

综合利用

油梨粕中总黄酮提取工艺优化及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究

陶阿丽,冯学花,宋祖荣,周婉婉,陈涛,汝彩云

(安徽新华学院药学院,合肥230088)

摘要:采用单因素试验和响应面法对油梨粕中总黄酮的提取工艺进行优化,并研究其抑制 α -葡萄糖苷酶活性作用。结果表明:油梨粕总黄酮最佳提取工艺条件为提取温度65℃、提取时间27 min、乙醇体积分数60%、液料比30:1、提取次数1次,此条件下油梨粕总黄酮得率可达9.25%;油梨粕总黄酮提取物具有较好的抑制 α -葡萄糖苷酶活性作用。

关键词:油梨粕;总黄酮;提取工艺; α -葡萄糖苷酶;活性抑制

中图分类号:TS224;TQ936

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)01-0121-05

Optimization of extraction process of total flavonoids from *Persea americana* Mill. meal and its inhibitory effect on α -glucosidase activity

TAO Ali, FENG Xuehua, SONG Zurong, ZHOU Wanwan,
CHEN Tao, RU Caiyun

(College of Pharmacy, Anhui Xinhua University, Hefei 230088, China)

Abstract: The extraction process of total flavonoids from *Persea americana* Mill. meal was optimized by single factor experiment and response surface methodology, and its inhibitory effect on α -glucosidase activity was studied. The results showed that the optimal extraction conditions of total flavonoids from *Persea americana* Mill. meal were obtained as follows: extraction temperature 65 °C, extraction time 27 min, volume fraction of ethanol 60%, ratio of liquid to material 30:1 and extraction times once. Under the optimal conditions, the yield of total flavonoids reached 9.25%. The total flavonoids extract of *Persea americana* Mill. meal had a good inhibitory effect on α -glucosidase activity.

Key words: *Persea americana* Mill. meal; total flavonoids; extraction process; α -glucosidase; activity inhibition

油梨(*Persea americana* Mill.),又名牛油果、鳄梨、酪梨等,原产于中美洲、墨西哥热带湿润地区或热带高原,是一种木本油料树种^[1]。研究表明,油梨具有良好的抗病毒、抗氧化、保肝等生物活性,富含多种天然活性成分,包括萜类、黄酮、生物碱、甾体、类胡萝卜素、高级脂肪酸及衍生物等^[2-5]。油梨中的黄酮类

物质具有一定的降糖作用,可有效阻碍葡萄糖扩散以及抑制 α -葡萄糖苷酶活性^[6-7],可作为绿色、天然降血糖食品。近年来,油梨的开发多集中于油梨油提取,其副产物油梨粕未得到充分利用。目前,关于油梨粕的研究少见报道^[8],对油梨粕中黄酮类物质的提取研究和生物利用亦鲜见报道。

本文以油梨果肉脱脂后的油梨粕为研究对象,对油梨粕中的黄酮类物质进行提取,通过响应面法^[9-10]获得油梨粕中总黄酮的最佳提取工艺条件。初步研究油梨粕中总黄酮提取物抑制 α -葡萄糖苷酶活性作用,以期为油梨的深入开发和资源利用提供理论指导。

收稿日期:2017-04-18;修回日期:2017-09-14

基金项目:安徽省教育厅高校优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2016395);安徽新华学院校级科研团队项目(2016td016);安徽新华学院校级科研重点项目(2016zr008)

作者简介:陶阿丽(1983),女,副教授,硕士,研究方向为基础化学与天然产物开发(E-mail)taoali84@163.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料

油梨粕(将油梨鲜果洗净去籽,干燥至恒重后粉碎过筛。加石油醚脱脂后得油梨粕,烘干至恒重备用);芦丁对照品(中国食品药品检定研究院); α -葡萄糖苷酶,4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG),阿卡波糖(美国 Sigma 试剂公司);其他试剂均为分析纯。

FY130 型中药粉碎机,DZF-6020 型恒温鼓风干燥箱,1510 型酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司),UV-4802S 型紫外可见分光光度仪(尤尼柯仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 芦丁标准曲线绘制

精密称取芦丁对照品 10 mg,用 70% 乙醇溶解后定容至 50 mL,即得质量浓度为 0.200 mg/mL 芦丁标准溶液。精密吸取芦丁标准溶液 0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 mL,分别移入 25 mL 容量瓶中,各加入 70% 乙醇溶液至 10 mL,继续分别加入 5% NaNO_2 溶液 1.00 mL,摇匀后静置 6 min,再各加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1.00 mL,摇匀后静置 6 min。最后分别加入 1.0 mol/L NaOH 溶液 10 mL,加蒸馏水定容至刻度,静置 15 min。以不添加芦丁对照品为空白,在波长 510 nm 处测量吸光度 A 。以芦丁溶液质量浓度 c 为横坐标,以吸光度 A 为纵坐标,得标准曲线方程为 $A = 0.1012c + 0.2258$, $R^2 = 0.9932$ 。

1.2.2 油梨粕总黄酮的提取

准确称取 1.0 g 脱脂干燥后的油梨粕,以乙醇为溶剂,在圆底烧瓶中进行恒温浸提。抽滤取滤液,即得待测样品。按照 1.2.1 方法,吸取适量提取液测定吸光度,根据 1.2.1 所得标准曲线方程计算总黄酮质量浓度,按下式计算油梨粕总黄酮得率^[11-12]。

$$\text{总黄酮得率} = \frac{C \times V}{m} \times 100\%$$

式中: C 为油梨粕提取液中总黄酮质量浓度,mg/mL; V 为提取液体积,mL; m 为油梨粕质量,g。

1.2.3 油梨粕总黄酮提取物抑制 α -葡萄糖苷酶活性试验^[13-14]

在 96 孔板中,将磷酸缓冲液(pH 6.8)50 μL 、 α -葡萄糖苷酶溶液(酶活力 0.2 U/mL)10 μL 和待测样品溶液 50 μL 混合,于 37 $^\circ\text{C}$ 反应 15 min,之后加入 PNPG 溶液(2.5 mmol/L)20 μL ,于 37 $^\circ\text{C}$ 反应 15 min。最后加入 Na_2CO_3 溶液(0.2 mol/L)80

μL 终止反应。在波长 405 nm 处测量吸光度 A 。以阿卡波糖为阳性对照,并按下式计算酶活性抑制率。

$$\text{酶活性抑制率} = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 100\%$$

式中: A_1 为样品 + 缓冲液的吸光度; A_2 为样品 + 缓冲液 + α -葡萄糖苷酶的吸光度; A_3 为 α -葡萄糖苷酶 + 缓冲液的吸光度; A_4 为空白组(缓冲液)吸光度。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取温度对油梨粕总黄酮得率的影响

称取 5 份 1.0 g 的油梨粕,按照液料比 30:1,各加入 70% 乙醇 30 mL,分别在 30、40、50、60、70 $^\circ\text{C}$ 水浴提取 20 min,抽滤后即得总黄酮提取液,平行试验 3 次取平均值。考察提取温度对油梨粕中总黄酮得率的影响,结果见图 1。

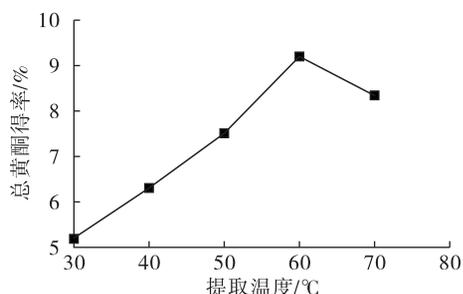


图 1 提取温度对油梨粕总黄酮得率的影响

由图 1 可知,在提取温度 30~60 $^\circ\text{C}$ 时,提取温度升高可增加总黄酮得率,在 60 $^\circ\text{C}$ 时总黄酮得率达到最高,随后总黄酮得率降低。升高温度,导致黄酮类物质溶出速度加快,因此黄酮溶解度增大。然而,过高的温度会导致黄酮类物质的水解或相互转化,反而造成黄酮得率降低^[15]。因此,在响应面试验中选取 50、60、70 $^\circ\text{C}$ 作为提取温度的 3 个水平。

2.1.2 提取时间对油梨粕总黄酮得率的影响

称取 5 份 1.0 g 的油梨粕,按照液料比 30:1,各加入 70% 乙醇 30 mL,分别在 60 $^\circ\text{C}$ 水浴提取 10、20、30、40、50 min,抽滤后即得总黄酮提取液,平行试验 3 次取平均值。考察提取时间对油梨粕总黄酮得率的影响,结果见图 2。

由图 2 可知,随着提取时间的延长,总黄酮得率呈现先增加后降低的趋势。提取时间为 20 min 时总黄酮得率最高,为 9.20%。分析其原因,可能是提取时间过长导致黄酮类物质发生水解,造成总黄酮得率有所降低。因此,在响应面试验中选取 10、20、30 min 作为提取时间的 3 个水平。

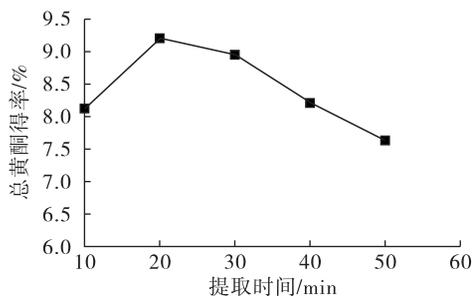


图2 提取时间对油梨粕总黄酮得率的影响

2.1.3 乙醇体积分数对油梨粕总黄酮得率的影响

称取5份1.0 g的油梨粕,按照液料比30:1,加入体积分数分别为40%、50%、60%、70%、80%的乙醇溶液30 mL,在60℃水浴提取20 min,抽滤后即得总黄酮提取液,平行试验3次取平均值。考察乙醇体积分数对油梨粕总黄酮得率的影响,结果见图3。

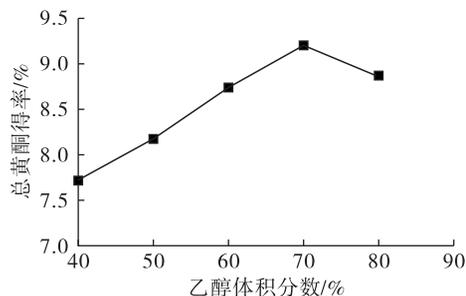


图3 乙醇体积分数对油梨粕总黄酮得率的影响

由图3可知,当乙醇体积分数小于70%时,油梨粕总黄酮得率随乙醇体积分数的增大呈现增加趋势。当乙醇体积分数继续增大时,油梨粕总黄酮得率反而下降。可能的原因是由于黄酮类物质是一类极性范围较大的物质,不同结构的黄酮极性和溶解性有较大差异。在体积分数为70%的乙醇溶液中,黄酮类物质能够最大限度地溶出。而当乙醇体积分数继续增大时,水溶性黄酮溶出量降低,从而出现总黄酮得率下降的现象。因此,在响应面试验中选取60%、70%、80%作为乙醇体积分数的3个水平。

2.1.4 液料比对油梨粕总黄酮得率的影响

称取5份1.0 g的油梨粕,分别加入70%的乙醇溶液10、20、30、40、50 mL,在60℃水浴提取20 min,抽滤后即得总黄酮提取液,平行试验3次取平均值。考察液料比对油梨粕总黄酮得率的影响,结果见图4。

由图4可知,油梨粕总黄酮得率随液料比的增大而增加,但是当液料比达到30:1后,总黄酮得率基本保持不变。因此,考虑到提取的充分性,固定液料比为30:1。

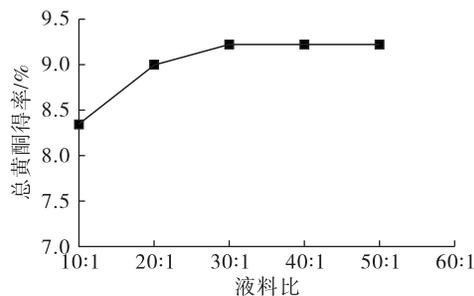


图4 液料比对油梨粕总黄酮得率的影响

2.1.5 提取次数对油梨粕总黄酮得率的影响

称取5份1.0 g的油梨粕,按照液料比30:1,加入70%的乙醇溶液30 mL,在60℃水浴提取20 min,分别提取1、2、3、4次,合并滤液浓缩,即得总黄酮提取液,平行试验3次取平均值。考察提取次数对油梨粕总黄酮得率的影响,结果见图5。

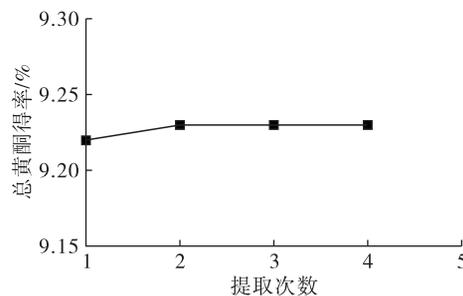


图5 提取次数对油梨粕总黄酮得率的影响

由图5可知,随着提取次数的增加,油梨粕总黄酮得率增加不明显。在提取1次后,油梨粕中的总黄酮基本已充分溶出。为节省成本,确定提取次数为1次。

2.2 响应面试验

通过单因素试验结果,固定液料比30:1、提取次数1次,选取对油梨粕总黄酮得率影响较大的提取温度、提取时间和乙醇体积分数3个因素为自变量,以油梨粕总黄酮得率为因变量,采用响应面分析法,应用Design-Expert 8.0.6软件,进行三因素三水平试验。响应面试验因素与水平见表1,响应面试验设计及结果见表2,分差分析见表3。

表1 响应面试验因素与水平

水平	A 提取温度/℃	B 提取时间/min	C 乙醇体积分数/%
-1	50	10	60
0	60	20	70
1	70	30	80

采用Design-Expert 8.0.6软件对表2结果进行响应面回归分析,得拟合方程: $Y = 9.06 - 0.11A + 0.48B + 0.18C + 0.82AB - 0.44AC - 0.73BC - 0.90A^2 - 1.20B^2 - 0.075C^2$ 。

表2 响应面设计及其结果

试验号	A	B	C	总黄酮得率(Y)/%
1	1	1	0	7.99
2	-1	1	0	6.70
3	0	0	0	9.21
4	0	0	0	9.17
5	1	-1	0	5.58
6	0	1	-1	8.97
7	1	0	-1	8.23
8	-1	0	1	8.81
9	0	-1	-1	6.38
10	1	0	1	7.85
11	0	1	1	7.74
12	-1	0	-1	7.44
13	0	0	0	8.94
14	0	0	0	8.96
15	0	-1	1	8.05
16	-1	-1	0	7.56
17	0	0	0	9.02

由表3可知,3个因素对总黄酮得率的影响程

表3 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	17.88	9	1.99	69.94	<0.000 1	极显著
A	0.09	1	0.09	3.25	0.114 2	不显著
B	1.83	1	1.83	64.56	<0.000 1	极显著
C	0.26	1	0.26	9.00	0.019 9	显著
AB	2.67	1	2.67	94.12	<0.000 1	极显著
AC	0.77	1	0.77	26.96	0.001 3	极显著
BC	2.10	1	2.10	74.02	<0.000 1	极显著
A ²	3.43	1	3.43	120.74	<0.000 1	极显著
B ²	6.06	1	6.06	213.46	<0.000 1	极显著
C ²	0.02	1	0.02	0.83	0.391 5	不显著
残差	0.20	7	0.03			
失拟项	0.14	3	0.05	3.04	0.155 3	不显著
纯误差	0.06	4	0.01			
总计	18.08	16				

优化多元回归方程得模型最大值,即提取温度65.68℃、提取时间27.39 min、乙醇体积分数60%时,油梨粕总黄酮得率达到最大值,为9.28%。从实际操作的角度考虑,对响应面回归拟合所得的最佳条件进行修正,确定最佳提取工艺条件为提取温度65℃、提取时间27 min、乙醇体积分数60%。

为验证响应面法所得结果的可靠性,根据上述修正后优化条件进行油梨粕中总黄酮提取试验,重复进行3次平行试验,得油梨粕总黄酮平均得率为9.25% (RSD为1.12%),与模型所得理论预测值

度为 $B > C > A$;模型 $F = 69.94, P < 0.000 1$,表明该回归模型极显著; $R_{Adj}^2 = 0.974 7$,信噪比为27.126 (远大于4),可知回归方程可信度很高;失拟项 $P = 0.155 3 > 0.05$,表明失拟不显著,模型拟合度较高,能够很好地对油梨粕总黄酮得率进行预测。模型的一次项中,A对总黄酮得率不具显著性差异,B、C对总黄酮得率具极显著性和显著性差异;模型的二次项中, A^2, B^2 对总黄酮得率的影响极显著,而 C^2 不具显著性差异,说明3个影响因素之间不是简单的线性关系;交互项中,AB、AC、BC均具极显著性差异,表明3个因素之间的相互影响较大。

根据多元回归方程作响应面三维分析,结果显示,当提取时间约27 min、提取温度约65℃时,油梨粕总黄酮得率达到最大值,之后在最大值波动。当提取温度约65℃、乙醇体积分数为60%时,总黄酮得率达到最大值,之后在最大值波动。当提取时间约27 min、乙醇体积分数为60%时总黄酮得率达到最大值,之后在最大值波动。

9.28%非常接近,说明该模型可靠有效。

2.3 油梨粕总黄酮提取物对 α -葡萄糖苷酶的活性抑制作用

不同质量浓度油梨粕总黄酮提取物对 α -葡萄糖苷酶的活性抑制作用如图6所示。

由图6可知,油梨粕总黄酮提取物对 α -葡萄糖苷酶具有一定的活性抑制作用,并且随着油梨粕总黄酮提取物质量浓度的增大,对 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用也随之增强。同时,相较于阿卡波糖,油梨粕总黄酮提取物对 α -葡萄糖苷酶的活性抑制作用较差。

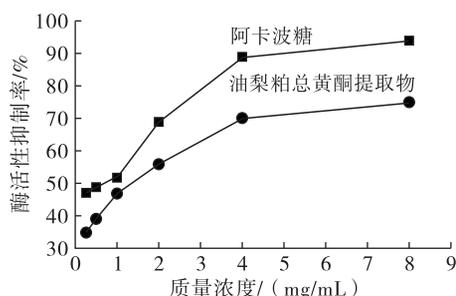


图6 油梨粕总黄酮提取物对 α -葡萄糖苷酶的活性抑制作用

3 结论

以油梨果肉脱脂后的油梨粕为研究对象,对油梨粕中的黄酮类物质进行提取,通过响应面法优化得到油梨粕总黄酮最佳提取工艺条件为:提取温度 65°C ,提取时间 27 min ,乙醇体积分数 60% ,液料比 $30:1$,提取次数 1 次。在最佳提取工艺条件下,总黄酮平均得率为 9.25% 。油梨粕总黄酮提取物具有较好的抑制 α -葡萄糖苷酶活性作用。黄酮类成分具有抗衰老、抗癌、降血糖等多种药理作用,是油梨中所含的一类重要的活性成分。研究油梨粕总黄酮的最佳提取条件,以及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性作用,为深入研究其黄酮成分的降血糖作用提供一定的基础,对于油梨的深度开发和资源利用具有重要的基础意义。

参考文献:

[1] DREHER M L, DAVENPORT A J. Hass avocado composition and potential health effects [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2013, 53: 738 - 750.

[2] PINO J, ROSADO A, AGUERO J. Volatile components of avocado (*Persea americana* Mill.) fruit [J]. J Essent Oil Res, 2000, 12(3): 377 - 378.

[3] 熊洋, 崔晓冰, 钟俊桢, 等. 水剂法提取油梨油及其理化特性研究[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(1): 85 - 90.

[10] ROZ A E, BARD J M, HUVELIN J M, et al. The anti-proliferative and pro-apoptotic effects of the *trans* 9, *trans* 11 conjugated linoleic acid isomer on MCF-7 breast cancer cells are associated with LXR activation [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013, 88(4): 265 - 272.

[11] 刘芸, 苏平, 宋思圆. 响应面法优化黄秋葵籽油中亚油酸的共轭转化率[J]. 食品工业科技, 2015, 36(24): 273 - 277.

[12] 刘瑞阳, 邢华斌, 杨亦文, 等. 甲醇为溶剂红花籽油碱法异构化合成共轭亚油酸的研究[J]. 中国油脂, 2010, 35(6): 29 - 32.

[13] 彭永健, 许新德, 张莉华, 等. 红花籽油制备共轭亚油酸工艺优化及其组成分析[J]. 中国油脂, 2015, 40

[4] 黄思思, 宁德生, 夏梦雯, 等. 油梨不同部位总酚含量、抗氧化及抗菌活性[J]. 广西科学院学报, 2016, 32(2): 151 - 155.

[5] 刘四新, 李从发, 明飞平, 等. 油梨深加工的研究[J]. 中国食品学报, 2004, 4(4): 51 - 54.

[6] 葛宇, 曹剑秋, 钟利文, 等. 油梨和羊奶果果肉粗提物对 α -葡萄糖苷酶的体外抑制[J]. 热带农业科学, 2017, 37(2): 16 - 19.

[7] 马锦锦, 林娟娜, 魏崧丞, 等. 葛根异黄酮类化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及构效分析[J]. 中成药, 2015, 37(4): 858 - 862.

[8] 宁德生, 黄思思, 谢运昌, 等. 油梨果渣化学成分分析及其多酚类成分的清除自由基能力[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(14): 93 - 97.

[9] 王宗成, 龙燕萍, 彭延波, 等. 响应面优化油茶叶黄酮提取工艺及抑菌活性研究[J]. 中国油脂, 2017, 42(4): 123 - 130.

[10] 叶菊, 孙立卿, 吉守祥. 响应面法优化蓝花荆芥中总黄酮提取工艺[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2017, 35(1): 62 - 68.

[11] 陶阿丽, 戴一, 华芳, 等. 桂花中总黄酮提取工艺及采收期研究[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(2): 247 - 249.

[12] 白生文, 汤超, 田京, 等. 沙棘果渣总黄酮提取工艺及抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2015, 36(10): 59 - 64.

[13] 康文艺, 张丽, 宋艳丽. 茜草抑制 α -葡萄糖苷酶活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(9): 1104 - 1107.

[14] 李古月, 刘佳鑫, 才谦. 齿叶白鹃梅叶中黄酮类化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性研究[J]. 天津中医药大学学报, 2015, 34(3): 165 - 168.

[15] 王汉卿, 王文苹, 闫津金, 等. 超声提取枸杞叶中总黄酮提取工艺及其不同采收期含量变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 44 - 47.

[14] 郑云武, 杨晓琴, 黄元波, 等. 橡胶籽油碱催化异构化合成共轭亚油酸的制备工艺研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(16): 253 - 258.

[15] 潘群文, 陈美珍, 吴演. 海篷子籽油制备共轭亚油酸及其组分分析[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(2): 42 - 46.

[16] 陈丽敏, 郜海燕, 陈杭君, 等. 响应面法优化山核桃亚油酸碱异构化研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(8): 74 - 79.

[17] 张合亮, 赵祥忠, 宋俊梅. 功能性配料——共轭亚油酸的研究进展[J]. 江苏调味副食品, 2014(2): 4 - 8.

[18] 刘芸. 黄秋葵籽油中共轭亚油酸的制备及其抗氧化活性的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.

(上接第102页)