

狗枣猕猴桃叶粗多糖闪式提取工艺及其体外抗氧化活性

常清泉, 陆娟, 谭莉, 王海莲, 白晓仙

(长春师范大学 化学学院, 吉林 长春 130032)

摘要:以狗枣猕猴桃叶为试材,以狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率为响应值,在单因素试验的基础上,利用响应面法研究闪式提取因素对狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率的影响,优化狗枣猕猴桃叶粗多糖闪式提取工艺。同时利用体外自由基清除试验测定粗多糖抗氧化活性。结果表明:当液料比为 $17.38 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,分散机转速为 2.22 档,温度为 44.54°C ,提取时间为 10.49 min 时,狗枣猕猴桃叶粗多糖的提取率最高,可达 10.69%。在此条件下所得的狗枣猕猴桃叶粗多糖具有较强的总抗氧化能力及自由基清除能力,其能力大小与粗多糖质量浓度呈现一定的正相关关系。

关键词:狗枣猕猴桃;多糖;闪式提取;响应面分析;抗氧化活性

中图分类号:S 665.309.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)17-0149-10

狗枣猕猴桃(*Actinidia kolomikta* (Rupr. et Maxim.) Planch.) 属猕猴桃科猕猴桃属落叶藤本植物^[1],别名狗枣子,深山木天蓼,主要分布于我国东北、华北等地,在朝鲜、日本等国家也有分布,尤其在我国吉林省长白山区各县均有出产^[2]。狗枣猕猴桃叶含大量黄酮及黄酮苷^[3-5]、萜类^[6]、挥发油类^[7-8]、多糖等化合物,果实富含维生素 C 和水溶性多糖。其叶和果实均可入药,夏季采叶鲜用或晒干备用,果实成熟时采摘,鲜用^[1]。而关于狗枣猕猴桃叶多糖的文献报道较少。

植物多糖的提取方法有回流提取法^[9]、微波

萃取法^[10]、超声波萃取法^[11-12]、超临界萃取法^[13]及闪式提取法^[14]等。闪式提取法简称闪提,是一种在常温下快速提取的方法,是以组织破碎原理为基础,整个提取过程中包含快速破碎、剧烈搅拌、超速分子动态渗透作用及强力震动等原理,具有操作时间短、效率高、易于保护热敏性成分等优点,是一种高效可行的提取方法^[15-16]。

响应面分析(response surface methodology, RSM)是一种利用优化工艺参数,解决多变量问题的统计方法,系统学与统计学的结合,有助于快速建模,缩短优化时间和提高工程应用可信度^[17],随着计算机的发展,它逐渐成为一种精确度高、优化效果好并且很实用的技术^[18]。在前期研究的基础上^[19],该研究通过响应面分析(RSM)对狗枣猕猴桃叶多糖的闪式提取工艺进行优化,同时对粗多糖进行体外抗氧化活性测定,以期能为狗枣猕猴桃叶的开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试狗枣猕猴桃叶采自吉林省安图县山区,

第一作者简介:常清泉(1995-),女,硕士研究生,研究方向为天然有机化学。E-mail:Diana65154@163.com.

责任作者:陆娟(1982-),女,博士,副教授,研究方向为天然有机化学。E-mail:smilecui0513@163.com.

基金项目:吉林省教育厅“十二五”科学技术资助项目(吉教科合字[2013]第 255 号);长春师范大学自然科学基金资助项目(长师院自科合字政策[2010]第 026 号);长春师范大学 2017 年度研究生教育创新计划资助项目(cscxy2017031)。

收稿日期:2017-04-06

干燥后粉碎过 40 目筛,备用。

供试试剂:石油醚、无水乙醇、葡萄糖、浓硫酸、苯酚均为分析纯。

供试仪器:T10 基本型分散机(广州仪科实验室技术有限公司,该分散机转速档共有 5 档,转速分别为 1 档 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,2 档 $9\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,3 档 $11\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,4 档 $14\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,5 档 $20\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$);Heraeus Multifuge X1R 型离心机(ThermoFisher SCIENTIFIC);UV-1601 型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司)等。

1.2 试验方法

1.2.1 狗枣猕猴桃叶粗多糖样品溶液的制备

准确称取石油醚脱脂的狗枣猕猴桃叶粉末 2 g,按照液料比 $20\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 加入蒸馏水,在设定提取转速及温度下提取一定的时间,离心提取液、取上层清液,浓缩至一定体积,加 3 倍无水乙醇 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下醇沉 24 h,离心得沉淀,脱水干燥得粗多糖。分别取适量粗多糖粉末,配成样品液,备用。

1.2.2 标准曲线的绘制

精密移取浓度为 $1.070\,4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖标准液 0、1、3、5、7、9 mL 于 10 mL 具塞试管中,利用苯酚-硫酸法,按照参考文献[19]绘制标准曲线: $A=9.993C-0.027$,相关系数 $R^2=0.999$,线性范围为 $50\sim 450\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2.3 单因素试验

采用单因素试验分别考察液料比、闪式提取转速(以分散机转速档考察)、提取温度、提取时间 4 因素对狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率的影响。

液料比对粗多糖提取率的影响:选择液料比 20、30、40、50、60 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$,固定提取时间 15 min,提取温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,分散机转速为 3 档,考察不同液料比对狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率的影响;分散机转速档对粗多糖提取率的影响:选择分散机转速 1、2、3、4、5 档,固定液料比 $40\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$,提取时间 15 min,提取温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,考察不同转速对粗多糖提取率的影响。提取温度对粗多糖提取率的影响:选择提取温度分别为 30、40、50、60、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$,固定液料比 $40\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$,提取时间 15 min,分散机转速 3 档,考察不同提取温度对狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率的影响。提取时间对粗

多糖提取率的影响:选择提取时间分别为 5、10、15、20、25 min,固定液料比为 $40\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$,提取温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,分散机转速 3 档,考察不同提取时间对狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率的影响。

1.2.4 响应面试验设计

在单因素试验的基础上,利用狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率(Y)为响应值,按照前文研究^[19]以液料比(X_1)、分散机转速(X_2)、提取温度(X_3)及提取时间(X_4)为变量,利用 Box-behnken 中心组合试验设计原理,设计 4 因素 3 水平的试验方案,应用 Design-expert 8.05b 软件,建立数学回归模型,确定狗枣猕猴桃叶粗多糖的最佳闪式提取工艺。试验设计各水平值见表 1。

表 1 Box-behnken 试验设计因素与水平

Table 1 Variables and levels in central composite design

因变量 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
X_1 液料比 Liquid-solid ratio/ $(\text{mL}\cdot\text{g}^{-1})$	10	20	30
X_2 分散机转速 Rotate speed/档	1	2	3
X_3 提取温度 Extraction temperature/ $^{\circ}\text{C}$	30	40	50
X_4 提取时间 Extraction time/min	5	10	15

1.2.5 双因子交互分析

固定 4 因素中的 2 个为中值,建立拟合目标值的数学模型,绘制因变量曲面图及等高线图,绘制出的响应面图可直观反映各因素及它们之间的交互作用对响应值的影响,参照文献[11]可知,不同形状的轮廓图表示不同变量之间的相互作用,一个椭圆的等高线表示变量之间的交互关系对 Y 的影响较显著,而圆形的等高线则表示变量之间的交互关系对 Y 的影响不显著^[20]。

1.2.6 狗枣猕猴桃叶粗多糖的抗氧化活性

总抗氧化活性(FRAP)测定参考文献[21],将醋酸缓冲液($300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH 3.6)、TPTZ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,溶于 $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸中)、 FeCl_3 ($20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)溶液按照 10:1:1 的比例混合配制成新鲜的 FRAP 工作液,分别取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 不同浓度的样品溶液($0.1\sim 5.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)加入 96

孔板中,迅速加入 FRAP 工作液 150 μL ,利用 FRAP 工作液为空白,测定 4 min 时样品的吸光度值,同时以 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为标准品,按照样品测定的操作,在 $0.1 \sim 12.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,绘制工作曲线,计算样品的 FRAP 值。

对羟基自由基的清除作用:采用 Fenton 反应^[21],整个反应体系含有 2 mL EDTANa₂-Fe(II) ($0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),800 μL 水杨酸 ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),2 mL H_2O_2 ($6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 0.2 mL 不同浓度的样品溶液 ($0.1 \sim 5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),混匀后于 37°C 水浴保温 30 min,以蒸馏水为空白,在 510 nm 处测吸光度值,同时按照上述操作,测定维生素 C 的吸光度值。按照以下公式计算羟基自由基清除率: $E(\%) = (A_1 - A_0)/(A_2 - A_0) \times 100$ 。式中: A_1 为反应体系的吸光度, A_0 为空白溶液的吸光度, A_2 为不加样品或不加 H_2O_2 时体系的吸光度。

对超氧阴离子自由基清除能力测定:按照参考文献^[21]取不同质量浓度的样品溶液 50 μL 于微孔板中,分别加入 50 μL 氮蓝四唑(NBT)溶液 ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),50 μL 还原型辅酶 I (NADPH) 溶液 ($468 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 50 μL 吩嗪硫酸甲酯(PMS)溶液 ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。混匀后于 25°C 水浴 5 min,于分光光度计 560 nm 波长处测吸光度。以水代替多糖溶液, $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液代替 NBT 溶液,做空白试验。 $E(\%) = (A_0 - (A_i - A_j))/(A_0) \times 100$ 。式中: A_0 ,空白对照试验(水代替多糖溶液)的吸光度; A_i ,样品试验的吸光度; A_j ,样品干扰试验 ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液代替 NBT 溶液)的吸光度。

对 DPPH 自由基的清除作用:根据参考文献^[21-22]方法,移取不同浓度的多糖溶液 2 mL 于 10 mL 比色管中,分别加入浓度为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液 2 mL,在暗处充分反应 30 min,在 517 nm 处测量其吸光度,按照公式计算清除率: $E(\%) = (A_{\text{DPPH}} - A_s)/A_{\text{DPPH}} \times 100$ 。式中: A_{DPPH} 为 DPPH 溶液吸光度值, A_s 为样品+DPPH溶液吸光度。同时,用相应的维生素 C 溶液代替多糖溶液,测定维生素 C 的清除能力。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 液料比对狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率的影响

由图 1a 可知,狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率随着液料比的增加而升高,这是因为增加液料比会使狗枣猕猴桃叶细胞内外浓度差增大,从而增大狗枣猕猴桃叶多糖由组织细胞内部向周围溶剂扩散的传质动力,使提取速度更快速、完全。但当液料比达到 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 时,再增大溶剂液料比多糖提取率增大幅度不大,同时液料比太高会使提取液中多糖浓度降低,增加分离、纯化的工作量,增加能耗和生产成本,所以液料比选择 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 较为适宜^[21]。

2.1.2 分散机转速对狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率的影响

由图 1b 可知,随着分散机转速档的增大,粗多糖提取率也增大,当闪式分散机转速为 2 档时最大,再增加闪式分散机转速提取率反而减小,其原因可能是由于随着闪式分散机转速的增大,较多的多糖可以渗透细胞膜进入细胞和溶剂,因此增大转速可以提高提取率。然而,过高的转速会引起刀头过热,这可能会影响提取效率^[14]。因此,最佳转速为 2 档。

2.1.3 提取温度对狗枣猕猴桃叶多糖提取率的影响

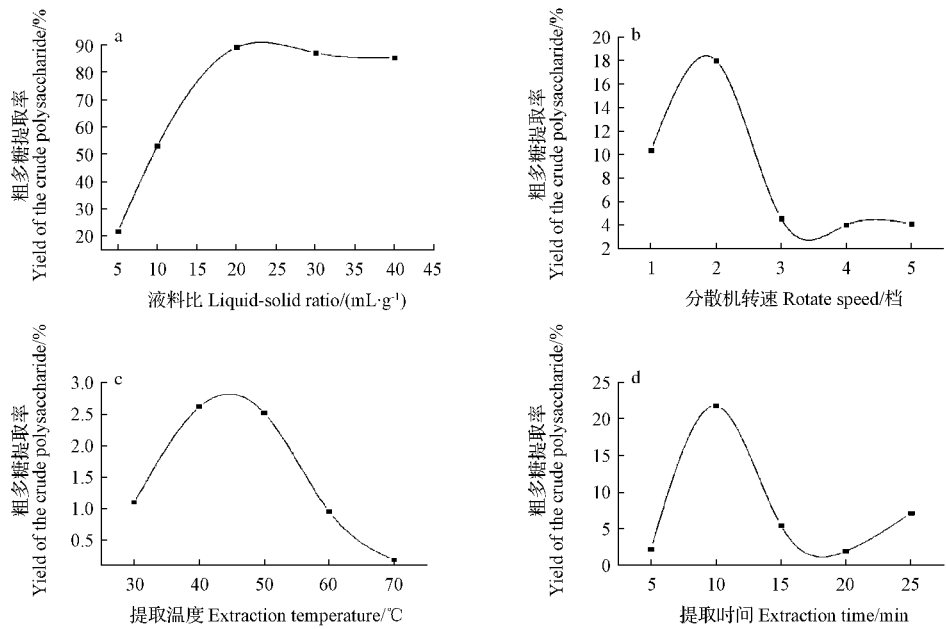
由图 1c 可知,在 $30 \sim 40^\circ\text{C}$,随着提取温度的升高,多糖提取率也逐渐增加,当温度为 40°C 时最大,再增高温度,提取率反而减小。温度的影响可以解释为在较高的温度下,溶剂中多糖具有较高的溶解度和扩散性。但是温度过高,部分多糖可能会发生水解为单糖或低聚糖,从而使多糖的提取率下降^[21]。此外过高的温度会导致表面张力降低,增加微气泡,导致提取率的降低^[23]。因此,最佳提取温度是 40°C 。

2.1.4 提取时间对狗枣猕猴桃叶多糖提取率的影响

由图 1d 可知,随着提取时间的延长,粗多糖提取率增加,但当提取时间超过 10 min 后,再继续增加提取时间,提取率反而减小。这可能是由

于随着浸泡时间的增长,狗枣猕猴桃叶提取液中多糖含量在增高,而分散机作用的时间过长,闪式提取器刀头高速旋转产生大量热,易发生氧化反

应,可能导致糖链的断开或者卷曲,变成单糖和低聚糖,多糖的提取率随着提取时间的延长而降低^[16]。因此,最佳提取时间是 10 min。



注:a. 液料比对粗多糖提取率的影响;b. 分散机转速档对粗多糖提取率的影响;c. 提取温度对粗多糖提取率的影响;d. 提取时间对粗多糖提取率的影响。

Note: a. The influence of liquid-solid ratio on the yield of the crude polysaccharide; b. The influence of rotate speed on the yield of the crude polysaccharide; c. The influence of extraction temperature on the yield of the crude polysaccharide; d. The influence of extraction time on the yield of the crude polysaccharide.

图 1 单因素试验结果

Fig. 1 Results of single test

2.2 多元二次响应面回归模型拟合分析

通过 Design-expert 8.05b 分析软件对表 2 中的响应面试验结果进行回归分析,以狗枣猕猴桃叶粗多糖的提取率(Y)为因变量,液料比(X₁)、分散机转速(X₂)、提取温度(X₃)以及提取时间(X₄)为自变量,进行回归拟合,得到回归方程:

$$Y(\%) = 10.27 - 0.55X_1 + 0.75X_2 + 0.41X_3 - 0.67X_4 - 1.57X_1^2 - 2.28X_2^2 - 1.02X_3^2 - 1.52X_4^2 + 0.96X_1X_2 - 0.84X_1X_3 - 1.01X_1X_4 + 0.88X_2X_3 + 1.17X_2X_4 + 0.99X_3X_4$$

Box-behnken 试验设计方案及结果					
Table 2 Box-behnken design matrix and response values					
编号 No.	X ₁ 料液比 Liquid-solid ratio/(mL · g ⁻¹)	X ₂ 分散机转速 Rotate speed/档	X ₃ 提取温度 Extraction temperature/°C	X ₄ 提取时间 Extraction time/min	Y 提取率 Extraction rate/%
1	30	2	40	5	8.598
2	20	2	40	15	6.057
3	30	3	40	10	7.500
4	30	2	40	10	7.737
5	20	2	30	10	10.310
6	30	2	40	15	4.915
7	20	3	40	5	6.564
8	10	2	50	15	8.107

表 2(续)
Table 2(Continued)

编号 No.	X ₁ 料液比 Liquid-solid ratio/(mL · g ⁻¹)	X ₂ 分散机转速 Rotate speed/档	X ₃ 提取温度 Extraction temperature/℃	X ₄ 提取时间 Extraction time/min	Y 提取率 Extraction rate/%
9	20	2	40	5	8.659
10	20	2	50	10	10.305
11	10	1	50	10	7.320
12	30	2	40	10	6.698
13	20	1	40	15	3.639
14	20	2	50	5	7.500
15	20	2	40	15	8.843
16	20	2	50	10	9.999
17	20	3	40	15	7.186
18	20	3	30	10	9.269
19	20	1	30	5	7.678
20	10	2	40	10	8.917
21	30	1	40	10	3.818
22	20	3	40	10	6.494
23	10	2	40	10	6.600
24	10	2	50	5	7.769
25	20	2	30	10	10.591
26	20	2	40	10	10.143
27	10	3	40	10	7.167
28	20	1	40	10	6.015
29	20	1	40	10	6.767

表 3
Table 3 Results of analysis of variance

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型	89.40	14	6.39	39.50	<0.000 1
X ₁	3.65	1	3.65	22.55	0.000 3
X ₂	6.66	1	6.66	41.22	<0.000 1
X ₃	2.02	1	2.02	12.52	0.003 3
X ₄	5.36	1	5.36	33.16	<0.000 1
X ₁ ²	15.93	1	15.93	98.56	<0.000 1
X ₂ ²	33.82	1	33.82	209.20	<0.000 1
X ₃ ²	6.70	1	6.70	41.42	<0.000 1
X ₄ ²	15.01	1	15.01	92.84	<0.000 1
X ₁ X ₂	3.68	1	3.68	22.74	0.000 3
X ₁ X ₃	2.82	1	2.82	17.42	0.000 9
X ₁ X ₄	4.04	1	4.04	25.00	0.000 2
X ₂ X ₃	3.11	1	3.11	19.24	0.000 6
X ₂ X ₄	5.43	1	5.43	33.59	<0.000 1
X ₃ X ₄	3.89	1	3.89	24.07	0.000 2
残差	2.26	14	0.16	—	—
纯误差	0.20	4	0.05	—	—
失拟项	4.24	10	17.46	2.57	0.188 0
误差	27.17	4	6.79		
总和	4 795.04	28			

相关系数(R²)=0.975 3,校正系数(Adj R²)=0.950 6,预测系数(Pre R²)=0.871

二项式模型拟合方差分析显示,模型 $F=39.50$,且 $P<0.000\ 1$,模型方程极显著($P<0.01$);模型失拟项 $F=2.57$, $P=0.188\ 0$,表明失拟项相对于绝对误差不显著,说明未知因素对试验结果干扰较小。对模型拟合的相关系数进行分析,进一步判断模型的拟合度,模型 $R^2=0.975\ 3$,校正系数 $\text{Adj } R^2=0.950\ 6$,表明模型与实际试验拟合较好,试验误差较小,可以用来对狗枣猕猴桃叶粗多糖的闪式提取工艺进行分析和预测。

对回归方程系数进行显著性检验,表明液料比、闪式转速、提取温度及提取时间(X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4)及其交互均对狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率有不同程度的影响,其中 X_2 、 X_4 和几个因素的二项式(X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2)的影响最为显著($P<0.000\ 1$)。

2.3 响应面双因子间交互影响分析

2.3.1 液料比与分散机转速相互作用对粗多糖提取率的影响

由图 2a、2b 可知,随着液料比和分散机转速的增大,狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率迅速增大,当液料比为 $15\text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 、分散机转速为 2 档时,粗多糖提取率为 10.01% ,这可能是由于增加溶剂

会使狗枣猕猴桃叶细胞内外浓度差增大,随着分散机转速的增大,较多的多糖可以渗透细胞膜进入细胞和溶剂。而后随着液料比的增大,会使提取液中多糖浓度降低,过高的转速也会引起刀头过热使部分多糖发生水解,粗多糖提取率反而降低。

2.3.2 液料比与提取温度相互作用对粗多糖得率的影响

由图 2c、2d 可知,随着液料比和提取温度的增大,粗多糖提取率增大,当液料比为 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,提取温度为 45°C 时,粗多糖的提取率达到最大值为 9.98% ,而后随着液料比和提取温度的增大,粗多糖提取率降低,这可能是由于随着提取温度的增大,粗多糖的扩散性和溶解度增大,但是温度过高,部分多糖可能会发生水解为单糖或低聚糖。

2.3.3 液料比与提取时间相互作用对粗多糖提取率的影响

由图 2e、2f 可知,随着提取时间的延长,粗多糖提取率增大,当液料比为 $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,提取时间为 11 min 时,粗多糖提取率达到最大值,而后随着液料比的增大,时间的延长,粗多糖提取率反而降低,这可能是由于液料比的增大,会使提取液中多糖浓度降低,提取时间的增大,提取器刀头产生大量热,可能导致糖链的断开或者卷曲,变成单糖或低聚糖。

2.3.4 分散机转速与提取温度相互作用对粗多糖提取率的影响

由图 2g、2h 可知,随着转速和提取温度的增大,粗多糖提取率增大,当转速为 2 档,提取温度 38°C 时,粗多糖的提取率最大,为 9.90% 。随着转速和温度的增大,粗多糖提取率降低,这可能是由于转速增大导致刀头温度增高,加之提取温度增高,都可能诱使多糖水解或糖链断开,从而使粗多糖提取率降低。

2.3.5 分散机转速与提取时间相互作用对粗多糖提取率的影响

由图 2i、2j 可知,粗多糖提取率随着转速和提取时间的增大而增大,当转速为 2 档,提取时间为 7 min 时,粗多糖提取率达到最大值 10.09% ,其后随着转速和提取时间的增大而降低。这可能是由于转速越大,提取时间越长,致使刀头产生大量

的热,从而使粗多糖的糖链断裂,粗多糖提取率降低。

2.3.6 提取温度与提取时间相互作用对粗多糖提取率的影响

由图 2k、2l 可知,粗多糖提取率随着提取温度和提取时间的增大而增大,当提取温度 38°C ,提取时间 7 min 时,粗多糖提取率达到最大值 9.98% ,其后随着提取温度和提取时间的增大而降低。这可能是温度升高,粗多糖的溶解度和扩散性增大,但是高温也会致使多糖水解,糖链断开,此外还会有其它杂质溶出,因而粗多糖提取率降低。提取时间越长,致使刀头产生大量的热,从而使粗多糖糖链断裂,也会致使粗多糖提取率降低。

2.4 提取工艺条件的优化

通过软件分析,得到的闪式波提取狗枣猕猴桃叶粗多糖的最佳条件为液料比 $17.38 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,分散机转速 2.22 档、提取温度 44.54°C ,提取时间 10.49 min ,在此条件下,狗枣猕猴桃叶粗多糖提取率理论值为 10.69% 。为检验响应面优化法预测结果的可靠性,固定液料比为 $17 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,分散机转速 2 档、提取时间 10 min 、提取温度 45°C 进行验证试验,3 次平行试验所得到的实际提取率为 10.69% ,因此,采用响应面优化法得到的提取条件参数准确可靠,具有实际应用价值。

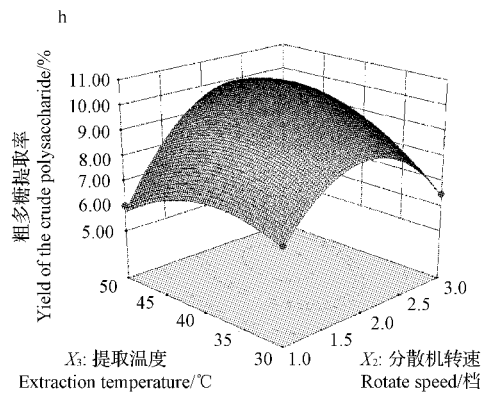
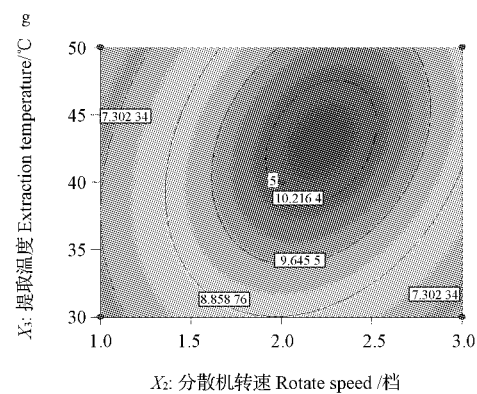
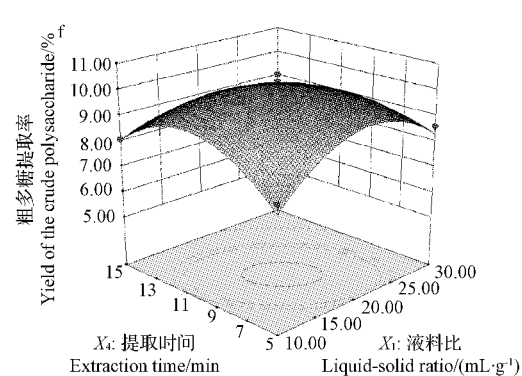
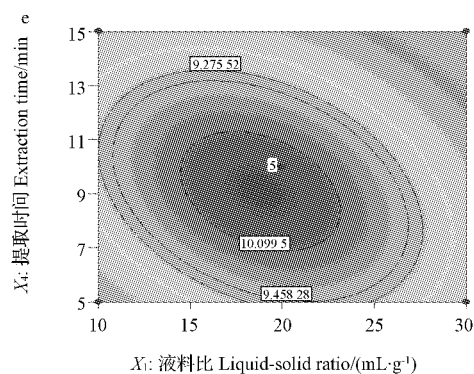
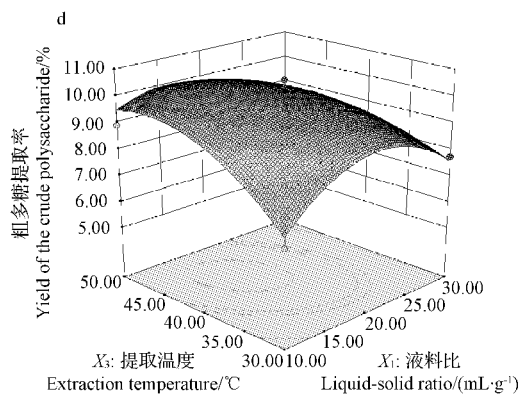
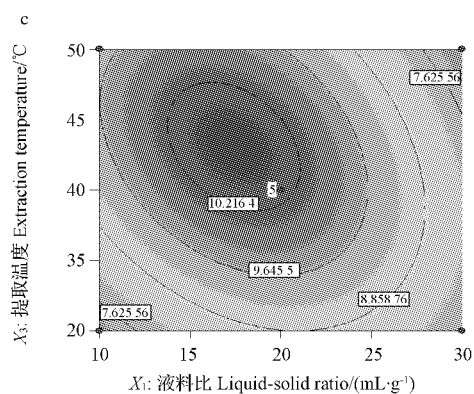
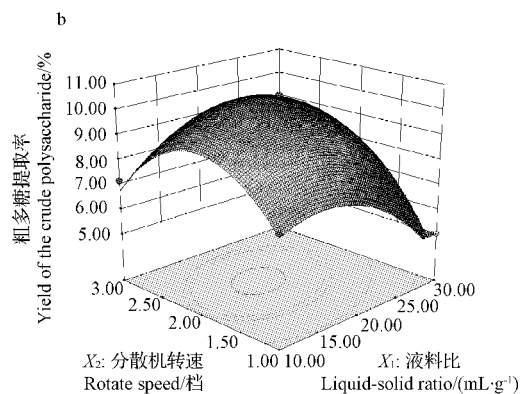
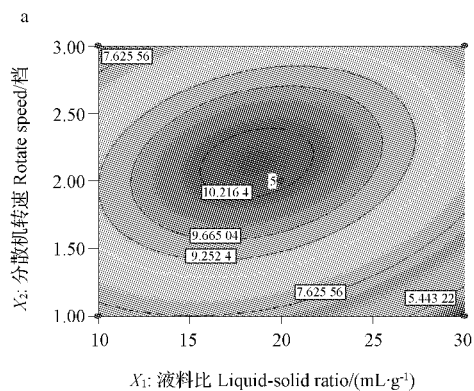
2.5 狗枣猕猴桃叶粗多糖的体外抗氧化活性评价

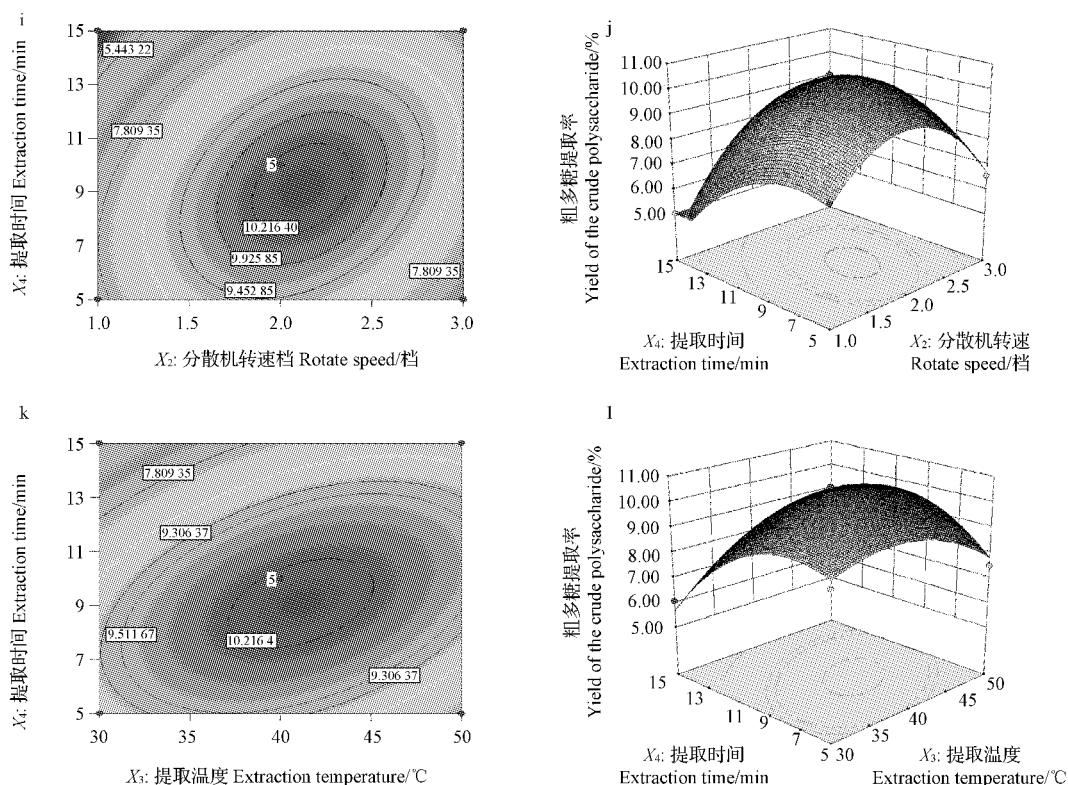
2.5.1 狗枣猕猴桃叶多糖总抗氧化活性 (FRAP)

在闪式提取最优工艺下,狗枣猕猴桃叶粗多糖的 FRAP 值见图 3,可知狗枣猕猴桃叶粗多糖的总抗氧化能力 (FRAP 值) 随着粗多糖浓度的增大而增大。

2.5.2 粗多糖对自由基清除能力

在闪式提取最优工艺下,狗枣猕猴桃叶粗多糖对羟基 ($\cdot\text{OH}$)、超氧负离子自由基 (O_2^-) 及 DPPH 自由基的清除能力见图 4。可知狗枣猕猴桃叶粗多糖对 3 种自由基均具有清除作用,且清除能力随着粗多糖浓度的增大而增大,但均小于维生素 C 对 3 种自由基的清除作用。经计算表明,粗多糖清除羟基自由基的半数抑制浓度





注:a和b是液料比与分散机转速相互作用对粗多糖提取率的影响;c和d是液料比和提取温度相互作用对粗多糖提取率的影响;e和f是液料比与提取时间相互作用对粗多糖提取率的影响;g和h是分散机转速和提取温度相互作用对粗多糖提取率的影响;i和g是分散机转速与提取时间对粗多糖提取率的影响;k和l是提取温度和提取时间对粗多糖提取率的影响。

Note:a and b are the influence of liquid-solid ratio and rotate speed on the yield of the crude polysaccharide; c and d are the influence of liquid-solid ratio and extraction temperature on the yield of the crude polysaccharide; e and f are the influence of liquid-solid ratio and extraction time on the yield of the crude polysaccharide; g and h are the influence of rotation speed and extraction temperature on the yield of the crude polysaccharide; i and g are the influence of rotate speed and extraction time on the yield of the crude polysaccharide; k and l are the influence of extraction temperature and extraction time on the yield of the crude polysaccharide.

图2 二因素相互作用对粗多糖提取率的影响

Fig. 2 Influence of different extraction conditions on the yield of the crude polysaccharide

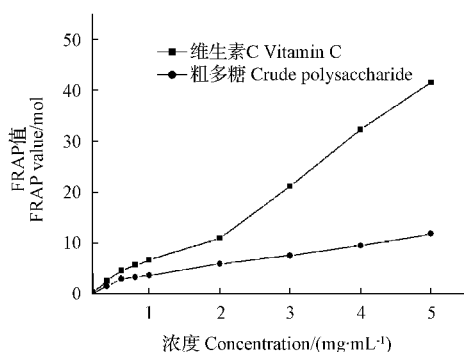


图3 粗多糖总抗氧化能力

Fig. 3 Total antioxidant capacity of the crude polysaccharide

(IC_{50})为 $4.03 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,清除超氧负离子自由基(O_2^-)的半数抑制浓度(IC_{50})为 $3.15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,清除 DPPH 自由基的半数抑制浓度(IC_{50})为 $4.76 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以上结果表明,狗枣猕猴桃叶粗多糖可以作为一种天然的抗氧化剂。

3 结论与讨论

在单因素的基础上,采用4因素3水平的响应面法(RSM)建立了闪式提取狗枣猕猴桃叶粗多糖的工艺,同时利用体外清除自由基试验测定了狗枣猕猴桃叶粗多糖的抗氧化活性。试验考察了液料比、闪式分散机转速、提取温度、提取时间

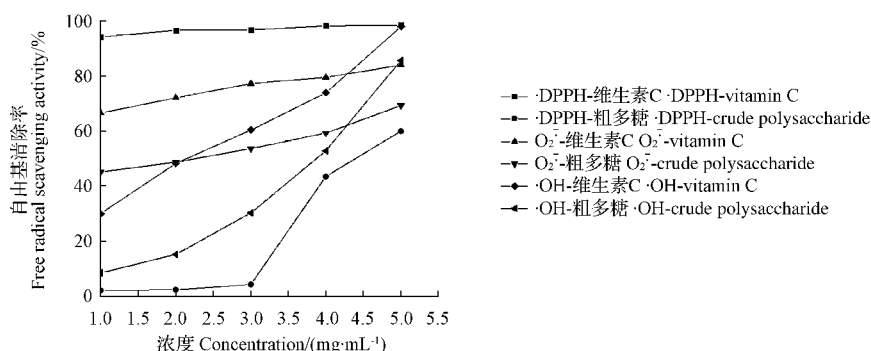


图 4 粗多糖对自由基的清除能力

Fig. 4 Radical scavenging ability of the crude polysaccharide

对粗多糖提取率的影响,确定最佳工艺条件为液料比 $17.38 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,分散机转速 2.22 档、提取温度 $44.54 \text{ }^{\circ}\text{C}$,提取时间 10.49 min,在该条件下狗枣猕猴桃叶粗多糖的提取率为 10.69%。修正上述因素为液料比 $17 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,分散机转速 2 档、提取时间 10 min、提取温度 $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行验证试验,3 次平行试验所得到的实际提取率为 10.69%,与传统工艺相比,提取温度由 $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 降至 $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$,提取时间由 2 h 缩短为 10 min,粗多糖提取率增大,明显优于传统热回流提取法。因此,利用闪式提取法提取狗枣猕猴桃叶粗多糖具有成本低、操作简单、投资较少、提取效率较高等优点。建立的模型预测提取率与实际提取率吻合得很好,说明模型预测可靠,可应用于从狗枣猕猴桃叶中提取多糖提取条件的优化。此外,经体外抗氧化试验发现,在最优条件得到的狗枣猕猴桃叶粗多糖可作为一种天然的抗氧化剂进一步开发利用。

参考文献

- [1] 严仲铠,李万林. 中国长白山药用植物彩色图志[M]. 北京:人民科学出版社,1997.
- [2] 张继有. 长白山植物药志[M]. 长春:吉林人民出版社,1982.
- [3] 金立日,桂明玉,李绪文,等. 狗枣猕猴桃叶化学成分研究[J]. 高等学校化学学报,2007,28(11):2060-2064.
- [4] 陆娟,李绪文,桂明玉,等. 狗枣猕猴桃叶化学成分研究(II)[J]. 高等学校化学学报,2009,30(3):468-474.
- [5] LU J, JIN Y R. Flavonoids from the leaves of *Actinidia kolomikta*[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2010, 46(2): 205-208.
- [6] 陆娟,杨瑞杰,桂明玉,等. 狗枣猕猴桃叶中一个新的三萜皂苷[J]. 中国药学杂志,2009,44(16):1215-1217.
- [7] 常晓丽,马冰如,单敬文,等. 狗枣猕猴桃叶化学成分研究[J]. 中草药,1996,27(7):395.
- [8] 常晓丽,石钺,马冰如,等. 狗枣猕猴桃叶挥发油化学成分研究[J]. 1991,17(6):569-570.
- [9] 赵怡红,邱玉华. 微波法与传统工艺提取北冬虫夏草多糖的比较研究[J]. 内蒙古农业科技,2009(3):68-69.
- [10] 侯秀娟,沈勇根,徐明生,等. 响应曲面法优化微波萃取化橘红多糖[J]. 中国食品学报,2013(3):101-109.
- [11] 陆娟,常清泉,王思齐,等. 响应面法优化核桃青皮粗多糖超声提取工艺研究[J]. 北方园艺,2015(22):125-129.
- [12] 姜少娟. 毛竹叶多糖超声提取工艺研究[J]. 北方园艺,2013(13):166-168.
- [13] 盛桂华,周泉城. 超临界 CO_2 萃取瓜蒌多糖工艺研究[J]. 食品工业科技,2008(5):208-210.
- [14] 陈克家,杜玉梅,李焱,等. 竹叶多糖的闪式提取工艺条件的优化[J]. 贵州农业科学,2013(2):163-165.
- [15] 张琳,王红伟,苏小莉. 闪式提取法在山药醇提物提取中的应用[J]. 济源职业技术学院学报,2015(1):21-23.
- [16] 李娇,荣永海,荣龙. 闪式提取铁皮石斛多糖[J]. 中药材,2013(9):1524-1527.
- [17] VOHRA A. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala* [J]. Process Biochemistry, 2002, 37(9):999-1004.
- [18] CUI F J, LI Y, XU Z H, et al. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2006, 97(10):1209-1216.
- [19] 陆娟,常清泉,谭莉,等. 响应面法优化狗枣猕猴桃叶粗多糖微波辅助提取工艺研究[J]. 北方园艺,2016(17):129-133.
- [20] LIU Y, WEI S L, LIAO M C. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology[J]. Industrial Crops and Products, 2013(49):837-843.
- [21] CHEN R Z, TAN L, LU J, et al. Extraction, isolation, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *As-tragalus membranaceus* [J]. Ind Crop Prod, 2015(77):434-443.

[22] KUMARAN A, KARUNAKARAN R J. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus* [J]. Food Chemistry, 2007, 100(1): 356-361.

[23] CHEN R Z, JIN C G, LU J, et al. Optimization extraction, characterization and antioxidant activities of pectic polysaccharide from tangerine peels [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 187-197.

Optimization of Homogenate Extraction of Crude Polysaccharides and Antioxidant Activity From *Actinidia kolomikta* Leaves

CHANG Qingquan, LU Juan, TAN Li, WANG Hailian, BAI Xiaoxian

(College of Chemistry, Changchun Normal University, Changchun, Jilin 130032)

Abstract: Using the leaves of *Actinidia kolomikta* as test material, taking the yield of crude polysaccharide as the response value, on the basis of single-test, the effect of homogenate extraction factors on crude polysaccharide were designed by the response surface method (RSM) to determine the optimum technology. And the antioxidant capacity of the crude polysaccharide was assessed through radical scavenging test. The results showed that the liquid-solid ratio was $17.38 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, the rotate speed was 2.22 gear, the extraction temperature 44.54°C , and the extraction time was 10.49 minutes. Under the condition the yield of the crude polysaccharide from the leaves of *Actinidia kolomikta* was 10.69%. The radical scavenging test showed that the crude polysaccharide had antioxidant capacity, and the antioxidant capacity was proportional to the concentration of crude polysaccharide.

Keywords: *Actinidia kolomikta* leaves; polysaccharide; homogenate extraction; response surface methodology; antioxidant activity

出口香菇保鲜贮运法

信息广角

一、排湿 刚采摘的香菇含水量较高,须进行排湿处理。1)晾晒。鲜香菇置于晒帘上,菇盖倾斜向上均匀排列。晾晒时间:秋冬菇 3~6 h;春菇 6~7 h;夏菇 1~2 h。2)热风排湿。菇盖向下均匀摊在晒帘上,置于自制的热风回转窑内,在 40°C 环境中排湿。3)利用排湿机排湿。排湿后的鲜香菇,采用大包装时含水量须在 70%~80%,采用小包装时含水量可在 80%~90%。

二、贮存 水分达标的鲜香菇装入塑料筐中,移入 $1\sim4^\circ\text{C}$ 的冷库存放。启运前,分级、剪柄、称质量,重新回冷库搁置 2 h 后,按大小 2 种规格包装。

三、包装 菇盖直径 6 cm 以上为 L 级,直径 5 cm 以上为 M 级,直径 4 cm 以上为 S 级。大包装时使用透明无毒薄膜袋,鲜香菇装入后抽气密封,再移入隔热的塑料泡沫箱内,外用瓦楞纸箱包装,每箱净质量 5 kg 或 10 kg。小包装是将鲜香菇装于塑料盒专用的托盘上,数量 4~8 朵不等,菌褶要向上,排列要整齐,每盒净质量 100 g。再用塑料保鲜膜密封,装入纸箱。瓦楞纸箱用胶带封口,并标明级别、质量和发货日期等储存于冷库待运。

四、运输 鲜香菇装妥后要及时启动。在气温低于 15°C 时,可用普通车运送,否则必须用制冷车 ($1\sim3^\circ\text{C}$) 运送。不同的温度条件下,香菇保鲜的时间也各不相同。 1°C 保鲜 18 d; 6°C 时 14 d; 15°C 时 7 d,温度越高保鲜时间越短。

(来源:中国农业新闻网)