

葡萄皮渣原花青素微波辅助提取工艺的优化及其抗氧化活性研究

陈月英, 王彦平, 孙瑞琳, 谢克英, 杨会会, 古 洋

(河南农业职业学院 食品工程学院, 河南 郑州 451450)

摘 要:以葡萄皮渣为试材,采用微波辅助提取方法和体外抗氧化试验,研究了葡萄皮渣中原花青素提取工艺和体外抗氧化活性。结果表明:最佳工艺为乙醇体积分数 60%(v/v)、料液比 1:20 g·mL⁻¹、微波时间 90 s、微波功率 800 W。在此条件下,原花青素提取率为 9.12 mg·g⁻¹。体外抗氧化试验中,葡萄皮渣原花青素提取物表现明显的抗氧化能力,对 DPPH 自由基(DPPH·)和羟基自由基(·OH)具有较好的清除能力,但抗氧化能力比维生素 C 弱。

关键词:葡萄皮渣;原花青素;微波辅助提取;抗氧化性

中图分类号:TS 202.3 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)11-0123-04

葡萄皮渣是酿制葡萄酒的副产物,我国是葡萄酒酿造大国,酿酒生产过程中产生的大量葡萄皮渣,目前大多被当作饲料、肥料,甚至垃圾处理,不仅附加值低还对环境造成了严重污染。葡萄皮渣中存在多种功能成分^[1],如原花青素、白藜芦醇、葡萄籽油、膳食纤维等,因此葡萄皮渣的深度开发成为葡萄产业增值的新思路。

原花青素(proanthocyanidins, PC)是一类经生物类黄酮次生代谢途径合成的天然多酚类化合物,由不同数量的儿茶素或者表儿茶素结合而成^[2]。原花青素在自然界广泛存在,在葡萄籽和松树皮中含量较高^[3]。原花青素具有较强的抗氧化、清除自由基功能,有明显的抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤、抑菌、防治糖尿病和保护心血管等作用^[4-6]。现采用微波辅助技术提取葡萄皮渣中的原花青素,采用正交实验设计优化提取条件,并探索了葡萄皮渣原花青素体外抗氧化性能,以期为葡萄皮渣综合利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试葡萄皮渣为河南民权产“赤霞珠”葡萄,取自郑州生源生物食品厂 2014 年葡萄酒生产中产生的葡萄皮渣。置于 60℃ 恒温箱烘 24 h,称恒重、粉碎后,过 60 目

筛。采用索氏抽提法脱除葡萄皮渣中的脂类物质,保存备用。

供试试剂:1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH·, 纯度 99%)购自 Sigma-Aldrich 公司;原花青素标准品购自上海圻明生物科技有限公司;无水乙醇、甲醇、香草醛、硫酸、三氯乙酸、三氯化铁、铁氰化钾、双氧水、硫酸亚铁等均为分析纯,购自国药集团。

供试仪器:UV power 紫外可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器股份有限公司);202-3AB 电热恒温鼓风干燥箱(上海乔跃电子科技有限公司);RE2000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);D5-R2 离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);EG823MF3-NS 微波炉(美的集团股份有限公司);HH-2 数显恒温水浴锅(上海乔跃电子科技有限公司);BS224S 分析天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 原花青素标准曲线的绘制 称取干燥至恒重的原花青素标准品 100 mg,用 95%乙醇溶解,定容至 50 mL,摇匀得 2.0 mg·mL⁻¹的原花青素标准溶液。分别取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 的 2.0 mg·mL⁻¹原花青素标准溶液置于 50 mL 的容量瓶中,并用 95%乙醇定容,得 0.04~0.20 mg·mL⁻¹的原花青素标准溶液。于试管中取 0.5 mL 95%无水乙醇和不同浓度标准溶液,加入 2.5 mL 3%香草醛的甲醛溶液,再加入 2.5 mL 30%硫酸的甲醇溶液,摇匀,30℃水浴保温 20 min。用分光光度计于 500 nm 波长处测定其吸光度^[9]。以吸光度为纵坐标,浓度(mg·mL⁻¹)为横坐标作标准曲线如图 1 所示,其线性回归方程为: $y=0.2629x+0.0007$, $R^2=0.9993$ 。

第一作者简介:陈月英(1964-),女,硕士,教授,现主要从事营养与食品安全等研究工作。E-mail:14389487@qq.com。

基金项目:河南农业职业学院科学研究资助项目(ky2015-zr-08);2015 年度河南省高等学校优秀教学团队建设资助项目;2014 年度河南省高等学校“专业综合改革试点”资助项目。

收稿日期:2016-02-14

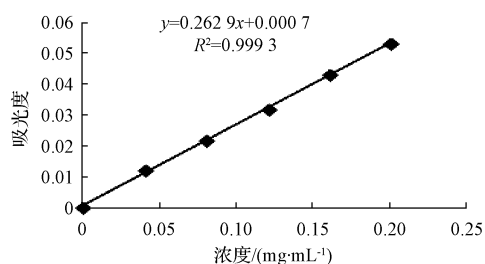


图1 原花青素标准曲线

1.2.2 原花青素提取工艺 准确称取 0.5 g 葡萄皮渣粉,微波辅助下用一定体积分数的乙醇萃取。提取液 6 000 r·min⁻¹,离心 20 min,收集上清液;以同样方法对萃取物进行第 2 次和第 3 次提取,合并上清液,进行旋转蒸发后用 95%乙醇定容至 25 mL。

1.2.3 单因素试验和正交实验 设料液比 1:20 g·mL⁻¹、乙醇体积分数 60%(v/v)、微波时间 90 s、微波功率 254 W、提取 1 次为通用提取条件,分别在乙醇体积分数、料液比、微波功率、微波时间和提取次数 5 个方面进行单因素试验,考察其对葡萄皮渣原花青素提取率的影响。根据单因素试验结果,设计 4 因素 3 水平的正交实验,见表 1。按照 1.2.1 的方法测定提取液的吸光度,并计算原花青素提取率,以确定葡萄皮渣原花青素微波辅助提取的最佳工艺条件。

表 1 正交实验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 料液比/(g·mL ⁻¹)	C 微波时间/s	D 微波功率/W
1	50	1:10	60	440
2	60	1:15	90	616
3	70	1:20	120	800

1.2.4 葡萄皮渣原花青素体外抗氧化活性的测定 1) 总还原能力的测定^[10]:取不同浓度样品各 1 mL 倒入试管,加入 2.5 mL 0.2 mol·L⁻¹的磷酸缓冲液(pH 6.6),再加入 2.5 mL 1%铁氰化钾,混匀,50 ℃水浴 20 min;冷却后加入 2.5 mL 10%的三氯乙酸,混匀,混合液 3 500 r·min⁻¹,离心 10 min;取上清液 2.5 mL 倒入试管,加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1%氯化铁,静置 10 min后,于 707 nm 波长处测定其吸光度。2) DPPH·清除率的测定^[11]:取不同浓度样品各 0.2 mL 倒入试管,加入 3.8 mL 浓度为 80 mg·L⁻¹的 DPPH·无水乙醇溶液,摇匀,室温下黑暗处放置 30 min,于 517 nm 波长处分别测定吸光度 A_i,另取不同浓度样品各 0.1 mL 倒入试管,加入 3.9 mL 无水乙醇,于 517 nm 波长处分别测定参比吸光度 A_b;再取 0.1 mL 无水乙醇,加入 3.9 mL 80 mg·L⁻¹的 DPPH·无水乙醇溶液,于 517 nm 波长处测定空白吸光度 A₀。DPPH·清除率(%)=[1-(A_i-A_b)/A₀] \times 100。3) ·OH 清除率的测定^[12]:取不同浓度样品各 2 mL 倒入试管,加入 2 mL 6 mmol·L⁻¹ FeSO₄ 溶液,再加入 6 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 溶液,摇匀,静置 10 min

后,加入 2 mL 6 mmol·L⁻¹水杨酸溶液,摇匀,静置 30 min。于 510 nm 波长处分别测定其吸光度 A_i;另用蒸馏水代替水杨酸溶液重复上述试验,测得参比吸光度 A_b;另用蒸馏水代替样品溶液重复上述试验,测得空白吸光度 A₀。·OH 清除率(%)=[1-(A_i-A_b)/A₀] \times 100。

2 结果与分析

2.1 葡萄皮渣原花青素提取的单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对原花青素提取率的影响 由图 2 可知,乙醇体积分数为 60%~70%时,原花青素提取率最高,超过 70%后,提取率开始下降,这可能与溶剂浓度过高,溶出物太多、太复杂的缘故。故选择乙醇体积分数为 60%~70%用于进一步优化试验。

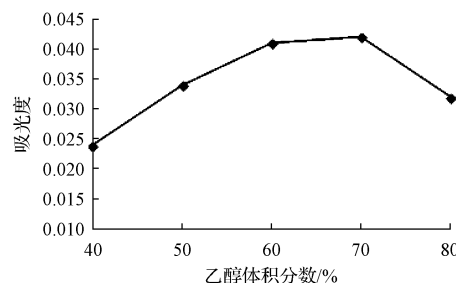


图2 乙醇体积分数对原花青素提取率的影响

2.1.2 料液比对原花青素提取率的影响 由图 3 可知,相同条件下,葡萄皮渣中原花青素的提取率随着料液比的增大而升高。当料液比由 1:5 g·mL⁻¹增加到 1:15 g·mL⁻¹时,原花青素提取率不断升高,当料液比大于 1:15 g·mL⁻¹时,原花青素的提取率趋于稳定。故选择料液比为 1:(10~20) g·mL⁻¹用于进一步优化试验。

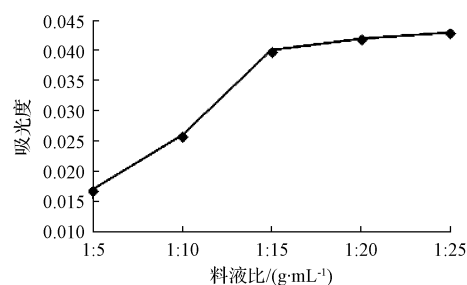


图3 料液比对原花青素提取率的影响

2.1.3 微波时间对原花青素提取率的影响 由图 4 可知,微波时间在 60~90 s,原花青素随着时间延长而升高,90~150 s 范围时趋于稳定,之后下降,这可能由于原花青素不稳定,微波时间越长越容易被氧化分解的缘故。故选择微波时间在 60~120 s 进一步优化试验。

2.1.4 微波功率对原花青素提取率的影响 由图 5 可知,随着微波功率的增大,葡萄皮渣原花青素提取率先升高后下降,微波功率为 616 W 时,原花青素提取率最高,800 W 时反而下降,可能是因为功率过大加速了原花青素

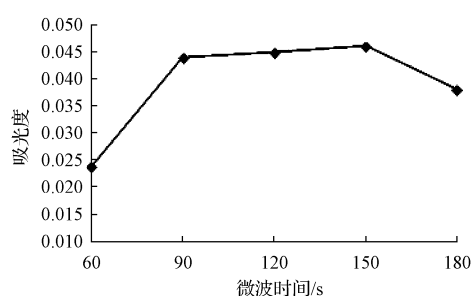


图4 微波时间对原花青素提取率的影响

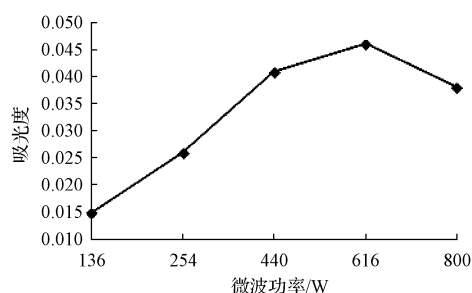


图5 微波功率对原花青素提取率的影响

的氧化分解或溶出物,更多影响了试验的提取率^[13]。故选择微波功率在 440~800 W 用于进一步优化试验。

2.1.5 提取次数对原花青素提取率的影响 试验结果显示,1、2、3 次提取的葡萄皮渣原花青素提取率分别为 6.32、7.64、7.80 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,可见微波提取葡萄皮渣原花青素提取 2 次即可。

2.2 葡萄皮渣原花青素提取的正交实验

由表 2 可知,各因素的极差顺序为 $R_C > R_A > R_D > R_B$,即对原花青素提取效果重要性排序为微波时间>乙醇体积分数>微波功率>料液比。最佳组合为 $A_2B_3C_2D_3$,最佳提取工艺为乙醇浓度 60%、料液比 1:20 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、微波时间 90 s、微波功率 800 W。对最佳提取工艺条件做验证试验,重复 3 次,此条件下葡萄皮渣原花青素的平均提取率为 $(9.12 \pm 0.87) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,高于正交实验中所有试验结果。

表2 葡萄皮渣原花青素提取的正交实验结果

试验编号	A	B	C	D	原花青素含量/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
1	1	1	1	1	4.61
2	1	2	2	2	6.77
3	1	3	3	3	7.26
4	2	1	2	3	8.82
5	2	2	3	1	7.54
6	2	3	1	2	6.35
7	3	1	3	2	5.87
8	3	2	1	3	4.92
9	3	3	2	1	6.60
K_1	6.21	6.43	5.29	6.25	$A_2B_3C_2D_3$
K_2	7.57	6.41	7.40	6.33	
K_3	5.80	6.74	6.89	7.00	
R	1.77	0.33	2.11	0.75	

2.3 葡萄皮渣原花青素体外抗氧化活性

2.3.1 葡萄皮渣原花青素的总还原能力 由图 6 可知,在试验的浓度范围内,葡萄皮渣原花青素的总还原能力随着浓度的增加而升高,并且样品浓度与总还原力存在量效关系。相同浓度下,葡萄皮渣原花青素的总还原能力明显低于维生素 C。

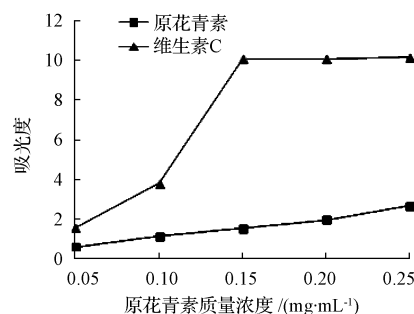


图6 葡萄皮渣原花青素的总还原能力

2.3.2 葡萄皮渣原花青素对 DPPH· 的清除作用 由图 7 可知,在选定的浓度范围内,葡萄皮渣原花青素对 DPPH· 具有良好的清除能力,且作用效果随着浓度的提高而增强,通过线性回归方程计算得到葡萄皮渣原花青素的 $\text{IC}_{50} = 0.200 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,而维生素 C 的 $\text{IC}_{50} = 0.175 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,这说明在相同浓度下,葡萄皮渣原花青素对 DPPH· 的清除能力比维生素 C 弱。

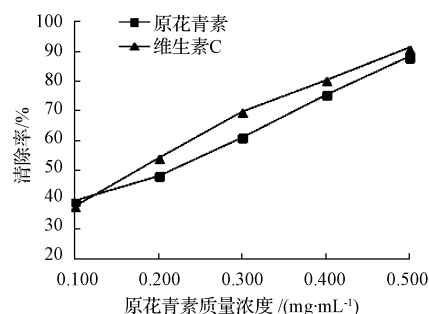


图7 葡萄皮渣原花青素对 DPPH· 的清除作用

2.3.3 葡萄皮渣原花青素对 ·OH 的清除作用 由图 8 可以看出,在选定的浓度范围内,葡萄皮渣原花青素对

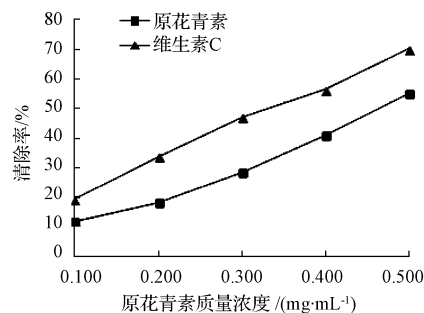


图8 葡萄皮渣原花青素对 ·OH 的清除作用

• OH具有良好的清除能力,并且原花青素浓度与• OH清除率之间存在量效关系,通过线性回归方程计算得到葡萄皮渣原花青素的 $IC_{50}=0.474\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,而维生素C的 $IC_{50}=0.337\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,这说明在相同浓度下,葡萄皮渣原花青素对• OH的清除能力比维生素C弱。

3 讨论

原花青素是植物体中广泛存在的一类多酚化合物的总称,占葡萄籽提取物的85%^[6]。原花青素一般易溶于水、乙醇、甲醇等极性强的溶剂,从经济性和环境保护角度考虑,该研究使用乙醇作为提取剂,探究葡萄皮渣原花青素微波辅助提取最佳工艺参数。单因素试验及正交实验结果表明,不同提取因素对葡萄皮渣原花青素提取效果影响较大,各因素对提取率的影响由大到小依次为微波时间、乙醇体积分数、微波功率和料液比。优化后最佳提取工艺为乙醇体积分数60%、料液比1:20 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、微波时间90 s、微波功率800 W。在此条件下做验证试验,测得葡萄皮渣原花青素的平均提取率为 $(9.12\pm0.87)\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。该方法工艺简便、高效、快速、成本低,提取剂乙醇使用量少且无毒无害。

该研究从总还原力、对DPPH•和• OH清除能力3个角度评价其抗氧化性。总还原力是考察抗氧化剂提供电子的能力,1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH•)是一种很稳定的自由基,其乙醇溶液呈深紫色,遇到抗氧化剂时其颜色变浅,褪色程度与清除剂的清除能力及数量呈正相关^[12];• OH的氧化能力很强,会导致组织细胞损伤,由人体通过新陈代谢产生,从而导致机体膜过氧化和蛋白质交联变性等,对人体伤害较大^[14]。抗氧化性试验结果表明,葡萄皮渣原花青素在试验浓度下,浓度与总还原能力、对DPPH•和• OH的清除能力呈正相关,即浓度越高抗氧化能力越强。由此可见,葡萄皮渣原花青素作为天然抗氧化剂具有广阔的开发前景。

参考文献

- [1] 高学峰,杨继红,王华.葡萄及葡萄酒生产过程中副产物的综合利用研究进展[J].食品科学,2015,36(7):289-295.
- [2] 王竹青,王军.“赤霞珠”葡萄皮渣中原花青素的提取工艺研究[J].食品科学,2009,30(12):101-106.
- [3] 方莉,王静,许媛,等.葡萄皮渣中原花青素对临床常见分离菌的抗菌效应分析[J].重庆医学,2015,44(4):453-455.
- [4] FRACASSETTI D,COSTA C,MOULAY L,et al. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*) [J]. Food Chemistry, 2013, 139(1/4):578-583.
- [5] 张峰源,赵先英,张定林,等.原花青素抗肿瘤作用及机制研究进展[J].重庆医学,2012,41(27):2887-2889.
- [6] 董晓敏,韩瑞芳,刘天明.葡萄籽原花青素对金黄色葡萄球菌的抑菌研究[J].食品工业,2015,36(8):188-192.
- [7] NISHIZUKA T,FUJITA Y,SATO Y,et al. Procyanidins are potent inhibitors of LOX-1:a new player in the French Paradox[J]. Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences, 2011, 87(3):104-108.
- [8] CASTELL-AUVI A,CEDO L,PALLARES V,et al. Procyanidins modify insulinemia by affecting insulin production and degradation[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2012, 23(12):1565-1572.
- [9] 朱靖蓉.葡萄籽原花青素的分离提纯及抗氧化研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2007.
- [10] 孟庆焕.牡丹种皮黄酮提取分离与抗氧化及抗疲劳作用研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2013.
- [11] 杨申明,王波,王振吉,等.金雀花总黄酮提取工艺优化及抗氧化性研究[J].浙江农业学报,2015,27(2):278-284.
- [12] 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.
- [13] 刘利娥,张冠军,刘金盾,等.芝麻叶多酚的提取及其抗氧化活性研究[J].食品科技,2013,38(9):205-209.
- [14] 瞿鹏,李贯良,徐茂田,等.催化动力学荧光法测定中草药对羟基自由基的清除率[J].光谱学与光谱分析,2004,24(11):1407-1409.

Study on Optimization of Microwave-assisted Extraction of Proanthocyanidins From Grape Residues and Its Antioxidant Activity

CHEN Yueying, WANG Yanping, SUN Ruilin, XIE Keying, YANG Huihui, GU Yang

(Department of Food Engineering, Henan Vocational College of Agriculture, Zhengzhou, Henan 451450)

Abstract: Taking grape residue as the experimental material, the extraction technology and antioxidant activity of proanthocyanidins from grape residue were studied by microwave assisted extraction and *in vitro* antioxidant activity. The results showed that the optimum condition were as follows, 60% (v/v) ethanol as the solvent, material-solvent ratio 1:20 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, microwave time 90 seconds, microwave power 800 W. Under such conditions, the yield of proanthocyanidins was $9.12\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. The extraction from grape residues showed significant antioxidant capacity, and activity to removing DPPH• and • OH, but weaker than vitamin C.

Keywords: grape residues; proanthocyanidins; microwave-assisted extraction; antioxidant