解量增加并逐渐达到饱和状态。选择料液比为 1:18 时左右为宜。

2.3 正交试验

正交实验结果见表 2,方差分析见表 3 和表 4。

表 2 正交优化试验结果
Table 2 Orthogonal optimization test results

序号 Serial No.	A	B	C	D	总黄酮得率 Total flavonoid yield (%)	总多酚得率 Total polyphenols yield (%)
1	1	1	1	1	1.08 ± 0.00	11.95 ± 0.00
2	1	2	2	2	1.30 ± 0.01	6.16 ± 0.06
3	1	3	3	3	1.47 ± 0.01	7.36 ± 0.12
4	2	1	2	3	1.57 ± 0.05	7.07 ± 0.13
5	2	2	3	1	1.46 ± 0.05	15.99 ± 0.03
6	2	3	1	2	1.32 ± 0.01	6.17 ± 0.03
7	3	1	3	2	1.31 ± 0.01	6.98 ± 0.05
8	3	2	1	3	1.13 ± 0.01	6.65 ± 0.03
9	3	3	2	1	1.71 ± 0.00	15.48 ± 0.05
k1-总黄酮 Total flavonoid	1.29	1.32	1.18	1.42		
k2-总黄酮 Total flavonoid	1.45	1.30	1.53	1.31		
k3-总黄酮 Total flavonoid	1.38	1.50	1.41	1.39		
k1-总多酚 Total polyphenols	8.49	8.67	8.26	14.47		
k2-总多酚 Total polyphenols	9.74	9.60	9.57	6.44		
k3-总多酚 Total polyphenols	9.70	9.67	10.11	7.03		
R-总黄酮 Total flavonoid	0.17	0.20	0.35	0.11		
R-总多酚 Total polyphenols	1.25	1.00	1.85	8.04		

由表 2 数据分析可得:若以总黄酮得率为评价指标,通过极差分析可知最佳组合为 $A_2B_3C_2D_1$;各因素对总黄酮得率影响的主次顺序为单纯有机溶剂提取温度、超声处理时间、超声处理温度、单纯有机溶剂提取时间,即 C、B、A、D。若以总多酚得率为评价指标,通过极差分析可知最佳组合为 $A_2B_3C_3D_1$;各因素对总多酚得率影响的主次顺序为单纯有机溶剂提取时间、单纯有机溶剂提取温度、超声处理温度、超声处理时间,即 D、C、A、B。

由表 2 数据还可可知,提取总黄酮工艺中单纯有机溶剂提取温度(C)因素中的 2 水平(50 ℃) k_2 值与 3 水平(60 ℃) k_3 值相近。综合考虑各因素与试验指标的关系及生产运营成本等因素,最终认为

浸膏的最佳提取工艺参数组合为 $A_2B_3C_3D_1$ 。

查表得 $F_{0.05}(2, 18) = 3.55$, $F_{0.01}(2, 18) = 6.01$,由表 3 可得:因素 A、B、C、D 的 F 值均大于 $F_{0.01}$,即超声处理温度、超声处理时间、单纯有机溶剂提取温度、单纯有机溶剂提取时间均对总黄酮得率有着极显著影响,这反映了超声处理温度、超声处理时间、单纯有机溶剂提取温度、单纯有机溶剂提取时间对总黄酮得率起着主要作用。

查表得 $F_{0.05}(2, 18) = 3.55$, $F_{0.01}(2, 18) = 6.01$,由表 4 可得:因素 A、B、C、D 的 F 值均大于 $F_{0.01}$,即超声处理温度、超声处理时间、单纯有机溶剂提取温度、单纯有机溶剂提取时间均对总多酚得率有着极显著影响,这反映了超声处理温度、超声处

表3 总黄酮正交优化实验方差分析

Table 3 Analysis of orthogonal optimal experiment variance of total flavonoids

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Free degree	均方 Mean square	F 值 F value	显著水平 Significant level
A	0.13	2	0.06	212.27 **	$F_{0.05}(2,18) = 3.55$
B	0.23	2	0.12	389.51 **	$F_{0.01}(2,18) = 6.01$
C	0.57	2	0.28	961.87 **	
D	0.06	2	0.03	95.33 **	
误差 Error	0.01	18	0.00		
总变异 Total variation	0.98	26			

注:“*”表示差异达到 $F_{0.05}$ 显著水平,“**”表示差异达到 $F_{0.01}$ 极显著水平。

Note:“*” means that the difference reaches significant level of $F_{0.05}$,“**” means that the difference reaches extremely significant level of $F_{0.01}$.

表4 总多酚正交优化实验方差分析

Table 4 Analysis of orthogonal optimal experimental variance of total polyphenols

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Free degree	均方 Mean square	F 值 F value	显著水平 Significant level
A	9.14	2	4.57	1045.84 **	$F_{0.05}(2,18) = 3.55$
B	5.65	2	2.83	646.95 **	$F_{0.01}(2,18) = 6.01$
C	16.34	2	8.17	1870.45 **	
D	361.01	2	180.51	41316.15 **	
误差 Error	0.08	18	0.00		
总变异 Total variation	392.23	26			

注:“*”表示差异达到 $F_{0.05}$ 显著水平,“**”表示差异达到 $F_{0.01}$ 极显著水平

Note:“*” means that the difference reaches significant level of $F_{0.05}$,“**” means that the difference reaches extremely significant level of $F_{0.01}$.

理时间、单纯有机溶剂提取温度、单纯有机溶剂提取时间对总多酚得率起着主要作用。

验证:经正交试验优化后可得出提取青橄榄浸膏的最佳提取工艺条件为:超声提取温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 超声提取时间为 6 min , 单纯有机溶剂提取温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 单纯有机溶剂提取时间为 45 min , 在此条件下得到橄榄浸膏中总黄酮平均提取得率为: 1.76% ; 总多酚平均提取得率为 15.53% 。实验结果与正交试验设计结果拟合良好,利用正交试验优化得到的青橄榄浸膏的工艺参数可靠。

2.4 青橄榄浸膏抗氧化能力的评价

2.4.1 清除超氧阴离子自由基能力

图8显示的是邻苯三酚的自氧化反应线性回归。

由图8可得,所得线性回归直线方程为 $y = 0.0321x + 0.1002$, $R^2 = 0.9638$,因此,邻苯三酚自氧化的反应速率 $V_0 = 0.0321$ 。加入抗坏血酸后,邻苯三酚的自氧化反应明显放慢,吸光度基本保持不变。

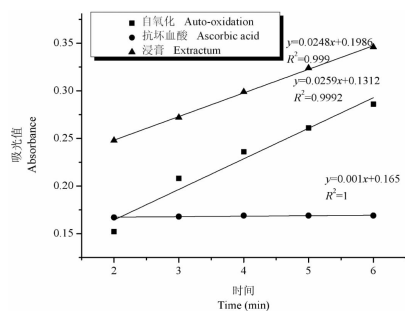


图8 邻苯三酚的自氧化反应线性回归图

Fig. 8 Linear regression diagrams of self oxidation reaction of o-phenyl three phenol

证明了抗坏血酸(0.3 mg/mL)溶液对邻苯三酚的自氧化反应有明显的抑制作用。加入浸膏溶液后,邻苯三酚的自氧化反应明显放慢,吸光度变化明显较未加入浸膏溶液前变化缓慢。证明了浸膏溶液(0.3 mg/mL)同样对邻苯三酚的自氧化反应具有抑制作用。但较抗坏血酸的抑制效果较差。

分别加入抗坏血酸以及浸膏溶液后,邻苯三酚的自氧化反应线性回归直线方程分别为:抗坏血酸

溶液线性回归方程: $y = 0.001x + 0.165$; $R^2 = 1$; 浸膏溶液线性回归方程: $y = 0.0248x + 0.1986$; $R^2 = 0.999$ 。两者的抑制率分别为: 抗坏血酸对超氧阴离子自由基抑制率为 96.89%; 浸膏对超氧阴离子自由基抑制率为 22.74%。

2.4.2 清除羟基自由基能力测定

图 9 显示的是抗坏血酸和样品对羟基自由基的清除率的影响。由图 9 可知, 随着抗坏血酸浓度的增大, 对羟基自由基的清除率也随之增大, 但增大幅度呈现先逐渐增大后趋于平稳的现象; 随着浸膏溶液浓度的增大, 对羟基自由基的清除率越大, 整体呈现较为平稳的增长。总体而言, 抗坏血酸以及浸膏溶液均具有清除羟基自由基的能力, 但浸膏的清除能力与抗坏血酸的清除能力接近, 但浸膏溶液对羟基自由基的清除能力较好。

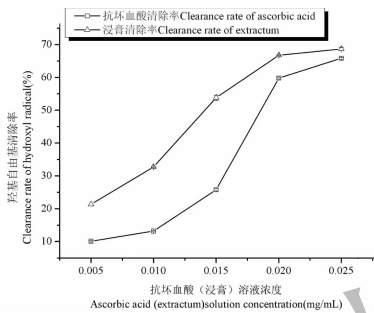


图 9 抗坏血酸与浸膏溶液对羟基自由基的清除率的影响

Fig. 9 Effect of ascorbic acid and sample solution on hydroxyl radical scavenging rate

2.4.3 DPPH 自由基清除能力的测定

图 10 显示的是抗坏血酸和样品对 DPPH 自由基的清除效果。由图 10 可看出, 在 DPPH 乙醇溶液中分别加入抗坏血酸以及浸膏溶液, 经过 30 min 反应后, 颜色明显变浅。随着加入的抗坏血酸以及浸膏溶液浓度的加大, 反应体系颜色越浅。并且由此实验可得, 在清除 DPPH 自由基的能力上, 浸膏溶液的清除能力明显强于抗坏血酸。

3 结论

青橄榄中含有丰富的黄酮及多酚物质, 本实验采用超声辅助提取制得了橄榄浸膏, 以总黄酮、总多酚得率为指标, 采用单因素及正交实验优化了提取工艺条件。测定了橄榄浸膏对超氧阴离子自由基的抑制率能力、羟基自由基的清除率以及 DPPH 自由基的清除率。结果表明: 用乙醇体积分数为 70%, 料液比为 1:18 时, 在 50 °C 温度下超声提取 6 min

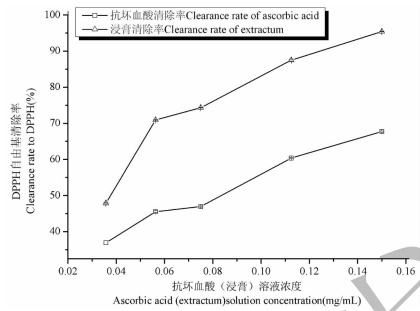


图 10 抗坏血酸与浸膏溶液对 DPPH 自由基的清除率的影响

Fig. 10 Effect of ascorbic acid and sample solution on the scavenging rate of DPPH radical

再在 60 °C 温度下进行单纯有机溶剂提取 45 min 提取青橄榄浸膏效果最好, 所得到的青橄榄浸膏中总黄酮得率为 1.76%, 总多酚得率为 15.53%。在对超氧阴离子自由基清除能力方面, 浸膏 (0.3 mg/mL) 对超氧阴离子自由基的抑制率为 22.74%, 相当于同等质量浓度下抗坏血酸抑制效果的 23.5%。在对羟基自由基的清除方面, 浸膏 (0.02 mg/mL) 对羟基自由基的清除率为 67.32%, 相当于同等质量浓度的抗坏血酸清除效果的 112.58%。在对 DPPH 自由基的清除方面, 浸膏 (0.15 mg/mL) 对 DPPH 自由基的清除率为 95.40%, 相当于同等质量浓度的抗坏血酸清除效果的 140.83%。因此说明, 由最优工艺提取出的青橄榄浸膏具有良好的抗氧化活性。

参考文献

- Lin YF, Chen QX. Research progress on functional components and antioxidant activities of Olives [J]. Chin J Trop Crop (热带作物学报), 2010, 31: 158-163.
- Zhu HR, Huang XD, Luo YY, et al. Study on extraction technology of Daisy Honeysuckle Extract [J]. China Medical Herald (中国医药导报), 2012, 9: 132-133.
- Li XF, Xu ZQ, Yan M, et al. Optimization for vacuum belt drying process of Qibai Pingfei granule through response surface methodology [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40(20): 3987-3992.
- Zhao D, Zhou TQ, Feng SX, et al. Determination of pedunculoside, praeruptorin A and praeruptorin B in Paracetamol and Chlorphenamine Maleate with Three Herb Extracts Capsules by HPLC-ELSD-UV [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2012, 34: 1908-1912.

(下转第 23 页)