

doi:10.11937/bfyy.20172383

生姜总黄酮甲醇浸提工艺的响应面优化及提取液对羟自由基清除活性

李会端, 江岸, 余建中

(楚雄师范学院 化学与生命科学学院, 云南 楚雄 675000)

摘要:以生姜为试材, 甲醇水溶液为溶剂, 采用浸提法提取总黄酮, 通过设计单因素试验和 Box-benhnken design 响应面优化生姜总黄酮的提取工艺, 大孔树脂吸附纯化总黄酮提取液, 设计体外抗氧化试验, 探究了甲醇浸提生姜总黄酮工艺的响应面优化过程及提取物对羟自由基的清除活性, 以期生姜作为调味品的营养和药用价值开发应用提供前期研究基础。结果表明: 甲醇浸提生姜总黄酮的最佳工艺条件为甲醇体积分数 60%、料液比 3:30 g·mL⁻¹、浸提温度 60℃和浸提时间 3.0 h, 在此条件下, 试验测得总黄酮得率最大值为 0.497%。与多元响应模型理论预测值 0.538%吻合良好, 佐证了响应面分析是一种多变量复杂工艺过程优化的有效方法, 获得的多元回归模型对目标响应值具有精准的预测作用。体外抗氧化活性对照试验结果显示, 相同浓度的 3 种抗氧化剂对·OH 清除活性依次为抗坏血酸>BHT>生姜总黄酮, 3 种抗氧化剂的浓度和清除率有显著的量-效关系。

关键词:响应面分析; 生姜; 总黄酮; 甲醇浸提; 得率; 羟自由基清除活性

中图分类号:S 632.501 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)23-0155-10

黄酮类化合物是一类多酚类天然抗氧化剂, 在自由基清除、抗癌、抗肿瘤、提高肌体免疫力等方面有显著效果^[1-3]。以往报道的黄酮类化合物的提取方法主要有有机溶剂浸提(回流)法、超声提取、微波提取、超临界流体及酶辅助提取法^[4]。生姜作为人们日常生活中一种重要的调味品, 文献中关于生姜中总黄酮的提取也有一些报道^[5-7]。中南大学研究人员报道了姜叶中总黄酮的响应面优化工艺, 在乙醇体积分数为 70%, 浸提温度和时间分别为 76℃和 95 min 最佳工艺条件下, 总黄酮最大提取率为 15.42 mg·g⁻¹^[5]。莫开菊

等^[6]研究了生姜中总黄酮的提取并对其结构进行了初步鉴定, 正交实验获得最佳提取条件为 90%乙醇提取液, 60~65℃提取 2 h, 相应提取率 1.250%, 通过紫外光谱分析提取物主要成分为双氢黄酮。高淑云等^[7]研究表明索氏提取姜中总黄酮, 响应面优化获得的最佳条件为乙醇体积分数 66.4%, 料液比 1:39.9 g·mL⁻¹, 提取温度和时间分别为 96.95℃和 4.02 h, 最大提取率为 1.611 mg·g⁻¹。

响应面分析(RSM)是一种解决包含多个变量问题的统计学方法, 通过合理的试验设计拟合因子和响应值获得多元二次回归方程, 分析回归方程确定最优过程参数。RSM 具有缩短试验周期, 回归方程精度高, 多因素间的交互作用等优点^[8]。RSM 是一种有效的复杂过程优化技术, 已被成功地用于天然植物中总黄酮类提取的工艺优化^[9-10]。课题组选用甲醇浸提生姜中总黄酮, 响应面优化甲醇浸提工艺过程, 通过分光光度法测

第一作者简介:李会端(1983-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事天然产物有效成分的化学提取工艺等的教学与科研工作。E-mail:lh08@cxtc.edu.cn.

基金项目:大学生创新创业训练资助项目(16449); 国家自然科学基金资助项目(21643006); 国家公派访问学者资助项目(201608530002)。

收稿日期:2017-07-18

定甲醇浸提液中总黄酮浓度,大孔树脂吸附纯化产物,并进一步研究了生姜总黄酮提取物对羟自由基的清除活性。以期为生姜中总黄酮的提取及生姜作为调味品的营养和药用保健价值开发应用提供前期研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试生姜为云南楚雄市产生姜。

供试化学试剂:芦丁(优级纯)(日本和光纯药工业株式会社);2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)(国药集团);抗坏血酸、无水甲醇、A8型大孔树脂、亚硝酸钠 NaNO_2 、硝酸铝 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、

氢氧化钠 NaOH 、浓氨水等其它试剂均为国产分析纯(天津市化学试剂厂)。

供试仪器:Alpha-1502 分光光度计(上海谱元仪器有限公司);CP224C 电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司);HH-S2 型电热恒温水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂);SHZ-ⅢA 循环水式多用真空泵(河南省豫华仪器有限公司);102 型电热鼓风干燥箱(威瑞科教仪器有限公司)等。

1.2 试验方法

生姜总黄酮甲醇浸提工艺的单因素试验、响应面优化、总黄酮浸提液的分离纯化及提取物对羟自由基清除活性研究,试验流程如图1所示。

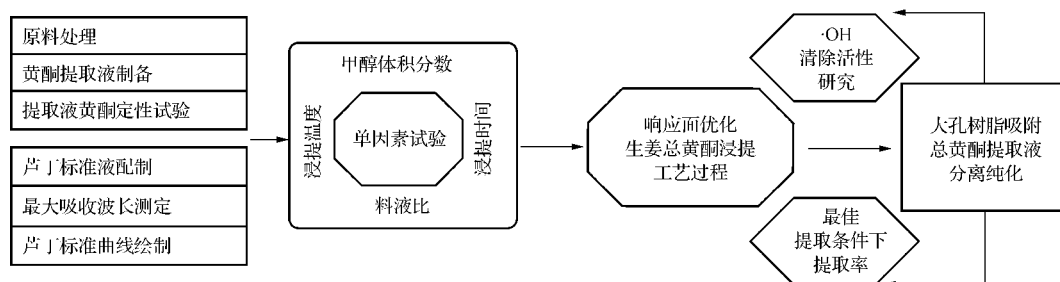


图1 响应面优化甲醇浸提生姜总黄酮、纯化及羟自由基清除活性试验流程

Fig. 1 Experimental illustration of RSM optimization of ginger flavonoids extraction and radical scavenging effects

1.2.1 生姜预处理

生姜(楚雄农贸市场)→清洗切片晾干→60℃恒温干燥箱干燥处理12h→粉碎后过40目筛→干粉备用。

1.2.2 生姜总黄酮的提取工艺流程和提取液的定性试验

电子天平精准称取3.0000g生姜干粉于50.0mL的锥形瓶中,加入30mL 50%的甲醇溶液,保鲜膜封口,置于70℃恒温水浴锅中浸提2h,减压抽滤、洗涤,将滤液和洗涤液合并转入50.00mL的容量瓶中定容,即得生姜总黄酮浸提液。

用吸量管依次移取2.00mL生姜总黄酮浸提液于4支小试管中,分别加入4%NaOH溶液、浓氨水、 AlCl_3 溶液,10% FeCl_3 溶液,观察显色反应结果。

1.2.3 最大吸收波长的测定和芦丁标准曲线的绘制

分别用吸量管精确吸取1.00mL芦丁标准

液和生姜总黄酮浸提液置于比色管中,依次加入5% NaNO_2 -10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ -4%NaOH显色,用50%甲醇溶液定容至10.00mL刻度,摇匀、静置15min,测试吸光度,确定黄酮类化合物的最大吸收波长^[11]。

配制0.01mg·mL⁻¹的芦丁标准溶液。用吸量管精确移取0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、7.00、8.00mL芦丁标准溶液于9支比色管中,依次加入5% NaNO_2 -10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ -4%NaOH显色,用50%甲醇溶液定容至10.00mL刻度,摇匀、静置15min,以第一支比色管中的溶液为参比,于最大吸收波长处测试吸光度,绘制标准曲线^[12]。

1.2.4 生姜总黄酮提取的单因素试验

甲醇浸提生姜总黄酮工艺考察甲醇体积分数、料液比、浸提温度和时间单因素条件对浸提液总黄酮得率的影响。1)固定料液比3:30g·mL⁻¹,浸提温度70℃,浸提时间2.0h,考察45%、50%、

55%、60%、65%、70%、75% 甲醇体积分数的影响。2) 固定甲醇体积分数, 浸提温度 70 ℃, 浸提时间 2.0 h, 考察 1.5 : 30、2 : 30、3 : 30、4 : 30、5 : 30、6 : 30 g · mL⁻¹ 料液比的影响。3) 固定甲醇体积分数和料液比, 浸提时间 2.0 h, 考察 30、40、50、60、70、80、90 ℃ 浸提温度的影响。4) 固定甲醇体积分数、料液比和浸提温度, 考察 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 h 浸提时间的影响。

表 1 响应面分析的因素水平

Table 1 Factors and levels of response surface methodology

响应因子水平编码 Levels of independent variables	响应因子 Independent variables			
	A: 甲醇体积分数 Methanol concentration/%	B: 浸提时间 Extraction time/h	C: 浸提温度 Extraction temperature/℃	D: 料液比 Solid-liquid ratio/(g · mL ⁻¹)
-1	60	2.0	50	3 : 30
0	65	3.0	60	4 : 30
+1	70	4.0	70	5 : 30

1.2.6 总黄酮得率的计算

精确移取 1.00 mL 浸提液于比色管中, 按 1.2.3 操作显色并测试吸光度 A 值。带入回归方程, 按照下式计算浸提液中总黄酮得率。总黄酮得率 R(%) = $C \times 10 \times 50 \times 10^{-3} / M \times 100$ 。式中: C 测试液黄酮浓度 (mg · mL⁻¹), M 为姜粉末的质量 (g)。

1.3 项目测定

使用响应面分析确定的最佳浸提工艺制备生姜总黄酮浸提液, 将浸提液合并, 离心分离; 生姜总黄酮浸提液直接上样, 使用 A8 型大孔树脂吸附 24 h, 达到吸附饱和后, 用 60% 甲醇溶液洗脱, 将洗脱液合并, 蒸发浓缩溶剂, 干燥后得总黄酮粉末^[14]。

羟自由基清除率的测定: 配制 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg · mL⁻¹ 不同浓度的抗氧化剂溶液, 根据 Fenton 反应体系操作^[15], 在最大吸收波长处测定吸光度, 与蒸馏水空白液对照, 按照下式计算羟自由基清除率。设计对照试验, 比较生姜总黄酮、BHT 和抗坏血酸 3 种抗氧化剂对羟自由基的清除活性。·OH 清除率 (%) = $(A_0 - (A_x - A_{x0})) / A_0 \times 100$ 。式中: A₀ 是对照液的吸光度, A_x 是生姜总黄酮的吸光度, A_{x0} 是不加 H₂O₂ 本底溶液吸光度。

1.2.5 生姜总黄酮提取工艺的响应面优化

生姜总黄酮甲醇浸提工艺的响应面优化过程参照文献^[13], 结合单因素试验结果, 固定甲醇体积分数、料液比、浸提温度和时间 4 个因素, 每个因素设计 3 个水平, 采用 -1、0、+1 编码, 以浸提液中总黄酮得率 (Y) 为响应值, 建立 Box-benhknen 响应面分析模型, 如表 1 所示。

1.4 数据分析

采用 Origin 6.0 软件处理试验数据作图, 利用 Design-expert 8.0 软件设计响应面分析试验方案并进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长和芦丁标准曲线绘制

生姜总黄酮提取液和芦丁标准溶液的显色反应对照试验结果见表 2, 二者显色反应现象一致, 说明原料中含有黄酮类化合物。由图 2 可知, 二者吸收光谱最强吸收峰的位置, 确定 495 nm 为后续试验中总黄酮化合物的最大吸收波长。配制不同浓度的芦丁标准溶液, 在 495 nm 处扫描吸光度, 绘制芦丁标准曲线, 得线性回归方程 $Y = 0.002\ 5 + 25.964X$, 线性相关系数为 $R^2 = 0.999\ 5$ 。

表 2 生姜提取液和芦丁的显色反应对比

Table 2 Chromogenic reaction of ginger extract and rutin solution

试剂 Reagent	4% NaOH	NH ₃ · H ₂ O	AlCl ₃	FeCl ₃
提取液 Extract	亮黄	黄色	浅黄	墨绿
芦丁 Rutin	亮黄	黄色	浅黄	墨绿

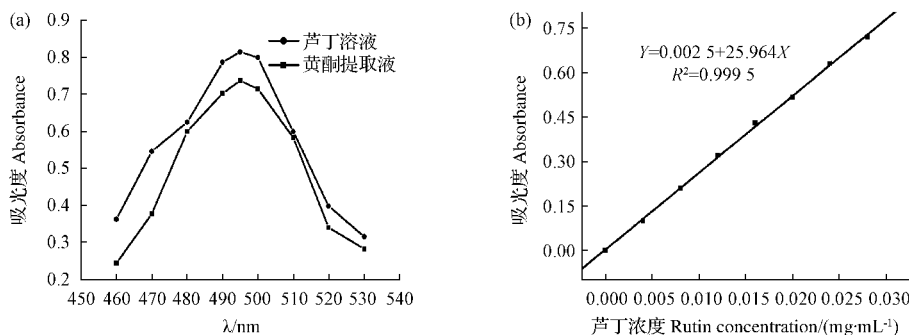


图2 生姜提取液和芦丁的紫外吸收光谱及芦丁标准曲线

Fig. 2 Absorption spectrum of ginger extracts and rutin solution, the standard curve of rutin solution

2.2 生姜总黄酮提取的单因素试验及结果

由图3可知,随着甲醇体积分数增加和提取液极性的降低,一方面导致总黄酮从原料生姜向甲醇浸提液的溶出速率降低,总黄酮得率开始降低,另一方面还增加了其它脂溶性杂质的溶出几率,增加总黄酮后期分离纯化难度,因此确定较佳的甲醇体积分数为65%,对应总黄酮得率最大值0.338%。料液比影响原料生姜和甲醇浸提液之间的浓度梯度,浓度梯度太小不利于黄酮类化合物的溶出,浓度梯度太大一则给后期提取液的回

收带来困难,二则会造成原料浪费,故确定料液比的较佳试验条件为4:30 g·mL⁻¹,对应总黄酮得率最大值0.303%。试验中需要严格控制浸提温度,温度太低黄酮溶出速率过慢,太高又会导致溶剂大量挥发和黄酮类化合物的变性,试验中确定的较佳提取温度为60℃,对应总黄酮最大得率0.468%。浸提时间3.0 h生姜总黄酮向甲醇浸提液中的溶出过程达到平衡,对应总黄酮最大得率0.346%。

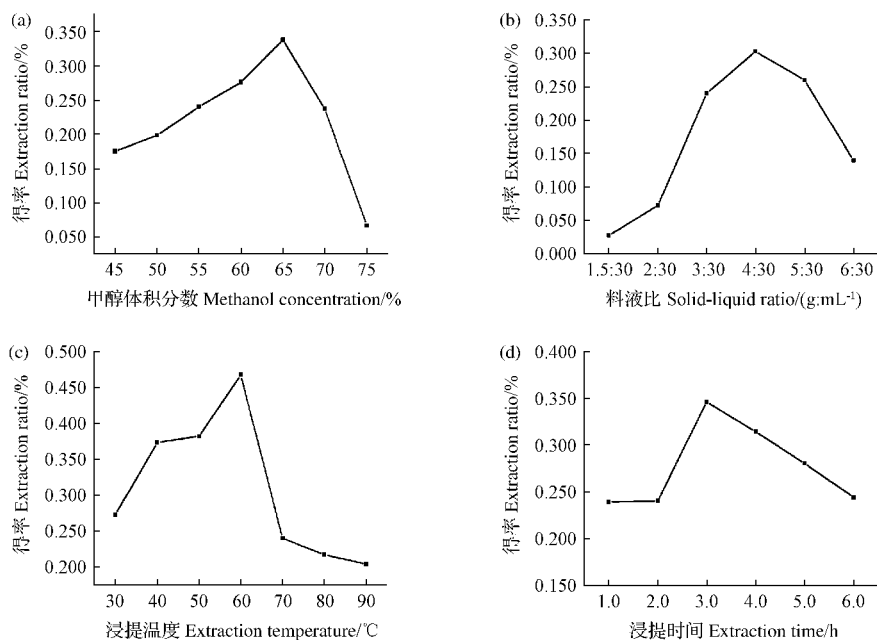


图3 甲醇体积分数、料液比、浸提温度和时间的单因素试验结果

Fig. 3 Effect of methanol concentration, solid-liquid ratio, temperature and time on the extraction ratio of total flavonoids

2.3 生姜总黄酮提取工艺的响应面优化过程

2.3.1 多元回归模型的建立

根据单因素试验结果,选定甲醇体积分数为 60%~70%,料液比(3:30)~(5:30)g·mL⁻¹,

浸提温度 50~70℃和时间 2.0~4.0 h 为生姜总黄酮提取响应面分析的响应因子和各因子真实水平范围。共设计 25 组试验,其中 16 组析因试验,8 组星点试验,1 组中心点试验(表 3)。

表 3 生姜总黄酮提取响应面优化设计及试验结果

Table 3 Experimental design and results for extraction ratio by using Box-behnken design and RSM

编号 No.	响应因子 Independent variables				响应值 Response
	A: 甲醇体积分数 Methanol concentration/%	B: 浸提时间 Extraction time/h	C: 浸提温度 Extraction temperature/℃	D: 料液比 Solid-liquid ratio/(g·mL ⁻¹)	总黄酮得率 Extraction ratio/%
1	65	3.0	50	3:30	0.310
2	60	4.0	60	4:30	0.459
3	60	3.0	70	4:30	0.412
4	70	3.0	50	4:30	0.412
5	70	4.0	60	4:30	0.445
6	65	3.0	70	5:30	0.238
7	65	2.0	50	4:30	0.428
8	65	4.0	60	5:30	0.220
9	60	3.0	60	5:30	0.226
10	65	3.0	50	5:30	0.471
11	65	4.0	60	3:30	0.452
12	65	3.0	70	3:30	0.462
13	60	3.0	50	4:30	0.405
14	65	2.0	70	4:30	0.379
15	70	3.0	60	5:30	0.270
16	65	2.0	60	3:30	0.348
17	65	4.0	50	4:30	0.356
18	70	3.0	60	3:30	0.342
19	60	3.0	60	3:30	0.497
20	65	4.0	70	4:30	0.353
21	70	3.0	70	4:30	0.324
22	65	2.0	60	5:30	0.432
23	60	2.0	60	4:30	0.264
24	65	3.0	60	4:30	0.309
25	70	2.0	60	4:30	0.324

由表 3 可知,浸提液中总黄酮得率介于 0.220%~0.497%。当甲醇体积分数 60.46%、浸提时间 2.57 h、温度 69.91℃、料液比 3.03:30 g·mL⁻¹时,浸提液中总黄酮得率理论最大值 0.538%。执行 Design-expert 8.0 软件对各响应因子和响应值之间的试验数据进行拟合,获得以生姜总黄酮提取率为响应值的多元回归方程:总黄酮得率(%)=+0.31-0.012×A+9.167E-003×B-0.018×C-0.046×D-0.018×AB-0.024×AC+0.050×AD+0.011×BC-0.079×BD-0.096×CD+0.025×A²+0.035×B²+0.046×C²+0.011×D²。

2.3.2 多元回归模型的方差分析 ANOVA (analysis of variance)

多元回归模型的方差分析结果(表 4)显示响应值生姜总黄酮得率与 4 个响应因子之间并不是简单的线性关系。模型 P=0.162 8,远远大于 0.05,说明多元回归模型中各项对响应值的影响并不显著;失拟项 16.28%归因于较高的信噪比。‘Prob>F’的 P<0.050 0 预示着回归模型中各响应因子显著性,浸提时间和料液比的交互项,浸提温度和料液比的交互项,料液比的一次项对响应值影响显著;回归方程中众多其它项对响应值影响并不显著。相关系数 R²(0.722 9)和调整系数 R_{Adj}²(0.334 9)差别较大,说明响应面分析中

得到的多元回归方程模型仍需进一步修正。变异系数($C.V. = 18.32\%$)说明模型有一定的重现性,信噪比(5.491)大于4.000,说明响应面分析确定的多元回归模型对响应值有一定的预测作

用。方差分析结果显示各响应因子对响应值影响依次为料液比>浸提温度>甲醇体积分数>浸提时间。

表4 生姜总黄酮甲醇浸提工艺响应面分析多元回归模型的方差分析

Table 4 ANOVA for response surface quadratic model for extraction of total flavonoids from ginger

方差来源 Source of deviation	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	F值 <i>F</i> value	P值 <i>P</i> value Prob> <i>F</i>	显著性 Significant
模型 Model	0.116 965	14	0.008 355	1.863	0.162 8	
A	0.001 776	1	0.001 776	0.396	0.543 2	
B	0.001 008	1	0.001 008	0.225	0.645 5	
C	0.003 816	1	0.003 816	0.851	0.378 0	
D	0.025 576	1	0.025 576	5.704	0.038 1	显著
AB	0.001 369	1	0.001 369	0.305	0.592 7	
AC	0.002 256	1	0.002 256	0.503	0.494 3	
AD	0.009 900	1	0.009 900	2.208	0.168 1	
BC	0.000 529	1	0.000 529	0.118	0.738 4	
BD	0.024 964	1	0.024 964	5.567	0.040 0	显著
CD	0.037 056	1	0.037 056	8.264	0.016 5	显著
A ²	0.001 782	1	0.001 782	0.397	0.542 5	
B ²	0.003 484	1	0.003 484	0.777	0.398 8	
C ²	0.006 072	1	0.006 072	1.3547	0.271 6	
D ²	0.000 349	1	0.000 349	0.078	0.785 8	
残差 Residual	0.044 841	10	0.004 484			
失拟项 Lack of fit	0.161 806	24				
纯误差 Pure error		0				
总和 Cor total		10				
相关系数 <i>R</i> -squared	0.722 9		调整系数 Adj <i>R</i> -squared		0.334 9	
信噪比 Adeq Precision	5.491		变异系数 <i>C.V.</i> /%		18.32	

2.3.3 响应面和等高线分析

图4所示的各响应因子的3D响应面和等高线生动的反映了上述多元回归响应面分析模型。3D响应面图可直观反映各响应因子对响应值的影响,还可进一步分析响应值对不同响应因子的敏感程度;等高曲线的离散程度则反映了不同响应因子间的交互作用对响应值的影响,圆形等高线表明响应因子间的交互效应弱,椭圆形等高线则预示着响应因子间的交互效应较强。

甲醇体积分数和浸提时间交互作用对响应值总黄酮得率的影响如图4a所示,3D响应面中甲醇体积分数对应曲面曲率较大,对黄酮得率的影响较浸提时间更为显著;接近圆形的等高线则意味着甲醇体积分数×浸提时间($A \times B$)的交互作用弱,对生姜总黄酮提取率影响不明显 $P =$

0.592 7。当 $A = 60.46\%$ 、 $B = 2.57$ h时对应最大得率0.538%。甲醇体积分数和浸提温度交互作用对响应值的影响如图4b所示,从3D响应面中2个响应面的曲率来看,浸提温度对总黄酮提取率的响应更为显著;接近圆形的等高线同样预示着甲醇体积分数×浸提温度($A \times C$)弱交互作用,对响应值影响不显著 $P = 0.494 3$ 。当 $A = 60.46\%$ 、 $C = 69.91$ °C时对应最大黄酮得率0.538%。甲醇体积分数和料液比的交互作用对响应值的影响如图4c所示,后者对应曲面的曲率较前者大,预示着料液比对响应值的影响更为显著;圆形的等高线依旧预示着甲醇体积分数×料液比($A \times D$)弱交互作用,对响应值影响较弱 $P = 0.168 1$ 。当 $A = 60.46\%$ 、 $D = 3.03 : 30$ g·mL⁻¹时,对应最大得率0.538%。

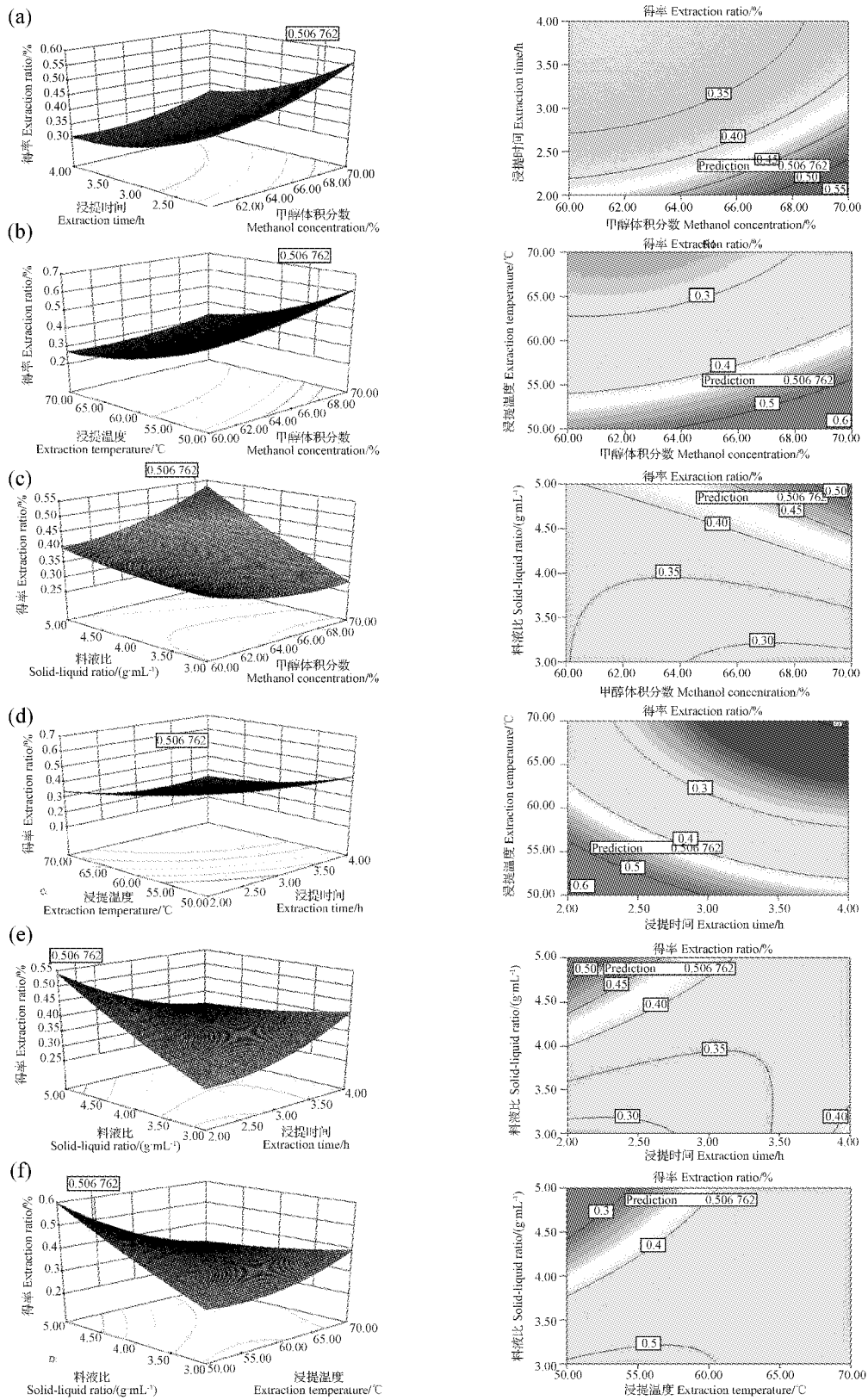


图 4 各响应因子及交互作用对响应值影响的响应面分析

Fig. 4 RSM analyses for interactive effects of each independent variables

图 4d 所示的圆形等高线预示的浸提温度和浸提时间的交互作用,对响应值总黄酮得率的响应并不显著 $P=0.7384$,当浸提时间和温度分别为 2.57 h 和 69.91 $^{\circ}\text{C}$ 时,对应最大得率 0.538%。浸提时间和料液比的交互作用对响应值的影响如图 4e 所示,料液比对应曲面较浸提时间更为陡峭,预示着其对响应值的影响更为显著;椭圆形的等高线预示着浸提时间 \times 料液比(B \times D)二者较强的交互作用,对响应值的影响比较显著 $P=0.04$ 。如 4f 图所示,较陡的响应面和椭圆形的等高线,结合 $P=0.0165$ 表明浸提温度和料液比的线性和交互作用对响应值的影响都比较显著。当浸提温度为 69.91 $^{\circ}\text{C}$,料液比为 3.03 : 30 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对应最大得率 0.538%。

2.3.4 响应面确定的最佳浸提工艺条件及验证性试验

执行 Design-expert 8.0 程序求解四元二次回归方程,甲醇浸提生姜总黄酮的最佳工艺条件为甲醇体积分数 60.46%、浸提时间 2.57 h、温度 69.91 $^{\circ}\text{C}$,料液比 3.03 : 30 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,在此条件下,拟合多元回归响应面分析方程获得的生姜总黄酮得率的理论最大值为 0.538%。在响应面分析确定的最佳工艺条件基础上,设计了如表 5 所示的验证性试验,甲醇体积分数为 60%、浸提时间

3.0 h、浸提温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 、料液比 3 : 30 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,设计 3 组平行试验,试验测得生姜总黄酮得率平均值为 0.499%。试验测定值和根据多元响应模型理论拟合值基本吻合,佐证了多元响应模型对目标响应值的可预测性;二者之间的误差反映了该模型略显粗糙,仍需要进一步优化。

2.4 体外抗氧化活性试验及结果

黄酮类化合物作为一类天然抗氧化剂,因其苯环上的邻二羟基结构,对多种活性氧自由基具有清除活性^[16-17]。该研究设计对照试验比较了生姜总黄酮、抗坏血酸和 BHT 3 种抗氧化剂对羟自由基的清除活性,由图 5 可知,3 种抗氧化剂均体现出显著量-效关系,随着抗氧化剂浓度的增加,对羟自由基的清除活性增加;相同浓度的 3 种抗氧化剂对羟自由基的清除活性依次为抗坏血酸>BHT>生姜总黄酮。甲醇浸提过程中为了提高生姜总黄酮的溶出速率达到最大得率采取了控制较高提取温度的条件,破坏了总黄酮的活性基团;另外有机溶剂浸提法导致提取液中除了总黄酮还有很多脂溶性的副产物,后期对提取液的纯化分离过程又过于简单,得到的产物不纯。基于以上 2 点原因,生姜总黄酮对羟自由基的清除能力低于相同浓度的抗坏血酸和 BHT。

表 5 响应面分析确定的最佳条件下生姜总黄酮最大提取率

Table 5 Obtained experimental data of extraction ratio under optimal experimental conditions

次数 Run	最佳提取工艺条件 Optimal extraction conditions	吸光度 Absorbance	得率 Extraction ratio/%	平均值 Average value/%
1	A=60	0.779	0.498	
2	B=3.0 C=70	0.775	0.496	0.499
3	D=3 : 30	0.786	0.503	

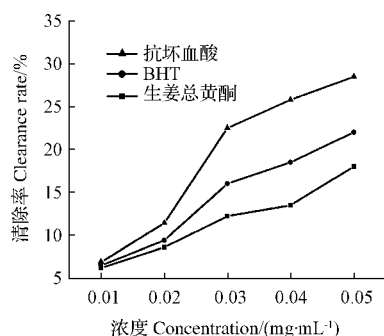


图 5 3 种抗氧化剂对羟自由基清除活性对照试验结果

Fig. 5 Scavenging activity comparison of ginger extracts, BHT and L-ascorbic acid

3 结论

该试验研究了生姜总黄酮甲醇浸提工艺的响应面优化过程,提取液的分离纯化及提取物对羟自由基的清除活性。选定甲醇体积分数、浸提时间、浸提温度和料液比 4 个提取条件设计单因素试验,根据单因素试验结果确定响应面分析的响应因子的中心点和水平范围,响应面优化得到的最佳提取工艺条件为甲醇体积分数 60%,浸提时间和温度分别为 3.0 h 和 60 $^{\circ}\text{C}$,料液比为 3 : 30 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,试验测得的最大提取率为

0.497%。与根据多元回归模型理论预测的最大提取率 0.538% 较为吻合。一方面说明多元回归模型对目标值有预测作用,另一方面试验和理论值之间的差别说明模型仍需进一步修正。

3 种抗氧化剂对羟自由基的清除活性均呈现显著地量-效关系,同等浓度条件下的清除活性顺序为抗坏血酸>BHT>生姜总黄酮。较高浸提温度使得黄酮结构中的活性基团遭到破坏,提取液的后分离纯化不彻底均导致总黄酮抗氧化活性降低。对提取液的纯化分离,黄酮类化合物的结构鉴定等是后续工作的重点。

参考文献

- [1] YANG L, CAO Y L, JIANG J G, et al. Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl[J]. Journal of Separation Science, 2010, 33(9): 1349-1355.
- [2] DAFFODIL E D, MOHAN V R. Total phenolics, flavonoids and *in vitro* antioxidant activity of *Nymphaea pubescens* wild rhizome[J]. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2013, 2(5): 3710-3722.
- [3] LIY H, JIANG B, ZHANG T, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 444-450.
- [4] WANG L, WELLER C L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants[J]. Trends in Food Science and Technology, 2006(17): 300-312.
- [5] 王宗成, 蒋玉仁, 刘小文, 等. 响应面优化生姜茎叶总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(9): 1582-1588.
- [6] 莫开菊, 程超, 吴淑华, 等. 生姜黄酮提取纯化及结构的初步鉴定[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 229-233.
- [7] 高淑云, 葛壮壮. 响应法优选生姜中黄酮提取工艺研究[J]. 中国调味品, 2012, 37(12): 32-35.
- [8] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3): 91-94.
- [9] AMADO I R, FRANCO D, SÁNCHEZ M, et al. Optimization of antioxidant extraction from *Solanum tuberosum* potato peel waste by surface response methodology[J]. Food Chemistry, 2014, 165: 290-299.
- [10] RANIC M, NIKOLIC M, PAVLOVIC M, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of natural antioxidants from spent espresso coffee grounds by response surface methodology[J]. Journal of Cleaner Production, 2014, 80: 69-79.
- [11] 李会端. 酶解法提取紫藤总黄酮及自由基清除活性研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2014, 42(3): 79-84.
- [12] LI H D. Response surface optimization of flavonoids extraction from two kinds of Chinese tea and research on antioxidant effect[J]. NPAIJ, 2015, 11(1): 1-11.
- [13] 李会端. 响应面优化玛咖总黄酮提取及对·OH 抑制作用探究[J]. 食品科技, 2014, 40(4): 302-308.
- [14] 王春民, 刘刚, 费艳, 等. 大孔吸附树脂法纯化黄芩总黄酮工艺研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 58-60.
- [15] 杨申明, 范树国, 文美琼, 等. 微波辅助提取澳洲坚果壳多糖的工艺优化及抗氧化性评价[J]. 食品科学, 2016, 37(10): 17-22.
- [16] SMIRNOFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Photochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [17] HEIM K E, TAGLICFERRO A R, BOBILYA D J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13(10): 572-584.

Optimization of Extract Methodology of Total Flavonoids From Ginger and Hydroxyl Radicals Scavenging Effect

LI Huiduan, JIANG An, YU Jianzhong

(Department of Chemistry and Life Science, Chuxiong Normal University, Chuxiong, Yunnan 675000)

Abstract: The total flavonoids were extracted from ginger by using methanol as solvent. The extraction process was optimized by single factor test and Box-benhnken design, the total flavonoids were purified by macroporous resin. *In vitro* antioxidant test was also designed. In order to provide the preliminary research basis for the development and application of nutrition and medicinal value of the ginger as condiment, the optimization process of the total flavonoids extraction by response surface methodology and the scavenging effect on hydroxyl radical were studied. The results indicated that the optimum extract conditions were methanol concentration of 60%, solid-liquid ratio of 3 : 30 g · mL⁻¹, extraction temperature of 60 °C and time of 3.0 hours. The maximum experimental extraction ratio

doi:10.11937/bfyy.20170673

不同保鲜方法对黄秋葵果实贮藏品质及 活性氧代谢的影响

辛松林^{1,2}, 秦文¹, 李慧妍¹, 亢小勤², 湛仁贵²

(1. 四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川旅游学院 食品学院, 四川 成都 610100)

摘 要:以黄秋葵果实为试材,采用4种不同保鲜处理(壳聚糖、气调、1-MCP、水杨酸,以不作任何处理为对照)后,置于 $(9\pm 1)^{\circ}\text{C}$,相对湿度85%~90%条件下贮藏,研究贮藏过程中黄秋葵果实活性氧代谢相关物质的变化。结果表明:3种保鲜处理及气调较对照均可显著提高黄秋葵果实的总抗氧化能力、DPPH·清除能力、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除能力、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力;显著降低细胞膜的渗透率、 H_2O_2 含量和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量。可知壳聚糖处理的保鲜效果最好,其次为水杨酸、1-MCP,气调处理的保鲜效果最差。

关键词:壳聚糖;1-MCP;气调;水杨酸;黄秋葵果实;贮藏品质;活性氧代谢

中图分类号:S 649.609.1+3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)23-0164-06

黄秋葵(*Abelmoschus esculentus*)属锦葵科秋葵属一年生草本植物,果实肉质柔嫩,口感润滑,具有独特的风味,又因其果实内部含有较为丰富

的粘性多糖、蛋白质、维生素及黄酮等,不但具有较高的营养价值,还具有一定的医疗保健功能。随着社会对于绿色、有机蔬菜关注度的不断提高,黄秋葵作为兼备营养与保健功能的蔬菜之一,已经获得了越来越多的重视。但因黄秋葵果实表面积大,有细小绒毛,采后易发生失水、老化而丧失食用价值,这些因素极大的影响了黄秋葵的消费和流通,因此,针对这一难题,研究出有效的保鲜贮藏方法对采后的黄秋葵果实进行处理,不仅可以减小经济损失,更有利于黄秋葵的进一步推广。

近年来,有关黄秋葵的研究主要集中于种植、加工及应用等方面^[1-4],尤其在黄秋葵功能性成

第一作者简介:辛松林(1981-),男,博士,副研究员,现主要从事农产品加工与贮藏等研究工作。E-mail:23016024@qq.com.

责任作者:秦文(1967-),女,博士,教授,博士生导师,现主要从事果蔬采后生理等研究工作。E-mail:qinwen1967@aliyun.com.

基金项目:四川省科技厅科技支撑资助项目(2016JY0119);四川省教育厅面上资助项目(16ZA0351)。

收稿日期:2017-05-18

was 0.497% by RSM under the optimum extract conditions. The experimental extraction ratio matched well with the theoretical value of 0.538% by solving the multiple regression equation. RSM had been proved to be an effective technique for optimization of extraction process and the fitted quadratic model had a predictive effect on target extracts. The scavenging effect of ginger extracts, BHT and L-ascorbic acid on $\cdot\text{OH}$ with the same concentration were sorted by L -ascorbic acid > BHT > ginger extract, and all the three antioxidant reagents displayed a significant dose-effect relationship.

Keywords: response surface methodology; ginger; total flavonoids; methanol soaked; extraction ratio; hydroxyl radicals scavenging effect