

超声波辅助提取崂山绿茶中脂肪酶抑制剂工艺的研究

任秀娟^{1,2}

(1. 山东商务职业学院 食品工程系, 山东 烟台 264670; 2. 山东商务职业学院 粮油食品工程技术研发中心, 山东 烟台 264670)

摘要: 以崂山绿茶为原料, 分别用水、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行脂肪酶抑制剂活性部位筛选, 运用超声波辅助提取的方法, 考察研究乙醇浓度、超声波功率、超声提取温度和超声提取时间对崂山绿茶中脂肪酶抑制剂的得率和抑制率的影响, 通过正交试验得到超声波辅助法提取崂山绿茶中脂肪酶抑制剂的最佳工艺条件。结果表明: 崂山绿茶中水、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇组分对脂肪酶抑制的 IC_{50} 值分别为 3.95、9.64、34.73、0.69、21.61 mg/mL; 最佳的工艺条件为: 300 W 功率下, 用浓度为 60% 的乙醇, 在 30 °C 下浸提 10 min, 用乙酸乙酯萃取后浓缩并冷冻干燥提取物, 最终提取物得率为 29.2%, 对脂肪酶抑制率为 79.2%。

关键词: 崂山绿茶; 脂肪酶抑制剂; 活性筛选; 超声辅助提取; 提取工艺

Ultrasonic-assistant Extraction of Lipase Inhibitor from Laoshan Green Tea

REN Xiu-juan^{1,2}

(1. Food Engineering Department, Shandong Business Institute, Yantai 264670, Shandong, China;
2. Research & Development Center of Food Engineering Technology, Shandong Business Institute, Yantai 264670, Shandong, China)

Abstract: Taking Laoshan green tea as raw material, the active parts of lipase inhibitors were screened by water, petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and n-butanol, and the extraction rate of ethanol concentration, ultrasonic power, ultrasonic extraction temperature and ultrasonic extraction time on the yield of lipase inhibitors in Laoshan green tea was investigated by ultrasonic assisted extraction. The best conditions of ultrasonic extraction of lipase inhibitor from Laoshan green tea were obtained by orthogonal test. The results showed that the IC_{50} values of water, petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and n-butanol in Laoshan green tea were 3.95, 9.64, 34.73, 0.69 mg/mL and 21.61 mg/mL, respectively. The better technological conditions were: 300 W power, 60% ethanol concentration, 10 minutes at 30 °C and ethyl acetate extraction. After extraction, the extract was concentrated and freeze-dried. The final extraction yield was 29.2%, and the inhibition rate on lipase was 79.2%.

Key words: Laoshan green tea; lipases inhibitor; activities screening; ultrasonic-assistant extraction; extracting process

引文格式:

任秀娟. 超声波辅助提取崂山绿茶中脂肪酶抑制剂工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(5): 71-75

REN Xiujuan. Ultrasonic-assistant Extraction of Lipase Inhibitor from Laoshan Green Tea[J]. Food Research and Development, 2019, 40(5): 71-75

根据世卫组织研究报道,中国当前超重人口超过3亿,已成为拥有超重人口最多的国家,而且这个数字还在飞速增长。科研人员发现^[1]肥胖病人患高血压、高血脂、心脑血管等疾病的概率比一般人要高。肥胖往往和人们摄入过多高脂、高热量食物有关,降低脂肪摄入,可以有效降低体重。人体摄入的脂肪先通过消化系统中的胰脂肪酶(porcine pancreatic lipase, PPL)水解^[1],然后被吸收转换成能量。在脂肪水解过程中,胰脂肪酶作为重要的水解酶可以把油脂水解为甘油和单分子脂肪酸^[2],因此抑制或降低体内胰脂肪酶的活性可以对脂肪的水解和吸收进行抑制,以此达到减重和控制肥胖的目的^[3]。目前已发现多种能抑制脂肪酶活性的功能成分,如黄酮类物质^[4-7]、多酚类物质^[8-10]、香水莲花提取物^[11]等,但目前还未有绿茶中脂肪酶抑制剂提取的报道。

国内外对绿茶的诸多研究表明,绿茶中的活性成分具有调节血脂^[12-13]和控制肥胖^[14-15]等多种保健功能,在崂山绿茶中提取分离能抑制脂肪酶活性的功能性成分,并优化其提取工艺,不但可以改善目前日益严重的人群肥胖问题,对开发绿茶资源进而服务新旧动能转换也具有重大的意义。

超声波对生物细胞有破坏作用^[16],可以强化萃取系统物质的传递作用,与传统溶剂法提取工艺相比,能使有效成分更好的溶出^[17]。该文对萃取液施加超声波,对超声波辅助提取崂山绿茶中脂肪酶抑制剂的影响因素进行探讨,并筛选出最佳的提取工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

崂山绿茶:市售,晒干后粉碎,备用;猪胰脂肪酶(酶活 $\geq 30\ 000\ \text{U/g}$):Sigma公司;硝基苯基月桂酸酯底物溶液(P-nitrophenyl laurate, pNPL):月桂酸4-硝基苯酯:安徽酷尔生物工程有限公司;pH 7.5磷酸缓冲液(分析纯):国药集团化学试剂有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器及设备

LTB-1000数显温控超声波清洗机:济宁鲁通超声电子设备有限公司;RE-2001A旋转蒸发器:上海亚荣仪器厂;ZNCL-GS磁力搅拌器:上海一科仪器有限公司;2-16N高速常温离心机:湖南恒诺仪器设备有限公司;5202P型数显pH计:登科普瑞(北京)科技有限公司;DNM-9606酶标分析仪:北京普朗新技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 胰脂肪酶活性检测方法

37℃恒温下,把底物与胰脂肪酶放置3min,底物

1min内释放1 μmol 对硝基苯酚所需要的酶量为一个酶活力单位,U。

在试管中加入pH 7.5的磷酸缓冲溶液350 μL 、450 μL pNPL底物、样品溶液50 μL ,37℃预热10min后加入150 μL 胰脂肪酶(0.2mg/mL),混匀,37℃避光反应60min,16000r/min离心3min,取上清于405nm波长测吸光度^[18-19]。用缓冲溶液代替样品液做对照组做3次平行试验。抑制率按公式(1)进行计算率。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{(A_1 - A_2)}{A_1} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_1 、 A_2 分别为对照组和不同样品溶液在405nm处的吸光度。

1.3.2 崂山绿茶提取物得率的计算

提取物冷冻干燥后,称量,按公式(2)计算提取物的得率。

$$Y/\% = \frac{m'}{m} \times 100 \quad (2)$$

式中: Y 为提取物得率,%; m' 为提取物质量,g; m 为崂山绿茶质量,g。

1.3.3 崂山绿茶中脂肪酶抑制剂活性部位筛选

取粉碎后的崂山绿茶1kg,按1:7(g/mL)的料液比加入95%乙醇,浸提3次,每次半小时。浓缩提取液,按1:3(g/mL)的料液比分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取至有机层无色,浓缩并冷冻干燥各有机相提取物,配成所需浓度后按1.3.1所述方法测定各极性溶剂提取物的抑酶活性。

1.3.4 超声波提取崂山绿茶中脂肪酶抑制剂的单因素试验

称取20g崂山绿茶6份于烧杯中,置于超声清洗仪中超声提取,分别对乙醇浓度、超声功率、超声提取温度、超声提取时间等影响因素进行单因素试验,把得到的浸提液进行浓缩,再用有机溶剂萃取,冷冻干燥有机溶剂萃取液,干燥后的粉末物质即为崂山绿茶中抑制脂肪酶的活性成分^[20-21]。

1.3.4.1 乙醇浓度对脂肪酶抑制剂的得率和抑制率的影响

以1:15(g/mL)料液比分别加入20%、30%、40%、50%、60%、70%的乙醇,30℃下超声浸提30min,超声波功率为300W。测量超声波下不同浓度乙醇对提取物的得率和对脂肪酶活性抑制率的影响。

1.3.4.2 超声功率对脂肪酶抑制剂的得率和抑制率的影响

以1:15(g/mL)料液比加入60%乙醇,设不同超声功率(100、200、300、400、500、600W)在30℃下提取30min。测量不同超声功率对提取物的得率和对脂肪

酶活性抑制率的影响。

1.3.4.3 超声提取温度对脂肪酶抑制剂的得率和抑制率的影响

以 1:15(g/mL)料液比加入 60%乙醇,不同温度下(20、30、40、50、60、70℃)下超声提取 30 min,超声功率为 300 W。测量不同提取温度对提取物的得率和对脂肪酶活性抑制率的影响。

1.3.4.4 超声提取时间对脂肪酶抑制剂的得率和抑制率的影响

以 1:15(g/mL)料液比加入 60%乙醇,30℃下超声提取若干分钟(10、20、30、40、50、60 min),超声功率为 300 W。测量不同提取时间对提取物的得率和对脂肪酶活性抑制率的影响。

1.3.5 提取工艺的正交试验

在单因素试验的基础上,以脂肪酶抑制剂的得率和抑制率为指标,以乙醇浓度、超声功率、超声提取温度、超声提取时间作为正交试验的考察因素,选用 $L_9(3^4)$ 正交试验,因素和水平见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验的因素和水平

Table 1 The factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平	A 乙醇浓度/%	B 超声功率/W	C 超声提取温度/℃	D 超声提取时间/min
1	50	200	30	10
2	60	300	40	20
3	70	400	50	30

2 结果与分析

2.1 崂山绿茶中脂肪酶抑制剂活性部位筛选

不同溶剂提取物对脂肪酶活性的抑制作用见图 1。

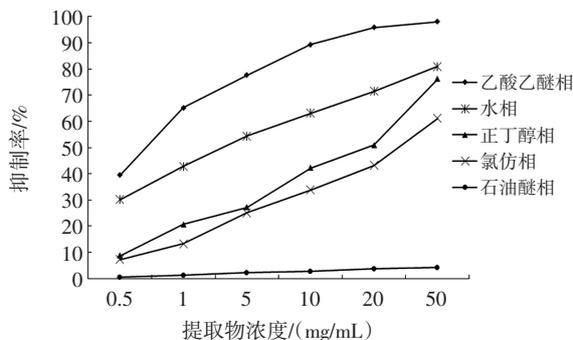


图 1 不同溶剂提取物对脂肪酶活性的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effects of different solvent extracts on lipase activity

由图 1 可见,5 种不同极性提取物对脂肪酶活性的抑制作用从大到小依次为:乙酸乙酯提取物>水相提取物>正丁醇提取物>氯仿提取物>石油醚提取物。

其中乙酸乙酯提取物的抑制效果显著,当提取物浓度为 10 mg/mL 时,对脂肪酶活性的抑制率可达 89.3%。不同溶剂提取物抑制脂肪酶活性的 IC_{50} 见表 2。

表 2 不同溶剂提取物抑制脂肪酶活性的 IC_{50}

Table 2 IC_{50} of different solvent extracts to inhibit lipase activity

不同溶剂提取物	IC_{50} /(mg/mL)
水提取物	3.95
石油醚提取物	9.64×10^6
氯仿提取物	34.73
乙酸乙酯提取物	0.69
正丁醇提取物	21.61

根据图 1 计算得出不同极性溶剂提取物对脂肪酶活性的抑酶 IC_{50} ,如表 2 所示,乙酸乙酯提取物对脂肪酶活性的抑制效果最好,石油醚提取物抑制效果最差。因此选择用乙酸乙酯作为超声提取脂肪酶抑制剂工艺的萃取剂。

2.2 单因素试验

2.2.1 乙醇浓度对脂肪酶抑制剂的得率和抑制率的影响

测量不同浓度乙醇条件下提取物的得率和对脂肪酶的抑制率见图 2。

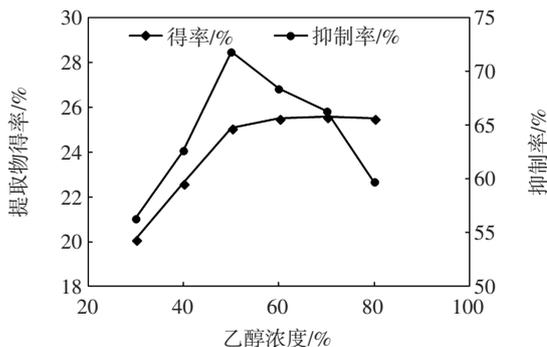


图 2 乙醇浓度对脂肪酶抑制剂得率和抑制率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on the yield and inhibition rate of lipase inhibitors

由图 2 可知,脂肪酶抑制剂的得率随着乙醇浓度的增加而增加,但当乙醇浓度大于 50%时,得率增加不大;脂肪酶抑制剂的抑制率在乙醇浓度为 50%时最大,高于 50%时抑制率反而下降,这可能是因为随着乙醇浓度增加,非抑制成分溶解物增加,虽然得率增加,但抑制剂含量下降,从而导致抑制率下降。

2.2.2 超声功率对脂肪酶抑制剂的得率和抑制率的影响

测量不同超声功率下提取物的得率和对脂肪酶的抑制率见图 3。

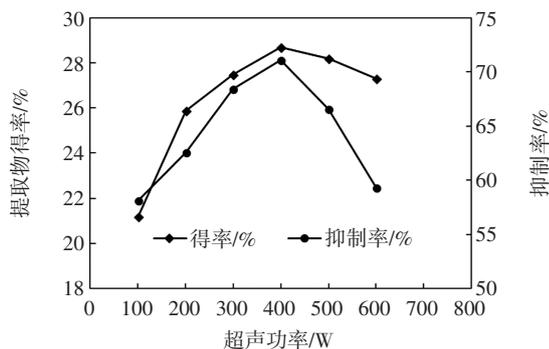


图3 超声功率对脂肪酶抑制剂得率和抑制率的影响

Fig.3 Effect of ultrasound power on the yield and inhibition rate of lipase inhibitors

由图3可知,提取物得率和对脂肪酶的抑制率都在400 W时达到最大。这是因为随着超声功率增加,热效应也逐渐加强,脂肪酶抑制剂的活性降低。

2.2.3 超声提取温度对脂肪酶抑制剂的得率和抑制率的影响

测量不同超声提取温度下提取物的得率和对脂肪酶的抑制率见图4。

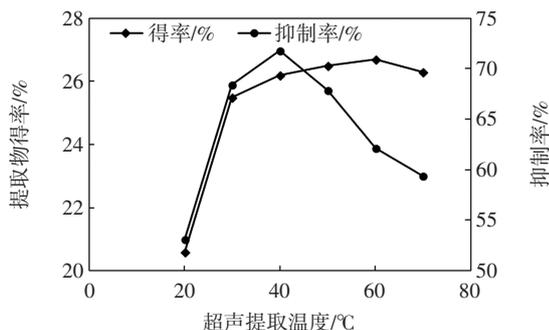


图4 提取温度对脂肪酶抑制剂得率和抑制率的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on the yield and inhibition rate of lipase inhibitors

由图4可知,提取物得率与提取温度成正比,而抑制率随着温度升高先增加后降低,在40°C时抑制率最大。可见,温度升高虽然可增加得率,但却使脂肪酶抑制剂降低了活性。

2.2.4 超声提取时间对脂肪酶抑制剂的得率和抑制率的影响

超声提取时间对提取物的得率和对胰脂肪酶活性的抑制率的影响如图5所示。

由图5可知,提取率随时间不同而不同,如果超声提取时间过短,则有效成分来不及从绿茶细胞中溶出,影响提取率,但当绿茶中脂肪酶抑制剂基本浸出完毕后,增加提取时间对得率影响不大,其抑制率反而有所下降,因为活性成分在溶液中长时间受热可能

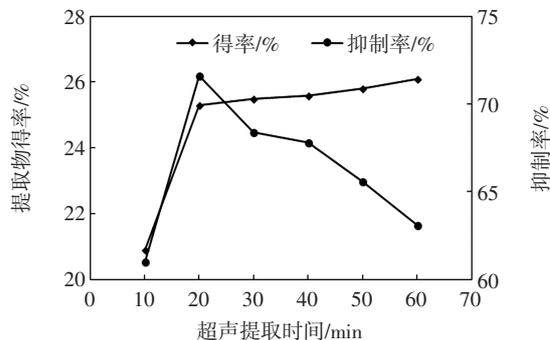


图5 超声提取时间对脂肪酶抑制剂得率和抑制率的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic extraction time on the yield and inhibitory rate of lipase inhibitors

使部分结构被破坏。从图5可以看出超声提取20 min时抑制率最大。

2.3 正交试验

在单因素试验的基础上,对乙醇浓度、超声功率、超声提取温度、超声提取时间4个影响提取工艺的因素进行正交试验,结果如表3所示。

表3 超声提取崂山绿茶中脂肪酶抑制剂的正交试验结果

Table 3 Orthogonal test of ultrasonic extraction of lipase inhibitors from Laoshan green tea

试验号	A 乙醇浓度	B 超声功率	C 超声提取温度	D 超声提取时间	得率/%	抑制率/%
1	1	1	1	1	27.2	69.8
2	1	2	2	2	27.6	71.6
3	1	3	3	3	27.8	67.5
4	2	1	2	3	28.4	78.1
5	2	2	3	1	27.8	79.4
6	2	3	1	2	28.1	75.9
7	3	1	3	2	28.7	61.5
8	3	2	1	3	28.8	63.6
9	3	3	2	1	27.9	66.8
得率						
K ₁	82.6	84.3	84.1	82.9		
K ₂	84.3	84.2	83.9	84.4		
K ₃	85.4	83.8	84.3	85.0		
R	2.8	0.5	0.4	2.1		
优水平	3	1	3	3		
主次顺序	A	D	B	C		
抑制率						
K' ₁	208.9	209.4	209.3	216		
K' ₂	233.4	214.6	209	209		
K' ₃	191.9	210.2	207	209.2		
R	41.5	5.2	2.3	7		
优水平	2	2	1	1		
主次顺序	A	D	B	C		

由表3可以看出,影响提取物得率的因素的主次顺序为A>D>B>C,即乙醇浓度对得率影响最大,其次

是超声提取时间,然后是超声功率和超声提取温度。最优组合为 A₃B₁C₃D₃,即用 70%乙醇,超声波功率为 200 W,在 50℃下超声提取 30 min。对于抑制剂抑制率,影响因素的主次顺序为 A>D>B>C,即乙醇浓度对抑制率影响最大,其次是超声提取时间,然后是超声功率和超声提取温度,最优组合为 A₂B₂C₁D₁,即用 60%乙醇,超声功率为 300 W,在 30℃下提取 10 min。经综合评价,确定 A₂B₂C₁D₁为最终优化工艺条件。

2.4 验证优化工艺试验

用 60%乙醇,设定超声功率为 300 W,在 30℃下超声提取 10 min,以此条件进行 3 次验证试验,结果见表 4。

表 4 崂山绿茶中脂肪酶抑制剂最佳提取工艺条件

Table 4 Verification of the optimum conditions for inhibitor

编号	得率/%	相对标准偏差(得率)/%	平均得率/%	抑制率/%	相对标准偏差(抑制率)/%	平均抑制率/%
1	29.1			78.9		
2	28.9	0.86	29.2	79.2	0.36	79.2
3	29.5			79.6		

3 次验证试验相对标准偏差值皆在 2%之内,说明此工艺稳定性好。在此工艺条件下,提取物平均得率为 29.2%,平均抑制率为 79.2%。

3 结论

用不同极性溶剂对崂山绿茶中脂肪酶抑制剂的活性部分进行筛选,水、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇组分对崂山绿茶中脂肪酶抑制的 IC₅₀ 值分别为 3.95、9.64、34.73、0.69、21.61 mg/mL,脂肪酶抑制剂重要集中在乙酸乙酯组分中,因此提取工艺先用乙醇提取,再用乙酸乙酯萃取。经综合评定,确定超声波法提取崂山绿茶中脂肪酶抑制剂的最佳工艺条件为:用 60%乙醇,超声功率为 300 W,在 30℃下超声提取 10 min,得率和抑制率分别为 29.2%和 79.2%。与单纯用溶剂浸提相比,超声波辅助提取工艺提高了脂肪酶抑制剂的得率和抑制率,并大大缩短了提取时间。

参考文献:

[1] 耿杰,张洪梅,周泉城.文冠果壳皂苷抑制胰脂肪酶活性的研

究[J].现代食品科技,2014,30(11): 89-92

[2] Birari R B, Bhutani K K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential [J]. Drug Discovery Today, 2007, 12: 879-889

[3] Buchhol Z T, Melzig M F. Polyphenolic Compounds as Pancreatic Lipase Inhibitors[J]. Planta Medica, 2015, 81: 771-783

[4] 杨鹏,李艳琴.荞麦黄酮和荞麦糖醇对胰脂肪酶的抑制作用[J].食品科学,2015,36(11): 60-63

[5] 高畅,胡利,迟原龙,等.桑叶黄酮对胰脂肪酶的抑制作用[J].食品科技,2017(5): 194-198

[6] 杨剑萍,林巧文,蒋辽川,等.中药黄酮的提取及其脂肪酶抑制活性研究[J].分析试验室,2017(6): 713-716

[7] 王远,郑雯,蔡珺珺,等.辣木叶黄酮结构分析及其对胰脂肪酶的抑制作用[J].食品科学,2018,39(2): 31-37

[8] 张忠.茶多酚对胰脂肪酶活性的抑制作用[J].食品工业,2013(8): 168-170

[9] 赵瑜,周家春,张靖伟,等.紫娟茶提取物对血管紧张素转换酶、α-淀粉酶和胰脂肪酶的体外抑制作用[J].食品工业科技,2017,38(19): 11-20

[10] 刘天因,徐梦佳,胡冰,等.茯砖茶多酚类物质对胰脂肪酶活性的抑制作用[J].食品科学,2015,36(21): 46-49

[11] 张丹,姚正颖,侯北伟,等.香水莲花提取物对胰脂肪酶活性的抑制作用[J].食品科技,2017(3): 227-231

[12] 张惠.绿茶在身体健康领域的应用展望[J].福建茶叶,2017,39(9): 41-42

[13] 刘安军,郭丹霄,刘慧慧,等.绿茶提取物的降血脂及减肥作用研究[J].现代食品科技,2012,28(6): 601-605

[14] 郭虹雯,许翔雨,陈莹婕,等.绿茶茶汤对肥胖相关肠道菌群的影响[J].茶叶科学,2016(4): 344-362

[15] 孙世利,凌彩金,潘顺顺,等.茶叶抑制肥胖的生物化学与分子细胞生物学机制[J].中国农学通报,2011,27(2): 373-377

[16] 严伟,李淑芬,田松江.超声波协助提取技术[J].化工进展,2002, 21(9): 649-651

[17] 胡斌杰,陈金锋,王官南.超声波法与传统热水法提取灵芝多糖的比较研究[J].食品工业科技,2007(2): 190-192

[18] Gordon J, Nimish N K, Derek S. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro[J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 193-199

[19] 冉琳,何钢,梁立,等.黑木耳多糖对胰脂肪酶活性的抑制作用[J].食品工业科技,2017,38(21): 56-60

[20] 任秀娟,马海乐.葡萄籽提取物脂肪酶抑制活性筛选及抑制机理的研究[J].食品工业科技,2009(6): 181-186

[21] 任秀娟.葡萄籽中脂肪酶抑制剂的分离提取及对营养型大鼠减肥效果的研究[D].镇江:江苏大学,2009: 100-120

收稿日期:2018-08-09