

三峡库区乌皮香核桃隔膜皂苷提取及抗氧化测定

陈林,王兆丹,曲留柱*,金小勇,王小玉

(重庆三峡学院生命科学与工程学院,生物与食品基础实验教学中心(市级实验教学示范中心),
重庆 404100)

摘要:本实验采用超声波法,响应面设计提取三峡库区特产核桃隔膜皂苷。结果显示核桃隔膜中皂苷提取的最佳提取工艺参数为:提取功率300 W,提取时间为96 s,料液比为1:33(g/mL),皂苷的提取得率为5.98%。通过DPPH,ABTS法对核桃隔膜皂苷提取物进行抗氧化实验,表明皂苷提取物对自由基清除效果明显,有较强的抗氧化活性。

关键词:核桃隔膜,皂苷,超声波提取,响应面分析,抗氧化性

Antioxidant activity of ultrasonic extraction isolates from three gorges reservoir area *Juglans regia* of Wu walnut

CHEN Lin, WANG Zhao-dan, QU Liu-zhu*, JIN Xiao-yong, WANG Xiao-yu

(Biotechnology and Food Basic Experimental Teaching Center (Municipal Experimental Teaching Demonstration Center)
College of Life Science and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404100, China)

Abstract: The total saponins were examined in the dissepiment of Wu walnut. On the basis of single factor experiments with the method of ultrasonic-assisted extraction, optimal parameters of extraction process was researched by using response surface method. A mathematical model including material/liquid ratio, ultrasonic treatment time and extraction temperature was created. By typicality analysis, the optimum process conditions were as follows: the ultrasonic treatment time was 96 s, the ultrasonic power was 300 W and the material/liquid ratio was 1:33(g/mL). Under such conditions, an optimal total saponins yield of 5.98% was obtained. Saponins displayed strong antioxidant effect and scavenging capacity against DPPH, ABTS radical, and more strengthen with the increase in the concentration of total crude saponins extract.

Key words: *Juglans regia*; saponins; ultrasonic extraction; response surface method; antioxidant

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)18-0248-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.18.041

核桃隔膜又称分心木(*Juglans regia*),为带骨质内果皮的种隔,完整呈类圆形或椭圆形,直径约2.5 cm。表面棕色至褐色,有光泽,边缘增厚。体轻,质脆,易折断,味微涩。用于肾虚遗精,滑精,遗尿,泻痢^[1-3]。目前国内外对核桃属植物^[4-7]药用性研究较多,但对内隔膜的研究较少,导致其药用价值未能充分认识造成资源浪费。

超声波提取法最大优点是节约能源和时间。它利用超声波的空化效应^[8],使植物活性成分在不被破坏的情况下溶出,且体系温度不会大幅度升高。响应面分析方法(response surface methodology, RSM)是一种优化工艺条件的有效方法^[9-10],可用于确定各种

因素及其交互作用在工艺过程中对指标(响应值)的影响,精确的表述因素和响应值之间的关系。本实验主要针对三峡库区核桃品种核桃隔膜皂苷提取物工艺学研究及功能初步测定,以期加深对其综合利用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

核桃隔膜 选自重庆城口乌皮香核桃,出油率达25%,取出核桃隔膜,然后用粉碎机将其打成粉末,过40目筛;薯蓣皂苷标准品(MUST-10102901)、无水乙醇 色谱纯。

JY92-II 超声波细胞粉碎机 宁波新基生物科技股份有限公司; FZ102-微型植物粉碎机 天津市

收稿日期: 2014-12-23

作者简介: 陈林(1986-),女,硕士,实验师,主要从事食品化学,天然产物提取及活性方面的研究, E-mail: friendlin@126.com。

* 通讯作者: 曲留柱(1984-),男,博士,主要从事食品科学方面的研究, E-mail: 103881829@qq.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(CSTC2009BB5236); 12科研创新团队建设三峡库区农产品绿色保鲜技术; 2014年重庆三峡学院科学研究青年资助项目(14QN26)。

泰斯特仪器有限公司;SHZ-95B型循环水式多用真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司;RE-52旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;UV2450型紫外可见分光光度计 日本岛津公司;AL-104电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的测定 准确称量薯蓣皂苷样品5.4 mg,并定容至100 mL,从标准样品中取出5 mL用70%的乙醇溶液定容至10 mL,依次取样稀释配制梯度浓度标准溶液。对标准溶液进行全波长扫描,检测得出标准品的最佳吸收波长为210 nm,在该波长下检测梯度标准液的吸光值,根据得到的吸光值及其溶液浓度,绘制标准曲线,拟合得线性回归方程。

1.2.2 核桃隔膜皂苷提取方法 核桃隔膜粉碎后,用电子天平精确称量1 g样品,并按一定料液比加入70%的乙醇溶液进行超声波提取,将提取后的溶液用旋转蒸发器浓缩;稀释后,在210 nm下测定样品的吸光值 A_c ,带入标准曲线计算出样品皂苷提取当量,再计算核桃隔膜皂苷提取得率。

核桃隔膜皂苷提取得率(%)=实测 A_c 值对应标准曲线样品皂苷量/核桃隔膜样品量 $\times 100$

1.2.3 回收率实验 精密称取薯蓣皂苷标准品,配制标准溶液,按照1.2.2方法测定吸光度值,带入回归方程计算总皂苷含量。

回收率(%)=(实测值-样品所含的总皂苷量)/加入皂苷标准品量 $\times 100$

1.2.4 单因素实验

1.2.4.1 提取时间的确定 在超声波功率为275 W,料液比为1:30(g/mL)条件下,用超声波细胞粉碎机依次提取0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.25 min;并计算皂苷提取得率,确定提取得率随提取时间的变化趋势。

1.2.4.2 提取功率的确定 在料液比为1:30(g/mL),提取1.5 min,设置功率为175、200、225、250、275、300、325、350 W分别提取,并计算皂苷提取得率,确定提取得率随提取功率的变化趋势。

1.2.4.3 料液比的确定 在超声波功率为275 W,料液比依次为1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45(g/mL)的条件下,提取1.5 min,并计算皂苷提取得率,确定提取得率随提取料液比的变化趋势。

1.2.5 响应面实验 在单因素实验的基础上分别以

提取功率、提取时间及料液比3个因素为考察对象,以皂苷提取得率为响应值,采用响应分析进行提取条件的优化。

1.2.6 核桃隔膜对DPPH自由基清除作用 准确移取3.9 mL 25.61 mg/L的DPPH溶液,加入0.1 mL体积分数70%的乙醇溶液,混匀,在517 nm波长处测吸光度(A_c)。将各待测样品用相应的提取溶剂配成0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 $\mu\text{g/mL}$,分别准确移取0.1 mL不同浓度的各样品溶液,加入3.9 mL DPPH溶液(25.61 mg/L),混合均匀,室温避光反应30 min后于517 nm处测定吸光度(A_i)。同时测定3.9 mL体积分数70%乙醇溶液中加入0.1 mL不同浓度样品溶液的吸光度(A_j)^[11],以BHT作为阳性对照。DPPH清除率按以下公式计算:

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}) \times 100$$

1.2.7 核桃隔膜对ABTS自由基清除作用 取5.0 mL 7 mmol/L的ABTS⁺溶液,加入88.0 μg 140 mmol/L的过硫酸钾在室温下置于暗处反应12~16 h,形成ABTS⁺自由基储备液。在734 nm处,用体积分数70%的乙醇将ABTS⁺自由基储备液稀释至吸光度为0.70 \pm 0.02备用。准确量取0.1 mL浓度10、20、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$ 的样品溶液,加入3.9 mL ABTS⁺溶液,混匀,在室温下反应6 min后734 nm处测定吸光度 A_E ^[12-14]。同时吸取3.9 mL ABTS⁺溶液,加入0.1 mL体积分数70%的乙醇溶液于734 nm处测定吸光度 A_B 。ABTS自由基清除率计算公式如下:

$$\text{ABTS自由基清除率}(\%) = \frac{A_B - A_E}{A_B} \times 100$$

1.2.8 数据处理 每一组实验至少重复三次计算平均值。单因素及抗氧化实验数据采用Excel 2007统计并作初步处理,结果用平均值 \pm 标准偏差表示。使用软件SAS 9.2对数据分析处理并绘制响应曲面和等高线。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的测定

将配制好的不同浓度薯蓣皂苷标准品对照溶液在210nm波长处测定吸光度 A ,得到回归方程 $Y = 2.548X - 0.003$, $R^2 = 0.9995$ 。表明皂苷浓度在0.005~0.0135 mg/mL范围内线性良好。

2.2 回收率实验

精密称取薯蓣皂苷标准品,配制标准溶液,按照1.2.3方法测定皂苷回收率为99.29% \pm 0.07%,由此可见该标曲具有很高的可靠度,可用于皂苷含量的检测。

2.3 核桃隔膜皂苷提取的单因素实验

图1~图3分别为不同提取功率、提取时间及料液比下核桃隔膜皂苷的提取得率。随着超声波功率的增加,得率呈增加趋势,且在275 W达到最大,之后得率随功率的增加呈下降趋势。

超声功率275 W,料液比1:30的条件下,核桃隔膜皂苷提取得率呈先增加后下降趋势。当提取时间超过1.5 min,皂苷溶解度达到饱和状态,皂苷提取得率反而逐渐下降。随着超声时间延长,植物细胞被破

表1 核桃隔膜皂苷提取响应面实验因素与水平
Table 1 Factors and levels of central composite test on extraction of saponins

水平	因素		
	X_1 提取功率 (W)	X_2 提取时间 (min)	X_3 料液比 (g/mL)
1.68	334	2.34	1:46.8
1	300	2	1:40
0	250	1.5	1:30
-1	200	1	1:20
-1.68	166	0.66	1:13.2

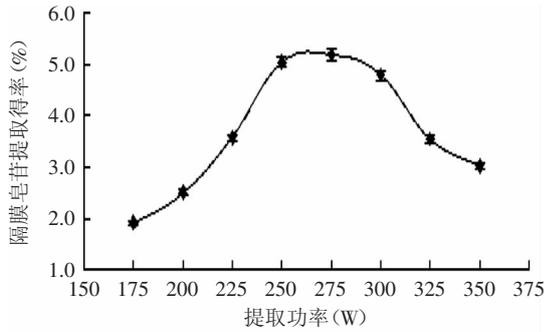


图1 不同提取功率对隔膜皂苷提取得率的影响

Fig.1 Effect of extraction power on the extraction efficiency of extraction rate

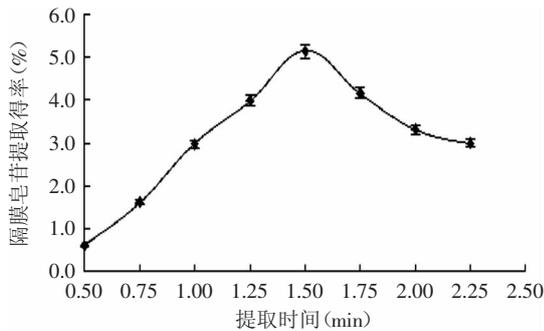


图2 不同提取时间对隔膜皂苷提取得率的影响

Fig.2 Effect of extraction time on the extraction efficiency of extraction rate

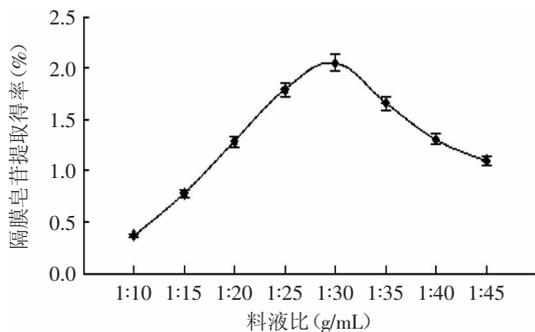


图3 不同料液比对隔膜皂苷提取得率的影响

Fig.3 Effect of extraction material/liquid ratio on the extraction efficiency of extraction rate

坏,内容物流出影响皂苷提取得率,故此条件下提取1.5 min提取得率最高。

超声功率275 W,提取时间1.5 min的条件下,料液比从1:10提高到1:30时,提取得率从0.372%增加到2.05%,进一步提高料液比,提取得率下降。

2.4 响应面实验

超声波辅助提取核桃隔膜皂苷的响应面实验结果见表2,对表2数据进行回归分析,回归模型的方程为:

$$Y = 56.28 + 10.32X_1 + 0.89X_2 + 4.44X_3 - 8.63X_1^2 - 4.28X_1X_2 - 18.96X_2^2 - 1.88X_1X_3 + 3.52X_2X_3 - 11.49X_3^2$$

对该响应面回归模型进行方差分析(表3)。从此模型的方差分析表可知,响应面回归模型达到极显著水平($p=0.0013<0.05$),复相关系数 R^2 为0.9251,说明

表2 核桃隔膜皂苷提取响应面实验设计方案及结果

Table 2 Experimental design and result of central composite test on extraction of saponins

实验号	X_1	X_2	X_3	皂苷含量 (%)
1	1	1	1	5.385±0.564
2	1	1	-1	4.784±0.220
3	1	-1	1	4.442±0.675
4	1	-1	-1	4.371±0.115
5	-1	1	1	3.852±0.400
6	-1	1	-1	3.014±0.505
7	-1	-1	1	3.546±0.486
8	-1	-1	-1	3.178±0.097
9	1.68	0	0	5.897±0.381
10	-1.68	0	0	4.116±0.514
11	0	1.68	0	3.743±0.250
12	0	-1.68	0	4.204±0.299
13	0	0	1.68	5.236±0.753
14	0	0	-1.68	4.205±0.500
15	0	0	0	5.769±0.477
16	0	0	0	5.439±0.575
17	0	0	0	5.584±0.513
18	0	0	0	5.632±0.550

表3 回归方程的方差分析表

Table 3 Analysis of variance of the regression model

回归	自由度	平方和	复相关系数	F值	p值
线性	3	614.512168	0.4268	15.20	0.0011
平方	3	682.999585	0.4744	16.89	0.0008
交互	3	34.486900	0.0240	0.85	0.5033
模型	9	1331.998652	0.9251	10.98	0.0013

表4 二次多项式回归模型系数的显著性检验结果

Table 4 Regression coefficients of predicted quadratic polynomial model

参数	自由度	估计值	标准差	T值	p值
截距	1	-133.570983	43.812705	-3.05	0.0159
X_1	1	0.683684	0.235117	2.91	0.0197
X_2	1	59.013181	19.672832	3.00	0.0171
X_3	1	2.666699	0.983642	2.71	0.0266
X_1^2	1	-0.001224	0.000414	-2.96	0.0182
X_1X_2	1	0.060700	0.051923	1.17	0.2760
X_2^2	1	-26.875891	4.135360	-6.50	0.0002
X_1X_3	1	-0.001335	0.002596	-0.51	0.6210
X_2X_3	1	0.250000	0.259614	0.96	0.3638
X_3^2	1	-0.040723	0.010338	-3.94	0.0043

该二次模型能够拟合真实的实验结果,实验误差小。

从二次多项式回归模型系数的显著性检验结果(表4)可知,在所选的各因素水平范围内,对结果影响因素大小顺序为:提取时间、提取功率、料液比。由显著性检验可知,其中, X_2^2 、 X_3^2 对Y的影响极显著($p<0.01$), X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1^2 对Y的影响显著($p<0.05$), X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 对Y的影响不显著。

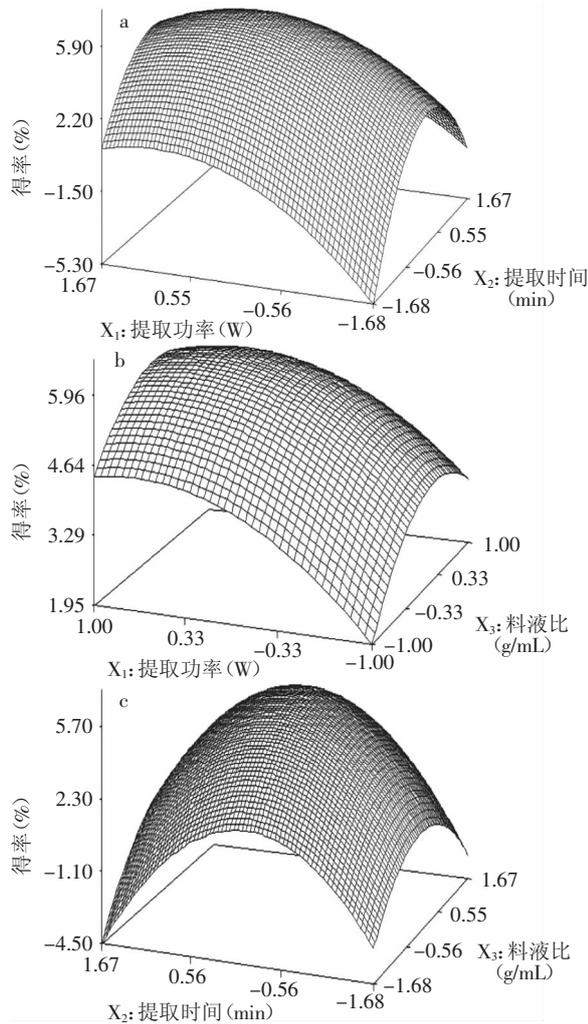


图4 因素交互作用对核桃隔膜皂苷提取得率影响的响应曲面
Fig.4 Response surface plots for the effects of process parameter on the extraction efficiency of saponins

根据回归方程做出响应面图(图4)可直观反映出各因素对响应值的影响。由图4可知,各因素之间的交互作用对核桃隔膜皂苷提取得率均具有一定的影响,但均不显著。

由SAS 9.2统计软件分析得到响应值Y的最大估计值为5.98%,此时提取功率、提取时间、料液比对应的

编码值分别为 $X_1=0.606882$ 、 $X_2=0.106907$ 、 $X_3=0.160032$,即提取功率300.978 W,提取时间为1.590 min,料液比为1:32.689。为实验方便性选择提取功率300 W,提取时间为96 s,料液比为1:33 (g/mL),对核桃隔膜皂苷提取进行验证实验得到实际提取得率为5.83%,与预测值非常接近,相对误差为2.5%。

2.5 乌皮香核桃隔膜抗氧化性分析

DPPH·是一种以氮为中心的稳定紫色自由基,在620 nm处有强吸收。ABTS与一定浓度的过硫酸钾在暗处反应12~16 h经活性氢氧化生成稳定的蓝绿色阳离子自由基ABTS⁺,若加入具有抗氧化活性物质会与之发生褪色反应^[15]。核桃隔膜皂苷的抗氧化活性实验结果如表5所示。从表5可以看出,核桃隔膜提取物对自由基清除率随质量浓度的增加而增强,呈一定的线性关系, R^2 分别为0.8915和0.9938。

3 结论

根据Box-Benhnken的中心组合实验设计原理,在单因素实验的基础上,采用了3因素3水平的响应面分析方法,对核桃隔膜皂苷的提取工艺进行了优化,确定核桃隔膜中皂苷最佳提取工艺参数为:提取功率300 W,提取时间为96 s,料液比为1:33 (g/mL)。在此条件下测得的实际提取得率为5.83%,与预测值的相对误差为2.5%。同时得到了核桃皂苷提取得率与各因素变量的二次多项式回归方程,该模型回归极显著,实验拟合较好。因此利用响应面法优化核桃隔膜皂苷提取条件是可行的。抗氧化活性实验表明,核桃皂苷对自由基清除效果明显,有较强的抗氧化活性,核桃隔膜提取物对自由基清除率随质量浓度的增加而增强,呈一定的线性关系, R^2 分别为0.8915和0.9938。

参考文献

- [1] 郝容庭,张毅萍. 中国核桃[M]. 北京:中国林业出版社,1992.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 中药大辞典:上册[M]. 北京:人民卫生出版社,1975:667.
- [3] 景援朝,赵焕新,白虹. 分心木的研究进展[J]. 药学研究, 2014(3):167-169.
- [4] 李福双,申健,谭桂山. 胡桃属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药,2007,29(10):1490-1495.
- [5] 杨明珠,田新雁,肖朝江,等. 核桃分心木化学成分与生物

表5 乌皮香核桃提取物清除DPPH、ABTS自由基能力

Table 5 Antioxidant effect and scavenging capacity against DPPH、ABTS⁺ of Wu walnut

样品浓度(μg/mL)	DPPH清除率(%)		ABTS清除率(%)
	乌皮香核桃提取物	BHT	
0.5	27.166±0.891 ^c	8.619±0.122 ^c	11.989±0.114 ^c
1.0	33.857±0.917 ^c	22.378±1.021 ^d	20.853±0.604 ^d
1.5	35.033±0.934 ^d	26.998±0.923 ^c	33.029±0.065 ^c
2.0	36.148±0.762 ^b	30.524±0.165 ^d	46.255±0.992 ^b
2.5	44.234±0.855 ^a	50.721±0.066 ^a	54.259±1.145 ^a
线性方程	$y=3.6427x+24.360$	$y=9.2350x+0.1430$	$y=10.994x-0.2944$
R^2	0.8915	0.9163	0.9938

注:每列不同小写字母表示具有显著性差异, $p<0.05$ 。

(下转第256页)

30-37.

- [5] 杨霞,张志胜,郑乾魏,等. 超临界CO₂萃取南美白对虾虾青素的工艺优化[J]. 农业工程学报,2013,29(1):294-300
- [6] 施佳慧,吕桂善,徐同成,等. 磷虾油的脂肪酸成分及其降血脂功能研究[J]. 营养学报,2008,30(1):115-116.
- [7] 董志俭,王庆军,李学鹏,等. 虾油旋转蒸发降盐过程中风味物质的变化[J]. 中国食品学报,2014,14(4):231-237.
- [8] Pu J,Bechtel P J,Sathivel S. Extraction of shrimp astaxanthin with flaxseed oil:Effects on lipid oxidation and astaxanthin degradation rates[J]. Biosystems Engineering,2010,107(4):364-371.
- [9] Sánchez-Camargo A P,Meireles M Â A,Ferreira A L K,et al. Extraction of ω-3 fatty acids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste using supercritical CO₂+ethanol mixtures[J]. The Journal of Supercritical Fluids,2012,61:71-77.
- [10] Handayani A D,Sutrisno,Indraswati N,Ismadji S. Extraction of astaxanthin from giant tiger(Panaeus monodon) shrimp waste using palm oil:studies of extraction kinetics and thermodynamic[J]. Bioresource Technology,2008,99(10):4414-4419.
- [11] Peralta E M,Hatate H,Kawabe D,et al. Improving antioxidant activity and nutritional components of Philippine salt-fermented shrimp paste through prolonged fermentation[J]. Food Chemistry,2008,111(1):72-77.
- [12] 冯滢滢,段杉,李远志. 食盐浓度对虾油风味成分形成的影响研究[J]. 现代食品科技,2013,29(2):269-273.
- [13] Sachindra N M, ahendrakar N S. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils[J]. Bioresource Technology,2005,96(10):1195-1200.
- [14] Cheung I W, Li-Chan E C. Application of taste sensing system for characterisation of enzymatic hydrolysates from shrimp processing by-products[J]. Food Chemistry,2014,145:1076-1085.

- [15] Shih I-L,Chen L-G,Yu T-S,et al. Microbial reclamation of fish processing wastes for the production of fish sauce[J]. Enzyme and Microbial Technology,2003,33(2-3):154-162.
- [16] González-Félix M L, da Silva F S D, Davis D A, et al. Replacement of fish oil in plant based diets for Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei)[J]. Aquaculture,2010,309(1-4):152-158.
- [17] 童彦,雒莎莎,应铁进. 鱼蛋白水解液美拉德反应条件优化及反应前后氨基酸组成变化[J]. 中国食品学报,2011,11(8):101-106.
- [18] Sachindra N M,Bhaskar N,Siddegowda G S,et al. Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste[J]. Bioresource Technology,2007,98(8):1642-1646.
- [19] Cao W,Zhang C,Hong P,et al. Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis[J]. Food Chemistry,2008,109(1):176-183.
- [20] 高向阳. 食品分析与检验[M]. 北京:中国计量出版社,2008.
- [21] Gupta B S,Ako J E. Application of guar gum as a flocculant aid in food processing and potable water treatment[J]. European Food Research and Technology,2005,221:746-751.
- [22] Glencross B,Irvin S,Arnold S,et al. Effective use of microbial biomass products to facilitate the complete replacement of fishery resources in diets for the black tiger shrimp, Penaeus monodon[J]. Aquaculture,2014,431:12-19.
- [23] Senphan T, Benjakul S. Impact of enzymatic method using crude protease from Pacific white shrimp hepatopancreas on the extraction efficiency and compositions of lipids[J]. Food Chemistry,2015,166:498-506.
- [24] 谢主兰,陈龙,雷晓凌. 采用挥发性盐基氮动力学模型预测低盐虾酱的货架寿命[J]. 现代食品科技,2013,29(1):29-34.

(上接第251页)

- 活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2012,12:1707-1711,1728.
- [6] 王艳,迪丽达尔·马合木提,韩艳春,等. 维吾尔药核桃分心木不同提取物对肾阳虚模型小鼠的实验研究[J]. 新疆医科大学学报,2012(2):153-157.
- [7] 于海玲. 核桃楸的研究进展[J]. 延边大学医学学报,2005,28(2):154-156.
- [8] 胡爱军,罗登林,丘泰球. 超声强化超临界流体萃取机理的研究[J]. 高校化学工程学报,2005,05:11-15.
- [9] LI Quanhong, FU Caili. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein[J]. Food Chemistry,2005,92(4):701-706.
- [10] 茆诗松,王静龙,史定华,等. 统计手册[M]. 北京:科学出版社,2003:78-86.
- [11] Sun Ting, Ho CT. Antioxidant activities of buckwheat extractsp

- [J]. Food Chemistry,2005,90:743-749.
- [12] St phanie Dudonm, Xavier Vitrac, Philippe Coutire, et al. Comparative study antioxidant properties and total phenolic of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays[J]. J Agric Food Chem,2009,57:1768-1774.
- [13] Fang ZX, Zhang YH, Yuan L, et al. Phenolic compounds and antioxidant capacities of bayberry juices[J]. Food Chemistry,2009,113:884-888.
- [14] Yvonne V Yuan, Dawn E Bone, Meshell F Carrington. Antioxidant activity of dulce(Palmaria palmata) extract evaluated invitio[J]. Food Chemistry,2005,91:485-494.
- [15] 刘春红,马宇,何忠梅,等. 平贝母多糖的分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2011,32(21):2-33.