

辣木籽多糖的内部沸腾法提取及抗氧化活性

胡玲华¹, 牛延菲^{1,2}, 田瑞丰¹, 王 滨¹, 陈保森³, 吴春华¹

(1. 西南林业大学 化学工程学院, 昆明 650224; 2. 云南省药物研究所, 昆明 650111;

3. 云南维泰生物科技有限公司, 云南 宜良 652100)

摘要:为加快辣木籽多糖提取速率,以辣木籽为原料,采用内部沸腾法提取其中的多糖。采用单因素实验和响应面实验对内部沸腾法提取辣木籽多糖的工艺条件进行优化,通过自由基清除活性考察其抗氧化活性。结果表明:最优提取工艺条件为解吸剂乙醇体积分数 20%、蒸馏水提取温度 74℃、提取时间 5 min、料液比 1:27,在此条件下辣木籽多糖得率可达 12.5%;质量浓度为 5.0 mg/mL 的辣木籽多糖对羟自由基的清除率为 91.1%,质量浓度为 1.0 mg/mL 的辣木籽多糖对 DPPH 自由基的清除率为 38%;质量浓度为 5.0 mg/mL 的辣木籽多糖对超氧阴离子自由基的清除率为 59.8%。综上,辣木籽多糖具有一定的抗氧化活性。

关键词:辣木籽;多糖;内部沸腾法;抗氧化活性

中图分类号:F426.82;TS225.1 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)11-0147-06

Extraction and antioxidant activity of polysaccharide from

Moringa oleifera seed by internal boiling method

HU Linghua¹, NIU Yanfei^{1,2}, TIAN Ruifeng¹, WANG Bin¹,

CHEN Baosen³, WU Chunhua¹

(1. School of Chemistry and Engineering, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China ;

2. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China; 3. Yunnan Weedtechnology

Biotechnology Co., Ltd., Yiliang 652100, Yunnan, China)

Abstract: In order to accelerate the extraction rate of *Moringa oleifera* seed polysaccharide, the polysaccharide was extracted from *Moringa oleifera* seed by internal boiling method. Single factor experiment and response surface methodology were used to optimize the internal boiling extraction conditions of *Moringa oleifera* seed polysaccharide, and the antioxidant activity of free radical scavenging activity was studied. The results showed that the optimal extraction conditions were obtained as follows: volume fraction of desorbent ethanol 20%, distilled water extraction temperature 74℃, extraction time 5 min, and solid-liquid ratio 1:27. Under the optimal conditions, the yield of *Moringa oleifera* seed polysaccharide could reach 12.5%. The results of antioxidant activity study showed that the hydroxyl free radical scavenging rate of *Moringa oleifera* polysaccharide with a mass concentration of 5.0 mg/mL was 91.1%. The DPPH scavenging rate of *Moringa oleifera* polysaccharide with a mass concentration of 1.0 mg/mL was 38%. Superoxide anion scavenging rate of *Moringa oleifera* polysaccharide with a mass concentration of 5.0 mg/mL was 59.8%. In conclusion, *Moringa oleifera* seed polysaccharide has some antioxidant activity.

收稿日期:2021-08-28;修回日期:2022-06-08

基金项目:国家重点研发计划——中医药现代化研究(2017YFC1702506)

作者简介:胡玲华(1997),女,硕士研究生,研究方向为天然植物资源的利用与改性(E-mail)1609955477@qq.com。

通信作者:吴春华,教授,博士(E-mail)kmwuchunhua@163.com。

Key words: *Moringa oleifera* seed; polysaccharide; internal boiling method; antioxidant activity

辣木(*Moringa oleifera*),又名辣根树,是辣木科(Moringaceae)辣木属(*Moringa adans*)多年生木本植物,全株包括根、叶、花、茎、树皮、种子和果皮都可

被利用,被称为“神奇之树”^[1-3]。辣木叶营养丰富,富含各种矿物质及生物活性成分,能够补充人体所需营养^[4]。辣木籽富含蛋白质、矿物质、油脂、维生素、黄酮及多酚类化合物,具有抗菌、抗氧化、抗癌等生物活性,作为一种新资源食品,有很高的研究开发价值^[5-8]。辣木籽多糖作为辣木籽抗氧化活性的重要成分之一,近年来因其具有的多种生物活性,包括免疫调节、抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗辐射、抗病毒、抗菌等作用^[9],而受到研究者的关注。

目前辣木籽多糖的提取方法有溶剂提取法、超声波辅助法、酶提法、微波提取法^[10]等。近年来,内部沸腾法因具有提取时间短、溶剂用量少、得率高、杂质少、可有效保留活性成分、对环境影响小等特点而被用于多糖等植物活性成分的提取^[11-15]。内部沸腾法是指用少量解吸剂充分润湿原料一定时间后,加入一定温度的提取剂(高于浸润物料溶剂的沸点),溶剂渗透到原料内部,解吸剂来不及扩散就产生沸腾,使得目标成分更容易被解吸带入提取溶剂中,从而强化目标成分的提取过程。目前采用内部沸腾法提取辣木籽多糖的报道还很少^[16]。为加快辣木籽多糖的提取速率,本文采用内部沸腾法从辣木籽中提取多糖,在单因素实验基础上,利用响应面法对提取工艺进行优化,并通过自由基清除能力研究辣木籽多糖的抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

辣木籽,购自云南省红河州元阳县南沙基地。无水乙醇、95%乙醇、硫酸亚铁、水杨酸、L-抗坏血酸、1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH)、Tris-盐酸缓冲溶液、焦性没食子酸、盐酸、磷酸缓冲液、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、过氧化氢水溶液,所有试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

ScoutSE-SE202F-电子天平,奥豪斯仪器(常州)有限公司;TDL-5-A-低速大容量离心机,上海安亭科学仪器厂;DFY-500-500克摇摆式高速中药粉碎机,温岭市林大机械有限公司;RV8-旋转蒸发仪,艾卡仪器设备有限公司;WFJ7200-紫外-可见分光光度计,尤尼柯仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 辣木籽预处理

将辣木籽进行初步干燥,粉碎,过约178 μm(80目)筛后,放于70℃烘箱中烘干8h得到干燥的辣木籽粉末,备用。

1.2.2 辣木籽多糖提取

准确称量辣木籽粉末1.00g于圆底烧瓶中,加入5mL一定体积分数的乙醇作为解吸剂,解吸30min,使解吸剂充分渗透辣木籽粉,再按一定料液比加入一定温度的蒸馏水提取一定时间,提取结束后冷却至室温,将溶液放入离心机以3500r/min的转速离心10min,将上清液进行过滤,浓缩至5mL左右,加入95%乙醇使溶液中乙醇体积分数高于80%,冰箱放置12h进行醇沉,过滤后得到多糖提取物,烘干至恒重,称质量。以多糖质量与原料质量的比值计算多糖得率。

1.2.3 辣木籽多糖抗氧化活性的测定

1.2.3.1 羟自由基清除能力

往烧杯中加入1mL9mmol/L水杨酸溶液(50%乙醇配制)、1mL9mmol/LFeSO₄、1mL0.03%过氧化氢水溶液和1mL一定质量浓度的辣木籽多糖水溶液,在37℃下水浴加热1h。待其温度降至室温后,用紫外-可见分光光度计测定样品在510nm处的吸光度(A₁)。用1mL去离子水代替辣木籽多糖溶液作为空白对照组,测定其吸光度(A₀)。用1mL50%乙醇溶液代替水杨酸溶液作为样品对照组,测定其吸光度(A₂)。以抗坏血酸作为阳性对照组,进行3次平行实验。按公式(1)计算羟自由基清除率(x₁)^[17]。

$$x_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3.2 DPPH自由基清除能力

将3mL一定质量浓度的辣木籽多糖水溶液与5mL0.1mmol/LDPPH-乙醇溶液充分混合,在室温、黑暗条件下反应30min,测定其在517nm波长处的吸光度(A₁)。同时测定3mL乙醇和5mLDPPH-乙醇混合溶液的吸光度(A₀)和3mL辣木籽多糖溶液和5mL乙醇的吸光度(A₂)。以L-抗坏血酸作为阳性对照组,进行3次平行实验。按公式(2)计算DPPH自由基的清除率(x₂)^[18]。

$$x_2 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

1.2.3.3 超氧阴离子自由基清除能力

将配制好的0.05mol/L、pH8.2Tris-盐酸缓冲液置于25℃水浴锅中保温30min。取一定质量浓度的2.0mL辣木籽多糖水溶液,加入4.5mLTris-盐酸缓冲液、0.4mL25mmol/L邻苯三酚溶液混合均匀,25℃反应4min,再添加两滴8mol/L的盐酸,加入15mL去离子水,测定其在320nm波长处的吸光度(A₁)。同时测定不加邻苯三酚但加辣木籽多

糖样品的吸光度(A_2),以及加邻苯三酚但不加辣木籽多糖样品的吸光度(A_0)。以L-抗坏血酸作为对照组,进行3次平行实验。按公式(3)计算清除率(x_3)^[19]。

$$x_3 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

1.2.4 数据处理

采用Excel 2016软件以及Design Expert 8.0.6对实验数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 辣木籽多糖提取单因素实验

2.1.1 提取温度对辣木籽多糖得率的影响

设定料液比1:25、提取时间5 min、解吸剂乙醇体积分数20%,考察提取温度对辣木籽多糖得率的影响,结果见图1。

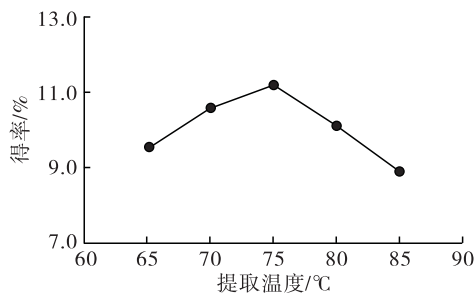


图1 提取温度对辣木籽多糖得率的影响

由图1可知,在65~85℃范围内,随着提取温度的升高,辣木籽多糖得率呈先升高后降低的趋势,在75℃时辣木籽多糖得率达到最高。当提取温度较低时,辣木籽多糖的溶出较为困难,随着提取温度的升高,分子运动越活跃,越有利于多糖解吸后扩散到溶液中,但提取温度过高,内部乙醇沸腾速度过快,对流扩散维持时间缩短,加上多糖分子较大,扩散迁移较慢,易造成溶出通道的堵塞^[13-14],从而使辣木籽多糖得率降低。综合考虑,最优提取温度为75℃。

2.1.2 提取时间对辣木籽多糖得率的影响

设定料液比1:25、提取温度75℃、解吸剂体积分数20%,考察提取时间对辣木籽多糖得率的影响,结果见图2。

由图2可知,随着提取时间的延长,辣木籽多糖得率逐渐上升,在5 min时辣木籽多糖得率达到最高。当提取时间较短时,物料内部未充分接触,使得提取过程不完全就结束,得率不高;当提取时间为5 min时,提取过程充分,多糖基本溶出;继续延长提取时间,辣木籽多糖得率下降,其原因有可能是较长的提取时间会引起辣木籽多糖结构的改变和多糖的降解。综合考虑,适宜的提取时间为5 min。

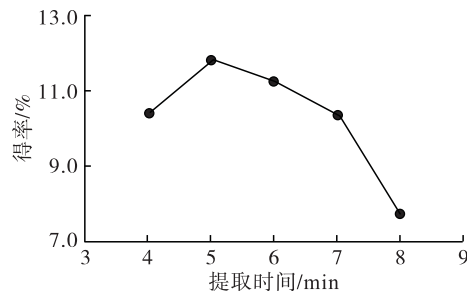


图2 提取时间对辣木籽多糖得率的影响

2.1.3 料液比对辣木籽多糖得率的影响

设定提取温度75℃、提取时间5 min、解吸剂体积分数20%,考察料液比对辣木籽多糖得率的影响,结果见图3。

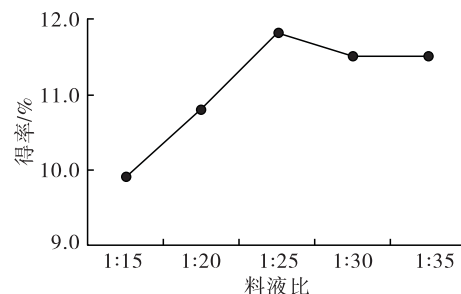


图3 料液比对辣木籽多糖得率的影响

由图3可知,辣木籽多糖得率随着料液比的增加先升高后降低再趋于平缓。料液比为1:25时,辣木籽多糖得率最高。因此,最优料液比为1:25。

2.1.4 解吸剂体积分数对辣木籽多糖得率的影响

设定料液比1:25、提取温度75℃、提取时间5 min,考察解吸剂乙醇体积分数对辣木籽多糖得率的影响,结果见图4。

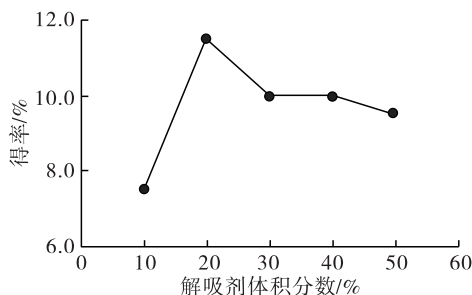


图4 解吸剂体积分数对辣木籽多糖得率的影响

由图4可知,辣木籽多糖得率随着解吸剂体积分数的增加先升高,当解吸剂体积分数达到20%时辣木籽多糖得率最高,继续增大解吸剂体积分数,辣木籽多糖得率下降。综合考虑,选择20%的乙醇作为解吸剂。

2.2 响应面分析法优化辣木籽多糖提取工艺

2.2.1 响应面实验设计及实验结果

在单因素实验的基础上,固定解吸剂体积分数为20%,根据Box-Behnken中心组合实验设计原

理,采用三因素三水平的响应面分析法,以提取温度(A)、提取时间(B)、料液比(C)为自变量,以辣木籽多糖得率(Y)为响应值,通过响应面分析对提取条件进行优化,响应面实验因素水平见表1,响应面分析方案与实验结果见表2。

采用 Design - Expert 8.0.6 软件对表2中的数据进行分析,得出辣木籽多糖得率与各因素编码值之间的回归关系: $Y = 12.30 - 0.48A - 0.087B + 0.38C + 0.47AB - 0.81AC + 0.18BC - 0.53A^2 - 1.64B^2 - 1.41C^2$ 。对实验结果进行方差分析,结果见表3。

表1 响应面实验因素水平

水平	提取温度/°C	提取时间/min	料液比
-1	70	4	1:20
0	75	5	1:25
1	80	6	1:30

表2 响应面分析方案与实验结果

实验号	A	B	C	得率/%
1	1	1	0	10.2
2	1	0	1	9.4
3	0	0	0	11.9
4	-1	0	-1	9.7
5	0	1	-1	8.7
6	-1	1	0	9.9
7	0	0	0	12.2
8	-1	-1	0	11.1
9	1	0	-1	10.1
10	0	0	0	12.3
11	0	0	0	12.5
12	0	-1	-1	9.2
13	1	-1	0	9.4
14	0	1	1	9.7
15	0	-1	1	9.5
16	0	0	0	12.6
17	-1	0	1	12.3

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	29.61	9	3.29	46.82	<0.000 1	**
A	1.85	1	1.85	26.37	0.001 3	**
B	0.06	1	0.06	0.87	0.381 6	
C	1.16	1	1.16	16.55	0.004 8	**
AB	0.90	1	0.90	12.84	0.008 9	**
AC	2.64	1	2.64	37.58	0.000 5	**
BC	0.12	1	0.12	1.74	0.228 2	
A ²	1.19	1	1.19	16.91	0.004 5	**
B ²	11.38	1	11.38	161.90	<0.000 1	**
C ²	8.33	1	8.33	118.50	<0.000 1	**
误差项	0.49	7	0.07			
失拟项	0.19	3	0.06	0.85	0.533 5	
纯误差	0.30	4	0.08			
总误差	30.10	16				

注:*代表5%显著水平,**代表1%显著水平

由表3可见,该模型的 p 值远小于0.01,说明该模型是显著的,可以很好地解释数据的变异性。而失拟项的 p 值为0.533 5,远大于0.05,表明回归模型建立得比较成功,能较好地描述各因素与响应值之间的关系,可以对该实验进行分析。该模型的回归系数(R^2)为0.983 7,校正回归系数(R_{Adj}^2)为0.962 6,表明该模型拟合度良好,真实值与预测值间相关性较高,实验误差较小,可利用回归方程对辣木籽多糖得率进行分析预测。由响应面回归模型方

差分析可知,影响辣木籽多糖得率的因素显著性顺序为 A (提取温度) $>C$ (料液比) $>B$ (提取时间)。交互项 AB 、 AC 影响显著($p < 0.01$),二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 影响显著($p < 0.01$),说明各个影响因素与响应值之间存在复杂的交互影响。

2.2.2 最优工艺参数的确定

通过对所得回归模型的分析,确定辣木籽多糖的最优提取条件为提取温度73.9 °C、提取时间4.88 min、料液比1:26.75,在此条件下预测的辣木

籽多糖得率可达 12.56%。考虑到实验室的设备与试剂条件,对最优提取条件进行修正,修正后最优工艺条件为提取温度 74 ℃、提取时间 5 min、料液比 1:27,在此条件下进行 3 次平行实验,平均得率为 12.5%,与预测结果一致,说明模型的预测结果良好,具有一定的应用价值。经测定,最优条件下提取的辣木籽多糖纯度为 64.98%。

董成国^[9]采用水提醇沉法对辣木籽多糖进行提取,优化的工艺条件为料液比 1:55.5、提取温度 79 ℃、提取时间 1 h,在此条件下多糖得率可达 14.11%。相比之下,本方法具有提取时间短、溶剂用量少等特点。

2.3 辣木籽多糖的抗氧化活性

2.3.1 清除羟自由基的能力

辣木籽多糖对羟自由基的清除能力见图 5。由图 5 可看出,随着辣木籽多糖质量浓度增加,辣木籽多糖对羟自由基的清除能力也相应增强。质量浓度为 5.0 mg/mL 的辣木籽多糖溶液的羟自由基清除率为 91.1%,略低于 1.0 mg/mL 的 L-抗坏血酸对羟自由基的清除能力,表明辣木籽多糖对羟自由基有较好的清除效果。

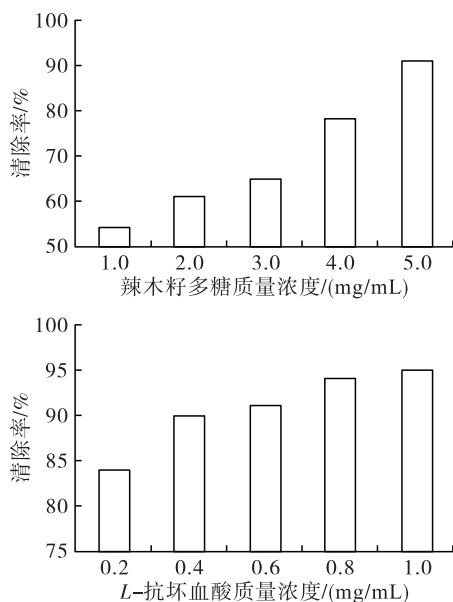


图 5 辣木籽多糖和 L-抗坏血酸对羟自由基的清除能力

2.3.2 清除 DPPH 自由基的能力

辣木籽多糖对 DPPH 自由基的清除能力见图 6。从图 6 可知,在辣木籽多糖质量浓度为 0.2 ~ 1.0 mg/mL 时,辣木籽多糖对 DPPH 自由基清除率随着辣木籽多糖质量浓度的增加而升高。辣木籽多糖质量浓度达到 1.0 mg/mL 时,其对 DPPH 自由基的清除率是 38%,是同质量浓度的 L-抗坏血酸的 40%,表明辣木籽多糖对 DPPH 自由基有较好的清

除能力。

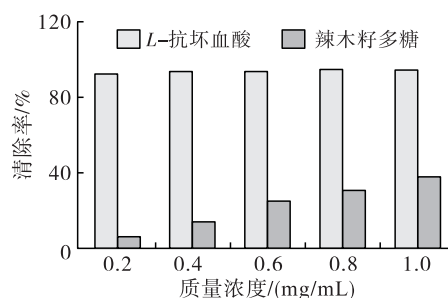


图 6 辣木籽多糖和 L-抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除能力

2.3.3 清除超氧阴离子自由基的能力

辣木籽多糖对超氧阴离子自由基的清除能力见图 7。从图 7 可知,辣木籽多糖对超氧阴离子自由基的清除率随辣木籽多糖质量浓度的增加而提高,质量浓度为 5.0 mg/mL 的辣木籽多糖对超氧化阴离子自由基的清除率可以达到 59.8%,是 1.0 mg/mL 的 L-抗坏血酸对超氧阴离子清除能力(清除率 92%)的 65%,表明辣木籽多糖有一定的清除超氧阴离子自由基的能力。

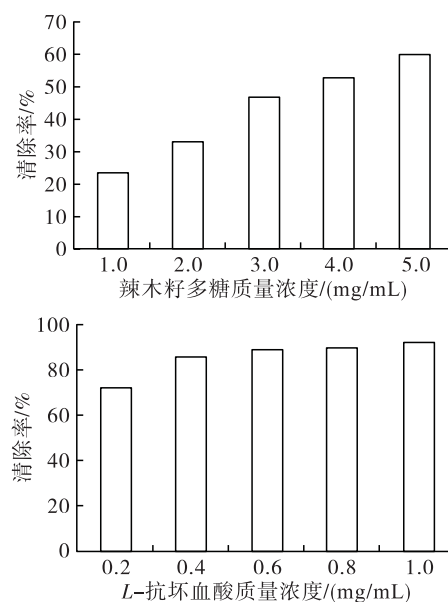


图 7 辣木籽多糖和 L-抗坏血酸对超氧阴离子自由基的清除能力

3 结论

通过内部沸腾法提取辣木籽多糖,采用响应面分析法对提取工艺进行优化,得出最优工艺条件:用 20% 乙醇解吸 30 min(料液比 1:5),然后用蒸馏水提取,提取温度 74 ℃、提取时间 5 min、料液比 1:27,在此条件下辣木籽多糖得率可达 12.5%。

辣木籽多糖对羟自由基、DPPH 自由基和超氧阴离子自由基有较好的清除能力,但效果均比同质量浓度下 L-抗坏血酸的清除能力小。5.0 mg/mL 的辣木籽多糖对羟自由基和超氧化阴离子的清除率

分别为 91.1% 和 59.8%。1.0 mg/mL 的辣木籽多糖对 DPPH 自由基的清除率可以达到 38%。

参考文献:

- [1] 任广旭, 伊素芹, 张鸿儒, 等. 辣木功效的研究现状[J]. 食品研究与开发, 2016 (16): 219 - 222.
- [2] GOPALAKRISHNAN L, DORIYA K, KUMAR D S. *Moringa oleifera*: a review on nutritive importance and its medicinal application[J]. Food Sci Human Well, 2016, 5 (2): 49 - 56.
- [3] 邵婷, 刘昕, 黎重阳, 等. 超声波辅助高效提取辣木籽中的蛋白质[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(9): 207 - 213.
- [4] 许登峰, 孙桂菊. 辣木的营养价值及功能活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(S1): 225 - 228.
- [5] 郑萍, 毕静, 王娇, 等. 辣木籽营养成分及提取工艺研究进展[J]. 江苏调味副食品, 2019(4): 6 - 8, 30.
- [6] MANI S, JAYA S, VADIVAMBAL R. Optimization of solvent extraction of *Moringa (Moringa oleifera)* seed kernel oil using response surface methodology [J]. Food Bioprod Process, 2007, 85(4): 328 - 329.
- [7] TEIXEIRA C, KIRSTEN F V, TEIXEIRA P. Evaluation of *Moringa oleifera* seed flour as a flocculating agent for potential biodiesel producer microalgae[J]. J Appl Phycol, 2012, 24(3): 557 - 563.
- [8] 王丽虹, 许悦, 刘阳. 辣木籽中活性物质及其生理功能研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(4): 190 - 195.
- [9] 董成国. 辣木籽水溶性多糖的分离纯化、结构表征及其抗氧化活性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016.
- [10] 王雪, 赵立春, 廖夏云, 等. 辣木籽化学成分的不同提取方法及药理研究概况[J]. 中国民族民间医药, 2019, 28 (4): 48 - 56.
- [11] LIU C J, LIN J Y. Anti - inflammatory and anti - apoptotic effects of strawberry and mulberry fruit polysaccharides on lipopolysaccharide - stimulated macrophages through modulating pro - /anti - inflammatory cytokines secretion and Bcl - 2/Bak protein ratio [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(9): 3032 - 3039.
- [12] 李建凤, 李陈, 廖立敏. 内部沸腾法提取金银花多糖[J]. 食品与机械, 2016, 32(11): 166 - 168, 228.
- [13] 汪建红. Box - Behnken 试验设计优化内部沸腾法提取荸荠皮多糖工艺[J]. 食品研究与开发, 2019, 40 (10): 115 - 119.
- [14] 陈晓光. 内部沸腾法强化提取若干中药有效成分的研究及评价[D]. 南宁: 广西大学, 2012.
- [15] 陈晓光, 韦藤幼, 彭梦微, 等. 丹参酚酸 B 减压内部沸腾法提取的动力学及相关热力学研究[J]. 高校化学工程学报, 2011, 25(6): 961 - 965.
- [16] 郑韵英, 胡汉娇, 周滢, 等. 辣木籽硒多糖的提取工艺研究[J]. 广州化工, 2021, 49(18): 48 - 51.
- [17] 章莺莺. 牡荆子 75% 乙醇提取物的抗氧化活性评价[J]. 化工时刊, 2012, 26(8): 19 - 21.
- [18] 王春林, 武芸, 芦娅妮, 等. Plackett - Burman 联合响应面法优化黑果枸杞黄酮提取工艺及抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 218 - 225.
- [19] LIUBIMOVSKII S O, USTYNYUK L Y, TIKHONOV A N. Superoxide radical scavenging by sodium 4, 5 - dihydroxybenzene - 1, 3 - disulfonate dissolved in water: experimental and quantum chemical studies [J/OL]. J Mol Liq, 2021 (2): 115810 [2021 - 08 - 28]. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115810>.

· 公益广告 ·



节能减排 提质增效
油脂加工 精准适度

《中国油脂》宣