DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.2013.01.002



文章编号:1003-8701(2013)01-0075-05

# 超声波辅助提取番木瓜提取液抗氧化活性研究

杨玲娥,康永锋,马晨晨,陈 琦

(上海海洋大学食品学院,上海 201306)

摘 要:采用DPPH自由基清除率研究超声波辅助提取番木瓜乙醇提取液的抗氧化能力。主要研究提取温度、提取时间和提取功率对番木瓜乙醇提取液抗氧化活性的影响,并且以DPPH·清除率最大值为衡量标志,采用单因素和正交试验结合确定最佳提取条件,同时测定了番木瓜乙醇提取液中总多糖、总黄酮和总多酚的含量,研究了番木瓜乙醇提取液中总多糖、总黄酮和总多酚的含量和DPPH·清除率的相关性。通过正交试验研究得到的结论为:对以无水乙醇为溶剂番木瓜提取液,以DPPH·清除率最大为抗氧化活性衡量标准超声辅助提取最佳工艺条件为:提取时间30 min,提取温度40℃,超声功率为600W;3个因素对番木瓜乙醇提取液DPPH·清除率影响程度为:提取时间>提取温度>超声功率。番木瓜乙醇提取液的总多糖、总黄酮和总多酚含量与DPPH·清除率无可循相关性。

关键词:二苯代苦味肼基自由基(DPPH·);番木瓜;抗氧化活性;超声波辅助提取

中图分类号:TS201.1 文献标识码:A

# Studies on the Anti-oxidant Activity of Ultrasonic-assisted Extraction from Fruit of Carica Papaya

YANG Ling-e, KANG Yong-feng, MA Chen-chen, Chen Qi

(*School of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306, China)

Abstract: The DPPH radical scavenging activities was used as the main indicator of the antioxidant capacity of ultrasonic-assisted ethanol extracts from fruit of Carica papaya in different condition. Effects of extraction temperature, extraction time and extraction ultrasonic power on antioxidant activities of ethanol extracts from fruit of Carica papaya were studied. The maximum of clearance to DPPH was used as evaluating criteria. The best extracting condition was optimized by single factor and the orthogonal experiments. The content of total polysaccharide, total flavonoids and total polyphenols in these ethanol extracts were determined. The relationship among the content of total polysaccharide, total flavonoids, total polyphenols and the DPPH radical scavenging activities in these ethanol extracts was studied. Through orthogonal experiments, the optimal extraction conditions were determined: extraction time 30 min, extraction temperature 40℃, extraction ultrasonic power 400W. The influence degree of three factors on the extraction condition was the extraction time > the extraction temperature > the extraction ultrasonic power. No notable relationship among the content of total polysaccharide, total flavonoids, total polyphenols and the DPPH radical scavenging activities in these ethanol extracts was found.

Keywords: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; Carica papaya; Antioxidant activity; Ultrasonic-assisted extraction

番木瓜(*Carica papaya*)为番木瓜科番木瓜属多年生肉质草本植物,是一种热带常绿果树,又名“万寿果”、“番瓜”,俗称“木瓜”[1-2]。原产于墨西哥和中美洲,广泛栽培于热带和亚热带地区[3],自17

收稿日期:2012-09-26

基金项目:上海市教育委员会重点学科建设项目(J50704)

作者简介:杨玲娥(1964-),女,讲师,硕士,主要从事有机化学教学、天然有机化合物提取与应用研究。

世纪传入我国，主产于广东、海南、广西、台湾等地。

番木瓜素有“岭南佳果”的美称，成熟后果肉味甜而清香，番木瓜营养丰富、药食兼用[4-5]，为广受欢迎的水果。木瓜中含有与抗氧化效应有关的成分有齐墩果酸(萜类)、柠檬酸、维生素 C、黄酮类、鞣质、多酚类物质[6]，它们在消除自由基和活性氧以免引发体内细胞和组织的氧化损伤方面发挥着不同的功能。近年来国内对蔷薇科木瓜属木瓜抗氧化活性研究的人较多[7-11]，但对人们日常广泛食用的番木瓜科番木瓜抗氧化活性研究较少，尤其对番木瓜体外抗氧化活性的研究。

本试验采用无水乙醇作溶剂，采用超声萃取法提取市售番木瓜的抗氧化活性成分，并以 DPPH 清除率为抗氧化活性衡量标准研究超声辅助提取工艺对提取液抗氧化活性影响，同时研究番木瓜提取液中多糖、多酚及黄酮这些具有抗氧化活性的物质含量与番木瓜提取液抗氧化活性的相关性。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料与试剂

海南番木瓜(*Carica papaya*)，购于超市，果实成熟呈金黄色。

DPPH·(二苯基苦味酰基苯肼、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl，日本和光纯药工业株式会社 AR)；芦丁(国药集团化学试剂公司)；无水乙醇、浓硫酸、蒽酮、葡萄糖、乙酸乙酯、三氯化铝、钨酸钠、钼酸钠、磷酸、盐酸、溴水、硫酸锂、没食子酸，碳酸钠等试剂均为分析纯。

## 1.2 仪器与设备

XH-2008D 电脑智能温控低温超声波合成萃取仪：北京祥鹄科技发展有限公司出品；UV2000 型紫外可见分光光度计：龙尼可(上海)仪器有限公司产品；Mettler 电子天平：梅特勒一托力多仪器(上海)有限公司产品。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 番木瓜提取液制备方法

取适量鲜木瓜，去皮，用研钵制成果泥。准确称取 1.0 g 木瓜泥，转入 100 mL 烧瓶中加入 50 mL 无水乙醇，置于超声萃取仪器中。设置一定功率，调节一定温度，超声萃取一定时间后，将提取液冷却后抽滤。滤液即为待测木瓜提取液。

### 1.3.2 自由基清除率(SA)测定方法

按照参考文献[12]，吸取 2.0 mL 待测木瓜醇提液于试管中，再吸取 2.0 mL DPPH·乙醇溶液($6.5\times 10^{-5}$ mol/L)，充分混合后在室温下静置 30 min，于波长 517 nm 处测定吸光度 Ai；吸取 2.0 mL DPPH·乙醇溶液($6.5\times 10^{-5}$ mol/L)加入 2.0 mL 60%乙醇，测定吸光度 Ao；吸取 2.0 mL 待测木瓜醇提液加入 2.0 mL 60%乙醇，测定吸光度 Aj。

样品对 DPPH·自由基的清除能力(scavenging activity，SA)可用公式表示为：

$$SA(\%)=1-[(Ai-Aj)/Ao]\times 100\%$$

Ao 为 DPPH·与溶剂混合液的吸光度；Ai 为 DPPH·与样品反应后的吸光度；Aj 为样品与溶剂混合液的吸光度。

将试验重复 3 次，求得清除率的平均值。

### 1.3.3 提取液总黄酮的测定

按照参考文献[13]，精密称取在 105℃减压干燥至恒重的芦丁标准品 20.0 mg，用 60%乙醇溶解，定容到 100 mL，得到 0.200 mg/mL 的芦丁标准溶液。分别吸取上述芦丁标准溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 mL 于 10 支 25 mL 容量瓶中，加入 1.0 mL 5% $NaNO_2$ 溶液，摇匀，放置 6 min 后加入 1.0 mL 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液，摇匀，放置 6 min 后再加入 10.0 mL 5% NaOH 溶液，摇匀，用 60%乙醇定容至刻度，放置 15 min 后在 510 nm 处测定其吸光值，用第一瓶试剂作参比。以芦丁浓度对吸光值作图，并做线性回归，得标准曲线和回归方程 y=13.324x-0.001 5，R=0.999 7，在 8～70μg/mL 的范围内芦丁浓度与吸光度具有良好的线性关系。

提取液总黄酮含量测定和计算：吸取 5.0 mL 提取液于 25 mL 容量瓶中，与上述芦丁标准溶液加入相同试剂后，在 510 nm 处测定吸光值，用空白试剂作参比。若吸收值 A 在上述标准曲线之外，将提取液稀释 n 倍，直至在标准范围内，找到对应浓度值 c，那么提取液黄酮含量即为 5nc。

### 1.3.4 提取液总多糖的测定

按照参考文献[14]，精密称取在 105℃减压干燥至恒重的葡萄糖标准品 500 mg，少量蒸馏水溶解，加 0.25 mL 浓硫酸，用蒸馏水定容至 50 mL。精确吸取该液 1.0 mL，定容至 100 mL 得葡萄糖标准溶液，浓度为 0.100 mg/mL。分别吸取上述葡萄糖标准溶液配制成不同浓度的葡萄糖标准溶液，加入 0.5 mL 蒽酮乙酸乙酯试剂和 3 mL 浓硫酸，充分混合，放置 20 min 后在 624 nm 处测定吸收值用空白试剂作参比。以葡萄糖浓度对吸光值作图，并做线性回归，得标准曲线和回归方程 y=

0.012x- 0.00 23，R=0.999 5，在 10～70μ g/mL 的范围内葡萄糖浓度与吸光度具有良好的线性关系。

提取液总多糖含量测定和计算：吸取 1.0 mL 提取液中加入 0.5 mL 蒽酮乙酸乙酯试剂，3 mL 浓硫酸，用力振荡，再静置 20 min，在 624 mm 处测定吸收值 A，若吸收值 A 在上述标准曲线之外，稀释提取液 n 倍，直至在标准范围内，找到对应浓度值 c，那么提取液总多糖含量即为 nc。

1.3.5　提取液总多酚的测定

按照参考文献[15]配制福林酚试剂。精密称取 500 mg 没食子酸，用蒸馏水溶解并定容至 100 mL 作为多酚标准溶液，该溶液浓度为 5.00 mg/mL。吸取上述多酚标准溶液配制成不同浓度的多酚标准溶液，分别移取不同浓度的多酚标准液 1.0 mL 到 10 个 100 mL 的容量瓶中，分别加入 60 mL 的水，混合后加入 5 mL 福林酚试剂，混合，在 8 min 内，加入 15 mL 20%碳酸钠溶液，用蒸馏水定容。将上述标准溶液在 20℃放置 1 h 后，在波长为 765 nm 下测定吸光值，用空白试剂作参比。以没食子酸浓度对吸光值作图，并做线性回归，得标准曲线和回归方程 y=2.19x- 0.001 0，R =0.998 9，在 50～350μ g/mL 的范围内没食子酸浓度与吸光度具有良好的线性关系。

提取液总多酚含量测定和计算：吸取 1.0 mL 提取液到 100 mL 的容量瓶中，其他操作同上述多酚标准曲线绘制时对各不同浓度标准溶液的操作，然后在波长为 765 nm 下测定吸光值，绘制标准曲线，若吸收值 A 在上述标准曲线之外，稀释提取液 n 倍，直至在标准范围内，找到对应浓度值 c，那么提取液总多酚含量即为 nc。

## 2　结果与分析

### 2.1　超声萃取提取工艺对提取液 DPPH·清除率单因素影响

#### 2.1.1　提取时间

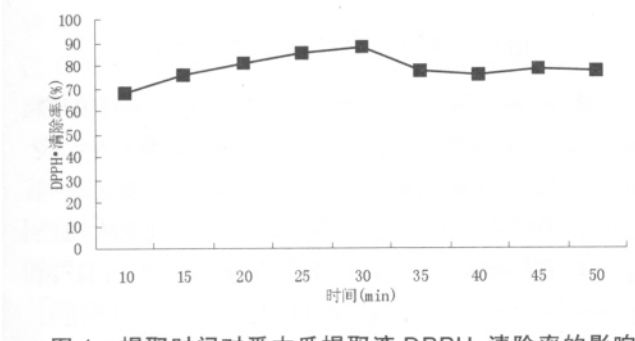


图 1　提取时间对番木瓜提取液 DPPH·清除率的影响

称取 1.0 g 木瓜泥，转入 100 mL 烧瓶中加入 50 mL 无水乙醇，置于超声萃取仪器中。设置超声功率 500W，调节温度 50℃，提取时间分别选用 10、15、20、25、30、35、40、45、50 min，研究提取时间对 DPPH ·清除率的影响。图 1 为试验结果。

由图 1 可见，以 30 min 为转折点，从 10 min 到 30 min 提取液的 DPPH·清除率逐渐上升，在 30 min 时达到最高，从 30 min 后，提取液的 DPPH·清除率则逐渐下降。该现象表明提取液抗氧化活性在 30 min 内随着提取时间增长浓度增加，因而提取液抗氧化活性不断增加，在 30 min 后，某些抗氧化物质可能发生一定降解，因而抗氧化活性反而下降。30 min 可以认为最佳提取时间。

#### 2.1.2　提取温度

称取 1.0 g 木瓜泥，转入 100 mL 烧瓶中加入 50 mL 无水乙醇，置于超声萃取仪器中。设置超声功率 500W，提取时间选用 30 min，调节温度为 20、30、40、50、60、70℃，研究提取温度对 DPPH·清除率的影响。图 2 为试验结果。

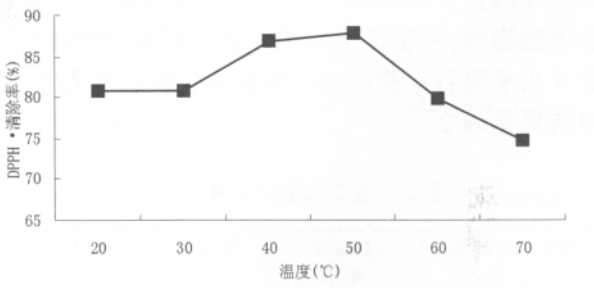


图 2　提取温度对番木瓜提取液 DPPH·清除率的影响

由图 2 可见，番木瓜提取液在提取温度为 50℃时最佳，DPPH·清除率(SA)最大，之后随温度的升高提取液清除率反而降低。该现象表明提取液开始时随着提取温度增加抗氧化活性物质浸出浓度增加，在大于 50℃后可能某些抗氧化物质发生降解，因而抗氧化活性下降。50℃可以认为最佳提取温度。

#### 2.1.3　超声功率

称取 1.0 g 木瓜泥，转入 100 mL 烧瓶中加入 50 mL 无水乙醇，置于超声萃取仪器中。设置超声功率 300、400、500、600、700W，提取时间选用 30 min，提取温度选用 50℃，研究超声功率对 DPPH·清除率的影响。图 3 为试验结果。

由图 3 可见，番木瓜提取液在功率 500W 时 DPPH·清除率(SA)最高，在大于 500W 后可能某

些抗氧化物质发生降解，因而抗氧化活性下降。500W 提取功率可认为最佳超声功率。

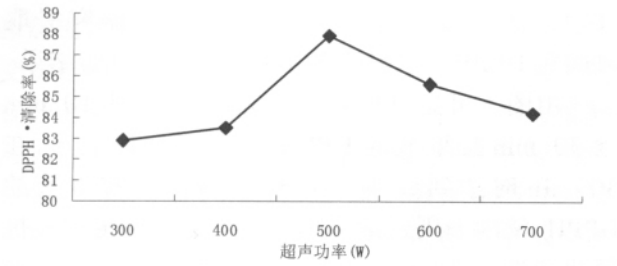


图 3 超声功率对番木瓜提取液 DPPH·清除率的影响

## 2.2 超声萃取提取因素对番木瓜提取液 DPPH·清除率影响正交试验

表 1 正交实验因素水平

| 编号 | A 提取时间(min) | B 提取温度(℃) | C 超声功率(W) |
|---|---|---|---|
| 1 | 25 | 40 | 400 |
| 2 | 30 | 50 | 500 |
| 3 | 35 | 60 | 600 |

由于实际提取操作中提取时间、温度及超声功率 3 因素交叉影响，为了考察各因素对总提取效果的影响，根据以上单因素试验结果，选用 3 因素 3 水平进行正交试验。因素水平设计见表 1，试验结果见表 2。

表 2 正交试验设计和结果

| 序号 | A 提取时间 | B 提取温度 | C 超声功率 | DPPH·清除率 SA(%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 80.25 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 81.22 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 78.78 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 83.76 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 82.22 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 92.44 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 87.61 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 72.00 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 77.55 |
| $k_1$ | 80.08 | 83.87 | 81.56 | |
| $k_2$ | 86.14 | 81.81 | 80.84 | |
| $k_3$ | 79.05 | 82.93 | 82.87 | |
| R | 7.09 | 2.06 | 2.03 | |

由表 2 分析可知，3 个考察因素番木瓜乙醇提取液 DPPH·清除率影响程度为：A>B>C，即提取时间 > 提取温度 > 超声功率；最佳工艺组合为 $A_2B_1C_3$，即提取时间 30 min，提取温度 40℃，超声功率为 600 W。

## 2.3 番木瓜提取液 DPPH·清除率与提取液总多糖、总黄酮及总多酚含量相关性

番木瓜乙醇提取液含有多种抗氧化活性物质[16]，总多糖、总黄酮、总多酚都具有清除 DPPH·的活性，为试图搞清番木瓜提取液 DPPH·清除率与这些抗氧化活性物质在番木瓜提取液中的含量的相关性，因此将正交试验所得各组提取液除测定 DPPH·清除率外还测定了提取液中的总多糖、总多酚、总黄酮含量。总多糖含量用蒽酮 - 硫酸法，总多酚含量用福林酚法，总黄酮含量则用芦丁做对照品，具体操作按 1.3.4、1.3.5 和 1.3.3。测定结果见图 4、图 5、图 6。

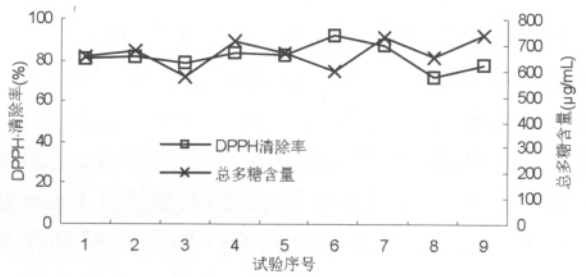


图 4 DPPH·清除率和总多糖含量

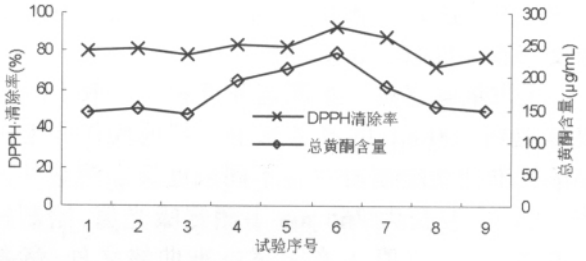


图 5 DPPH·清除率和总黄酮含量

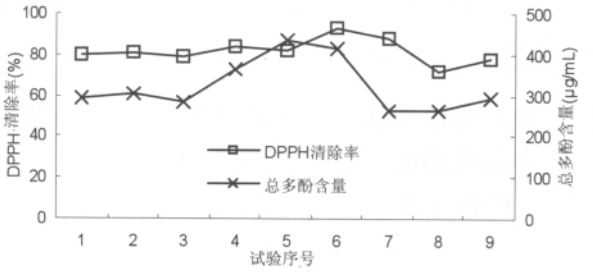


图 6 DPPH·清除率和总多酚含量

图 4 显示番木瓜乙醇提取液各组溶液中的总多糖含量与 DPPH·清除率无可循相关性；图 5 表明番木瓜乙醇提取液各组溶液中的总黄酮含量与 DPPH·清除率无明显相关性；由图 6 看出番木瓜乙醇提取液各组溶液中的总多酚含量也与 DPPH·清除率无可见相关性。原因可能因为番木瓜中还有 Vc、类胡萝卜素等具有抗氧化活性物质[16]，这可以

表明,番木瓜乙醇提取液对 DPPH·清除作用是所有存在于番木瓜提取液中的抗氧化活性物质综合作用效果,总多糖、总黄酮、总多酚对 DPPH·清除作用都不是主导作用的组分。

## 3　结　论

对以无水乙醇为溶剂番木瓜提取液,通过单因素试验和正交试验优化,得到以 DPPH·清除率最大为抗氧化活性衡量标准超声辅助提取最佳工艺条件为 :提取时间 30 min,提取温度 40℃,超声功率为 600W ;3 个因素对番木瓜乙醇提取液 DPPH·清除率影响程度为 :提取时间 > 提取温度 > 超声功率。

番木瓜乙醇提取液的总多糖、总黄酮和总多酚含量与 DPPH·清除率无可循相关性,番木瓜乙醇提取液对 DPPH·清除作用是番木瓜提取液中的所有抗氧化活性物质综合作用效果。

参考文献 :


[1] 李向宏,何　凡,华　敏 . 海南番木瓜产业优势及发展对策[J] . 中国果业信息,2004,20(3) :1- 2 .

[2] 张文学,胡　承,李仕强 . 番木瓜资源的应用状况[J] . 四川食品与发酵,2000(1) :26- 34 .

[3] Karina Almora, Jorge A Pino, Mercedes Hernandez. Evaluation of volatiles from ripening papaya (Carica papaya L., vat. Maradol roja)[J] . Food Chemistry, 2004(86): 127- 130 .

[4] Jorge A Pino, Karina Almoral, Rolando Marbot. Volatile components of papaya(Carica papaya L. Maradol variety)fruit [J] . Flavour Fragr, 2003(18): 492- 496 .

[5] Marisa M Wal1. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana(Musa sp. )and papaya(Carica papaya) cultivars grown in Hawaii [J] . Journal of Food Composition and Analysis,2006(19): 434- 445 .

[6] Kondo S, Kittikorn M, Kanlayanarat S. Preharvest Antioxidant Activities of Tropical Fruit and the Effect of Low Temperature Storage on Antioxidants and Jasmonates [J] . Postharvest Biology and Technology, 2005, 36(3): 309- 318 .

[7] 张　婷,糜漫天,唐　勇,等 . 光皮木瓜多酚类的提取和清除 DPPH 的抗氧化活性[J] . 营养学报,2007,29(5) :485- 489 .

[8] 胡华平,韩雅莉,张　峰 . 木瓜提取物抗氧化性质的初步研究[J] . 食品科学,2008,29(6) :645- 648 .

[9] 刘朝霞,胡士德,邹　坤,等 . 资木瓜乙醇提取物的体外抗氧化活性研究[J] . 三峡大学学报,2008,30(4) :72- 75 .

[10] 黄海兰,王海媛,高　昭,等 . 崂山光皮木瓜提取物抗氧化活性研究[J] . 食品科学,2009,30(17) :45- 47 .

[11] 张淑娟,徐怀德,米林峰,等 . 光皮木瓜汁体外抗氧化活性研究[J] . 食品科学,2011,32(21) :56- 61 .

[12] 许宗运,马少宾,张秀萍,等 . DPPH·法评价 37 种植物抗氧化活性[J] . 塔里木农垦大学学报,2004,16(3) :1- 4 .

[13] 刘朝霞,杨兴海,邹　坤 . 大孔吸附树脂分离纯化资木瓜黄酮的研究[J] . 中国中药杂志,2008,33(2) :139- 142 .

[14] 邹　瑶,齐桂年,王绍梅 . 茉莉花渣多糖含量测定方法的建立及抗氧化作用研究 [J] . 氨基酸和生物资源,2010,32(2) :76- 79 .

[15] 吴晓青,陈　丹,邱红鑫,等 . 芙蓉李中总多酚含量测定方法的优选[J] . 中国中医药科技,2011,18(2) :131- 133 .

[16] 吴显荣 . 番木瓜的生物化学 [J] . 热带作物科技,1992(1) :5- 11 .


(上接第 66 页) 组织再生植株生根率不断下降。20 d 后猕猴桃愈伤组织再生植株生根率在不同 $Cu^{2+}$ 浓度之间相差不明显,可能由于生根时间长的原因。

## 3　讨　论

铜是植物正常生命活动所必需的微量矿质元素,为多酚氧化酶、抗坏血酸氧化酶的成分,在呼吸的氧化还原过程中起重要作用。同时也存在于叶绿体的质体蓝素中,参与光合作用的电子传递,并有稳定叶绿素的功能[3- 4]。关于铜离子对植物器官再分化的促进作用的影响研究在水稻等植物中已有报道[5- 6]。本试验借鉴前人的研究,在猕猴桃愈伤组织再分化培养时增添了不同浓度的铜离子。研究发现,在培养基中适度增加铜离子,能够有效地改善愈伤组织质量,提高其胚性状态,并且猕猴桃愈伤组织转绿天数变短,绿芽分化率提高,但浓度过大则不利于再分化。这可能是由于铜离子处理激发了愈伤组织 POX 的活性,进而影响了愈伤组织生长发育的进程,提高了绿苗的分化率。同时,也可能由于铜离子与培养基中激素和培养基中的营养元素相互作用,通过与外植体内源激素的相互作用而提高愈伤组织再生频率[7- 8]。关于此问题的具体机制,还有待于进一步的深入研究。

参考文献 :


[1] 陈东虹 . 猕猴桃的药理活性研究进展 [J] . 广东药学院学报,2002,18(3) :231- 234 .

[2] 文国琴,何　震 . 红阳猕猴桃茎段愈伤组织诱导成苗技术[J] . 福建林业科技,2004,31(4) :78- 79 .

[3] 宋凤鸣,郑　重,葛秀春 . 活性氧及膜脂过氧化在植物 - 病原物互作中的作用[J] . 植物生理学通讯,1996,32(5) :377- 385 .

[4] 邱金龙,金巧玲,王钧 . 活性氧与植物抗病反应[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(1): 56- 63 .

[5] 马　静,安永平,孙建昌,等 . 微量元素对宁夏粳稻愈伤组织绿苗分化的影响[J] . 西北农业学报,2009,18(5) :213- 216 .

[6] 杨跃生,简玉瑜,郑迎冬 . 铜在水稻愈伤组织培养再生植株的促进作用[J] . 中国水稻科学,1999,13(2) :95- 98 .

[7] 刘元凤,刘彦卓,贺　红,等 . 几种影响籼稻成熟胚愈伤组织诱导及再生的因素 [J] . 植物生理学通讯,2004,40(3) :319- 322 .

[8] 徐吉臣,Yohan M. W.,Jeffery L. B. 高粱(*Sorghum bicolor*)分子图的构建及寄生草(*Striga asiatica*)萌发诱导物基因的定位[J] . 遗传学报,2001,28(9) :870- 876 .