

苹果渣多酚超声波提取工艺 及其抗氧化性研究^{*}

李志西, 李元瑞, 葛 蕾, 司翔宇

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 通过正交试验确定了苹果渣多酚化合物提取的优化工艺条件, 并对提取物的抗氧化性进行了研究。结果表明: 乙醇浓度、超声功率和提取时间对提取效果影响显著, 其优化工艺条件为乙醇浓度 70%, 超声功率 225 W, 提取时间 20 min。苹果渣多酚提取物对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除能力与脂质过氧化的抑制作用测定结果表明, 苹果渣多酚提取物对清除羟自由基和抑制脂质过氧化均有较强的作用, 清除率和抑制率分别达到 91.1% 和 93.4%。

[关键词] 苹果渣; 超声提取; 多酚; 抗氧化性

[中图分类号] S661.109.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)08-0131-04

苹果渣是果汁厂榨汁后产生的下脚料, 长期以来, 果汁厂将其作为废渣抛弃, 造成了环境的极大污染和资源的严重浪费。研究发现^[1], 苹果渣中含有多酚类化合物。苹果多酚是苹果中所含多元酚类物质的通称, 主要包括绿原酸、儿茶素、表糖儿茶素、苹果缩合丹宁、根皮苷、槲皮苷、原花青素等^[1]。药理研究表明, 苹果多酚具有预防龋齿、高血压、过敏反应, 抗肿瘤、突变, 阻碍紫外线吸收等多种保健功能; 同时还具有抗氧化、消臭、保鲜、护色、防止维生素损失等作用^[2,3]。苹果多酚主要存在于果皮中, 苹果加工企业排出的果渣中绝大部分是果皮, 所以, 果渣中多酚含量非常丰富。本研究以苹果渣为原料, 采用超声波提取法研究了苹果多酚的提取工艺, 并对提取物的抗氧化性进行了研究, 以期苹果多酚的开发和苹果渣的综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

苹果渣: 由陕西海升果业发展股份有限公司(乾县)提供。为了防止氧化, 将刚刚榨汁后的苹果渣立即放入液氮罐中保藏, 真空冷冻干燥后密封冷藏备用。

试剂: 原儿茶酸为 Sigma 公司产品, 正己烷、乙

醇、钨酸钠、钼酸钠、硫酸锂、磷酸、碳酸钠、硫代巴比妥酸、卵磷脂等试剂均为国产分析纯。

主要仪器: 超声洗涤仪(昆山市超声仪器有限公司), 751-GD 紫外可见光分光光度计(上海分析仪器总厂), 冷冻干燥仪, 旋转蒸发器。

1.2 方 法

1.2.1 苹果渣多酚化合物的提取 称取 10 g 干燥苹果渣置于试管中, 加正己烷脱蜡两次, 然后分别加入体积分数 50%, 70% 和 90% 乙醇, 在 20℃ 条件下采用 180, 225 和 250 W 超声波提取 2 次, 料液比 1:20。将提取液离心分离, 合并上清液, 减压回收乙醇得浓缩液, 将浓缩液真空冷冻干燥, 所得固体干燥物置于 4~6℃ 冰箱中保存, 待测。

1.2.2 苹果渣多酚化合物提取条件的优化 本研究着重考察溶剂浓度(A)、超声功率(B)、提取时间(C)3 个主要影响因素。选用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计对苹果渣多酚提取条件进行优化, 因素水平见表 1。

1.2.3 多酚含量的测定^[4] (1) 标准曲线的制作。配制 100 mg/L 原儿茶酸标准溶液。分别吸取 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL 原儿茶酸标准溶液, 加入 1 mL Folin-酚显色剂, 5 mL 1 mol/L 碳酸钠水溶液, 用蒸馏水定容至 10 mL, 混合均匀后, 室温下避光放置 1 h, 用 751-GD 紫外可见光分光光度计

^{*} [收稿日期] 2004-11-11

[基金项目] 陕西省“十五”攻关项目(2001K04-G10-02); 陕西省农业重点技术推广项目(2001-1-3-16)

[作者简介] 李志西(1958-), 男, 陕西临潼人, 教授, 在职博士, 主要从事天然产物与谷物功能食品研究。

[通讯作者] 李元瑞(1943-), 男, 河南荥阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品工程高新技术研究。

在 760 nm 处测定吸光值。以吸光值(A)对原儿茶酸浓度(C)进行线性回归分析,求得回归方程和相关系数分别为 $A = 0.0716C - 0.0097$ 和 $r = 0.997$ ($P < 0.01$)。分析表明,原儿茶酸质量浓度在 $0.002 \sim 0.012$ mg/mL 时与吸光值具有良好的线性关系。

(2) 样品中多酚含量的测定。准确称取 40 mg 苹果渣多酚化合物固体提取物,用蒸馏水溶解并定容至 5 mL,取 1 mL 按标准曲线制作方法测定吸光值,计算多酚含量。

表 1 影响苹果渣多酚化合物提取的因素水平表

Table 1 Effective factors and levels for extracting polyphenols in apple pomace

水平 Levels	因素 Factors		
	溶剂 浓度(A)/% Percent of solvent	超声 功率(B)/W Power of ultrasonics	提取 时间(C)/min Period of treatment
1	50	180	10
2	70	225	20
3	90	250	30

1.2.4 苹果渣中多酚类化合物的抗氧化作用

(1) 对·OH 的清除作用^[5,6]。在 10 mL 硬质试管中依次加入 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.4) 缓冲液 0.4 mL,一定量的多酚提取物,2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)乙醇溶液,1.04 mmol/L EDTA-1 mmol/L $\text{FeSO}_4\text{-1 mmol/L Vc}$ 0.1 mL,12 mmol/L H_2O_2 0.1 mL,60 mmol/L 脱氧核糖(DR) 0.05 mL,定容至

1.0 mL。然后将试管置于 37 °C 恒温水浴锅中保持 1 h,取出,迅速添加 10% 三氯乙酸(TCA) 1 mL 及 1% 硫代巴比妥酸(TBA) 1 mL,在 100 °C 沸水中加热 15 min,取出,冷却,然后于 532 nm 处测吸光值。按下式计算清除率:

清除率/% = $[A_{\text{模型}} - (A_{\text{DR}} - A_{\text{样品}})] / A_{\text{模型}} \times 100\%$,
式中, $A_{\text{模型}}$ 为模型管吸光值(不加样品); A_{DR} 为加入样品和 DR 后的吸光值; $A_{\text{样品}}$ 为样品吸光值(不加 DR)。

(2) 对脂质过氧化的抑制作用^[7]。取 0.2 mL 卵磷脂溶液,加入一定量的多酚提取物,BHT 的乙醇溶液,50 μL 50 mmol/L FeSO_4 溶液,0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4),定容至 3 mL,37 °C 恒温水浴锅中保持 40 min,然后加入 1 mL 10% TCA 和 1 mL 1% TBA,摇匀,100 °C 水浴 15 min,5 000 r/min 下离心 10 min,于 532 nm 处测定吸光值,用蒸馏水做空白对照。

抑制率/% = $(A_{\text{模型}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{模型}} \times 100\%$,
式中, $A_{\text{模型}}$ 为模型管的吸光值; $A_{\text{样品}}$ 为样品的吸光值。

2 结果与分析

2.1 苹果渣中多酚化合物提取工艺条件的确定

本研究以乙醇为溶剂,采用正交试验方法研究超声波提取苹果渣多酚的优化工艺条件,结果见表 2。

表 2 苹果渣中多酚化合物提取试验结果及计算表

Table 2 Extraction results of polyphenols in apple pomace and range calculation

实验号 Number of experiment	溶剂浓度(A)/% Percent of solvent	超声功率(B)/W Power of ultrasonics	提取时间(C)/min Period of treatment	空列 (D) Blank	多酚/ (mg·kg ⁻¹) Content of polyphenols
1	1(50)	1(180)	1(10)	1	1 038.2
2	1	2(225)	2(20)	2	1 717.9
3	1	3(250)	3(30)	3	1 185.7
4	2(70)	2	3	1	2 403.4
5	2	3	1	2	2 063.0
6	2	1	2	3	2 209.6
7	3(90)	3	2	1	2 180.8
8	3	1	3	2	1 900.7
9	3	2	1	3	2 231.9
K ₁	3 941.80	5 148.50	5 333.10	5 622.40	16 931.2
K ₂	6 676.00	6 353.20	6 108.30	5 681.60	
K ₃	6 313.40	5 429.50	5 489.80	5 627.20	
k ₁	1 313.93	1 716.17	1 777.70	1 874.13	
k ₂	2 225.33	2 117.73	2 036.10	1 893.87	
k ₃	2 104.47	1 809.83	1 829.93	1 875.73	
R	911.40	401.54	258.40	19.74	

由表2可以看出,各因素列的 R 值明显大于空列的 R 值,说明各因素对苹果渣中多酚化合物的提取均有明显的影响。比较 R 值的大小可以看出,因素的影响顺序为溶剂浓度>超声功率>提取时间。比较 K 值的大小可以看出,多酚提取的优化条件是 $A_2B_2C_2$,即乙醇浓度70%,超声功率225 W,提取时间20 min。

为进一步确定各因素对提取率的影响程度,对表2中的多酚含量进行方差分析和显著性检验。结果表明,溶剂浓度、超声功率对多酚提取率的影响达极显著水平($P < 0.01$),提取时间的影响达显著水平($P < 0.05$)。

2.2 苹果渣中多酚类化合物的抗氧化作用

2.2.1 提取物对 $\cdot OH$ 的清除作用 $\cdot OH$ 是活性氧中最活泼的氧自由基之一,它几乎能与活细胞中任何分子发生反应,可介导机体组织脂质过氧化,蛋白质解聚、聚合,核酸断裂和多糖裂解等生化过程,引发组织细胞病变,导致各种疾病发生和加速机体

衰老。减少此类自由基可预防衰老、心血管疾病,并具有防癌抗癌的作用^[8]。

以常用抗氧化剂BHT为参照,测定提取物对 $\cdot OH$ 的清除作用,结果见图1。由图1可知,多酚提取物和BHT对 $\cdot OH$ 均有较强的清除能力,且清除率随提取物加入量的增加而增大。在浓度相同(BHT浓度与提取物中多酚浓度相同)条件下,多酚提取物清除 $\cdot OH$ 的能力明显高于BHT。在反应体系中加入10 μL 提取液的清除率达到82.0%,当提取液加入量为50 μL 时,清除率可达到91.1%。

2.2.2 提取物对脂质过氧化的抑制作用 脂质过氧化是动脉粥样硬化的病因之一,其最终产物MDA可使膜蛋白、酶发生交联反应,使膜通透性增加,导致细胞膜结构、功能和代谢发生变化,对人体危害极大^[8]。本研究以卵磷脂溶液为脂质过氧化体系,测定提取物对脂质过氧化的抑制作用,结果见图2。

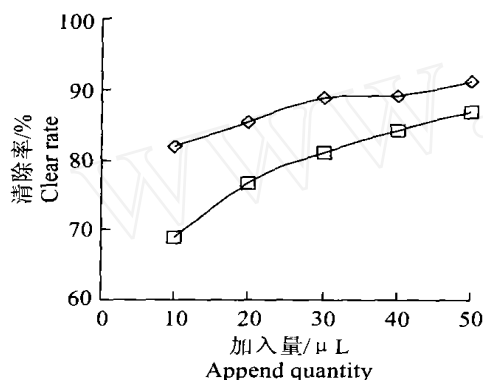


图1 苹果渣多酚提取物及BHT对 $\cdot OH$ 的清除作用

-◇-, 提取物; -□-, BHT

Fig 1 Clear effects on hydroxyl radical of BHT and polyphenols in apple pomace

-◇-, Extract; -□-, BHT

由图2可以看出,多酚提取物和BHT对脂质过氧化体系均有抑制作用,且抑制作用随提取物加入量的增大而增强。多酚提取物对脂质过氧化的抑制率随加入量的增加增幅很快,BHT的抑制率则增加缓慢。加入量超过30 μL 以后,两者抑制率无显著差异,当加入量为50 μL 时,多酚提取物的抑制率可高达93.4%。

3 小结与讨论

(1) 本文采用超声波提取法提取苹果渣中的多

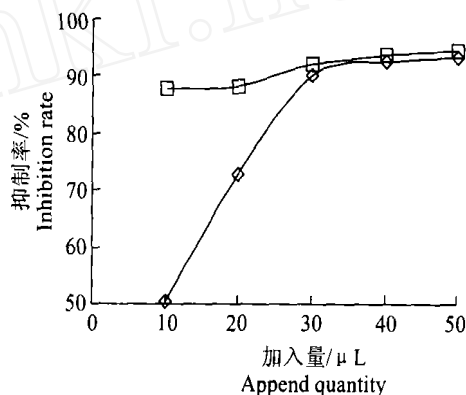


图2 苹果渣多酚提取物及BHT对脂质过氧化体系的抑制作用

-◇-, 提取物; -□-, BHT

Fig 2 Inhibition effects on lipid radical of BHT and polyphenols in apple pomace

-◇-, Extract; -□-, BHT

酚物质,超声波是频率高于20 kHz的弹性波,利用超声振动能量可加速改变物质组织结构、状态和功能。与热回流方法相比,超声提取可以大大缩短提取时间,而且低温提取还有利于有效成分的保护,具有能耗低、效率高和不破坏有效成分的特点^[9]。研究表明,超声波提取法对多酚物质的提取非常有效。

(2) 通过对苹果渣多酚提取物与BHT抗氧化作用的对比试验发现,多酚提取物对清除羟自由基和抑制脂质过氧化均有较强的作用。一般认为,多酚类物质的酚羟基是良好的电子提供者,因此可以表

现出较好的清除羟自由基和中断脂质氧化链式反应的能力。近年来许多研究表明^[10], 合成抗氧化剂对人体有危害, 如 BHA 对白鼠有致癌作用, BHT 可引起动物肝脏增大等, 现已限制或停止使用。苹果渣多酚提取物是天然产物, 安全无毒, 可用于保健食品生产或作为食品抗氧化剂, 市场前景广阔。

(3) 本文采用正交试验对影响苹果渣多酚的超声提取工艺条件进行了优化, 确定了其优化提取条件: 乙醇浓度 70%, 超声功率 225 W, 提取时间 20 min。抗氧化试验证明, 苹果渣多酚提取物对清除羟自由基和抑制脂质过氧化均有较强作用, 是一种良好的自由基清除剂和抗氧化剂。

[参考文献]

- [1] Maria Garcia Alonso, Sonia de Pascual Teresa, Celestion Santos Buelga, et al Evaluation of the antioxidant properties of fruits[J]. FC, 2004, 84: 13- 18
- [2] 孔繁东, 侯春青 苹果多酚的开发与应用[J]. 中国果菜, 2001, (2): 26
- [3] 武长柱 苹果多酚的功效研究及应用展望[J]. 彭城职业大学学报, 1999, 14(4): 92- 93
- [4] Singleton V L, Rossi J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents[J]. Am J Enol Vitic, 1965, 32: 58- 63
- [5] Halliwell B, Gutteridge J M C, Aruoma O I The deoxyribose method: a simple "Test Tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radical[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 165: 215- 219
- [6] 李小定, 荣建华, 吴谋成 灰树花多糖 PGF-1 体外对羟基的抑制作用[J]. 食品科学, 2003, 24(7): 126- 130
- [7] 吕晓玲, 朱惠丽, 姜平平, 等 紫苏提取物抗氧化活性体外实验研究[J]. 中国食品添加剂, 2003, 5(5): 22- 25
- [8] 方允中, 郑荣梁 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [9] 季大洪, 苏瑞强, 王 颖 高新工程技术在中药提取分离中的应用[J]. 时针国医药, 2000, 11(4): 369- 370
- [10] 徐雅琴, 于泽源, 任华峰 红树莓叶片中黄酮类物质提取及抗氧化性研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(5): 69- 70

Study on ultrasonic extraction of polyphenols in apple pomace and its antioxidational effects

L I Zhì-xi, L I Yuan-rui, G E L ei, S I X àng-yu

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The optimal conditions of polyphenol extraction from apple pomace were identified by using orthogonal test. The results showed that the alcohol concentration, ultrasonic power, and ultrasonic treatment time had significant effects on polyphenol extraction, and the optimizing conditions were 70% alcohol concentration, 225 W ultrasonic power, and 20 minutes of ultrasonic treatment time. Both the clearing capacity of polyphenol extract from apple pomace for hydroxyl radical and its inhibitory effect on lipid oxidation were very significant, and the clearing capacity and inhibitory rate were 91. 1% and 93. 4% respectively.

Key words: apple pomace; ultrasonic treatment; polyphenols; antioxidation