

正交试验优化野生猕猴桃中维生素C的提取工艺研究

李宁 李舒雯 蒋思清 肖鸿森 胡昊 杨艳 刘青青*

(西南医科大学公共卫生学院,四川泸州 646000)

摘要 为有效提取野生猕猴桃中的 V_C ,优化野生猕猴桃中 V_C 提取工艺,本文以 V_C 含量为评价指标,先后考察提取液pH值、料液比、超声提取时间对野生猕猴桃中 V_C 提取效果的影响。结果表明,野生猕猴桃中 V_C 提取效果最好的工艺条件为提取液pH值4、料液比1:12、超声提取时间35 min。由此得到的野生猕猴桃中 V_C 提取工艺稳定性良好,可为今后野生猕猴桃 V_C 提取提供基础。

关键词 野生猕猴桃; V_C ;分光光度法;正交试验

中图分类号 S663.4;TS255.4 文献标识码 A 文章编号 1007-5739(2019)11-0223-03

Optimization of Extraction Process of Vitamin C from Wild Kiwifruit by Orthogonal Text
LI Ning LI Shu-wen JIANG Si-qing XIAO Hong-sen HU Hao YANG Yan LIU Qing-qing*

(College of Public Health, Southwest Medical University, Luzhou Sichuan 646000)

Abstract In order to effectively extract V_C from wild kiwifruit and optimize the extraction process of V_C from wild kiwifruit, using V_C content as the evaluation index, the effects of pH value, solid-liquid ratio and ultrasonic extraction time on extraction effect of V_C in wild kiwifruit were investigated in this paper. The results showed that the best extraction process for V_C from wild kiwifruit was pH value of 4, solid-liquid ratio of 1:12, ultrasonic extraction time of 35 min. The extraction technology of V_C from wild kiwifruit has good stability, and provides a basis for the extraction of V_C from wild kiwifruit in the future.

Key words wild kiwifruit; V_C ; spectrophotometry; orthogonal test

V_C 是人体需要量最大的一类维生素,正常成人体内 V_C 含量为1 500~3 000 mg^[1]。由于人体缺乏古洛糖内酯氧化酶,不能自身合成 V_C ^[2],必须从食物中获取。水果和蔬菜含有丰富的 V_C ^[3],人体所需 V_C 的98%都来源于水果和蔬菜^[4]。野生猕猴桃肉质饱满、鲜嫩多汁,营养丰富。每100 g野生猕猴桃鲜果中含有100~420 mg V_C ,是苹果的20~80倍,是梨的30~140倍,是柑橘的5~10倍,被人们称为“ V_C 之王”^[5]。

目前 V_C 的测定方法有铜磷钼蓝体系分光光度法^[6]、荧光分光光度法^[7]、高效液相色谱—二极管阵列器法(HPLC-PDA)^[8]、2,6-二氯酚测定法^[9]、高效液相色谱法^[10]、电位滴定法^[11]。本试验研究野生猕猴桃中 V_C 提取的最佳工艺条件,采用紫外分光光度法测定野生猕猴桃中的 V_C 含量,为综合开发野生猕猴桃资源奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

试验材料:野生猕猴桃,采自宜宾县山区。

试验仪器与试剂:紫外分光光度计(岛津UV 2450型);超声波清洗器(华泰 ps-60型);台式低速离心机(北利 LD4-2A型);pH计(雷磁 PHS-3C型);分析天平(赛多利斯 BS224S); V_C 标准品(上海融禾医药科技发展有限公司,含量为99.9%);盐酸、硫酸、氢氧化钠,均为分析纯;蒸馏水,自制。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线。精密称取 V_C 标准品0.010 0 g,用盐酸溶液定容至1 000 mL容量瓶,用盐酸溶液定容,得到10 μ g/mL V_C 标准应用液。

精密吸取 V_C 标准应用液至10 mL容量瓶,盐酸溶液定

容,分别得到浓度为0、1.0、3.0、5.0、7.0、10.0 μ g/mL的 V_C 标准系列溶液。在243 nm处测定吸光度,以 V_C 标准溶液质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.2 样品制备。称取若干份10.000 g野生猕猴桃果肉至研钵,各加入盐酸溶液,混合、研磨,转移至250 mL烧杯中,超声后离心,上清液待测。

1.2.3 野生猕猴桃中 V_C 含量的测定。取1 mL上清液,在243 nm处测定吸光度,得到样品中 V_C 粗含量 m_1 (单位为mg/100 g,下同)。另取2 mL上清液至50 mL容量瓶中,加入蒸馏水20 mL,1 mol/L NaOH溶液8 mL,静置20 min后定容,摇匀,在243 nm处测定吸光度,得到243 nm处干扰的物质含量为 m_2 。 m_1 与 m_2 的差值为野生猕猴桃中 V_C 的含量。

1.2.4 单因素试验。固定盐酸溶液pH值为4、料液比[质量(g)与体积(mL)比,下同]为1:7、超声时间20 min,分别考察盐酸溶液pH(1、2、3、4、5、6)、料液比(1:1、1:3、1:5、1:7、1:10、1:15)、超声时间(0、5、10、15、20、30、40、50、70 min)对野生猕猴桃中 V_C 提取的影响,确定最佳因素水平。

1.2.5 正交试验。在1.2.4单因素试验的基础之上进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,以优化野生猕猴桃中 V_C 的提取工艺。具体如表1所示。

表1 正交试验因素与水平

水平	因素		
	提取液pH值(A)	料液比(B)/g·mL ⁻¹	超声时间(C)/min
1	3	1:8	25
2	4	1:10	30
3	5	1:12	35

2 结果与分析

2.1 标准曲线以及线性范围

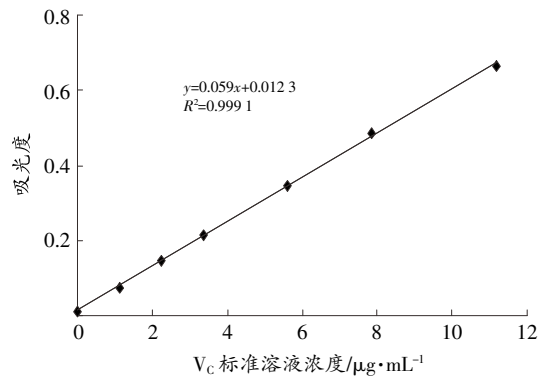
V_C 溶液标准曲线如图1所示,浓度在0~12 μ g/mL的范围内, V_C 在pH值=4的盐酸溶液中的吸光度随浓度呈线性变化,线性方程为 $y=0.059x+0.0123$,线性相关系数为0.999 1,线性良好。

基金项目 四川省省级大学生创新创业训练计划项目(201710632102);西南医科大学-宜宾县人民政府合作项目基金(2014YDZH-005)。

作者简介 李宁(1996-),女,四川绵阳人,在读本科生,从事食品分析与开发研究工作。

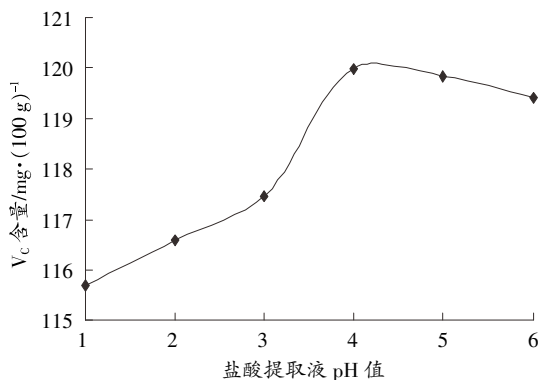
* 通信作者

收稿日期 2019-03-05

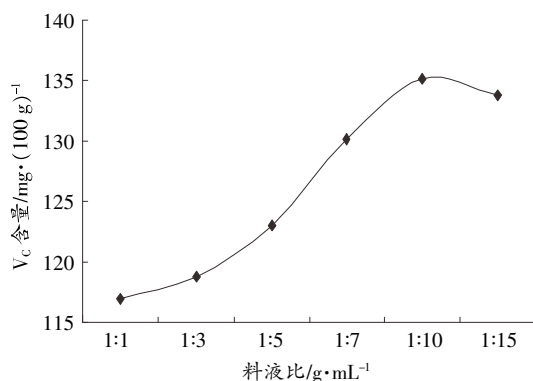
图1 V_c 溶液标准曲线

2.2 单因素试验

2.2.1 盐酸溶液 pH 值对野生猕猴桃 V_c 提取的影响。根据试验设计,考察盐酸溶液 pH 值对野生猕猴桃 V_c 提取的影响。从图 2 可以看出,盐酸溶液 pH 值在 1~4 之间,野生猕猴桃 V_c 含量逐渐增加,pH 值为 4 时 V_c 含量达到最高值,之后逐渐下降,故本试验确定盐酸 pH 值 3~5 作为正交试验的考察水平。

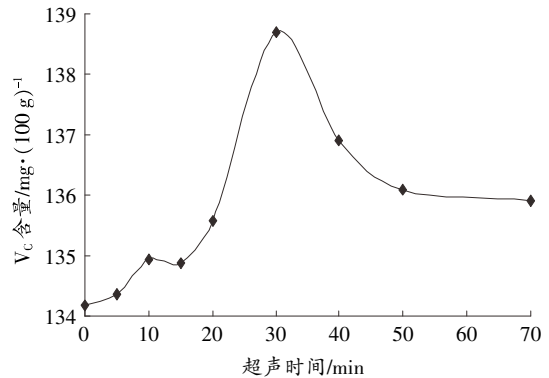
图2 盐酸溶液 pH 值对野生猕猴桃 V_c 提取的影响

2.2.2 料液比对野生猕猴桃 V_c 提取的影响。根据试验设计,考察料液比对野生猕猴桃 V_c 提取的影响。从图 3 可以看出,随着料液比的增加,野生猕猴桃 V_c 提取逐渐增加,当料液比大于 1:10,野生猕猴桃 V_c 提取逐渐减少。因此,料液比确定在 1:8~1:12 之间为正交试验的考察水平。

图3 料液比对野生猕猴桃 V_c 提取的影响

2.2.3 超声时间对野生猕猴桃 V_c 提取的影响。根据试验设计,考察超声时间对野生猕猴桃 V_c 提取的影响。从图 4 可

以看出,超声时间在 30 min 之前,随超声时间的增加,野生猕猴桃 V_c 提取量增加,超声时间在 30 min 时达到最高,超声时间超过 30 min 后,随超声时间的增加,野生猕猴桃 V_c 提取下降。因此,本试验确定超声时间 25~35 min 为正交试验的考察水平。

图4 超声时间对野生猕猴桃 V_c 提取的影响

2.3 正交试验

根据以上单因素试验得出盐酸的 pH 值、料液比以及超声时间的考察水平,进行正交试验,得出试验的最优条件并考察各因素的主次影响。

从表 2 可以看出,各因素对野生猕猴桃中 V_c 提取的影响程度由大到小为超声时间>料液比>盐酸提取液 pH 值。经过直观比较各因素的 k_1 、 k_2 和 k_3 得出,最佳工艺组合为 A₂B₃C₃。由此表明,紫外可见光光度法测定野生猕猴桃 V_c 含量的最佳试验条件:盐酸提取液 pH 值为 4、料液比 1:12、超声提取时间 35 min。

表2 正交试验设计及结果

处理	A	B	C	V _c 含量/ $\text{mg}\cdot(100\text{g})^{-1}$
1	3	1:8	25	135.41
2	3	1:10	30	135.86
3	3	1:12	35	139.91
4	4	1:8	30	136.19
5	4	1:10	35	138.69
6	4	1:12	25	136.78
7	5	1:8	35	137.40
8	5	1:10	25	136.74
9	5	1:12	30	136.65
K_1	411.18	409.00	408.93	
K_2	411.66	411.29	408.70	
K_3	410.79	413.34	416.00	
k_1	137.06	136.33	136.31	
k_2	137.22	137.10	136.23	
k_3	136.93	137.78	138.67	
R	0.29	1.45	2.44	

2.4 验证试验

在盐酸提取液 pH 值为 4、料液比 1:12、超声提取时间 35 min 的试验条件下提取野生猕猴桃 V_c,并用紫外可见光光度法测定,测出野生猕猴桃中 V_c 含量为 140.45 mg/100 g。

3 结论

本试验结果表明,超声提取野生猕猴桃中 V_c 的最佳条件为 pH 值为 4 的盐酸提取液、料液比 1:12、超声提取时间 35 min。标准曲线表明在浓度 0~12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内, $R^2=0.9991$,线性良好。该研究结果可为今后紫外可见分光光度法检测野生猕猴桃中 V_c 含量提供参考。

4 参考文献

- [1] 刘晓梅.V_C的临床不合理应用及常见不良反应[J].临床合理用药杂志,2012,5(25):37-38.
- [2] SMIROFF N, CONKLIN P L, LOEWUS F A. Biosynthesis of Ascorbic Acid in Plants: A Renaissance[J]. Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, 2001, 7(52): 437-467.
- [3] NEJATI -YAZDINEJAD M. Indirect determination of ascorbic acid (vitamin C) by spectrophotometric method[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2007, 42(12): 1402-1407.
- [4] 李军明, 张军. 体内维生素的生理功能和日常保健的科学合理摄取[J]. 中国食物与营养, 2009(3): 53-55.
- [5] 宋美晶. 不同品种猕猴桃的成分研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2013.

(上接第 218 页)

的嗜水气单胞菌以及从 60% 的健康鱼嗜水气单胞菌菌株分离得到⁶。

根据前人研究, 一个气单胞菌属菌株可以同时携带编码几个毒力因子的基因⁷。本文研究发现, *ahh1* 基因存在于食用鱼类产品的 41% 温和气单胞菌和 55% 嗜水气单胞菌中。*aerA* 和 *ahh1* 基因被发现在 68% 嗜水气单胞菌中存在。此外, 即使只有 *aerA* 基因, β -溶血性嗜水气单胞菌也表现出细胞毒性特性。不同的是, 溶血性温和气单胞菌和非溶血性嗜水气单胞菌没有携带 *aerA* 基因。而分离来自于淡水鱼类产品 53% 的嗜水气单胞菌被发现含有 *aerA* 基因。分离来自海洋鱼类分离得到的 89% 嗜水气单胞菌发现存在气溶素基因 *aerA* 和溶血素基因 *hlyA*。同样的研究结果也证实, 新鲜的鲑鱼、鳕鱼鱼片和切片以及真空包装的熏制鳕鱼和鲑鱼片中分离得到的嗜水气单胞菌都含有 *aerA* 基因, 而 92% 的样本含有 *hlyA* 基因⁸。前人研究表明, 冷冻鱼分离得到的 β -溶血性嗜水气单胞菌株都含有气溶素基因⁹。相反的结果是, 寿司、水生生物沙拉、鱼肉酱和虾分离得到嗜水气单胞菌没有发现溶血素基因和气溶素基因¹⁰。本研究中, β -溶血性嗜水气单胞菌检测结果都含有 *ahh1* 基因, 而 93% 的样本含有 *aerA* 基因, 其中 1 株从鲤鱼片和 1 株从带鱼片分离得到的菌株均没有携带 *aerA* 基因。

前人研究表明, 嗜水气单胞菌污染的和鱼产品都可以引发人体的腹泻¹⁰。大多数情况下, 此类疾病与水产养殖产品或冷藏食品直接食用息息相关。此外, 有研究发现, 气单胞菌属菌株与其他菌株相比较, 同时携带有 *ahh1* 和 *aerA* 基因的菌株具有更高的细胞毒性滴度¹¹, 从而证实 β -溶血性嗜水气单胞菌气溶素是一种重要的毒力因子。嗜水气单胞菌的致病性是多因素造成的, 可能取决于各种毒性因子的协同效应。在前人研究中, 发现所有分离来自鱼的嗜水气单胞菌菌株含有 *aerA* (100%) 和分离来自腹泻患者的菌株含有 *hlyA* (83%) 基因。溶血素也是人类气单胞菌属感染的发病机理重要组成成分。前人研究表明, 从腹泻病人的粪便中分离出 6 个嗜水气单胞菌菌株都含有 β -溶血性 *ahh1* 基因, 1/2 的菌株同时含有气溶素编码基因¹²。

考虑到免疫活性差和免疫力低下的人群越来越多, 有可能受到气单胞菌属感染潜在风险, 而且广泛的气单胞菌属存在于环境中, 长期监测潜在致病性气单胞菌属有助于公众健康。本研究表明, 毒性嗜水气单胞菌的 PCR 鉴定方法相比传统的微生物鉴定方法, 非常有用, 具有敏感、快速的特

- [6] 郭远凯, 郑艳霞, 梁奇峰. 铜磷钼蓝分光光度法测定维生素 C 的含量[J]. 煤炭与化工, 2018, 41(7): 156-160.
- [7] 陈亚斌, 何建国, 马天兰, 等. 维生素 C 荧光光谱的机理研究[J]. 食品工业科技, 2016, 3(22): 112-115.
- [8] 周宁菱. 饮料中维生素 C 含量的测定[J]. 食品安全导刊, 2018(34): 74-76.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中抗坏血酸的测定: GB 5009.86—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [10] 王淼. HPLC 法同时测定阿司匹林维生素 C 泡腾片中药物含量[J]. 海峡药学, 2018, 30(11): 65-68.
- [11] 余以刚, 肖性龙. 食品质量与安全检验实验[M]. 北京: 中国质检出版社, 2014.

点。本研究结果证实, 嗜水气单胞菌菌株存在毒力基因编码毒力因子。这些菌株是危险的, 有可能导致食物中毒。食用鱼类产品的安全性受到众多因素的影响, 包括鱼的来源、鱼的特性和加工方法。新鲜的鱼经过适当的加热进行食用是低风险的, 然而如果食用生鱼, 不够熟或仅进行简单处理会增加食用风险。食用鱼类产品含有嗜水气单胞菌对人类是危险的, 特别是对敏感的人群, 例如儿童、老年人和免疫功能不全的人。

本研究证实人类食用的鱼类产品存在 β -溶血性嗜水气单胞菌。此外, 研究发现, 所有这些菌株携带 *ahh1* 基因, 多数 β -溶血性嗜水气单胞菌携带 *aerA* 基因, 从而证实 β -溶血性嗜水气单胞菌溶血素基因和气溶素基因普遍存在于鱼类和鱼类产品中, 对消费者的健康造成潜在风险。因此, 有必要通过多重 PCR 检测技术进行快速有效的 β -溶血性嗜水气单胞菌的分离鉴定, 预防其对人体产生危害。

4 参考文献

- [1] JANDA J, ABBOTT S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(1): 35-73.
- [2] SUNEE K, SUWAT D, RUNGRWAN C, et al. Distribution of *Aeromonas hydrophila* Serogroups in different clinical samples and the development of polyclonal antibodies for rapid identification of the genus *Aeromonas* by direct agglutination[J]. Microbiol Immunol, 2002, 46(12): 875-879.
- [3] GRIM C J, KOZLOVA E V, SHA J, et al. Characterization of *Aeromonas hydrophila* wound pathotypes by comparative genomic and functional analyses of virulence genes[J]. Microbiology, 2013, 4(2): 64-73.
- [4] ANSARY A, HANEEF R M, TORRES J L, et al. Plasmids and antibiotic resistance in *Aeromonas hydrophila* isolated in Malaysia from healthy and diseased fish[J]. J Fish Dis, 1992, 15(2): 191-196.
- [5] GONZÁLEZ-SERRANO C J, SANTOS J A, GARCÍA-LÓPEZ M L, et al. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case[J]. J Appl Microbiol, 2002, 93(3): 414-419.
- [6] SUBASHKUMAR R, THAYUMANAVAN T, VIVEKANANDHAN G, et al. Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in acute gastroenteritis among children[J]. Indian J Med Res, 2006, 123(1): 61-66.
- [7] 储卫华, 陆承平. PCR 扩增特异性 16SrDNA 和溶血素基因检测致病性嗜水气单胞菌[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 79-82.
- [8] 王远微, 汤承, 于学辉, 等. 三重 PCR 检测鱼类致病性嗜水气单胞菌[J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 947-951.
- [9] CHEN Q, YAN Q, WANG K, et al. The portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into *Pseudosciaena crocea* and characteristic of the bacterial adhesion to the mucus[J]. Dis Aqu Organ, 2008, 80: 181-188.
- [10] 郭松林, 关瑞章, 柳佩娟. 双重 PCR 法快速检测欧鳗鲷嗜水气单胞菌[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2007, 12(4): 294-300.
- [11] SHEMESH M, TAM A, STEINBERG D. Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions[J]. Microbiology, 2007, 153: 1307-1317.
- [12] 毛宁, 王志明, 郑莺, 等. 嗜水气单胞菌与其拮抗菌 R-15 的生长曲线研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2008, 24(1): 82-85.