

柴达木枸杞类胡萝卜素提取工艺优化 及抗氧化活性研究

吴有锋^{1,2}, 马世震^{1,*}, 谭亮¹, 冯海生¹, 李彩霞¹

(1.中国科学院西北高原生物研究所,中国科学院藏药研究重点实验室,青海西宁 810008;
2.中国科学院大学,北京 100049)

摘要:以柴达木枸杞子为材料,采用超声波辅助溶剂提取方法,在单因素实验的基础上,应用 Box-Behnken Design 对料液比、提取溶剂配比、提取时间进行优化,并通过 DPPH 自由基清除实验研究类胡萝卜素的抗氧化活性,同时测定不同产地、不同采摘期柴达木枸杞类胡萝卜素含量。通过响应面分析优化后,得出超声波辅助提取柴达木枸杞中类胡萝卜素的最佳工艺条件为:提取溶剂为石油醚:无水乙醇($v/v=2.6:1$),料液比为 1:60(g/mL),提取时间 41 min,提取次数 1 次,在此条件下,类胡萝卜素的含量可达 321.52 mg/100 g。柴达木枸杞中类胡萝卜素 DPPH 自由基清除率 IC_{50} 为 34.09 $\mu g/mL$,柴达木枸杞类胡萝卜素具有较好的抗氧化活性并且不同产地、不同采摘期柴达木枸杞类胡萝卜素含量均存在显著差异($p < 0.05$)。

关键词:柴达木枸杞,类胡萝卜素,响应曲面,抗氧化活性

Extraction optimization and antioxidant activity for carotenoid in Qaidam Chinese wolfberry

WU You-feng^{1,2}, MA Shi-zhen^{1,*}, TAN Liang¹, FENG Hai-sheng¹, LI Cai-xia¹

(1.Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology,
Chinese Academy of Science, Xining 810008, China;
2.University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: The Qaidam Chinese Wolfberries were used as the raw material in carotenoid extracting. In order to improve extraction content, the method of ultrasonic-assisted organic solvent extraction was adopted. Based on the single factor experiments, solid-liquid ratio, the ratio of the extraction solvent and the extraction time were optimized by Box-Behnken Design. The inhibitory rate of DPPH scavenging activity was analyzed antioxidant activity of carotenoid. Under optimal extraction conditions, the contents of carotenoid in Qaidam Chinese Wolfberry from different producing areas and different picking period were determined. By the optimizing of response surface method, the optimalizing technique was obtained, which was that the extraction solvent was petroleum ether and ethanol mixtures ($v/v=2.6:1$), the solid-liquid ratio was 1:60 (g/mL), extraction time and extraction times were 41 min and 1, respectively. The content of carotenoid in Qaidam Chinese wolfberry was 321.52 mg/100 g under optimized conditions. The half maximal inhibiting concentration (IC_{50}) of DPPH scavenging activity of carotenoid was 34.09 $\mu g/mL$. There were statistically significant differences in carotenoid content in Qaidam Chinese Wolfberry compared with different producing areas and different picking period ($p < 0.05$).

Key words: Qaidam Chinese wolfberry; carotenoid; response surface methodology; antioxidant activity

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2016)14-0250-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.14.042

柴达木枸杞又名柴杞,主要出产于柴达木盆地。粒大饱满,肉质肥厚,色泽鲜艳,品质优良,相关研究表明柴达木枸杞多糖、类胡萝卜素、氨基酸等营养成分比其它地区高,这主要得益于青海柴达木盆地独

具特色的高原大陆性气候^[1]。现代医学研究证实,枸杞具有补肾养肝、润肺明目、抗氧化及协同防癌等多方面的药理作用^[2]。枸杞上述功能一般认为与其所含枸杞多糖、类胡萝卜素和甜菜碱等活性成分密切

收稿日期: 2016-01-04

作者简介: 吴有锋(1989-),男,硕士研究生,研究方向:药材质量标准和药物分析, E-mail: wuyoufeng14@mails.ucas.ac.cn。

* 通讯作者: 马世震(1963-),男,研究员,研究方向:植物化学和新产品研发, E-mail: szma@nwipb.cas.cn。

基金项目: 中国科学院藏药现代化重点实验室项目(Y4496110Z1)。

表 1 不同产地枸杞样品信息
Table 1 Sample information of Qaidam Chinese wolfberry from different producing areas

样品编号	采集地点	采集时间	海拔 (m)	经度	纬度
1		2015.8			
2	都兰县夏日哈镇沙珠玉村	2015.9	3056	98°02'45.5"	36°27'37.6"
3		2015.10			
4		2015.8			
5		2015.9			
6	都兰县宗加镇哈西瓦村	2015.10	2776	96°14'51.7"	36°23'51.8"
7		2015.8			
8		2015.9			
9		2015.10			
10	诺木洪一大队	2015.8	2831	96°27'29.1"	36°23'27.5"
11		2015.9			
12		2015.10			
13		2015.8			
14	格尔木市园艺场	2015.9	2800	94°55'50.7"	36°24'26.7"
15		2015.10			
16		2015.8			
17		2015.9			
18	德令哈市怀头他拉镇东滩村	2015.10	2836	96°46'36.8"	37°19'28.0"
	乌兰县赛什克乡兴乐村	2015.8	2977	98°38'56"	36°94'54"
		2015.9			
		2015.10			

相关。现代药理学研究证明,枸杞中类胡萝卜素具有重要的生理活性,包括抗氧化活性^[3-4]、提高免疫功能^[5]、预防癌症等^[4,6-7]。

目前,胡萝卜素提取的方法主要包括超声提取、微波提取、CO₂超临界萃取等方法,而常用的有超声提取、微波提取,它们操作方便、成本经济。此外枸杞类胡萝卜素所用的提取溶剂种类、形式(单一溶剂、不同比例混合溶剂)各不相同。王晓璇^[8]等通过超声波和微波处理的方法,用乙酸乙酯:乙醇=1:1(v/v)提取枸杞皮渣中的类胡萝卜素;张业辉^[9]等比较了几种单一溶剂和混合溶剂所提取类胡萝卜素溶液的吸光度值,确定异丙醇的提取效果最佳;Wang^[10]等采用乙烷-乙醇-丙酮-甲苯(v/v/v/v=10:6:7:7)提取枸杞中的类胡萝卜素。但是,前人的研究多采用毒性较大的提取溶剂,而本研究采用毒性较小的石油醚-无水乙醇混合液进行提取,并进行了柴达木枸杞类胡萝卜素提取条件的优化和抗氧化活性的研究。本研究采用超声辅助溶剂提取柴达木枸杞类胡萝卜素,在单因素实验基础上,通过 Box-Behnken Design 对类胡萝卜素提取工艺影响较大的三个因素即料液比、提取溶剂配比和提取时间进行优化。采用 DPPH 法研究类胡萝卜素抗氧化活性,同时测定了不同产地采摘期柴达木枸杞类胡萝卜素含量,为柴达木枸杞类胡萝卜素的进一步开发和应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

柴达木枸杞 2015 年 8 月~10 月采集于都兰县、诺木洪、格尔木等 6 个地区,样品具体信息见表 1。样品经中国科学院西北高原生物研究所马世震研究员鉴定确认为正品,经干燥处理(小于 50℃干燥)、粉碎后备用;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 德国 Sigma 公司;三氯甲烷、石油醚(沸点:60~90℃)、甲醇、正己烷、乙酸乙酯、丙酮、无水

乙醇、无水硫酸钠 均为分析纯,天津市百世化工有限公司;超纯水 实验室自制。

Varian Cary300Bio 型紫外-可见分光光度计 美国 Varian 公司;AG135 型精密电子天平 瑞士 Mettler Toledo 公司;KQ-100E 型超声波清洗器 昆山超声仪器科技公司;优普 UPE-II-40L 型超纯水机 上海优普实业有限公司;SL-500A 型高速多功能粉碎机 浙江省永康市松青五金厂。

1.2 实验方法

1.2.1 枸杞类胡萝卜素超声提取工艺 经干燥处理的枸杞子(含水量低于 11%)用超微粉碎机粉碎并过 40 目筛,精密称取 1.000 g,置于具塞锥形瓶中,以一定的料液比加入提取剂,密塞,摇匀,超声处理^[8]。冷却至室温,用盛有无水 Na₂SO₄ 的漏斗过滤至 100 mL 棕色容量瓶中,并用提取溶剂润洗锥形瓶和漏斗 2~3 次,定容^[11]。经适当的稀释(确保吸光度值 A 在 0.2~0.8 的范围)后用紫外-可见分光光度计进行测定。实验的全过程需要避光操作。

1.2.2 类胡萝卜素含量的测定 类胡萝卜素含量的测定参考了康保珊等^[12]的方法并进行改进。根据 Beer-Lambert 定律,每 100 g 枸杞样品中类胡萝卜素含量(mg/100 g)按如下公式计算^[13]:

$$m = \frac{1000 \times A \times V \times n}{2480 \times m_1} \quad \text{式(1)}$$

式中,m:样品中类胡萝卜素含量,mg/100 g;A:检测到的枸杞样品的吸光值;V:样品液定容体积,mL;n:稀释倍数;2480:在 1 cm 光程长的比色杯中 1 g/L 枸杞样品提取液的理论吸收值(按玉米黄素计);m₁:枸杞样品的质量 g。

1.2.3 类胡萝卜素最大吸收波长的确定 将石油醚-无水乙醇提取的柴达木枸杞类胡萝卜素溶液稀释定容后,以提取液为空白,在紫外-可见分光光度

仪器上从 350~600 nm 进行全波段扫描,以确定提取液的最大吸收波长。

1.2.4 提取溶剂体系的选择 精密称取枸杞粉末,置于具塞锥形瓶中,分别加入 5 种提取溶剂体系(1.氯仿:甲醇 = 2:1 (v/v)^[12]; 2.正己烷:丙酮 = 1:1 (v/v); 3.石油醚:丙酮 = 2:1 (v/v)^[14-15]; 4.乙酸乙酯:丙酮 = 1:1 (v/v)^[12]; 5.无水乙醇:石油醚 = 1:1 (v/v)) 在 40 °C 下超声提取 40 min,提取 2 次,冷却至室温,用盛有无水 Na₂SO₄ 的漏斗过滤至 100 mL 棕色容量瓶中,定容。经适当的稀释后,用相应的提取溶剂作为参比,在 450 nm 波长处测定吸光度值,根据上述公式(1)计算类胡萝卜素的含量,确定最适宜的提取溶剂体系。

1.2.5 单因素实验

1.2.5.1 提取液配比的选择 采用“1.2.1”下的方法提取,固定提取条件为:提取温度 40 °C、料液比 1:30 (g/mL)、超声提取 40 min、提取次数 2 次,考察无水乙醇-石油醚混合液配比(1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 2:1)对所得类胡萝卜素含量的影响。

1.2.5.2 料液比的选择 采用“1.2.1”下的方法提取,固定提取条件为:提取温度 40 °C、无水乙醇-石油醚混合液配比(v/v = 1:2)、超声提取 40 min、提取次数 2 次,考察不同料液比(1:30、1:40、1:50、1:60、1:70 g/mL)对所得类胡萝卜素含量的影响。

1.2.5.3 提取时间的选择 采用“1.2.1”下的方法提取,固定提取条件为:提取温度 40 °C、无水乙醇-石油醚混合液配比(v/v = 1:2)、料液比 1:50 (g/mL)、提取次数 2 次,考察超声时间(20、30、40、50、60 min)对所得类胡萝卜素含量的影响。

1.2.5.4 提取次数的选择 采用“1.2.1”下的方法提取,固定提取条件为:提取温度 40 °C、无水乙醇-石油醚混合液配比(v/v = 1:2)、料液比 1:50 (g/mL)、超声时间 40 min,考察提取次数(1、2、3、4 次)对所得类胡萝卜素含量的影响。

1.2.6 响应面实验设计 采用 Design-Expert 8.0.6 软件,根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理,综合单因素实验的结果,选取对柴达木枸杞中类胡萝卜素含量有较明显影响的三个因素(提取液配比、提取时间、料液比)进行对比实验。在单因素的实验基础上采用三因素三水平 L₉(3⁴) 的响应面分析方法,实验因素与水平见表 2。

表 2 响应面设计因素与水平

Table 2 Factors and levels of response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
A 提取液配比	1:1	1:2	1:3
B 料液比(g/mL)	1:40	1:50	1:60
C 超声时间(min)	30	40	50

1.2.7 抗氧化活性测定

1.2.7.1 DPPH 溶液的配制 精密称取 DPPH 粉末 3.94 mg,置于 100 mL 棕色锥形瓶中,用无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 0.1 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液,待用。操作全过程避光。

1.2.7.2 供试品溶液的配制 分别准确移取提取液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 于具塞试管中,用无水乙醇稀释至 2.0 mL 摇匀,待用。

1.2.7.3 DPPH 自由基清除率的测定 精密吸取 0.1 mmol/L DPPH 溶液 2.0 mL 与 2.0 mL 类胡萝卜素提取液于同一具塞试管中振荡摇匀,置于暗处反应 30 min 后于 517 nm 处测定其吸光度 A_{样品},空白为 2.0 mL 无水乙醇与 2.0 mL 蒸馏水混合液,同时测定 2.0 mL 0.1 mmol/L DPPH 溶液与 2.0 mL 无水乙醇混合后的吸光度 A_{对照},以及 2.0 mL 测试样品溶液与 2.0 mL 无水乙醇混合后的吸光度 A_{空白}。DPPH 自由基清除率的计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}}}\right) \times 100 \quad \text{式(2)}$$

1.3 数据处理

采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行多元回归并对回归模型进行方差分析,显著性分析采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析。实验数据重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 类胡萝卜素最大吸收波长确定

柴达木枸杞类胡萝卜素提取液最大吸收波长如图 1 所示,类胡萝卜素提取液在 450 nm 处出现最大吸收峰,在 420 nm 和 480 nm 出现典型的双尖峰,符合类胡萝卜素的特征吸收^[16],所以确定 450 nm 为最大吸收波长。

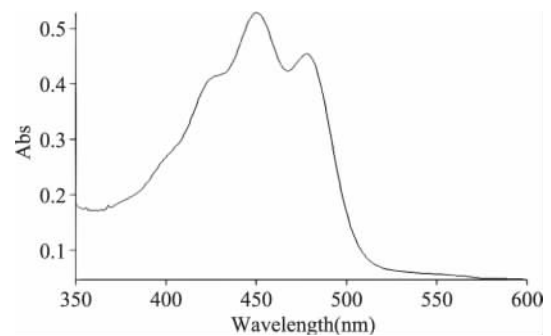


图 1 类胡萝卜素紫外-可见光吸收光谱图

Fig.1 UV-Visible Spectrum of the carotenoid

2.2 提取溶剂体系选择

不同溶剂体系提取后,类胡萝卜素的含量结果如图 2 所示。

由图 2 可知,在相同条件下,无水乙醇-石油醚(v/v = 1:1)提取效果最好,类胡萝卜素含量为 265.50 mg/100 g。乙酸乙酯-丙酮(v/v = 1:1)提取效果最差,类胡萝卜素含量为 132.03 mg/100 g。氯仿-甲醇(v/v = 2:1)和石油醚-丙酮(2:1)这两者差异不显著(p > 0.05),但与其它溶剂体系差异显著(p < 0.05)。无水乙醇-石油醚提取效果较好,这与理论相一致。类胡萝卜素按其化学结构和溶解性可分为两类,即:胡萝卜素类(Carotenes)系共轭烯烃,包括 α-胡萝卜素、β-胡萝卜素、γ-胡萝卜素等,其易溶于石油醚、苯、氯仿、难溶或不溶于乙醇和甲醇;叶黄素类(Xanthophylls)系共轭多烯烃含氧衍生物,可以

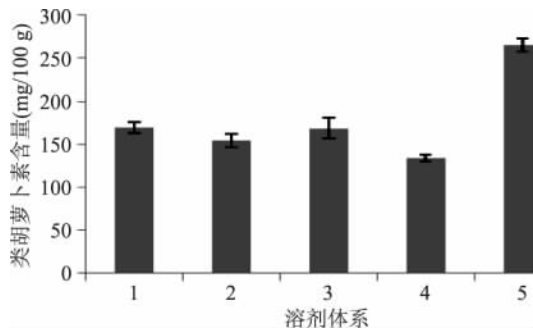


图2 不同溶剂提取结果 (n=3)

Fig.2 Extraction results of different solvents (n=3)

注:不同小写字母表明差异显著 (p<0.05)。

以醇、醛、酮、酸等形式存在,包括玉米黄素、隐黄素、叶黄素等,能溶于甲醇、乙醇和石油醚。文献中多报道使用不同比例的石油醚和丙酮,但无水乙醇的极性略大于丙酮更易将类胡萝卜素中极性大的提取出来并且叶黄素类易溶于乙醇,同时无水乙醇无毒。综合考虑安全性和提取效果,故选择无水乙醇-石油醚为提取溶剂。本研究采用超声辅助提取类胡萝卜素,操作简便,但由于超声过程中温度会随超声时间的持续而升高,不便于控制,其次,类胡萝卜素在高温下不稳定以及其提取溶剂容易挥发等原因,所以未选择超声温度作为优化的因素。根据前人的研究结果^[17],所以研究过程中控制温度在40℃以内。

2.3 单因素实验结果

2.3.1 提取溶液配比的选择 不同比例的无水乙醇-石油醚提取类胡萝卜素含量结果如图3所示。

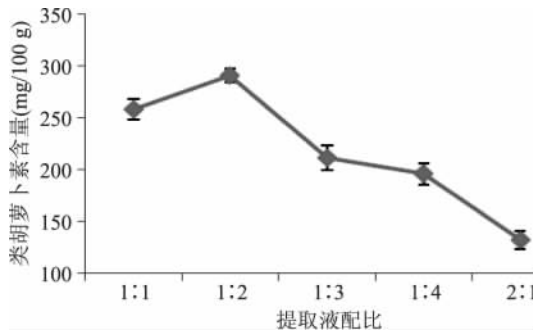


图3 不同配比提取液的提取结果 (n=3)

Fig.3 Extraction results of different proportion of extracts (n=3)

由图3可知,无水乙醇与石油醚的配比为1:2时,提取效果最好,类胡萝卜素的含量为291.08 mg/100 g。配比小于1:2时,溶剂极性较小,反之极性较大。枸杞中胡萝卜素类和叶黄素类都能溶于石油醚,而叶黄素类还能溶于乙醇,适度提高石油醚的比例有利于类胡萝卜素提取更完全,但随着石油醚比例的增高,类胡萝卜素的含量下降。当无水乙醇和石油醚的比例为2:1时,类胡萝卜素含量最低。故确定无水乙醇和石油醚的比例为1:2。

2.3.2 料液比的选择 不同料液比提取类胡萝卜素含量结果如图4所示。

由图4可知,随着料液比从1:30到1:50 (g/mL)时,类胡萝卜素的含量呈现缓慢增加的趋势,但从1:50到1:70 (g/mL)时,类胡萝卜素含量呈现迅速降

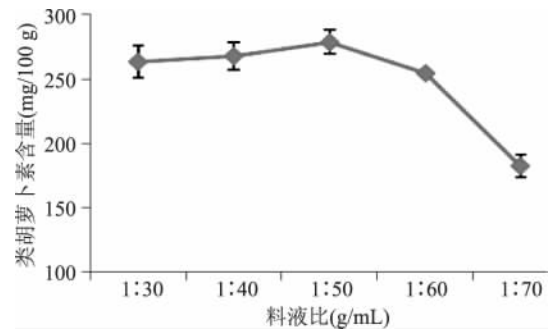


图4 不同料液比的提取结果 (n=3)

Fig.4 Extraction results of different solid-liquid ratio (n=3)

低的趋势。这可能是由于在一定范围内增加提取液的体积可以增加接触面积,使得较多类胡萝卜素被提取出来,但提取液的体积继续增大会使类胡萝卜素的提取达到饱和,同时提取液的挥发量增大,导致提取量趋于平稳或降低。考虑到提取溶剂体积过大会增加成本,体积过小类胡萝卜素提取不完全,导致原料浪费,故确定料液比为1:50 (g/mL)。

2.3.3 提取时间的选择 不同提取时间提取类胡萝卜素含量结果如图5所示。

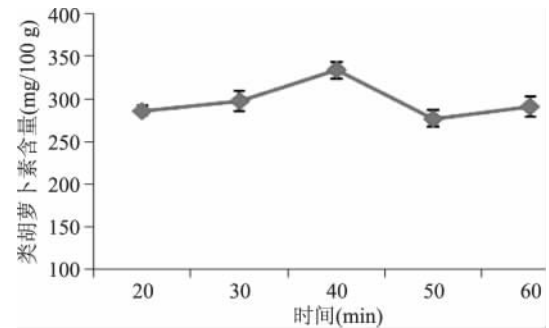


图5 不同提取时间提取结果 (n=3)

Fig.5 Extraction results of different time (n=3)

由图5可知,类胡萝卜素的含量提取时间在20~40 min,类胡萝卜素的含量逐渐增加,但40 min后,类胡萝卜素含量先下降,后基本不变。这可能由于长时间的超声提取溶剂挥发或类胡萝卜素发生受温度的影响部分分解所致^[18]。故提取的最佳时间确定为40 min。

2.3.4 提取次数的选择 不同提取次数提取类胡萝卜素含量结果如图6所示。

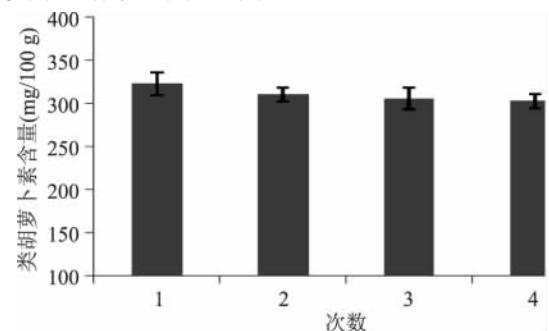


图6 不同超声次数提取结果 (n=3)

Fig.6 Extraction results of different times (n=3)

由图6可知,随着超声次数的提高,类胡萝卜素含量降低。这可能由于多次超声导致类胡萝卜素的结构受到破坏,而发生分解所致。从节省资源、降低能耗、成本等角度来考虑故选择提取次数为1次。

2.4 响应面法优化实验

2.4.1 响应面实验结果 在单因素实验的基础上,根据 Box-Behnken 设计进行了 17 组实验,其中 5 组中心点重复,结果见表 3。利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 3 实验数据进行多元回归拟合,所得的回归方程为:

$$Y = 321.89 - 3.21A + 0.44B + 0.70C + 6.66AB - 0.27AC + 0.28BC - 17.12A^2 + 3.36B^2 - 7.91C^2$$

对回归模型进行方差分析,结果见表 4。从表 4 可以得知,模型 $F = 328.69$, $p < 0.0001$ ($p < 0.01$),本实验模型是极其显著的,该模型可用于预测柴达木枸杞类胡萝卜素的提取工艺;失拟项为 $p = 0.0501$ ($p > 0.05$),失拟项不显著,表示单因素实验结果可以和数学模型拟合良好,实验误差小,即可以使用此模型对类胡萝卜素的提取量进行分析和预测^[17]。

回归方程中各变量对指标(响应值)影响的显著性,由 F 检验来判断,概率 p 的值越小,相应的变量显著程度就越高。从表 5 可知,用上述回归方程描述各因素中一次项 A 极显著, C 项显著。其次二次项 AB 、 A^2 、 B^2 、 C^2 极显著。各因素对类胡萝卜素含量的影响是 $A > C > B$ (A 、 B 、 C 分别为无水乙醇-石油醚的比例、料液比和时间)。交互项 AB 极显著,表明无水乙醇-石油醚的比例与料液比存在极显著的交互作用,因此每个实验因素对响应值的影响呈现的不是线性关系。

表 3 实验设计及其实验结果

Table 3 Box-Behnken design matrix and the experimental result

实验号	A	B	C	Y 类胡萝卜素含量 (mg/100 g)
1	0	0	0	322.27
2	-1	1	0	305.93
3	0	0	0	321.53
4	0	-1	-1	316.83
5	1	0	1	294.04
6	1	1	0	312.41
7	1	0	-1	293.69
8	-1	0	-1	299.14
9	0	0	0	322.38
10	0	1	-1	315.97
11	1	-1	0	297.02
12	0	1	1	318.43
13	0	0	0	321.42
14	-1	-1	0	317.19
15	0	-1	1	318.15
16	0	0	0	321.87
17	-1	0	1	300.58

2.4.2 响应面及等高线的分析 根据软件 Design-Expert 获得响应值的 3D 曲面,分析各因素对类胡萝卜素含量的影响及其各因素间的交互作用。图 7 中所示当溶剂比例 (A)、料液比 (B) 和提取时间 (C) 中任意一个因素为零水平时,其余两个因素的交互作用及对类胡萝卜素含量的影响。类胡萝卜素含量随

表 4 回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis of regression model

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	p 值	显著性	
模型	9	1844.49	204.94	328.69	<0.0001	**	
残差	7	4.36	0.62				
失拟项	3	3.63	1.21	6.58	0.0501		
误差项	4	0.74	0.18				
总和	16	1848.85					
		$R^2 = 0.9676$	$R^2_{adj} = 0.9246$	$R^2_{pred} = 0.6480$	$R^2_{adeq} = 13.562$	$C.V. \% = 2.51$	

表 5 回归方程系数显著性分析

Table 5 Analysis of the significant coefficients of regression equation

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	p 值	显著性
A	1	82.43	82.43	132.21	<0.0001	**
B	1	1.58	1.58	2.53	0.156	
C	1	3.88	3.88	6.22	0.0414	*
AB	1	177.56	177.56	284.77	<0.0001	**
AC	1	0.3	0.3	0.48	0.5123	
BC	1	0.32	0.32	0.52	0.4938	
A^2	1	1234.01	1234.01	1979.12	<0.0001	**
B^2	1	47.62	47.62	76.37	<0.0001	**
C^2	1	263.58	263.58	422.73	<0.0001	**

注:* 显著 ($p < 0.05$), ** 极显著 ($p < 0.01$)。

其中任意两个变量的增加呈现上升趋势,达到一定值时,曲面稍下降或趋于平缓。结果如图7(a~c)所示,其中图7(a)等高线出现明显的交互,说明料液比和溶剂比例之间交互作用较明显,与方差分析结果相符。图7(b)等高线趋向于圆形,说明溶剂比例和提取时间的交互作用不明显。随提取时间和溶剂比例的增加,类胡萝卜素含量先增加后降低。图7(c)等高线图没有发生交互,料液比和提取时间的交互作用不明显。随提取时间增加,类胡萝卜素含量先增加后降低;随料液比增加类胡萝卜素含量变化不大。

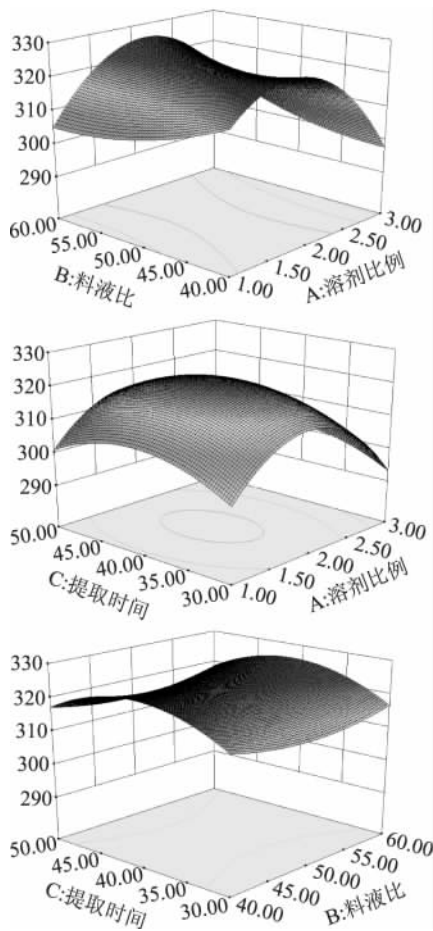


图7 两因素交互作用对提取量的响应面图

Fig.7 Response surface plots showing the effect of different extraction conditions on the extraction yield of carotenoid

2.4.3 验证实验和 DPPH 自由基清除率测定 通过 Box-Behnken 设计优化的条件,得到最佳提取条件为:石油醚:无水乙醇(v/v = 2.61:1),料液比为 1:60 (g/mL),提取时间 40.53 min,类胡萝卜素的含量最高为 321.52 mg/100 g。对响应面分析优化的提取工艺条件进行适当调整:石油醚:无水乙醇(v/v = 2.6:1),料液比为 1:60 (g/mL),提取时间 41 min,在此工艺条件下进行实验验证,重复三次得到类胡萝卜素平均含量为 321.55 mg/100 g, RSD 为 0.401%。实验值与预测值比较相差不大,说明该模型能很好的预测类胡萝卜素的含量。按“2.7.3”的方法测定吸光度值 A_{样品}、A_{对照}、A_{空白},根据公式(2)计算样品的 DPPH 自由基清除率,再计算样品 IC₅₀ 值,结果 IC₅₀ 为 34.09 μg/mL。

2.5 不同产地、不同采摘期柴达木枸杞类胡萝卜素含量测定

在最佳提取条件下,于 450 nm 波长处测定吸光度值,以相应的提取溶剂作为参比,测定不同产地、不同采摘期柴达木枸杞的类胡萝卜素含量,具体见表 6。

表6 不同产地、不同采摘期柴达木枸杞类胡萝卜素含量测定(n=3)

Table 6 The content of carotenoid in Qaidam Chinese Wolfberry from different producing areas and different picking period(n=3)

样品编号	采集地点	采集时间	类胡萝卜素含量 (mg/100 g)	RSD (%)
1		2015.8	238.92	2.01
2	都兰县夏日	2015.9	226.07	4.40
3	哈镇沙珠玉村	2015.10	211.39	2.34
4		2015.8	183.96	1.55
5	都兰县宗加镇	2015.9	219.95	1.30
6	哈西瓦村	2015.10	202.71	1.32
7		2015.8	300.05	3.87
8	诺木洪一大队	2015.9	211.10	3.51
9		2015.10	272.50	1.71
10		2015.8	248.95	4.73
11	格尔木市	2015.9	178.64	2.66
12	园艺场	2015.10	232.12	1.62
13		2015.8	355.05	2.40
14	德林哈市怀头	2015.9	209.32	2.84
15	他拉镇东滩村	2015.10	316.52	1.42
16		2015.8	321.52	2.67
17	乌兰县赛什	2015.9	242.92	4.31
18	克乡兴乐村	2015.10	228.23	1.72

由表 6 可以得出,不同产地、不同采摘期柴达木枸杞中类胡萝卜素含量均存在显著差异(p < 0.05)。8 月份于德林哈市采摘的枸杞中类胡萝卜素含量最高,都兰县宗加镇含量最低;9 月份于乌兰县采摘的枸杞中类胡萝卜素含量最高,格尔木市含量最低。导致这些差异可能的原因是本身的基因型,独特的地理环境,不同生长期的生理特征,不同生长季节的气候因素等等。由于产地的不同枸杞的营养成分和药用成分存在差异,在实际的应用中可以根据不同的需求选择不同产地的枸杞。

3 结论

在单因素实验的基础上,通过响应曲面法对枸杞类胡萝卜素提取工艺进行优化,得到最佳工艺条件为提取溶剂石油醚:无水乙醇(v/v = 2.6:1),料液比 1:60 (g/mL),提取时间 41 min,提取次数为 1 次。在最佳工艺条件下提取枸杞中类胡萝卜素的含量可达 321.52 mg/100 g。

通过对枸杞中类胡萝卜素 DPPH 自由基清除能力的测定,得出枸杞中类胡萝卜素具有很好的抗氧化能力,其 IC₅₀ 为 34.09 μg/mL。进一步验证了枸杞中类胡萝卜素作为抗氧化活性物质具有很好的应用前景,为柴达木枸杞深加工和开发利用提供了理论依据。

不同产地、不同采摘期柴达木枸杞中类胡萝卜

素含量均存在显著差异,导致这种差异可能的原因不仅有植物自身基因型、生理特征方面的因素,而且还有诸多环境因素。由于这种差异性的存在,在实际使用中可以根据需求选择不同产地、不同采收期的柴达木枸杞。

参考文献

- [1] 叶英,索有瑞,韩丽娟,等.柴达木枸杞研究开发现状及产业前景分析[J].食品工业,2014,35(2):210-213.
- [2] 王亚军,安巍,石志刚,等.枸杞药用价值的研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(30):13213-13214,13218.
- [3] Böhm F, Edge R, George Truscott T. Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen (O_2) and free radicals: potential effects for human health [J]. Acta Biochimica Polonica, 2012, 59(1): 27.
- [4] 黄丽,於洪建,吴巍.枸杞中类胡萝卜素的研究进展[J].食品研究与开发,2012,33(5):233-236.
- [5] Hughes DA. Dietary carotenoids and human immune function [J]. Nutrition, 2001, 17(10): 823-827.
- [6] 孙玉敬,乔丽萍,钟烈洲,等.类胡萝卜素生物活性的研究进展[J].中国食品学报,2012,12(1):160-166.
- [7] Zhang X, Zhao W - e, Hu L et al. Carotenoids inhibit proliferation and regulate expression of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR γ) in K562 cancer cells [J]. Archives of biochemistry and biophysics, 2011, 512(1): 96-106.
- [8] 王晓璇,牛黎莉,张盛贵.响应面法优化枸杞皮渣中类胡萝卜素提取工艺[J].食品工业科技,2013,34(4):232-

235,238.

- [9] 张业辉,张桂,孙卫东,等.枸杞中类胡萝卜素的提取研究[J].食品研究与开发,2006,127(11):84-87.
- [10] Wang C, Chang S, Inbaraj BS et al. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from Lycium barbarum L. and evaluation of antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2010, 120(1): 184-192.
- [11] 曹静亚,谭亮,迟晓峰,等.枸杞子中 β -胡萝卜素的快速溶剂萃取提取条件优化及 HPLC 测定 [J]. 中药材, 2013, 36(7): 1168-1171.
- [12] 康保珊,赵文恩,焦凤云,等.不同提取溶剂系统对类胡萝卜素总含量的影响 [J]. 食品工业科技, 2007, 128(1): 84-86.
- [13] 曲云卿,张同刚,刘敦华.不同产地枸杞中主要类胡萝卜素的聚类分析 [J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 76-79.
- [14] 陈敏,李赫,马文平,等.反相高效液相色谱法测定枸杞中类胡萝卜素及酯类化合物 [J]. 分析化学, 2006, 34(S1): 27-30.
- [15] 李赫,陈敏,马文平,等.不同成熟期枸杞中类胡萝卜素含量的变化规律 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(3): 599-605.
- [16] 杨亚玲,赵榆林,林强,等.固相萃取-高效液相色谱法测定枸杞中的类胡萝卜素 [J]. 分析实验室, 2004, 23(6): 25-27.
- [17] 王孝荣,罗佳丽,潘年龙,等.响应面优化枸杞色素提取工艺及稳定性研究 [J]. 西南师范大学学报:自然科学版, 2013, 38(8): 108-113.
- [18] 张春兰.枸杞色素的提取及稳定性研究 [M]. 新疆:新疆农业大学, 2005.

(上接第249页)

- [9] 刘婷婷,宋春春,王大为.微波辅助提取马铃薯淀粉及其特性研究 [J]. 食品科学, 2013, 34(6): 106-111.
- [10] 陶华蕾.紫脚板薯淀粉的提取工艺及综合利用研究 [D]. 南昌:江西农业大学, 2011.
- [11] 文红丽.薏苡淀粉提取纯化技术及其理化特性和微孔淀粉的制备研究 [D]. 重庆:西南大学, 2012.
- [12] 刘婷婷,崔海月,樊红秀.超声波辅助提取人参淀粉工艺优化及其性质 [J]. 食品科学, 2014, 35(10): 34-40.
- [13] 郝小燕,张巨松,顾卫红,等.响应面法及三波长技术优化蒽酮比色法测定豆类淀粉含量的研究 [J]. 中国粮油学报, 2009, 24(4): 169-172.
- [14] 郭冬生,彭小兰.蒽酮比色法和酶水解法两种淀粉测定方法的比较研究 [J]. 湖南文理学院学报, 2007, 19(3): 34-36.
- [15] Muralidhar R V, Chirumamila R R. A response surface approach for the companson of lipase production by Candida cylindracea using two different carbon sources [J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 9(1): 17-23.
- [16] 延莎,田玲爱,李琼,等.响应面法优化红芸豆淀粉提取

工艺 [J]. 食品科技, 2015, 40(2): 304-307.

- [17] Cheng Y L, Shao Y Y, Tseng K. Gelation Mechanism and Rheological Properties of Rice Starch [J]. Cereal Chem, 1995, 72(4): 393-400.
- [18] 吴旭丽,童群义.超声-微波协同作用对杭白菊汁水提取影响的研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 253-256.
- [19] 潘青友,童群义.响应曲面法优化超声-微波协同提取百合渣中总皂苷工艺的研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(16): 273-276.
- [20] 张润楚,郑海涛,兰蓝.实验设计与分析及参数优化 [M]. 北京:中国统计出版社, 2003.
- [21] 张海容,白娟,魏增云,等.超声萃取-响应面法优化淡竹叶多糖提取方法研究 [J]. 化学研究与应用, 2013, 25(3): 303-310.
- [22] 姚笛,叶曼曼,李琳,等.响应面法优化玉米芯中低聚木糖的酶法提取工艺 [J]. 中国粮油学报, 2014, 29(11): 14-17.
- [23] 黄生权,李进伟,宁正祥.微波-超声协同辅助提取灵芝多糖工艺 [J]. 食品科学, 2010, 31(16): 52-55.

全国中文核心期刊
轻工行业优秀期刊