

大蒜渣中多酚物质的提取研究

李浩, 贺帮亮, 洪松, 钱根, 吉昌龙, 张宽朝* (安徽农业大学生命科学学院, 安徽合肥 230036)

摘要 [目的] 对大蒜渣中的多酚物质进行提取研究, 以提高大蒜的资源利用率。[方法] 以大蒜渣为材料, 对其中的多酚类物质进行提取, 在单因素试验的基础上, 对溶剂浓度、提取温度、时间、料液比 4 个单因素进行正交试验, 并采用酒石酸亚铁分光光度法测定了总酚含量。[结果] 试验表明, 大蒜渣中多酚物质提取的适宜工艺条件为乙醇浓度 65%, 温度 50 ℃, 时间 70 min, 料液比 1:20 g/ml, 该类大蒜渣多酚粗提液具有一定的还原能力, 为一类有开发价值的天然产物。[结论] 研究可为促进大蒜渣中活性成分的开发利用和大蒜深加工技术的应用, 提升大蒜的资源利用率、加大农副产品综合利用研究提供参考。

关键词 大蒜渣; 多酚类物质; 提取

中图分类号 S609.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)30-10669-04

Study on Extraction of Polyphenols from the Garlic Residues

LI Hao, HE Bang-liang, HONG Song, ZHANG Kuan-chao* et al (School of Life Science, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract [Objective] To extract and study polyphenol substance from the garlic residues, improve utilization rate of garlic resources. [Method] With garlic residue as material, polyphenol substance was extracted. On the basis of single factor test, the orthogonal tests were carried out based on single factors including concentration of ethanol, extracting temperature, time and solid-liquid ratio. Total polyphenol substance were determined by the ferrous tartrate spectrophotometry. [Result] The results indicated that the optimum extracting condition as follows, ethanol 65%, temperature 50 ℃, extraction time of 70 min, solid-liquid ratio 1:20 g/ml. The results also showed that the polyphenolic extract has the deoxidizing ability, and is a promising natural antioxidant. [Conclusion] The study can provide reference for promoting development and utilization of active ingredients in garlic residue, application of garlic deep processing technique, improving utilization rate of garlic resources, strengthening comprehensive utilization of agricultural by-product.

Key words Garlic residue; Polyphenol substance; Extraction

大蒜, 百合科葱属植物, 有“土里长出的青霉素”的美称^[1]。现已证实, 大蒜的主要医用成分是二烯丙基三硫化物(即大蒜新素), 其具有抗菌消炎、抗癌、降压、增强机体免疫力等作用^[2]。大蒜还含有人体所必需的多种微量元素(如硒、锗、锌等)、维生素和氨基酸等。近年来, 国际上对大蒜油的需求不断增加, 故产生了大量的蒜渣。研究表明, 蒸馏法提取大蒜油后的剩余蒜渣(约占大蒜总重量的 99.5% 左右)均被遗弃掉, 这不仅造成了资源的极大浪费, 且由于蒜渣具有较强的刺激性臭味, 严重污染了环境^[3]。因此, 对大蒜渣的开发利用迫在眉睫。已有研究结果表明, 提取大蒜油后的大蒜渣含有人体所必需的矿物质、多种维生素、17 种氨基酸及微量元素硒、锗、碘、锌和 SOD(超氧化物歧化酶), 还有少量大蒜素, 具有很强的抗菌、消炎、降血压、降血脂能力, 对动脉硬化、心肌梗塞、血栓症、糖尿病有非常好的疗效, 且有抗病毒、抑制血小板凝聚、防治癌症和肿瘤、增强免疫功能、延缓衰老等功效, 有很高的开发利用价值, 并具有良好的经济效益和社会效益^[1-3]。

植物多酚类化合物是一类具有多个酚羟基化合物的总称, 是植物体内最重要的次生代谢产物。植物多酚具有很强的抗氧化性能和明显的抑菌、抗病毒、抗癌、抗老化以及抑制胆固醇上升等作用^[4-5]。因其独特的功能活性, 植物多酚已经被大量应用于医学、皮革、食品以及日用化工等相关领域, 且发挥出不可代替的功用。同时, 伴随着天然产物开发利用的不断兴起, 植物多酚类化合物已成为研究天然产物和有机

化学的重点, 国内外科学学者纷纷从不同角度和领域对植物多酚展开了广泛而深入的科研工作。

笔者以大蒜渣为材料, 对其中的多酚类物质进行提取, 探索大蒜渣的开发途径, 以促进大蒜渣中活性成分的开发利用和大蒜深加工技术的应用, 为提升大蒜的资源利用率、加大农副产品综合利用研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 大蒜, 购于合肥市菜市场; 焦性没食子酸、酒石酸钾钠、硫酸亚铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、甲醇、乙醇、丙酮等, 均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 原料预处理。 取大蒜约 200 g, 剥皮, 自来水浸泡 20~30 min。将浸泡过的大蒜放在组织捣碎机中, 加水至刚好漫过大蒜, 充分捣碎。将捣碎后的蒜渣倒入圆底烧瓶, 加入约等体积的水, 置于水浴锅中水浴处理(50 ℃ 水浴 2 h 或者 55 ℃ 水浴 4 h)。电热套上加热, 以水蒸汽进行蒸馏 1~3 h 不等, 加热过程中可见黄色大蒜精油被蒸馏出, 当观察不到精油继续馏出时即可停止加热(加热时间约为 1 h)。稍冷却后用 4 层纱布过滤, 即为蒜渣。稍晾干, 均匀平铺于白瓷盘上, 于 50 ℃ 的鼓风干燥箱中进行薄层干燥, 直至恒重为止^[6]。粉碎机粉碎, 备用。

1.2.2 单因素试验。

1.2.2.1 溶剂种类的选择。 在料液比 1:10 g/ml, 固定的提取温度为 30 ℃ 和提取时间为 60 min 的条件下, 分别用 60% 甲醇、60% 乙醇和蒸馏水提取, 比较不同溶剂对提取液中大蒜渣中多酚含量的影响, 选择适合用于大蒜渣多酚物质提取的溶剂。

作者简介 李浩(1990-), 男, 安徽岳西人, 本科生, 专业: 应用生物科学。* 通讯作者, 实验师, 硕士, 从事生物化学研究。

收稿日期 2014-09-12

1.2.2.2 溶剂浓度对多酚提取的影响。固定提取温度为 30 ℃、料液比 1:10 g/ml、提取时间 60 min,分别用 20%、40%、60%、80%、100% 的乙醇对大蒜渣多酚物质进行提取,分析乙醇浓度对大蒜渣多酚物质提取效果的影响。

1.2.2.3 提取时间对多酚提取的影响。以 60% 的乙醇为溶剂,提取温度 30 ℃,料液比 1:10 g/ml 的条件下,选择 20、40、60、80 min 的时间进行提取,分析提取时间对大蒜渣多酚物质提取效果的影响。

1.2.2.4 提取温度对多酚提取的影响。固定料液比 1:10 g/ml、提取时间 60 min、乙醇浓度 60% 条件下,分别选择 20、30、40、50、60 ℃ 对大蒜渣中多酚进行提取,分析提取温度对大蒜渣多酚物质提取效果的影响。

1.2.2.5 料液比对多酚提取的影响。在提取温度为 30 ℃ 和提取时间为 60 min、乙醇浓度为 60% 的条件下,分别以 1:5、1:10、1:15、1:20 g/ml 的料液比对大蒜渣多酚进行提取,分析料液比对大蒜渣多酚物质提取效果的影响。

1.2.3 正交试验设计。根据单因素试验确定的范围,将乙醇浓度、提取温度、提取时间、料液比作为考察因素,以总多酚含量为指标,用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验。

1.2.4 多酚含量的测定。以焦性没食子酸为标准品,采用酒石酸亚铁分光光度法测定总酚含量,总酚含量以没食子酸当量表示^[7]。

显示剂的配制:称准确量 0.25 g 硫酸亚铁,1.25 g 酒石酸钾钠,加蒸馏水溶解,定容至 250 ml。缓冲溶液的配制:将等浓度的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠按一定体积比混合均匀,得 pH 为 7.40 的磷酸盐缓冲溶液。标准溶液的配制:准确称取 20 mg 没食子酸,用 60% 丙酮-水溶液溶解,并在 100 ml 容量瓶中定容,得质量浓度为 0.2 mg/ml 的储备液。

1.2.4.1 标准曲线的绘制。分别准确移取 0.2 mg/ml 焦性没食子酸标准储备液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml 于 6 支试管中,依次加入 60% 丙酮水溶液至试管总体积均为 1.0 ml,然后再依次向其中加入 1.0 ml 显色剂,用缓冲溶液定容,摇匀,放置 20 min,于波长 540 nm 处测定吸光度,以焦性没食子酸含量(μg)为横坐标,以对应的 $OD_{540\text{ nm}}$ 为纵坐标,制作标准曲线。

1.2.4.2 大蒜渣多酚类物质得率的测定。在一定试验条件下对原料进行多酚物质提取,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,即得多酚粗提液。按“1.2.4.1”方法测定提取液吸光度,计算大蒜渣中多酚类物质的得率($\mu\text{g/g}$)。

1.2.4.3 多酚含量计算。公式如下:

$$W = \frac{C \cdot n \cdot V}{m}$$

式中, W 为多酚提取含量($\mu\text{g/g}$); C 为酒石酸亚铁分光光度法测定的提取液多酚质量(μg); n 为酒石酸亚铁分光光度法测定时提取液稀释倍数; V 为提取液体积(ml); m 为提取时大蒜渣质量(g)。

1.2.5 多酚还原能力的测定^[8]。pH 6.6 的磷酸盐缓冲液 2.5 ml 中分别加入不同浓度的试样液 2.5 ml、1% 铁氰化钾溶液 2.5 ml,混合均匀,50 ℃ 恒温 20 min,加入 10% 三氯乙酸

溶液 2.5 ml,3 000 r/min 离心 10 min。取上层清液 2.5 ml 加蒸馏水 2.5 ml 和 0.1% FeCl_3 溶液 0.5 ml,于波长 700 nm 处测定吸光度,吸光度越高,还原能力越强。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择 多酚类物质具有较大极性,易溶于极性溶剂。试验采用乙醇、甲醇 2 种常规有机溶剂和蒸馏水研究大蒜渣多酚提取的效果(图 1)。图 1 表明,3 种不同溶剂的提取效果存在一定差异,其中以 60% 乙醇的提取效果最好,60% 甲醇的提取效果次之,而蒸馏水的提取效果最差。因此,后续试验采用乙醇-水混合体系作为提取溶剂。

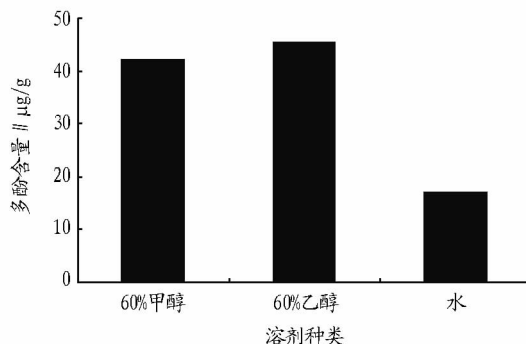


图 1 不同溶剂对大蒜渣多酚提取效果的影响

2.2 乙醇浓度对多酚提取效果的影响 试验得出,在乙醇浓度为 20%、40%、60%、80%、100% 时,大蒜渣多酚提取含量依次为 29.50、26.89、40.80、166.8、199.9 $\mu\text{g/g}$ 。

由试验发现,乙醇浓度在 20% ~ 60% 时,大蒜渣多酚的提取含量随着乙醇浓度的上升呈一定的增加趋势,原因可能是多酚在乙醇水溶液中的溶解度逐渐增大。当乙醇浓度达到 80% 以上时,由于提取液中除多酚外的其他杂质逐渐增多及提取溶剂中水分减少引起的通透性变差等原因,造成多酚含量测定体系中具有一定的浑浊或絮状沉淀,测定数据跃升,无法以酒石酸亚铁分光光度法来准确测量其中的多酚含量。

2.3 提取时间对大蒜渣多酚提取效果的影响 图 2 表明,大蒜渣中多酚的提取量随提取时间的增加呈现先增加后下降的趋势,在 60 min 时达到峰值,60 min 后随着时间的增加多酚提取量出现下降。这可能是因为随着时间的增加,大蒜渣中多酚物质的溶解程度逐渐增强,而在 60 min 时达到峰值后,多酚的溶出已经接近于饱和,再继续增加提取时间的时候,析出的多酚由于受光、热、多酚氧化酶等各种外界因素的影响,极易被氧化。因此,60 min 后反而随着时间的增加多酚提取量出现下降的情况。

2.4 料液比对多酚提取量的影响 图 3 表明,随着料液比中溶剂的逐步增加,大蒜渣中多酚提取量也逐渐增加。这可能是因为随着料液比中溶剂的增加,大蒜渣多酚在提取液中的溶解度逐渐增大。

2.5 提取温度对多酚提取量的影响 图 4 表明,随着提取温度的升高,多酚提取量增加,当提取温度为 40 ℃ 时,多酚提取量达到最大,再增加提取温度,多酚提取量逐渐下降。

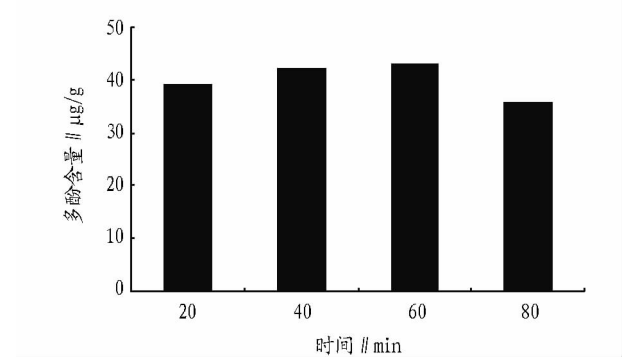


图2 不同提取时间对大蒜渣多酚提取效果的影响

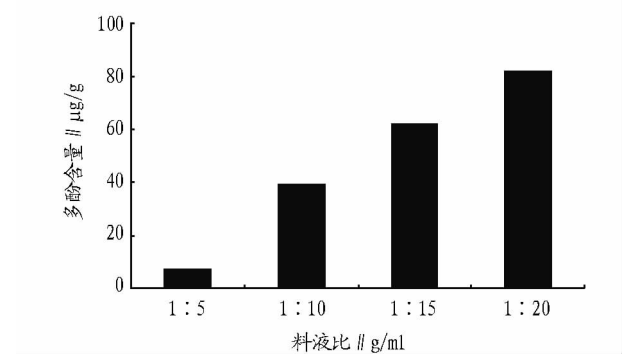


图3 不同料液比对大蒜渣多酚提取效果的影响

这可能是因为随着温度的上升而产生大量的热能,从而破坏了大蒜渣内各物质之间的氢键和疏水键,致使大量多酚物质扩散出来;提取温度达到 40 ℃ 以后,再增加提取温度,大蒜渣多酚提取量的下降可能与多酚的热稳定性或者多酚氧化酶催化作用的加强有关。

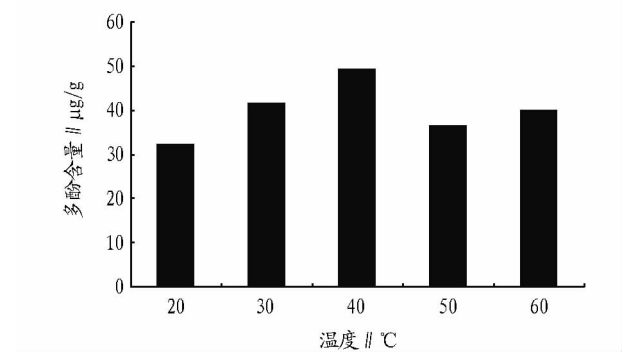


图4 不同提取温度对大蒜渣多酚提取效果的影响

2.6 大蒜渣多酚提取工艺条件的优化 根据以上单因素试验结果,设计 4 因素 3 水平的正交试验 $L_9(3^4)$,对影响大蒜渣多酚提取率的 4 个主要影响因素乙醇浓度、提取时间、料液比、提取温度进行研究,以便进一步优化多酚提取条件。正交试验因素水平设计见表 1,结果见表 2。

由表 2 结果可知,影响大蒜渣中多酚物质提取量 4 因素主次顺序为: $C > B > A > D$,即提取时间 > 温度 > 乙醇浓度 > 料液比,表明提取时间对大蒜渣多酚提取影响最大,其次为提取温度和乙醇浓度,料液比影响较小。从大蒜渣中提取多酚的最佳条件为 $A_3B_3C_3D_3$,即提取温度为 50 ℃、乙醇浓度 65%、料液比 1:20 g/ml、提取时间 70 min。

表 1 正交试验因素水平设计

水平	因素			
	乙醇浓度	温度(B)	时间(C)	料液比(D)
	(A) // %	℃	// min	g/ml
1	55	30	50	1: 10
2	60	40	60	1: 15
3	65	50	70	1: 20

表 2 正交试验方案及结果

试验号	因素				多酚提取量 μg/g
	乙醇浓度 (A)	温度 (B)	时间 (C)	料液比 (D)	
1	1	1	1	1	0.21
2	1	2	2	2	0.48
3	1	3	3	3	0.69
4	2	1	3	2	0.40
5	2	2	1	3	0.28
6	2	3	2	1	0.61
7	3	1	2	3	0.62
8	3	2	3	1	0.68
9	3	3	1	2	0.60
K_1	1.38	1.24	1.09	1.49	
K_2	1.29	1.44	1.71	1.49	
K_3	1.91	1.90	1.77	1.59	
R	2.397	2.400	2.418	2.325	
SS	0.077	0.080	0.098	0.005	

2.7 多酚还原能力的测定 抗氧化剂是一类能够抑制有害物质并使生物组织的生理氧化过程趋于正常的物质。作用机制主要是通过本身的还原作用给出电子以中和自由基,在此过程中,抗氧化剂自身将被氧化,其还原能力越强则抗氧化活性越强。因此,可通过测定物质还原能力来表明其抗氧化活性的强弱。测定还原能力的大小是以被测样品的电子供应是否良好为指标的,供应的电子不仅可以使 Fe^{3+} 被还原成 Fe^{2+} 外,还能同自由基发生反应,使得自由基转变为更为稳定的惰性类物质,从而中断自氧化连锁反应。同时,还原能力还可能与样品的分子结构有关,分子的未共用电子对越多,它的还原能力就越强。由图 5 可知,在试验检测的浓度范围内,大蒜渣多酚粗提液是很好的电子供应者,拥有良好的还原能力,且随着多酚浓度越高,其还原能力变得越强。

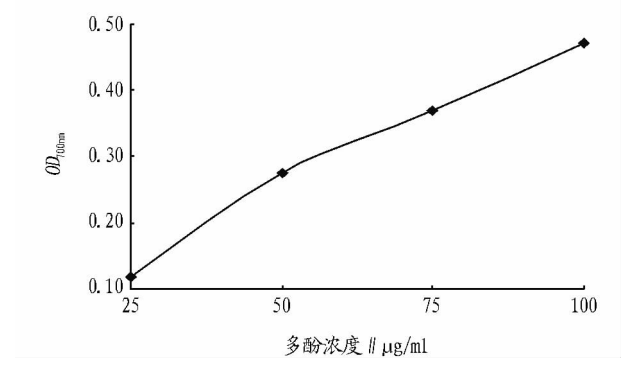


图5 不同浓度多酚粗提液还原能力

3 结论与讨论

作为一类多羟基化合物,多酚易溶或可溶于水、醚、醇、

酮、酯类等,因此,因工艺简便、成本低廉、纯度高优点,溶剂萃取法成为目前国内使用最普遍的多酚提取方法之一。在溶剂萃取法提取多酚的过程中,溶剂起到的作用就是最大限度地削弱生物分子之间作用力,以便尽可能地增强目标分子与溶剂分子之间相互作用力^[9-10]。因此,试验中乙醇、甲醇、蒸馏水对大蒜渣多酚提取的效果差异可能与3种提取剂的极性大小有关,也可能跟大蒜渣的细胞膜通透性有关,或者可能与植物组织中蛋白质、生物碱等物质键之间的相互缔合方式有关。

多酚作为极性有机溶剂,既有亲水基团又有疏水基团,从广义上说,也是一种表面活性剂^[9]。在生物物质的萃取过程中,受到提取剂浓度、溶液 pH、提取时间、提取液体积、温度等各种外界条件所影响。通过对乙醇法提取大蒜渣多酚物质的正交试验结果分析可知,提取时间对大蒜渣多酚的提取影响最大,其次是提取温度和乙醇浓度,料液比影响最小。该试验通过优化得出了从大蒜渣中提取多酚的最佳条件:提取温度为 50℃、乙醇浓度 65%、料液比 1:20 g/ml、提取时间 70 min。

多酚通过还原反应能够降低环境中氧含量,同时作为氢供体,提供质子,进而与环境中自由基结合,清除自由基,且对自由基诱发的生物大分子损伤起到保护作用。试验发现,随着提取液多酚浓度的增加其还原能力也会相应增加,表明

大蒜渣多酚物质是电子供应者,具有良好的还原能力,是一种天然的抗氧化剂。

该试验的原料是大蒜蒸馏提取精油后的固体废渣,其多酚含量虽已大大受损减少,但通过试验发现仍能提取出较高含量的多酚,这为进一步加强对大蒜渣中多酚等有效成分的综合利用,提高大蒜资源的附加值提供了理论和试验参考。

参考文献

- [1] 魏金凤,宋世林,叶先锋,等.大蒜精油提取后废弃物综合利用的研究——蒜渣综合利用的意义及成分分析[J].信阳师范学院学报:自然科学版,2001,14(1):96-98.
- [2] 许春萱,魏金凤,魏红光.大蒜精油提取后废弃蒜渣综合利用的研究[J].环境科学与技术,2002(6):42-44.
- [3] 徐霞,马海乐.大蒜及蒜渣的主要成分、功效与开发利用[J].食品工业科技,2004,25(5):141-143.
- [4] 彭功波,郑先波,冀爱青,等.果树多酚类物质生理功能及应用研究进展[J].中国农学通报,2010,26(11):157-163.
- [5] EPHRAIM P L, ROBERT A N. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer[J]. Journal of Ethno Pharmacology, 2007, 109(207):177-206.
- [6] 李瑜,宋会歌.蒜渣干燥动力学研究[J].江苏农业科学,2010(2):294-295.
- [7] 李志洲,刘军海.回归正交实验设计优化提子中多酚类物质的提取工艺[J].食品工业科技,2009,30(3):240-243.
- [8] 张宽朝,李冬磊.甘薯废弃物中多酚物质的提取及抗氧化活性[J].食品与生物技术学报,2011,30(4):565-570.
- [9] 蒋立科,罗曼.生物化学实验设计与实践[M].北京:高等教育出版社,2007.
- [10] MARJA P K, ANU I H. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds[J]. J. Agric Food Chem, 1999, 47:3954-3962.
- [11] NGUYENA T L, CHEN J, HU Y L, et al. Immuno-enhancing activity of sulfated Auricularia auricular polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89:1117-1122.
- [12] 宋广磊.黑木耳多糖的分离制备及生物活性研究[D].杭州:浙江工商大学,2011.
- [13] 邓庆华,赵志宇,张中振.黑木耳多糖的提取及其理化特性与抑菌活性研究[J].安徽农业科学,2012,40(12):7380-7381.
- [14] 李超,王磊,任遥,等.黑木耳多糖的微波提取及含量的测定[J].食品工业,2012,33(8):128-130.
- [15] 包海花,高雪玲,祖国美.一种改良的黑木耳多糖提取方法[J].中国林副特产,2005(4):28-29.
- [16] 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.
- [17] 黄静文,程玉来.绿豆皮多糖提取工艺的比较[J].食品科技,2013,38(5):12-16.
- [18] 李超柱,李慧,陈艳辉,等.缓冻协同微波提取甘薯多糖的工艺研究[J].食品科技,2013(2):187-191.
- [19] 吴映明,陈爱葵,彭锦红,等.超声波-超低温冻融处理对灵芝孢子粉多糖提取的影响[J].中国食用菌,2008,27(3):34-35.
- [20] ZHANG G W, HU M M, HE L. Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanut shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities *in vitro* [J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 91(2):158-168.
- [21] 项凤影,张莹,路祺,等.水浴和超声法制备波萝渣可溶性膳食纤维及其性能的表征[J].食品工业科技,2014(10):150-154.
- [22] 曹苏文,周凤娟,杨玉玲,等.板栗交联淀粉的制备和性质研究[J].河南工业大学学报,2014,35(2):67-72.
- [23] 林敏,吴冬青,李彩霞.黑木耳多糖提取条件的研究[J].河西学院学报,2004,20(5):87-89.
- [24] 王雪,王振宇.响应面法优化超声波辅助提取黑木耳多糖的工艺研究[J].中国林副特产,2009(3):1-5.
- [25] 孔祥辉,张介弛,戴肖东,等.黑木耳多糖的提取与纯化[J].生物技术,2005,15(1):81-82.

(上接第 10668 页)

结合热水浸提法提取多糖^[21],其提取率为 19.87%。该试验中采用缓冻和超低温冻融辅助热水提取的试验结果,其提取率均高于前三者,进一步说明该试验所采用的前处理方法能提高黑木耳多糖提取率。但该试验采用的室温超声提取黑木耳多糖提取率要低于上述方法,说明高温更有利于多糖的溶出,但是高温提取容易使多糖结构遭到破坏,从而影响其活性;而低温提取条件温和,可能会保持多糖的独特性质,所以关于不同提取条件下多糖活性的研究还有待进一步深入。

参考文献

- [1] NGUYENA T L, CHEN J, HU Y L, et al. In vitro antiviral activity of sulfated Auricularia auricular polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90:1254-1258.
- [2] TANG W, HEMM I, BERTRAM B. Recent development of antitumor agents from Chinese herbal medicines, Part II. High molecular compounds [J]. Panta Med, 2003, 69(3):193-201.
- [3] ZHAO Z Y, HUANGFU L T, DONG L L, et al. Functional groups and antioxidant activities of polysaccharides from five categories of tea [J]. Industrial Crops and Products, 2014, 58:31-35.
- [4] NI W H, GAO T T, WANG H L, et al. Anti-fatigue activity of polysaccharides from the fruits of four Tibetan plateau indigenous medicinal plants [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 150:529-535.
- [5] XU R J, YE H, SUN Y, et al. Preparation, preliminary characterization, antioxidant, hepatoprotective and antitumor activities of polysaccharides from the flower of tea plant [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50:2473-2480.
- [6] ZENG W C, ZHANG Z, GAO H, et al. Characterization of antioxidant polysaccharides from Auricularia auricular using microwave-assisted extraction [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89:694-700.