

# 正交法优化陈皮多糖提取工艺及其体外抗氧化活性研究

王俊青, 宁雅琴, 王晴晴, 冯晓敏, 徐紫怡, 周海斌\*

滁州学院材料与化学工程学院, 安徽 滁州

收稿日期: 2023年6月28日; 录用日期: 2023年7月19日; 发布日期: 2023年7月31日

## 摘要

目的: 探究陈皮多糖提取率的影响因素, 优化多糖的提取工艺条件, 评价多糖的体外抗氧化活性。方法: 以料液比、超声时间、超声温度为条件进行单因素试验, 并进行正交试验优化提取条件; 利用对DPPH自由基和羟基自由基的清除率进行陈皮多糖的体外抗氧化研究。结果: 提取工艺最佳条件为超声时间30 min, 料液比1:40, 超声温度70℃, 提取率为22.32%。结论: 正交试验优选了陈皮多糖的最佳提取工艺, 体外抗氧化研究验证了陈皮多糖具有抗氧化活性且呈现出较好的量效关系。本研究为陈皮的进一步开发利用提供了依据。

## 关键词

陈皮, 多糖, 单因素考察, 正交法, 体外抗氧化

# Optimization of Extraction Process and Antioxidant Activity of Tangerine Peel Polysaccharide by Orthogonal Method

Junqing Wang, Yaqin Ning, Qingqing Wang, Xiaomin Feng, Ziyi Xu, Haipin Zhou\*

School of Materials and Chemical Engineering, Chuzhou University, Chuzhou Anhui

Received: Jun. 28<sup>th</sup>, 2023; accepted: Jul. 19<sup>th</sup>, 2023; published: Jul. 31<sup>st</sup>, 2023

## Abstract

**Objective:** To explore the factors affecting the extraction rate of Tangerine peel polysaccharide,

\*通讯作者。

**文章引用:** 王俊青, 宁雅琴, 王晴晴, 冯晓敏, 徐紫怡, 周海斌. 正交法优化陈皮多糖提取工艺及其体外抗氧化活性研究[J]. 分析化学进展, 2023, 13(3): 262-270. DOI: 10.12677/aac.2023.133030

optimize the extraction conditions of polysaccharide, and evaluate the antioxidant activity of polysaccharide *in vitro*. Methods: Single factor experiments were carried out with solid-liquid ratio, ultrasonic time and ultrasonic temperature as the conditions, and orthogonal experiments were used to optimize the extraction conditions. The antioxidant activity of Tangerine peel polysaccharide was studied *in vitro* by using the scavenging rate of DPPH free radicals and hydroxyl free radicals. Results: The optimum extraction conditions were as follows: the ratio of solid to liquid was 1:40, the ultrasonic time was 30 min, and the ultrasonic temperature was 70°C. The extraction rate was 22.32%. Conclusion: The optimum extraction process of Tangerine peel polysaccharide was optimized by orthogonal test, and the *in vitro* antioxidant study verified that the Tangerine peel polysaccharide had good *in vitro* antioxidant activity. This study provides a basis for the further development and utilization of Tangerine peel.

## Keywords

Tangerine Peel, Polysaccharide, Single Factor Investigation, Orthogonal Method, Antioxidant Activity *in Vitro*

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 前言

陈皮, 原名橘皮, 又名桂皮、红皮, 是芸香科下的柑橘属和栽培变种的干燥成熟果皮[1]。可入药, 在临床上用于治疗胸腹胀满、脾虚导致的身体虚弱、消化不良以及恶心呕吐等症状。陈皮所含成分复杂, 主要包括挥发油类、黄酮类、生物碱类和多糖类等, 具有抗氧化、抗炎、镇咳、降低胆固醇、升压、抗休克及强心等药理作用[2]。例如, 陈皮中含有生物碱类成分辛弗林可以舒张豚鼠支气管平滑肌, 发挥止咳作用; 陈皮中的黄酮类成分具有降低心脑血管疾病的发病率的功效; 陈皮多糖对心血管系统具有强心、升压、扩张冠脉的作用, 也具有杀虫、抑菌作用, 且对胃肠运动起调节作用, 并且具有抗艾滋、免疫活性、抗氧化作用。目前, 对于陈皮中生物活性成分的研究主要集中在黄酮、生物碱等, 而对多糖的提取及性质研究鲜少涉及。本文对陈皮多糖的提取工艺进行优化, 并对其抗氧化活性进行研究, 对陈皮的开发利用提供一定的理论依据。

## 2. 材料与amp;方法

### 2.1. 材料

二十年新会陈皮(江门市广盈陈皮柑普茶有限公司)、D-无水葡萄糖标准品(德思特, HPLC  $\geq$  98%)、石油醚(AR)、无水乙醇(AR)、浓硫酸(AR)、苯酚(AR)、抗坏血酸(Vc)、DPPH、硫酸亚铁(AR)、过氧化氢(AR)、水杨酸(AR)、纯水。

### 2.2. 仪器

Cary 100Scan 紫外分光光度计, 电热恒温鼓风干燥箱, SHZ-DIII予华牌循环水真空泵, HZ602B 电子天平, 摇摆式粉碎机, 烧杯(500 mL), 容量瓶(100 mL), 容量瓶(25 mL), 锥形瓶(100 mL), 10~100  $\mu$ L DRAGON 移液枪。

## 2.3. 方法

### 2.3.1. 对照品溶液的制备

选取并称量葡萄糖标准品 25 mg，将其放置于干燥洁净的 50 mL 容量瓶中，向其中加入少量去离子水充分溶解，再加水稀释至该容量瓶刻度线，混匀可得到浓度为 0.5 mg/mL 的对照品溶液。

### 2.3.2. 供试品的制备

将陈皮放入烘箱干燥，粉碎，分批取 50 克陈皮粉末加入放有磁子的 500 mL 的单口圆底烧瓶，加入其 5 倍量的石油醚，放在 60℃ 的恒温水浴锅加热回流 1.5 h；过滤，挥干石油醚，再与 10 倍药材量的 80% 乙醇一同加入圆底烧瓶，在 80℃ 恒温水浴锅加热回流 1.5 h；过滤，挥干乙醇，放入 80℃ 烘箱烘干[3]，装入洁净干燥的密封袋中后备用。将烘干的陈皮粉过 60 目筛，装入密封袋，备用。

### 2.3.3. 葡萄糖标准曲线的制备

将 25 mg 葡萄糖标准品溶解在烧杯中的纯水中，转移到 50 mL 容量瓶中，定容。再分别移取定容后的液体 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 100 mL 的容量瓶中，定容至刻度线，摇匀，放置片刻。取六只干净试管，移取 2 mL 纯水至未编号试管中，作为空白体系；之后准确移取各浓度标准品溶液 2 mL 于剩余编号试管中，用移液管依次移取 1 mL 新配制的 5% 苯酚溶液和 5 mL 硫酸至各试管中，静置 5 min，待试管冷却至室温后，在 490 nm 的紫外条件下，测定吸光度，记录并整理数据，见表 1，得到葡萄糖标准曲线方程： $y = 13.046x - 0.0788$ ， $R^2 = 0.9996$ 。

由图 1 可知，葡萄糖浓度在 0.01~0.05 mg/mL 范围内与吸光度线性关系较好，则可利用该标准曲线进行接下来实验步骤。

Table 1. Effect of concentration of glucose solution on absorbance

表 1. 葡萄糖溶液浓度对吸光度的影响

	1	2	3	4	5
浓度(mg/mL)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
吸光度(A)	0.2086	0.3447	0.4639	0.6005	0.7330

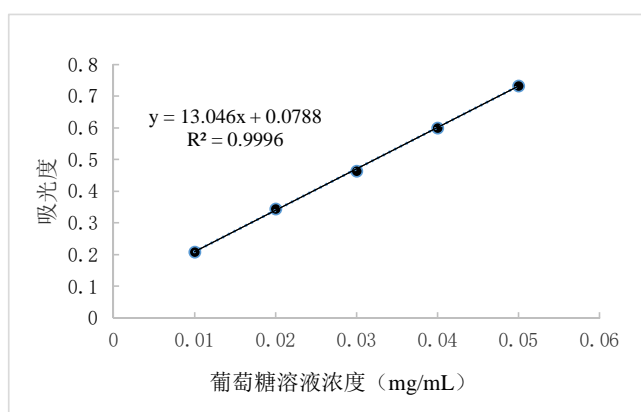


Figure 1. Glucose standard curve

图 1. 葡萄糖标准曲线

### 2.3.4. 陈皮多糖含量的测定

采用硫酸-苯酚法测定多糖含量，取 1 mL 陈皮多糖的提取液定容至 25 mL 容量瓶内；移取 2 mL 于

试管内, 再加入 1 mL 新配制的 5% 苯酚, 最后再缓慢加入 5 mL 硫酸, 充分振荡, 静置 5 min, 测其吸光度, 再根据葡萄糖标准曲线方程求出提取率。依据下列公式计算:

$$\text{多糖提取率}(\%) = (50 CV \times 10^{-3} / 1) \times 100$$

式中: C 是多糖的质量浓度, mg/mL; V 是多糖定容的体积, mL。

### 2.3.5. 单因素对照实验

#### 1) 超声时间

称取陈皮粉末五份各 1 g 放置于锥形瓶中, 加入乙醇溶解, 设置超声温度为 60℃, 料液比为 1:40, 分别超声 20 min、30 min、40 min、50 min、60 min, 冷却至室温后, 抽滤得滤液。按照 2.3.4 方法测定吸光度, 计算多糖提取率, 结果如表 2。

**Table 2.** Effect of ultrasonic time on extraction rate

**表 2.** 超声时间对提取率的影响

	1	2	3	4	5
超声时间(min)	20	30	40	50	60
吸光度(A)	0.6862	0.7530	1.0014	0.8240	0.7624
提取率(%)	5.82	6.46	8.84	7.14	6.55

#### 2) 料液比

称取陈皮粉末五份各 1 g 放置于锥形瓶中, 加入乙醇溶解, 设置超声温度为 60℃, 超声时间为 40 min, 料液比分别为 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 冷却至室温后, 抽滤得滤液。按照 2.3.4 方法测定吸光度, 计算多糖提取率, 按照 2.3.4 方法测定吸光度, 计算总皂苷提取率, 结果如表 3。

**Table 3.** Effect of solid-liquid ratio on extraction rate

**表 3.** 料液比对提取率的影响

	1	2	3	4	5
料液比(g:ml)	1:30	1:35	1:40	1:45	1:50
吸光度(A)	1.3343	1.3406	1.3657	1.0922	1.0222
提取率(%)	12.03	12.19	12.33	9.71	9.04

#### 3) 超声温度

称取陈皮粉末五份各 1 g 放置于锥形瓶中, 加入乙醇溶解, 设置超声温度分别为 50℃、60℃、70℃、80℃、90℃, 料液比为 1:40, 超声 50 min, 冷却至室温后, 抽滤得滤液。按照 2.3.4 方法测定吸光度, 计算总皂苷提取率, 结果如表 4。

**Table 4.** Effect of ultrasonic temperature on extraction yield

**表 4.** 超声温度对提取率的影响

	1	2	3	4	5
温度(℃)	50	60	70	80	90
吸光度(A)	1.9449	2.1348	2.1442	1.6631	1.4825
提取率(%)	17.88	19.70	19.79	15.18	13.45

### 2.3.6. 体外抗氧化活性实验

称取陈皮粉末 5 g, 按照最佳条件提取。称取适量陈皮多糖和 Vc (阳性对照), 分别用纯水配成系列质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)的多糖溶液[4]。

#### 1) 对 DPPH 自由基清除率的测定

取 5 支干净试管, 依次加入 1 mL 相应浓度的多糖待测液, 滴加完成后再加入 0.2000 mmol/L DPPH-乙醇溶液 2.50 mL, 振荡均匀, 避光静置 30 min, 测定吸光度  $N_x$ 。重复上述步骤, 用 95% 乙醇替换 DPPH 乙醇溶液作为对照, 测量对照  $N_T$  的吸光度; 用纯水替换多糖待测液, 测量空白吸光度  $N_0$ , 按下列公式计算陈皮多糖对 DPPH· 的清除率[5] [6]。

$$H(\%) = \frac{[N_0(N_x - N_T)]}{N_0} \times 100$$

#### 2) 对羟基自由基清除率的测定

取 5 支干净试管, 依次加入 1.00 mL 相应浓度的多糖待测液, 2.00 mL 6.000 mmol/L 硫酸亚铁溶液、2.00 mL 6.000 mmol/L 水杨酸 - 乙醇溶液, 静置 10 min 再加入 2.00 mL 6.000 mmol/L 过氧化氢溶液, 振荡均匀, 避光静置 30 min, 在 510 nm 下测定体系吸光度  $E_x$ , 重复上述流程, 用纯水替换过氧化氢作为对照, 测定对照吸光度  $E_T$ ; 用纯水替换多糖待测液作为空白体系, 测定空白吸光度  $E_0$ , 按下列公式计算陈皮多糖对羟基自由基的清除率[7] [8] [9]。

$$H(\%) = \frac{[E_0 - (E_x - E_T)]}{E_0} \times 100$$

## 3. 结果与分析

以陈皮多糖的提取率作为参考标准, 分别考察前述三个因素对金边龙舌兰总皂苷提取率的影响。

### 3.1. 超声时间对提取率的影响

当超声温度为 80℃, 料液比为 1:40 时, 研究不同超声时间对陈皮多糖提取率的影响。由图 2 可得, 多糖提取率在 20~40 min 之间, 随时间增加而不断提高, 40 min 达到最高提取率为 8.84%, 之后开始下降。分析原因可能是因为多糖经长时间加热后发生部分水解, 而使其含量降低。

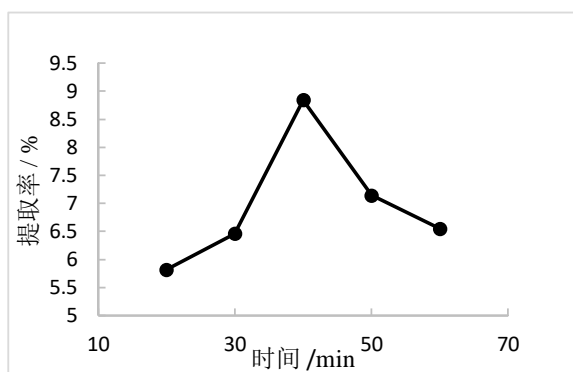


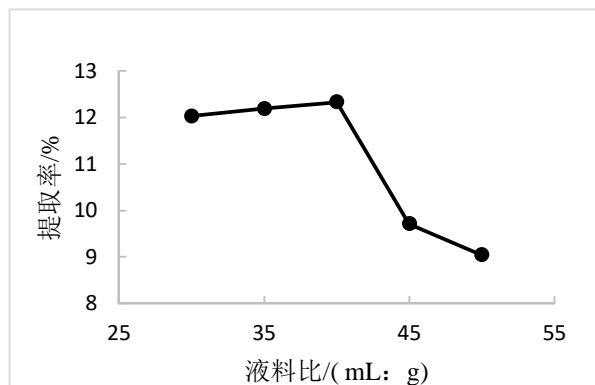
Figure 2. Relationship between ultrasonic time and extraction rate

图 2. 超声时间与提取率的关系

### 3.2. 料液比对提取率的影响

在设定超声时间 40 min, 温度 80℃ 的条件下, 研究不同料液比对陈皮多糖提取率的影响。由图 3 可

得, 在料液比 1:40 以前, 多糖的提取率随液料比增大而增大, 当水平为 1:40 时, 其值最高达 12.33%。分析原因可能是随着溶剂增加, 单位提取液中含有的多糖减少而杂质增加, 因此随着溶剂增加, 多糖提取率逐渐下降。

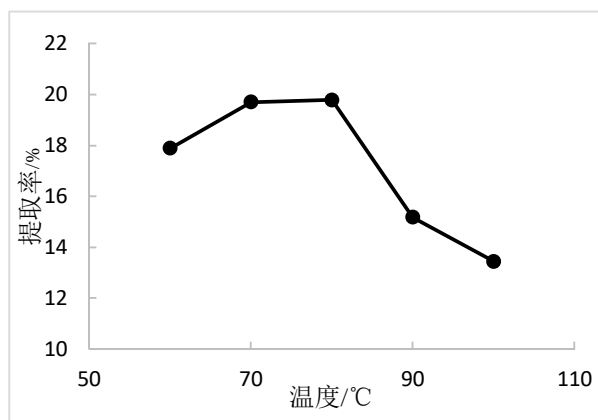


**Figure 3.** Relationship between solid-liquid ratio and extraction rate

**图 3.** 料液比与提取率的关系

### 3.3. 超声温度对提取率的影响

在固定超声时间 40 min, 料液比 1:40 的水平下, 研究不同温度对陈皮多糖提取率的影响。由图 4 可得, 在 60°C~80°C 下, 多糖提取率有所上升, 并在 80°C 达最大值 19.79%, 随后提取率开始下降, 分析原因可能是较高的温度条件会导致多糖结构破坏[10]。



**Figure 4.** Relationship between ultrasonic temperature and extraction rate

**图 4.** 超声温度与提取率的关系

### 3.4. 正交实验

#### 3.4.1. 正交实验对金边龙舌兰总皂苷提取条件的优化

基于单因素试验的结果, 以多糖提取率作为评价指标, 进行三因素三水平正交试验  $L_9(3^4)$ 。实验因素和水平编码见表 5。

**Table 5.** Orthogonal experimental factors and level table**表 5.** 正交实验因素与水平表

水平	A	B	C
	浸提时间(min)	提取温度(°C)	料液比(g:mL)
1	30	70	1:35
2	40	80	1:40
3	50	90	1:45

### 3.4.2. 正交试验结果分析

通过对表 6 的直观分析,可以发现,超声时间、料液比、超声温度均对陈皮多糖的含量提取有显著影响,影响程度依次为  $A > B > C$ ,即超声时间 > 料液比 > 超声温度。通过极差分析得到的理论最优组合为 A1B1C2,通过实验验证得此条件下多糖的提取率为 22.32%,即超声时间 30 min、料液比 1:40 (g:mL)、超声温度 70°C [11]。

**Table 6.** Orthogonal design and test results table**表 6.** 正交设计及试验结果表

编号	A	B	C	提取率%
1	1	1	1	23.18
2	1	2	2	20.11
3	1	3	3	20.32
4	2	1	2	13.75
5	2	2	3	10.42
6	2	3	1	9.90
7	3	1	3	9.80
8	3	2	1	8.38
9	3	3	2	9.91
K <sub>1</sub>	21.203	15.577	13.820	—
K <sub>2</sub>	11.357	12.970	14.590	—
K <sub>3</sub>	9.363	13.377	13.513	—
R	11.840	2.607	1.077	—

以最佳提取条件进行 3 次平行试验,得到多糖提取率为 22.32%。说明该提取条件具有较好的合理性和可靠性,表明该优化组合能有效提高陈皮多糖的提取率。

### 3.5. 实验验证

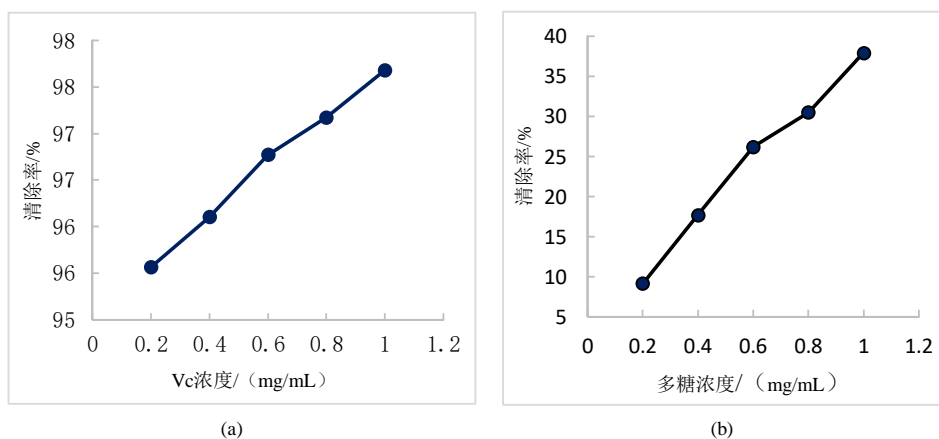
对正交试验得出的结果进行分析,在所选取的因素及水平范围内,得到当超声时间 30 min、料液比 1:40 (g:mL)、超声温度 70°C 时,陈皮多糖的提取效果最佳;接着对最佳提取条件进行验证,进行三次重复试验,得到金边龙舌兰总皂苷的提取率为 22.32%,表明在陈皮多糖的提取工艺条件中,正交试验优化后的提取条件适合对陈皮多糖的提取。

### 3.6. 体外抗氧化活性研究的分析

#### 3.6.1. DPPH 自由基的清除能力

从图 5 可以看出,对 DPPH 自由基的清除率随着多糖浓度的一起上升。虽低于 Vc 清除率,但在多

糖浓度为 1.0 mg/mL 时, DPPH 自由基清除率可达 37.95%, 表明陈皮多糖具有良好的清除 DPPH 自由基效果。

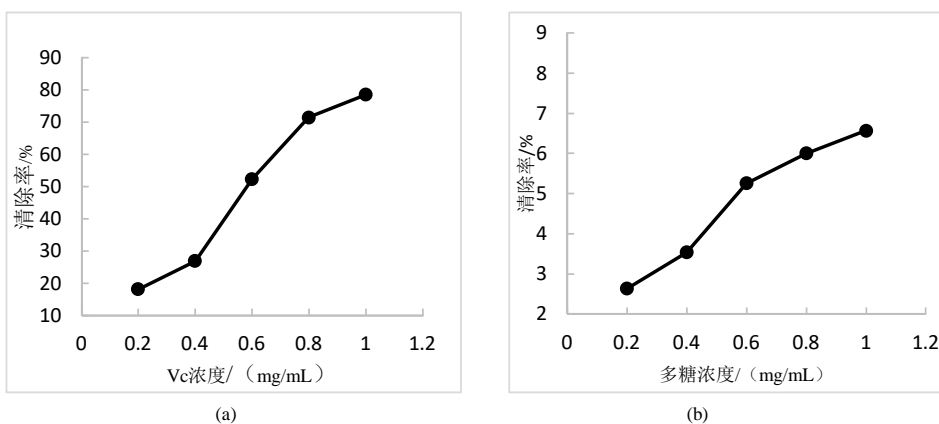


**Figure 5.** Change of DPPH free radical scavenging ability of samples with different mass concentrations

**图 5.** 不同质量浓度样品对 DPPH 自由基清除能力的变化

### 3.6.2. 羟基自由基的清除能力

从图 6 可以看出, 在实验的浓度范围内, 陈皮多糖对羟基自由基清除率随多糖浓度一起上升。总体来看, 尽管清除效果低于 Vc, 但在多糖浓度为 1.0 mg/mL 时, 羟基自由基清除率达到 6.57%, 说明陈皮多糖具有一定的清除羟基自由基的能力。



**Figure 6.** Changes of hydroxyl radical scavenging ability of samples with different mass concentrations

**图 6.** 不同质量浓度样品对羟基自由基清除能力的变化

## 4. 结论

本实验采用单因素试验和正交试验法对陈皮多糖的提取工艺进行优选, 筛选出最佳提取工艺: 超声时间 30 min, 超声温度 70℃, 料液比 1:40, 提取率达到 22.32%, 接近正交试验中的最大提取率, 说明优化后的提取条件效果较好。同时, 从测定的体外抗氧化实验结果来看, 羟基自由基清除率为 6.57%, DPPH 自由基清除率为 37.95%, 说明陈皮中的多糖具有较好的抗氧化活性, 这为陈皮的深度利用提供了一定的



数据依据。

本实验测定陈皮中多糖的含量，并为多糖的开发提供了一些数据基础。但也存在一定局限性：如实验中所提取的多糖，没有进行杂质检测，若要进一步得到准确的数据，需要在测定波长时，鉴定提取的多糖中是否含有蛋白质、色素等杂质。

## 基金项目

安徽省大学生创新创业训练计划项目(2022CXXL098, 2022CXXL092); 滁州学院大学生创新创业训练计划项目(2022CXXL2050115)。

## 参考文献

- [1] 刘懋, 郑昊, 杨一获, 胡楠, 张清波, 笔雪艳. 一测多评法同时测定陈皮中 6 个黄酮类成分的含量[J]. 中国药品标准, 2023, 24(2): 159-167. <https://doi.org/10.19778/j.chp.2023.02.010>
- [2] 许燕燕. 植物多糖的提取方法和工艺[J]. 福建水产, 2006(3): 32-36.
- [3] 赵重博, 王晶, 吴博, 吴纯洁. 星点设计优化天南星多糖提取工艺及提取动力学研究[J]. 陕西中医药大学学报, 2018, 41(5): 107-113.
- [4] 谢朋飞, 刘静, 蔡延渠, 王俊杰, 张远芳. 响应面法优化枫杨叶多糖醇提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(2): 341-347.
- [5] 田崇梅, 邢梦雨, 夏道宗. 黄芪多糖提取工艺优化及体外抗氧化性研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(9): 2072-2076.
- [6] 张骆琪, 刘苏伟, 王飞, 刘玉霞, 鲁传涛, 刘红彦. 地黄多糖超声提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 中成药, 2018, 40(12): 2662-2667.
- [7] 李珊, 梁俭, 冯彬, 刘晓凤, 洗丽清. 响应面法优化超声波辅助提取山竹果皮多糖的工艺及其体外抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(10): 103-110.
- [8] 孙玉姣, 侯淑婷, 鱼喆喆, 崔湘怡, 谭梓杉, 戚歆宇, 康雨芳. 宁夏红果枸杞多糖提取及其体外抗氧化活性研究[J]. 陕西科技大学学报, 2018, 36(5): 39-45.
- [9] 丁世环, 张嘉杨, 鲁群岷. 普洱茶茶渣中茶多糖的超声波辅助提取及其抗氧化性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(18): 187-192+200.
- [10] 李毅翔, 陈芋霏, 王艳艳. 超声-微波协同辅助优化酸枣果肉多糖提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国食物与营养, 2023, 29(1): 23-28. <https://doi.org/10.19870/j.cnki.11-3716/ts.20220629.001>
- [11] 梁敏丽, 莫柳艳, 劳燕芹, 余泳佳, 郑韵英. 木瓜蛋白酶提取辣木籽多肽的工艺研究[J]. 广东化工, 2023, 50(4): 67-70.