

# 桂花果实多酚的超声波提取及抗氧化活性研究

田 成

(湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北 恩施 445000)

**摘 要:** 以多酚得率为考察指标, 利用超声波处理, 通过单因素和正交试验优化桂花鲜果多酚的最佳提取工艺条件, 并对桂花果实多酚的抗氧化活性进行初步研究。结果表明: 桂花果实多酚的最佳提取工艺条件为 70% 乙醇作溶剂、料液比 1:8(g/mL)、以固定频率超声波提取 2 次、每次 40min, 桂花果实多酚的得率为 0.283%(即 2.83mg/g); 在相同质量浓度条件下, 桂花果实多酚溶液还原力明显高于 VC 溶液, 对羟自由基、亚硝酸根离子的最大清除率分别为 96.3% 和 65.4%, 并对猪油有较好的抗氧化作用。本研究为桂花资源的综合开发利用提供了一定的依据。

**关键词:** 桂花果实; 多酚; 超声波提取; 抗氧化性

## Ultrasonic Extraction and Antioxidant Activity of Polyphenols from *Osmanthus fragrans* Fruits

TIAN Cheng

(Biological Scientific and Technical College of Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China)

**Abstract:** The ultrasonic extraction of polyphenols from *Osmanthus fragrans* fruits was optimized by one-factor-at-a-time combined with orthogonal array design method to maximize extraction efficiency. The optimal extraction conditions were found to be 70% aqueous ethanol as extraction solvent at a solid-to-liquid ratio of 1:8 (g/mL) for twice repeated extraction for 40 min each time. Under these conditions, the yield of polyphenols was 2.83 mg/g. The reducing power of the obtained extract was distinctly higher than that of vitamin C at the same concentrations. Its maximum scavenging rates against hydroxyl free radicals and nitrite ions were 96.3% and 65.4%, respectively. In addition, the extract revealed stronger antioxidant effect on lard. This study could provide references for the comprehensive exploitation of *Osmanthus fragrans* fruits.

**Key words:** *Osmanthus* fruit; polyphenols; ultrasonic extraction; antioxidant activity

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)24-0106-05

桂花(*Osmanthus fragrans*)是木犀科木犀属常绿植物, 原产于中国西南部, 在四川、云南、广西、广东和湖北等地均有野生, 其果实为紫黑色椭圆形。植物多酚是一类广泛存在于植物中的多羟基酚类化合物, 主要存在于植物的皮、根、木、叶和果中<sup>[1]</sup>, 具有良好的抗癌、抗氧化、抗老化等生物活性<sup>[2-5]</sup>。目前对桂花果实多酚的研究尚未见报道, 因此本实验以新鲜桂花果实为原料, 利用超声波提取多酚类物质, 确定最佳工艺参数, 并对其抗氧化活性进行初步研究, 以发掘新的多酚类物质资源, 为天然抗氧化剂的开发提供依据, 同时为桂花资源的综合利用和深入研究提供一定的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

桂花果实 湖北省恩施市凤凰城小区。

没食子酸、硫代硫酸钠、无水乙醇、亚硝酸钠、对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺、碘化钾等均为国产分析纯。

UV765型紫外分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; DL-5型低速大容量离心机 上海安亭科学仪器厂; RE-52型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; KQ5200型超声波清洗器(超声波频率 40kHz, 功率 200W) 昆山市超声仪器有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 多酚含量的测定

##### 1.2.1.1 没食子酸标准曲线的制定<sup>[6]</sup>

以没食子酸为标样, 按照福林-酚法进行多酚含量测定, 以没食子酸质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 得回归线性方程:  $y = 0.7177x -$

收稿日期: 2011-06-30

作者简介: 田成(1974—), 男, 实验师, 硕士, 研究方向为天然产物开发。E-mail: tianchengenshi@126.com

0.0004(没食子酸的质量浓度范围为0~0.5mg/mL),  $R^2 = 0.9993$ 。

### 1.2.1.2 桂花果实多酚的提取及测定

称取一定量新鲜桂花果实, 去籽后将果肉研磨, 在固定频率超声波提取条件下, 以多酚得率为考察指标, 首先筛选出提取溶剂, 而后对提取溶剂体积分数、提取时间、料液比、提取次数为试验因素进行单因素和正交试验。将提取液经离心、浓缩后按标准曲线的测定方法测定吸光度, 根据回归线性方程计算出多酚得率。

$$\text{桂花果实多酚得率}/\% = \frac{\text{提取液多酚质量浓度} \times \text{提取液体积}}{\text{原料质量}} \times 100$$

### 1.2.2 桂花果实多酚的体外抗氧化性能研究

按1.2.1.2节中确定的最佳工艺制备桂花果实多酚提取液, 测定总多酚含量, 在冰箱中保存备用。

#### 1.2.2.1 样品还原能力的测定<sup>[7]</sup>

取不同质量浓度的桂花果实多酚溶液0.05mL于试管中, 加入2.45mL甲醇、2.5mL 0.2mol/L的磷酸盐缓冲液(pH6.6)和2.5mL 1%  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液, 混匀后在50℃保温20min, 然后加入2.5mL 10% 三氯乙酸溶液, 混匀后3000r/min离心10min, 取上清液2.5mL, 加2.5mL蒸馏水和1mL 0.1%  $\text{FeCl}_3$ , 混合均匀, 10min后在波长700nm处测定吸光度。以蒸馏水为参比溶液, 用相同质量浓度的VC溶液为阳性对照。

#### 1.2.2.2 对羟自由基清除率的测定<sup>[8]</sup>

取不同质量浓度的桂花果实多酚溶液2mL于具塞试管中, 依次加入2mL 6mmol/L  $\text{FeSO}_4$ 、2mL 6mmol/L水杨酸-乙醇溶液、2mL 6mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液, 在37℃反应30min, 然后在波长510nm处测定吸光度 $A_x$ , 并按相同方法测定未加入桂花果实多酚的溶液吸光度 $A_0$ , 未加入 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的溶液的吸光度 $A_{x0}$ , 均以蒸馏水为参比溶液。

$$\cdot\text{OH清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100$$

式中:  $A_0$ 为空白对照液的吸光度;  $A_x$ 为加入桂花果实多酚提取液的吸光度;  $A_{x0}$ 为不加 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的桂花果实多酚提取液本底的吸光度。

#### 1.2.2.3 对亚硝酸根离子( $\text{NO}_2^-$ )清除率的测定<sup>[9]</sup>

准确吸取2mL 5.0 $\mu\text{g/mL}$   $\text{NaNO}_2$ 溶液置于25mL容量瓶中, 分别加入2mL不同质量浓度的桂花果实多酚溶液后在25℃下反应30min, 然后再分别加入2mL 4g/L对氨基苯磺酸溶液, 混合均匀后于25℃下反应5min, 再分别加入1mL 2g/L盐酸萘乙二胺溶液, 用蒸馏水定容, 混

合均匀后在25℃反应15min, 然后在波长538nm处测定吸光度。按式计算 $\text{NO}_2^-$ 清除率。

$$\text{NO}_2^- \text{清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

式中:  $A_0$ 为不加样品溶液时 $\text{NaNO}_2$ 溶液的吸光度;  $A_1$ 为加入样品溶液后 $\text{NaNO}_2$ 溶液的吸光度;  $A_2$ 为不加 $\text{NaNO}_2$ 溶液时样品溶液的吸光度。

#### 1.2.2.4 对油脂抗氧化性的影响

分别称取20.00g猪油五份, 装入锥形瓶中, 一份作为空白, 另外四份加入不同质量的桂花果实多酚, 加入量分别是油质量的0.02%、0.05%、0.10%、0.20%, 混匀后, 将油放入(60 $\pm$ 1)℃的烘箱中, 每隔12h搅拌1次, 定期测定过氧化值(peroxide value, POV), 具体测定方法参见文献[10]。

## 2 结果与分析

### 2.1 桂花果实多酚提取工艺参数的确定

#### 2.1.1 不同提取溶剂对桂花果实多酚提取得率的影响

称取一定量新鲜桂花果实, 分别用60%乙醇、60%甲醇、60%丙酮、60%乙酸乙酯、蒸馏水按料液比1:8在固定频率超声波中提取2次, 每次提取30min, 结果如图1所示。

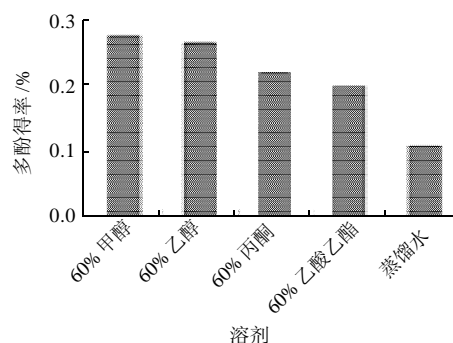


图1 溶剂对桂花果实多酚得率的影响

Fig.1 Effect of extraction solvents on extraction rate of polyphenols

由图1可知, 60%甲醇对多酚的提取效果最好, 60%乙醇次之, 但二者相差不大, 多酚是一种极性化合物, 溶剂的极性越大, 相对提取的效果越好, 甲醇极性比乙醇大, 但从安全方面、提取效果及经济成本考虑, 采用乙醇作为提取溶剂适宜。

#### 2.1.2 乙醇溶液体积分数对桂花果实多酚得率的影响

称取一定量桂花果实, 按料液比1:8分别用体积分数为40%、50%、60%、70%、80%的乙醇溶液以固定频率超声波提取两次, 每次提取时间为30min, 结果如图2所示。

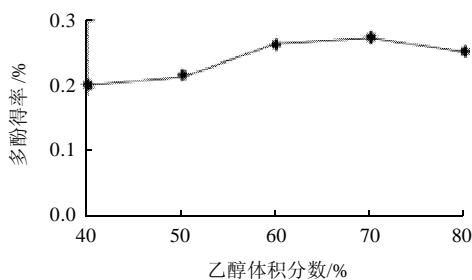


图2 乙醇溶液体积分数对桂花果实多酚得率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on extraction rate of polyphenols

由图2可知,多酚得率在一定乙醇体积分数范围内随乙醇体积分数的升高而增加,当乙醇溶液体积分数为70%时多酚得率最大,以后随乙醇溶液体积分数的增加多酚得率有所下降,这可能与桂花果实多酚的极性大小有关系,故乙醇溶液最佳体积分数为70%。

### 2.1.3 提取时间对桂花果实多酚得率的影响

在70%乙醇溶液、料液比1:8、提取次数2次条件,在固定频率超声波下处理不同时间,提取效果如图3所示。

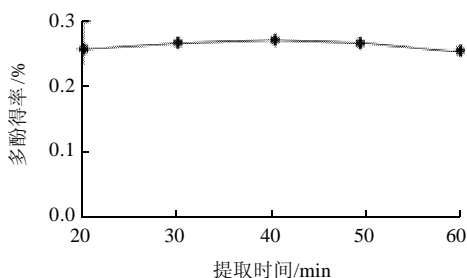


图3 提取时间对桂花果实多酚得率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on extraction rate of polyphenols

由图3可知,提取时间40min时,桂花果实多酚得率最大,以后随时间延长得率逐渐降低,可能因为提取时间过长导致温度升高,破坏了对应的分子结构,从而引起多酚得率下降。因此,选择最佳提取时间为40min。

### 2.1.4 不同料液比对桂花果实多酚得率的影响

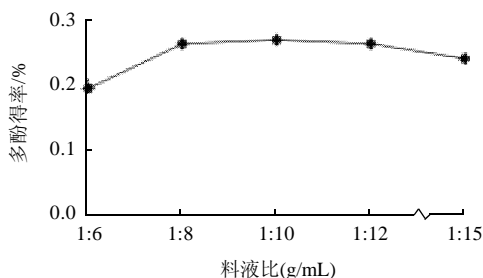


图4 料液比对桂花果实多酚得率的影响

Fig.4 Effect of solid-to-liquid ratio on extraction rate of polyphenols

在70%乙醇溶液、提取时间40min、提取次数2次条件,按不同料液比在固定频率超声波下提取,结果如图4所示。

由图4可知,桂花果实多酚提取得率随溶剂用量的增加而增大,在料液比1:10时最大,以后呈下降趋势,可能是溶剂用量增加至一定程度时,减弱了超声提取效果,从而使多酚提取得率下降,因此选择1:10为最佳料液比。

### 2.1.5 提取次数对桂花果实多酚得率的影响

在70%乙醇溶液、料液比1:10、提取时间40min条件,在固定频率超声波下提取不同次数,结果如图5所示。

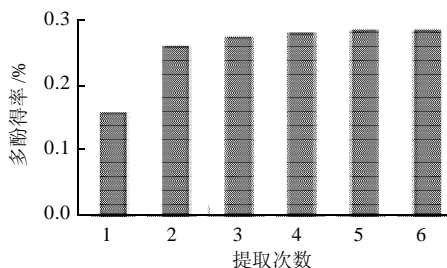


图5 提取次数对桂花果实多酚得率的影响

Fig.5 Effect of repeated extraction number on extraction rate of polyphenols

由图5可知,随着提取次数的增加桂花果实多酚析出越充分,多酚得率越大,但提取3次以后,多酚得率增加不大,说明经3次提取已将大部分多酚浸出。考虑提取效率与成本,提取3次较合理。

### 2.1.6 桂花果实多酚最佳提取工艺参数的优选

在单因素试验的基础上,进行乙醇溶液体积分数、提取时间、料液比、提取次数四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验,结果见表1。

表1 桂花果实多酚提取正交试验设计及结果

Table 1 Orthogonal array design matrix and results

| 试验号   | A 乙醇体积分数/% | B 提取时间/min | C 料液比(g/mL) | D 提取次数 | 多酚得率/% |
|-------|------------|------------|-------------|--------|--------|
| 1     | 60         | 30         | 1:8         | 2      | 0.267  |
| 2     | 60         | 40         | 1:10        | 3      | 0.250  |
| 3     | 60         | 50         | 1:12        | 4      | 0.213  |
| 4     | 70         | 30         | 1:10        | 4      | 0.277  |
| 5     | 70         | 40         | 1:12        | 2      | 0.266  |
| 6     | 70         | 50         | 1:8         | 3      | 0.275  |
| 7     | 80         | 30         | 1:12        | 3      | 0.216  |
| 8     | 80         | 40         | 1:8         | 4      | 0.250  |
| 9     | 80         | 50         | 1:10        | 2      | 0.213  |
| $k_1$ | 0.243      | 0.253      | 0.264       | 0.249  |        |
| $k_2$ | 0.273      | 0.255      | 0.247       | 0.247  |        |
| $k_3$ | 0.226      | 0.234      | 0.232       | 0.247  |        |
| R     | 0.047      | 0.021      | 0.032       | 0.002  |        |

由表1极差分析可知,影响桂花果实多酚得率的主次顺序为 $A > C > B > D$ ,即乙醇溶液体积分数>料液

比>提取时间>提取次数,最佳提取工艺参数为 $A_2B_2C_1D_1$ ,即在固定率超声波下,以70%乙醇为溶剂,按料液比1:8提取2次,每次时间为40min,此条件下桂花鲜果多酚得率为0.283%(即2.83mg/g)。

## 2.2 桂花果实多酚抗氧化活性的研究

### 2.2.1 桂花果实多酚的还原能力

还原能力与抗氧化活性之间有显著的相关性,因此通过对还原能力的测定可了解其抗氧化活性的大小<sup>[11-12]</sup>。在波长700nm处测得的吸光度越大,表明其还原能力越强。由图6可知,在实验质量浓度范围内,桂花果实多酚和VC的还原能力随质量浓度的增大而增强,在相同的质量浓度条件下,桂花果实多酚的还原力要强于VC,说明桂花果实多酚有较强的还原能力。同时根据图6中的回归方程,可计算出VC和桂花果实多酚的 $IC_{50}$ ( $A_{700nm}$ 达到0.5时的样品质量浓度)分别为44.36 $\mu$ g/mL和38.60 $\mu$ g/mL。

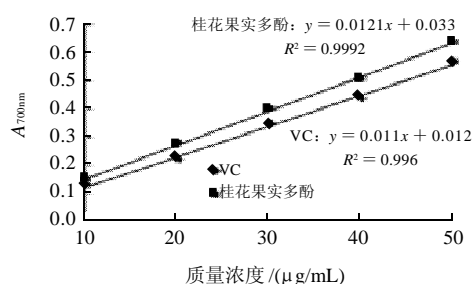


图6 VC与桂花果实多酚还原能力的比较

Fig.6 Comparison of reducing power between polyphenols from *Osmanthus fragrans* fruits and vitamin C

### 2.2.2 桂花果实多酚对羟自由基的清除作用

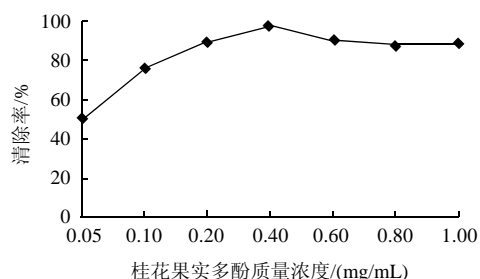


图7 桂花果实多酚对羟自由基的清除效果

Fig.7 Scavenging capacity of polyphenols from *Osmanthus fragrans* fruits on hydroxyl free radicals

羟自由基是高反应性自由基,反应距离短,速度快,攻击力强,几乎能与细胞中任何分子发生反应,使细胞坏死或发生突变,导致多种疾病的产生<sup>[13]</sup>。桂

花果实多酚对羟自由基的清除效果如图7所示。桂花果实多酚对羟自由基的清除作用明显,在多酚质量浓度为0.05~0.4mg/mL时,清除率随质量浓度的增加而增大,在0.4mg/mL时有最大清除率96.3%,说明桂花果实多酚是一种有效的羟自由基清除剂。图7表明桂花果实多酚对羟自由基的 $IC_{50}$ 为0.05mg/mL。

### 2.2.3 桂花果实多酚对亚硝酸根离子( $NO_2^-$ )的清除作用

亚硝胺是最强的化学致癌物之一,而亚硝酸盐在人体中适于合成亚硝胺,因此,清除亚硝酸盐可有效的防止亚硝胺致癌<sup>[14]</sup>。桂花果实多酚对亚硝酸根离子的清除效果如图8所示,在质量浓度范围0.05~1.00mg/mL内,桂花果实多酚对亚硝酸根离子均有一定的清除作用,并呈明显的量效关系,清除率随着质量浓度的增加而增大,最大清除率为65.4%,同时根据图8中的回归方程可计算桂花果实多酚对亚硝胺的 $IC_{50}$ 为0.67mg/mL。

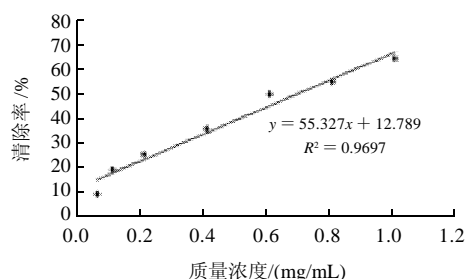


图8 桂花果实多酚对亚硝酸根离子的清除效果

Fig.8 Scavenging capacity of polyphenols from *Osmanthus fragrans* fruits on nitrite ions

### 2.2.4 油脂抗氧化实验

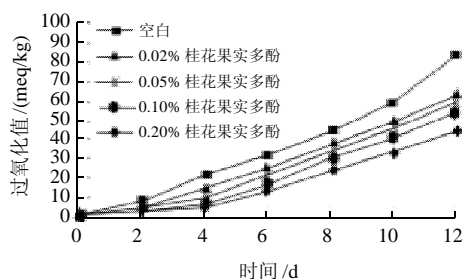


图9 桂花果实多酚对猪油的抗氧化效果

Fig.9 Antioxidant effect of polyphenols from *Osmanthus fragrans* fruits on lard

由图9可以看出,桂花果实多酚对猪油有明显的抗氧化作用,在60℃放置12d,所有猪油样品的过氧化值均呈上升趋势,与空白对照相比,不同添加量的桂花果实多酚均有明显的抗氧化能力,并呈明显的量效关系。在0~4d,不同添加量的桂花果实多酚的过氧化值

差距很小,随着贮存时间的延长,各种添加量的猪油的过氧化值的差距增大,这说明桂花果实多酚对猪油的抗氧化能力在逐渐增强。

### 3 结 论

通过对影响桂花果实多酚提取效果的乙醇体积分数、提取时间、料液比、提取次数进行单因素和正交试验,确定桂花果实多酚的最佳提取工艺参数为以70%乙醇作为提取溶剂、料液比1:8(g/mL)、在固定频率超声波下提取2次、每次提取时间40min,鲜样得率可达0.283%(即2.83mg/g)。

抗氧化试验表明,在试验质量浓度范围内,桂花果实多酚的还原能力随质量浓度的增大而增强,在相同的质量浓度条件下,桂花果实多酚的还原力要强于VC;桂花果实多酚对羟自由基、亚硝酸根离子的最大清除率分别为96.3%、65.4%,具有良好的清除作用,并有明显的量效关系;桂花果实多酚对猪油有明显的抗氧化作用,其抗氧化作用在一定浓度范围内随多酚用量的增加而增强。因此,桂花果实多酚是一种优良的天然抗氧化剂。

### 参考文献:

- [1] 孙达旺. 植物单宁化学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992.
- [2] WEBER M L. New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2009, 35(1): 57-68.
- [3] JAVED S, MEHROTRA N K, SHUKLA Y. Chemopreventive effects of black tea polyphenols in mouse skin model of carcinogenesis[J]. *Biomed Environ Sci*, 1998, 11(4): 307-313.
- [4] AVIRAM M, FUHRMAN B. Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis[J]. *Atherosclerosis*, 1998, 137(1): 45-50.
- [5] ATMANI D, CHAHER N, BERBOUCHA M, et al. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants[J]. *Food Chemistry*, 2009, 112(2): 303-309.
- [6] SLINKARD K, SINGLETON V L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1977, 28(1): 49-55.
- [7] OYAIZU M. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography[J]. *Food Composition and Analysis*, 1988, 35(11): 771-775.
- [8] SMIRNOFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [9] 王叔淳. 食品卫生检验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1988: 196—197.
- [10] 国家粮食局西安油脂食品及饲料质量监督检验测试中心. GB/T5538—2005 动植物油脂过氧化值测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [11] YEN G C, DUH P D, TSAI C L. Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls[J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41(1): 67-70.
- [12] DUH P D, YEN G C. Antioxidative activity of three herbal water extracts [J]. *Food Chemistry*, 1997, 60(4): 639-645.
- [13] RIMM E B, ASCHERIO A, GIOVANNUCCI E, et al. Vegetable, fruit, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men[J]. *The Journal of the American Medical Association*, 1996, 275(6): 447-451.
- [14] 陈忻, 刘爱文, 陈纯馨, 等. 壳聚糖及其衍生物对亚硝化反应的抑制作用[J]. *精细化工*, 2005, 22(3): 209-211.