

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2019.05.011

木槿花多糖的超声波辅助热水浸提工艺优化及抗氧化活性研究

曹际云

(德州学院 生命科学学院, 山东 德州 253023)

摘要: 以木槿花为材料, 在常规热水浸提基础上辅助超声波破碎提取木槿花多糖。通过单因素实验和 Box-Behnken 实验设计, 采用响应曲面法研究超声波辅助热水浸提工艺对木槿花多糖提取率的影响, 建立多糖提取率与提取因素之间的数学模型。结果表明: 在常规热水辅助超声波破碎提取木槿花多糖时, 在超声时间 20 min、超声功率 473 W、料液比为 1:25 (g/mL) 时木槿花多糖提取率达到 $(6.36 \pm 0.12)\%$ 。体外抗氧化实验初步验证了木槿花多糖对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子(O_2^-)的清除能力较强。

关键词: 木槿花多糖; 超声波辅助提取; 响应曲面; 抗氧化性

中图分类号: TS210.7 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2019)05-0055-06

Optimization of ultrasonic-assisted extraction and antioxidative activity of *Flos Hibisci* polysaccharides

CAO Ji-yun

(The Life of Science Dezhou University, Dezhou Shandong 253023)

Abstract: The polysaccharides were extracted from the white double-flowered *Hibiscus* by ultrasound-assisted hot water extraction technique. Through single factor experiment and Box-Behnken design, the effect of ultrasonic-assisted hot water extraction on the extraction yield of *Flos Hibisci* polysaccharides (HPs) was studied by response surface methodology, and the mathematical model between the extraction yield and the extraction factors was established. The results showed that the extraction yield of HPs reached $6.36 \pm 0.12\%$ when the ultrasonic time was 20 min, the ultrasonic power was 473 W and the ratio of material to liquid was 1:25 g/mL. In vitro antioxidant test preliminarily confirmed that HPs had strong scavenging capacity for hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) and superoxide anions (O_2^-).

Key words: *Flos Hibiscus* polysaccharides; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology; antioxidative activity

木槿 (*Hibiscus syriacus* L.), 属锦葵科木槿属, 灌木。最初的产地可能在亚洲, 它是韩国的国花, 也叫无穷花。我国各地均有栽培。木槿适应性强, 是我国北方地区常用的绿化树种之一^[1]。

木槿花 (*Flos Hibiscus*) 为锦葵科木槿花序, 早上盛开, 晚上败落, 被称为“朝开暮落花”。木槿花兼具食用和药用价值。早在《诗经·郑风》中以“薜”之名出现, 据晋代郭璞《尔雅注》中记载木槿“可食”, 清代吴其濬的《植物名实图考》记“以白花者为蔬, 滑美”。我国浙南、皖南和赣南等地区有食用木槿花的习俗^[2]。木槿花制品有木槿花茶、玉面蒸槿花、槿花炖肉、木槿花饼、

收稿日期: 2019-05-31

基金项目: 山东省 2019 重点研发专项 (2019GSF108113); 国家自然科学基金基本项目 (21701021)

作者简介: 曹际云, 1981 年出生, 女, 硕士。

槿花米汤、木槿花蛋糕等产品。木槿花中含有蛋白质、多糖、微量元素、多酚等多种有益成分,具有抑菌、抗氧化和防癌抗癌等功效^[3]。黄采姣等^[4]通过分析 5 种木槿花卉抗氧化活性的相关性,得出黄酮含量影响着抗氧化活性的强弱。Yoon 等^[5]研究发现木槿花提取成分可以用于恢复皮肤伤口,促进愈伤恢复。木槿花还被大量文献证明其具有治疗咳嗽,缓解疼痛,作为泻药,抗高血压和消炎等药物特性。Vignesh R.M.等^[6]经过研究发现,木槿花黏液可以抑制肺炎克雷伯菌和嗜热链球菌的活性,因此具有杀菌活性。

多糖 (Polysaccharides) 是一种生物大分子物质,具有抗肿瘤、抗氧化、降血糖降血脂、抗病毒、抗衰老和免疫调节作用等^[7]。孙云龙等^[8]研究发现枸杞多糖可能会促进血清细胞因子的分泌、增加促凋亡细胞和降低抑制凋亡蛋白来抑制肿瘤细胞增长,从而具有抗肿瘤作用。金果榄多糖、桑黄多糖、黑木耳多糖等^[9-11]也具有较弱的抗氧化活性。

国内外研究者对木槿花中的花色苷^[12]、多酚^[13]和总黄酮^[4]等物质的提取工艺进行了大量的研究,关于木槿花多糖的提取工艺和活性研究还不够深入。因此本实验在前期常规浸提木槿花多糖的研究基础上,探索了木槿花多糖超声波辅助浸提工艺及其体外抗氧化能力,为木槿花资源的开发与利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

白色重瓣木槿花:来自江苏省宿迁市沭阳县长景园林,恒温干燥(65℃),磨粉,备用。

无水乙醇、浓硫酸、水杨酸、盐酸、硫酸亚铁、双氧水、正丁醇-氯仿(V/V=1/5)等,试剂均为分析纯。

VCX500 超声破壁粉碎仪:美国 SONICS 公司;SXT-06 索氏提取器:上海华睿仪器有限公司;HHS21-8-S 水浴锅:上海新苗医疗器械制造有限公司;PL203 电子天平:梅特勒-托利多仪器有限公司;TDZ5-WS 低速架自动平衡离心机:长沙湘

智离心机仪器有限公司;UV-5500 紫外可见分光光度计:上海元析仪器有限公司;SHZ-D() 循环水式多用真空泵:河南省予华仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 木槿花多糖的提取和测定

取木槿花粉末,过筛。首先通过索氏提取器对木槿花粉末进行脱脂处理,脱脂后晾干备用。用适量蒸馏水作为提取剂,溶解处理好的木槿花粉末,通过调整超声破壁仪的超声时间、热水浸提时间、浸提的温度进行提取,抽滤后得到浸提液,然后醇沉提取液离心,得到多糖沉淀,用蒸馏水溶解多糖沉淀。加入一定体积正丁醇-氯仿,摇晃 15 min,将离心机设置成 4 000 r/min,离心 15 min,弃沉淀,得到木槿花多糖溶液。

木槿花多糖含量测定参照文献^[14],采用苯酚-硫酸法。用 100 mL 容量瓶将木槿多糖溶液稀释 100 倍,再将其稀释 10 倍,往 1 mL 稀释后的木槿花多糖溶液中加入配好的 5% 苯酚溶液 1 mL 和浓硫酸 5 mL,进行 15 min、100℃ 的水浴加热,完成后冷却。在波长 490 nm 测定吸光值。所得葡萄糖标准曲线的线性回归方程所得回归方程 $A=7.7629C+0.0059$ ($R^2=0.9971$)。

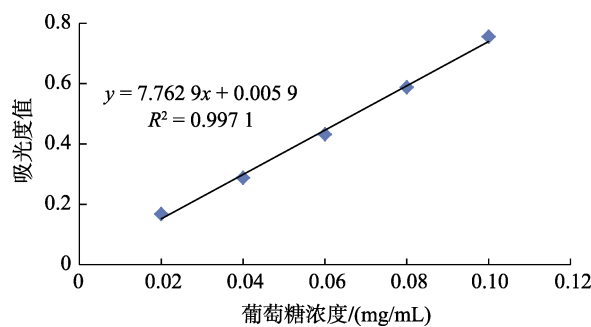


图 1 葡萄糖标准曲线

$$\text{木槿花多糖提取率} = \frac{C \times V \times N}{M} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C 为根据吸光度计算得到多糖浓度, mg/mL; V 为测定所用木槿花多糖溶液体积, mL; N 为木槿花多糖稀释倍数; M 为初始称取木槿花质量, mg。

1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 超声时间对多糖提取率的影响 准确称取 5.0 g 脱脂样品于三角瓶中,加 150 mL 去离子水,在 400 W 超声功率下破碎,时长依次为 5、

10、15、25、30 min, 热水浸提 3 h、温度 80 ℃, 重复 2 次, 测定多糖得率, 确定最适宜超声时间。

1.2.2.2 超声功率对多糖提取率的影响 准确称取 5.0 g 木槿花粉末于三角瓶中, 加 150 mL 去离子水, 超声时间 10 min, 破碎功率分别为 300、350、400、450、500 W, 水浴温度 80 ℃、提取时间 3 h、浸提 2 次, 测定多糖得率, 确定最佳超声功率。

1.2.2.3 液料比对多糖提取率的影响 准确称取 5.0 g 木槿花粉末于三角瓶中, 在 400 W 超声功率下破碎 10 min, 液料比分别为 15:1、20:1、25:1、30:1、35:1, 热水浸 3 h、浸提 2 次、温度 80 ℃, 测定多糖得率, 确定最佳液料比。

1.2.3 响应面优化实验

通过单因素实验和 Box-Behnken 实验设计, 采用响应曲面法研究超声波辅助热水浸提工艺对木槿花多糖提取率的影响, 探讨多糖提取率与提取因素之间的关系, 优化木槿花多糖的提取工艺。响应面优化实验因素与水平见表 1。

表 1 响应面优化实验因素与水平

| 水平 | 因素 | | |
|----|----------|----------|---------|
| | 超声时间 (A) | 超声功率 (B) | 料液比 (C) |
| -1 | 10 | 400 | 20:1 |
| 0 | 15 | 450 | 25:1 |
| 1 | 25 | 500 | 30:1 |

1.2.4 木槿花多糖抗氧化性测定

1.2.4.1 羟基自由基清除能力测定 参照 Fenton 反应体系^[15]。反应体系混匀加入 6 mmol/L FeSO₄ 和 6 mmol/L 水杨酸-乙醇各 2 mL, 再加入不同质量浓度的木槿花多糖提取液 2 mL, 6 mmol/L H₂O₂ 2 mL, 共 8 mL, 水浴反应 1 h (温度 37 ℃), 在波长 510 nm 下测其吸光值。配置 Vc 标准溶液作标样。计算清除率。

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

式中: CR 为清除率, %; A₀ 为蒸馏水代替试样的吸光值; A₁ 为样品吸光值; A₂ 为蒸馏水替代过氧化氢时的吸光度值。

1.2.4.2 超氧阴离子清除能力测定 采用邻苯三酚自氧化法^[16]。准确移取 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 值为 8.2) 3.5 mL、20 mmol/L 的 EDTA 水溶液 0.2 mL, 不同浓度的多糖溶液 0.5 mL 于管中形成混合物。先将混合物在 25 ℃ 水浴 20 min, 再加入等温的 10.0 mmol/L 的邻苯三酚 0.5 mL, 加入后立即摇匀, 准确反应 4 min 后用 1 mL 8 mol/L HCl 终止反应, 待反应 10 min 后测定其吸光值 A₁ (λ = 420 nm)。计算木槿花多糖对超氧阴离子的清除率。

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

式中: CR 清除率, %; A₁ 为样品的吸光值; A₀ 为空白对照的吸光值。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 超声时间对多糖提取率的影响

如图 2 所示, 超声时间 5~15 min 的范围, 多糖浸提率随着超声时间的延长而逐渐增高, 当超声时间超过 15 min 后, 多糖提取率呈现下降趋势。该现象主要归因于超声较长时间后, 细胞受到超声波的机械剪切加剧, 细胞破碎严重, 部分杂质混入多糖溶液, 多糖提取率下降^[17]。综上, 超声波辅助热水浸提木槿花多糖的超声时间宜控制在 15 min 左右。

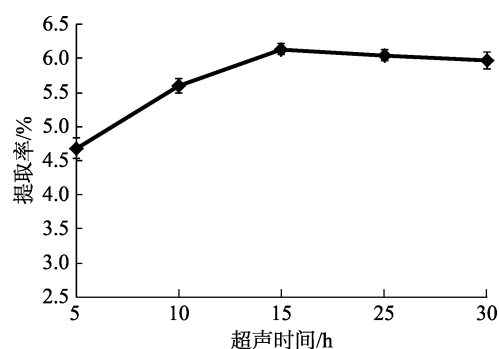


图 2 超声时间对木槿花多糖提取率的影响

2.1.2 超声功率对多糖提取率的影响

如图 3 所示, 超声功率 300~450 W 的范围, 超声功率越大, 多糖浸提率越高, 并在 450 W 时多糖提取率达到最大值 (4.4±0.1) %。当超声功率超过 450 W 后, 多糖提取率不再随着超声功率

的增大而发生变化，提取率趋于平缓。这种现象与相关文献报道^[11]略有不同，原因可能与多糖的不同种类和成分有关系。考虑到提取率、能耗及成本，超声功率宜控制在 450 W 以内。

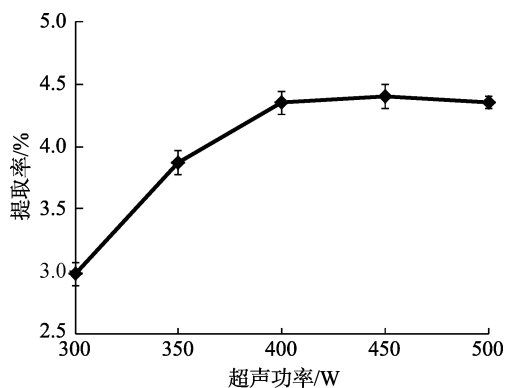


图 3 超声功率对木槿花多糖提取率的影响

2.1.3 液料比对多糖提取率的影响

如图 4 所示，当料液比小于 25 : 1 时，多糖浸提率随着液料比的增大而逐渐增高。而当液料比继续升高为 30 : 1，多糖提取率反而降低。这可能是原料分子间的互相作用减小，导致多糖提取率呈现下降趋势。与前期常规热水浸提木槿花多糖的研究略有不同。常规热水浸提木槿花多糖时，最佳液料比为 30 : 1。使用超声波辅助浸提时，最佳液料比在 25 : 1 即可。这说明，液料比相同的条件下，超声波辅助热水浸提多糖时，细胞破碎更完全，多糖溶出量更高。这有效降低了因料液比过大造成后期的浓缩、沉淀、离心等工作的工作量，有效提高了效率。

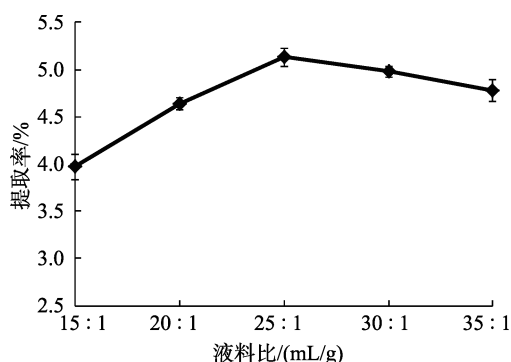


图 4 液料比对木槿花多糖提取率的影响

2.2 响应面法优化木槿花多糖提取工艺

2.2.1 Box-Behnken 实验结果

如表 2 所示，用 Design Expert 8.0 软件分析，

得到多糖得率与超声时间、超声功率和液料比三者之间回归方程：

$$Y=6.17+0.69A-0.30B-0.027C+0.56AB+0.18AC-0.49BC-0.46A^2-0.34B^2-0.41C^2$$

多元回归模型的方差分析见表 3。从表 3 种可知，回归方程模型极显著 ($P<0.000 1$)，失拟项不显著 ($p=0.058 0>0.05$)。模型的校正系数 $R^2=0.989 9$ ，说明该模型可以解释 98.99% 的响应值的变化，相关系数为 $R^2=0.995 6$ ，说明该模型与

表 2 Box-Behnken Design 实验设计与实验响应结果

| 序号 | 因素 | | | 多糖提取率/% |
|----|----|----|----|---------|
| | A | B | C | |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 6.083 |
| 2 | 0 | 1 | -1 | 5.71 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 6.148 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 6.195 |
| 5 | 0 | -1 | 1 | 6.139 |
| 6 | -1 | 1 | 0 | 3.795 |
| 7 | 1 | 0 | -1 | 5.815 |
| 8 | 0 | 1 | 1 | 4.585 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 5.293 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 6.179 |
| 11 | 1 | 1 | 0 | 6.297 |
| 12 | -1 | 0 | 1 | 4.398 |
| 13 | -1 | 0 | 0 | 5.126 |
| 14 | 1 | 0 | 1 | 6.198 |
| 15 | -1 | 0 | -1 | 4.722 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 6.172 |
| 17 | 1 | -1 | 0 | 5.786 |

表 3 回归模型方差分析结果

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值>F |
|----------------|---------|-----|---------|--------|-----------|
| Model | 9.54 | 9 | 1.06 | 175.12 | < 0.000 1 |
| A | 3.22 | 1 | 3.22 | 532.31 | < 0.000 1 |
| B | 0.49 | 1 | 0.49 | 81.01 | < 0.000 1 |
| C | 0.006 | 1 | 0.01 | 1.00 | 0.350 7 |
| AB | 0.68 | 1 | 0.68 | 113.05 | < 0.000 1 |
| AC | 0.12 | 1 | 0.12 | 20.65 | 0.002 7 |
| BC | 0.97 | 1 | 0.97 | 160.47 | < 0.000 1 |
| A ² | 0.82 | 1 | 0.82 | 136.14 | < 0.000 1 |
| B ² | 0.39 | 1 | 0.39 | 63.66 | < 0.000 1 |
| C ² | 0.631 | 1 | 0.63 | 104.26 | < 0.000 1 |
| 残差 | 0.042 | 7 | 0.01 | | |
| 失拟项 | 0.035 | 3 | 0.012 | 6.01 | 0.058 0 |
| 纯误差 | 0.007 7 | 4 | 0.001 9 | | |
| 总误差 | 9.58 | 16 | | | |

实际拟合非常好,实验误差小。其中超声时间及超声功率对响应值具有极显著的影响 ($P<0.0001$),液料比对响应值的影响不显著 ($P>0.05$),超声时间和超声功率之间的交互影响对响应值极显著 ($P<0.01$)。超声时间和功率、超声功率和料液比间的交互作用对响应值影响极显著 ($P<0.0001$)。

2.2.2 响应曲面分析

根据拟合函数,固定一个因素在“0”水平处理,分析另外 2 个因素对多糖得率的影响,做响应面分析,得到各因子交互作用响应面图(图 5)。如图 5 所示,时间和功率、超声功率和料液比、超声时间和液料比对木槿花多糖得率的交互作用极显著。

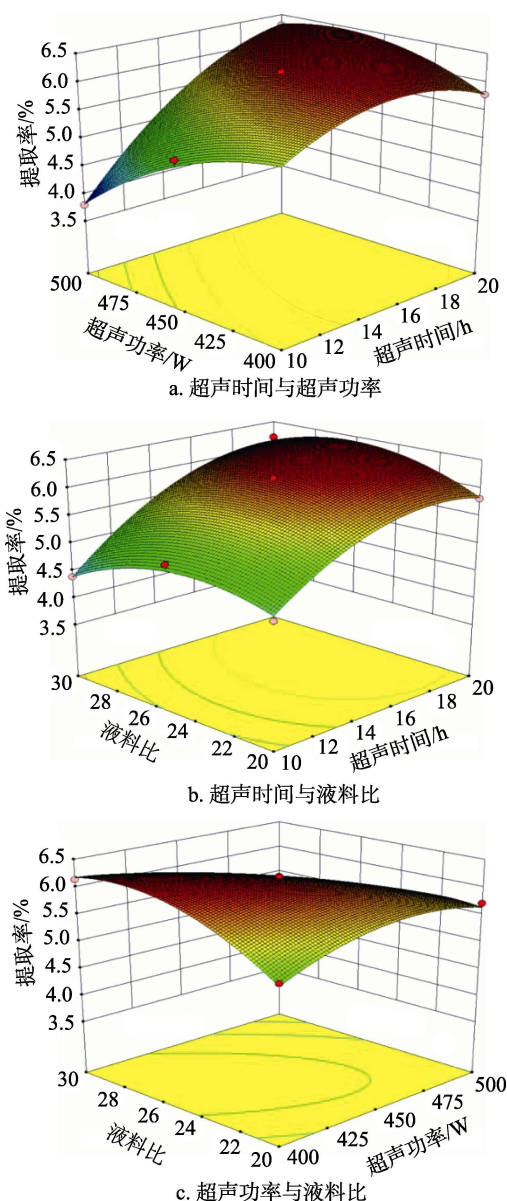


图 5 各因素交互作用对木槿花多糖提取率的响应面图

2.2.3 工艺的优化组合及验证

根据 Box-Behnken 实验设计,采用响应曲面法研究超声波辅助热水浸提工艺对木槿花多糖提取率的影响,建立多糖提取率与提取因素之间的数学模型。结果表明:在常规热水辅助超声波破碎提取木槿花多糖时,在超声时间 20 min、超声功率 473 W、料液比为 1:25 g/mL 时木槿花多糖提取率达到 $(6.36\pm 0.12)\%$ 。多糖提取率与超声时间、超声功率和液料比等 3 个因素之间的多元二次回归模型对木槿花多糖的提取条件优化可行,工艺参数准确。

2.3 木槿多糖抗氧化能力测定结果

2.3.1 木槿花多糖对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用

以 Vc 为对照品,由图 6 可知,样品浓度在 0.5~4 mg/mL 的范围,木槿花多糖浓度越大,羟基自由基的清除率越高。当木槿花多糖浓度达到 4 mg/mL 时, $(52.2\pm 0.7)\%$ 羟基自由基被清除。表明木槿花多糖清除羟基自由基时存在一定的量效关系。

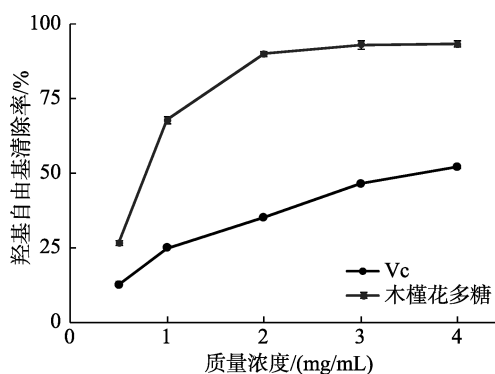


图 6 Vc 和木槿花多糖对羟基自由基的清除能力

2.3.2 木槿花多糖对超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除作用

以 Vc 为对照品,由图 7 可知,Vc 和木槿花多糖浓度在 0.5~4 mg/mL 的范围,随着样品浓度的增大, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 被清除的效果越好,当木槿花多糖浓度达到 2 mg/mL 时,可清除掉 $(52.09\pm 1.23)\%$ 的超氧阴离子自由基。说明表明木槿花多糖清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 时存在一定的量效关系。

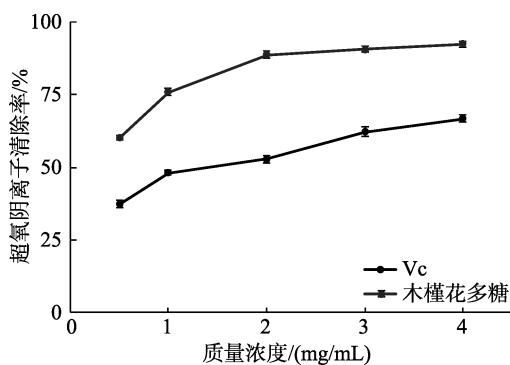


图 7 Vc 和木槿花多糖对超氧阴离子的清除能力

3 结论

根据 Box-Behnken 实验设计, 采用响应曲面法研究超声波辅助热水浸提工艺对木槿花多糖提取率的影响, 优化木槿花多糖的提取工艺。结果表明: 在常规热水辅助超声波破碎提取木槿花多糖时, 在超声时间 20 min、超声功率 473 W、料液比为 1:25 g/mL 时木槿花多糖提取率达到 (6.36±0.12)%。体外抗氧化实验初步验证了木槿花多糖对羟基自由基和超氧阴离子的清除能力较强。

参考文献:

- [1] 李秀芬, 朱建军, 殷丽青, 等. 木槿开花特性及食用价值[J]. 经济林研究, 2014, 32(1): 175-178.
- [2] 陈家龙, 朱建军, 王魏伟, 等. 浙南地区不同食用木槿花瓣营养成分分析与比较[J]. 食品研究与开发, 2015, 5(10): 131-132.
- [3] 苏建青, 刘学彬, 张晓云, 等. 植物多糖免疫功能调节研究进展[J]. 湖北农业科学, 2018(11): 10-13.
- [4] 黄采姣, 李安平, 李建周, 等. 木槿花生物活性成分分析及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2019, 40(3): 42-47.
- [5] YOON S W, LEE K P, KIM D Y, et al. Effect of absolute from hibiscus syriacus L. flower on wound healing in keratinocytes[J]. Pharmacogn Magazine, 2017, 13(49): 85-89.
- [6] VIGNESH R M, BINDU R, NAIR. A study on the antioxidant and antibacterial potential of the mucilage isolated from *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. (Malvaceae) [J]. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2018, 7(2): 1633-1637.
- [7] 桑野, 李晓光, 张昌浩, 等. 国内植物多糖的研究及发展趋势[J]. 吉林医药学院学报, 2017(6): 455-457.
- [8] 孙云龙, 庞博, 刘鑫, 等. 枸杞多糖体外抗肿瘤及免疫学[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(20): 5057-5059.
- [9] 蒋德旗, 柴善怀, 张兰熙, 等. 响应面法优化金果榄多糖提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2019(4): 85-90.
- [10] 崔诗遥, 曾鹏, 郎明紫, 等. 桑黄多糖的体外抗氧化作用研究[J]. 蚕桑通报, 2019, 50(1): 12-14.
- [11] 包鸿慧, 于婷婷, 盛倩, 等. 超声波辅助热水浸提黑木耳多糖工艺的优化研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2013, 25(3): 45-49.
- [12] 刘群录, 张宝智, 张彦婷, 等. 响应面法优化木槿花色苷超声辅助提取工艺研究[J]. 东北农业大学学报, 2014(2): 54-59.
- [13] 张雪娇, 金晨钟, 胡一鸿, 等. 响应面法优化超声提取木槿花多酚的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2015(21): 228-231.
- [14] 高馨, 郭义美, 周君, 等. 苯酚-硫酸法测定红参多糖含量研究[J]. 实验室科学, 2018, 21(1): 28-30.
- [15] 崔诗遥, 曾鹏, 郎明紫, 等. 桑黄多糖的体外抗氧化作用研究[J]. 蚕桑通报, 2019, 50(1): 12-14.
- [16] 刘丹丹, 朱志学, 马健, 等. 地木耳多糖的抗氧化活性与抗菌活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(4): 921-926.
- [17] 董汝晶. 多糖提取方法的研究进展[J]. 农产品加工, 2014(8): 46-48, 51. 完