

油橄榄叶存储条件对橄榄苦苷的影响

赵夏莲, 张煜泓, 曲继鹏*

(西昌学院农业科学学院, 四川 西昌 615013)

摘要:油橄榄叶中橄榄苦苷含量高于果实和树皮,但并未合理利用。为探究不同温度条件对油橄榄叶中橄榄苦苷含量的影响,以8年生小苹果油橄榄叶作研究材料,采用3种不同的干燥处理方式,将油橄榄叶片液氮研磨冷冻干燥、-20℃冷冻干燥或45℃烘干,得到油橄榄叶片干叶粉末,分4份分别储存于-80、-20、4、25℃温度条件下,采用超声波提取法得到样品提取液,使用高效液相色谱法测定提取液中橄榄苦苷含量。结果表明:采用45℃烘干的干燥方式、存储在25℃的样品橄榄苦苷质量分数最高,达到77.9 mg/g。

关键词:橄榄叶;橄榄苦苷;储存条件;HPLC

中图分类号:TQ351;S565.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-1891(2019)02-0008-04

Effects of Olive Leaf Storage Conditions on Olivopicrin Contents

ZHAO Xialian, ZHANG Yuhong, QU Jipeng*

(School of Agriculture Science, Xichang University, Xichang, Sichuan 615013, China)

Abstract: The olivopicrin content in olive leaves was higher than that in the fruits and the bark, but it was not reasonably utilized. To explore the effects of different temperature conditions on olivopicrin contents in olive leaves, the 8-year-old Apple olive leaves were used as test materials. Three different drying methods were used to grind and freeze-dry olive leaves with liquid nitrogen, freeze-dry olive leaves at -20℃ or dry them at 45℃, and then olive leaf powder was obtained. The leaf powder were divided into four samples which were stored at -80, -20, 4 and 25℃ respectively. Then their extract solutions were obtained by ultrasonic method, and the olivopicrin contents in the extracts were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the olivopicrin content in the sample stored at 25℃ was the highest, reaching 77.9 mg/g.

Keywords: olive leaf; oleuropein; storage condition; HPLC

0 引言

油橄榄(*Olea europaea* L.),木犀科(*Oleaceae*)木犀榄属(*Olea*)常绿乔木,又名齐墩果、洋橄榄、欧橄榄,是亚热带重要经济林木和地中海地区生产橄榄油的重要来源^[1]。我国油橄榄的引种始于20世纪60年代,主要分布于四川、云南、甘肃、广东等地区,到2015年底其种植面积已达600余km²^[2]。油橄榄果实能榨取营养丰富的橄榄油,可作为食用、工业、药用的原料,具有预防心脑血管疾病,糖尿病以及防癌、抗衰老、增进消化系统等功能,是一种非常完美的“功能性食品”,在国际上被誉为“飘雪的软黄金”。由于油橄榄果实价值大,现已实现大规模种植,但在工业化加工榨取橄榄油的同时,叶片直接被丢弃或焚烧,不仅造成环境和生态的破坏,还大

大的浪费了资源^[3]。研究表明,油橄榄叶片主要含有橄榄苦苷(Oleuropein)、黄酮(Flavonoids)、羟基酪醇(Hydroxytyrosol)等酚类化合物^[4]。橄榄苦苷是一种无毒的裂环烯醚萜苷类化合物,广泛存在于木犀科的植物中,是橄榄油中的一种苦味素^[5],也是橄榄叶的主要活性成分,而且油橄榄叶中橄榄苦苷含量也远高于油橄榄果实和树皮^[6]。有研究表明,橄榄苦苷的苦味是强效抗氧化剂,具有多种药理活性^[7],如抗氧化、抑菌^[8]、抗炎^[9]、抗紫外线^[10]、抗高血压^[11-12]、降血糖^[13]、抗病毒^[14]、抗癌^[15]以及保肾等作用,同时油橄榄叶中抗氧化活性成分比橄榄油高100倍。但目前油橄榄叶并没有得到充分利用。

不同温度储存条件下,油橄榄叶中橄榄苦苷含量有所不同。故本试验以油橄榄叶为材料,使用3种干燥方式,分别存储于-80、-20、4、25℃温度条

收稿日期:2019-05-12

基金项目:西昌学院2018年度省级“大学生创新创业训练计划”项目(西学院[2018]59号)。

作者简介:赵夏莲(1996—),女,四川西充人,本科,研究方向:植物天然产物。*为通信作者。

件下,探索橄榄苦苷储存最佳温度,为油橄榄叶中橄榄苦苷的生产以及综合开发利用提供理论依据和技术支持。通过对油橄榄叶存储条件的探索,使油橄榄叶副产品增值,合理开发利用其资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新鲜橄榄叶片,于2018年11月25日在凉山州西昌市西溪乡中泽油橄榄庄园取自8年生小苹果油橄榄树品种,采摘后置于常温条件运往实验室,进行叶片处理。

1.2 试剂与仪器

橄榄苦苷标准品(成都曼思特生物技术公司,纯度 $\geq 98\%$),乙腈(Geel.Belglum.NJ.USA,色谱纯),甲醇(成都科龙化学品公司,分析纯),液氮。

KQ-300DV型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Agilent 1260 HPLC(美国Agilent公司),UV-vis DAD检测器,C18色谱柱,UV-1750型紫外分光光度计(Shimadzu,日本),FA2004B型电子天平(上海精天电子仪器有限公司),UPT-T-101型超纯水器(成都超纯水科技有限公司),研钵,SCIENTZ-12N型真空干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司),TST101A-1B型电热鼓风干燥箱(成都特思特仪器有限公司),W135型高速万能粉碎机。

2 试验方法

2.1 油橄榄叶处理

油橄榄叶采摘后清水洗净,分别进行3种处理方式干燥(表1),粉碎,粉末过80目筛得到3种处理方式下的油橄榄叶片粉末样品。

表1 3种处理获得干燥粉末

| 处理 | 干燥方式 | 具体操作 |
|----|-----------|--|
| a | 液氮研磨,冷冻干燥 | 取新鲜油橄榄叶片于研钵,多次少量加入液氮,研磨至叶片粉碎成粉末,置冷冻干燥机干燥 |
| b | 45℃烘干 | 取常温状态下新鲜油橄榄叶片置于烘箱,设置温度为45℃,烘干至恒重后粉碎成粉末 |
| c | -20℃冷冻干燥 | 取新鲜油橄榄叶片于-20℃冷冻,置于冷冻干燥机干燥,干燥后粉碎机粉碎成粉末 |

将3种干燥条件下的样品分别储存于不同温度条件下:-80、-20、4、25℃。为减少实验误差,设置3组重复。7d后对试验的叶片样品进行橄榄苦苷含量的测量,记录并分析数据。

2.2 高效液相色谱法(HPLC)测定橄榄苦苷含量

2.2.1 检测波长的确定

精确称取11 mg 橄榄苦苷标准品,放入10 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶解,定容后摇匀,密塞,得到橄榄苦苷标准品溶液。用紫外可见分光光度计对橄榄苦苷标准品溶液进行全长扫描,在254 nm的波长有较强吸收,故采用254 nm为检测波长。

2.2.2 色谱条件

C18色谱柱($\phi 4.6$ mm \times 150 mm, 5.0 μ m);流动相:水:乙腈=75:25;流速:0.8 mL/min;柱温:30℃;进样量:10 μ L。

2.2.2 标准曲线绘制

精确称取橄榄苦苷标准品11 mg,放入10 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶解定容至刻度线,摇匀,得到1.1 mg/mL的标准品溶液。精确吸取溶液10 μ L,重复进样5次,测其峰面积的偏差。再分别精确吸取标准品溶液1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 μ L进样分析,重复3次,取峰面积平均值。以橄榄苦苷标准品质量为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线如图1,回归方程为: $Y=916.89X+53.442$ ($R^2=0.9995$)。

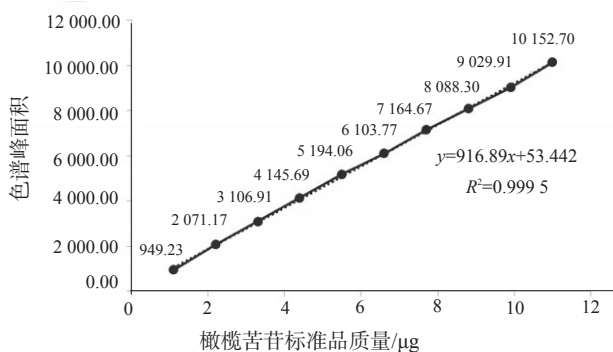


图1 橄榄苦苷标准曲线

2.3 超声波提取橄榄苦苷

取存储7d后的12组样品,使用超声波提取法提取样品。精确称取不同处理方式和存储条件的油橄榄叶粉末各50 mg,分别加入40 mL体积分数为78%的甲醇溶液在超声波下以40℃提取,时间为20 min,提取3次,提取完全后,过滤,用78%的甲醇溶液定容到50 mL,得到样品提取液待用。

2.4 橄榄苦苷含量测定

分别精密吸取对照品与供试品溶液各10 μ L,注入高效液相色谱仪,用外标法测定,计算样品中油橄榄苦苷的含量。

3 结果与分析

3.1 数据分析与处理

采用Excel2010制作橄榄苦苷标准曲线和进行

数据分析,并进行多重比较。

油橄榄叶片中橄榄苦苷的质量分数(mg/g)为:

$$W=5 \times (S-53.442) / 916.89 \times m$$

其中, *W* 为橄榄苦苷质量分数(mg/g), *S* 为色谱峰面积, *m* 为样品质量(g)。

3.2 不同温度条件对橄榄苦苷含量的影响

3.2.1 3种干燥方式对油橄榄叶中橄榄苦苷含量的影响

综合3组数据计算其平均值,得到不同干燥方式,不同温度条件下橄榄苦苷含量如表2。可看出两种极端情况:使用液氮研磨干燥处理所得样品,储存于25℃温度条件下,油橄榄叶中橄榄苦苷完全被降解,含量为0;采用45℃烘干处理所得样品,储存于25℃温度条件下,油橄榄叶中橄榄苦苷质量分数平均值最高,为77.9 mg/g。3种干燥方式下,不同储存温度处理的油橄榄叶中橄榄苦苷含量均存在显著性差异。

表2 3种干燥方式油橄榄叶中橄榄苦苷的质量分数 mg/g

| 处理 | 分组 | 温度/℃ | | | |
|----|-----|------|------|------|------|
| | | -80 | -20 | 4 | 25 |
| a | 第一组 | 3.5 | 6.4 | 1.5 | 0.0 |
| | 第二组 | 3.0 | 5.0 | 1.7 | 0.0 |
| | 第三组 | 2.5 | 7.8 | 1.6 | 0.0 |
| | 平均值 | 3.0 | 6.4 | 1.6 | 0.0 |
| b | 第一组 | 74.3 | 67.0 | 74.6 | 79.2 |
| | 第二组 | 73.3 | 68.4 | 77.5 | 76.8 |
| | 第三组 | 75.1 | 66.3 | 75.7 | 77.8 |
| | 平均值 | 74.2 | 67.2 | 75.9 | 77.9 |
| c | 第一组 | 72.3 | 67.3 | 68.4 | 68.4 |
| | 第二组 | 68.9 | 65.3 | 67.4 | 67.2 |
| | 第三组 | 69.4 | 64.9 | 68.2 | 67.0 |
| | 平均值 | 70.2 | 65.8 | 68.0 | 67.5 |

3.2.2 a处理在不同储存温度下橄榄苦苷含量的多重比较

a处理在不同储存温度下油橄榄叶中橄榄苦苷含量如图2。从图2可知,储存于-20℃的橄榄苦苷含量最高,储存于25℃时橄榄苦苷完全被降解。方差分析结果表明,a处理不同温度条件间油橄榄叶片中橄榄苦苷含量存在极显著性差异,且近似正态分布。多重比较可知,-20℃与-80℃及4℃温度条件下的橄榄苦苷含量差异显著,与25℃温度条件下的橄榄苦苷含量差异极显著。

3.2.3 b处理不同储存温度下橄榄苦苷含量的多重比较

b处理不同储存温度下油橄榄叶中橄榄苦苷含

量如图3。从图3可知,储存于25℃的橄榄苦苷含量平均值最高,储存于4℃的最低。方差分析结果表明,不同温度条件间油橄榄叶片中橄榄苦苷含量存在极显著性差异,且无线性规律。多重比较可知,储存于25℃和4℃、4℃和-80℃温度条件下平均橄榄苦苷含量差异均不显著,储存于25℃和-80℃温度条件下平均橄榄苦苷含量差异显著,储存于25℃和-20℃温度条件下平均橄榄苦苷含量差异达极显著水平。

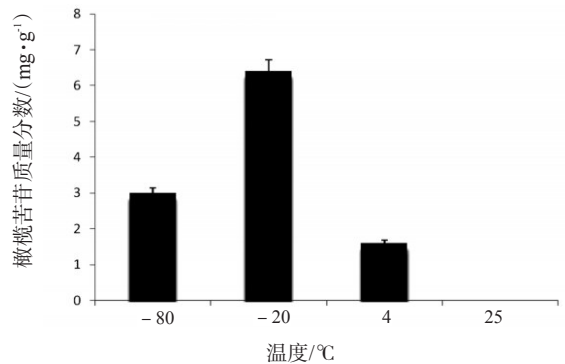


图2 a处理在4种存储温度下橄榄苦苷含量

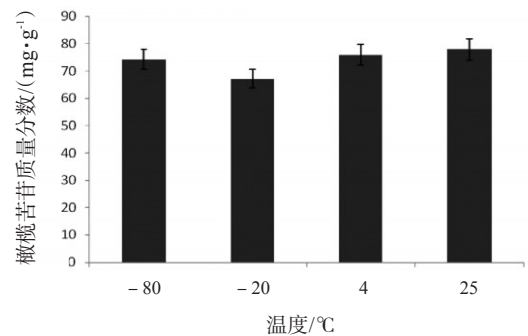


图3 b处理在4种存储温度下橄榄苦苷含量

3.2.4 c处理在不同储存温度下橄榄苦苷含量的多重比较

c处理在不同储存温度下油橄榄叶中橄榄苦苷含量如图4。从图4可知,储存于-80℃的橄榄苦苷得率均值最高。方差分析结果表明,不同温度条件间油橄榄叶片中橄榄苦苷含量存在显著性差异,且不存在线性规律。多重比较可知,储存于-80、4、25和-20℃温度条件下橄榄苦苷含量差异均显著。

4 结论

不同干燥方式,储存于不同温度条件下油橄榄叶中橄榄苦苷含量不同。吴遵秋^[6]研究表明,橄榄苦苷化学性质不稳定,易受温度影响。谢普军^[16]研究可知,油橄榄鲜叶在室温25℃下阴干能保持橄榄

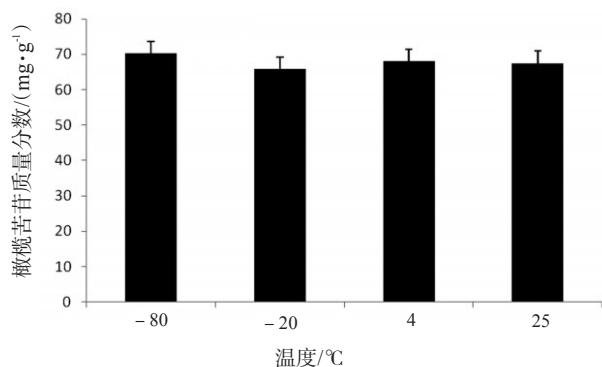


图4 处理在4种存储温度下橄榄苦苷含量

苦苷含量,在60℃烘干干燥橄榄苦苷含量有所降低;经解冻的油橄榄叶中的橄榄苦苷含量降低57.70%,并且53.50%的橄榄苦苷结构受损坏。室温下27d降解率达95.24%,在4℃条件下27d其降解率为38.10%。低温和高温都会使油橄榄叶片中

橄榄苦苷的含量有所降低。因此,橄榄苦苷容易受到温度条件的影响,使其结构遭到破坏,所以橄榄苦苷提取的一个首要和必经步骤是油橄榄叶样品的储存,油橄榄叶样品的存放尤其需要考虑其稳定性。3种不同干燥方式对油橄榄叶片中的橄榄苦苷含量影响有显著差异,4种储存温度对油橄榄叶片中橄榄苦苷含量影响有显著差异。不同干燥处理方式的最优储存温度不同,故油橄榄叶片的干燥处理方式是橄榄苦苷提取效率的影响因素之一,与党建章等^[17]的研究相一致。根据Erbay等^[18]的研究,烘干或室温比冷冻干燥处理更好,干燥处理橄榄苦苷含量优于鲜样,结合各干燥方式下、储存于不同温度条件中油橄榄叶中橄榄苦苷含量不成线性规律,猜测样品储存与干燥处理时温度有一定联系。综上所述得出结论,采用45℃烘干样品、储存在25℃所得到的油橄榄叶中提取的橄榄苦苷含量最高。

参考文献:

- [1] 韩华柏,何方.我国油橄榄引种研究进展[J].中国南方果树,2007(3):37-42.
- [2] 邓煜.中国油橄榄产业创新驱动发展的现状、趋势和对策[J].经济林研究,2018,36(2):1-6+206.
- [3] 高彩霞.油橄榄叶抗氧化物有效成分及其含量变化规律研究[D].中国林业科学研究院,2007.
- [4] 陈千良,孙文基.裂环烯醚萜类化合物研究进展[J].国外医药:植物药分册,2003,18(2):58-63.
- [5] 郝婷,崔建玲,赵桂琴,等.橄榄苦苷提取分离和药理活性的研究进展[J].承德医学院学报,2010,27(1):69-72.
- [6] 吴遵秋,吴宁.油橄榄橄榄苦苷的研究进展[J].贵州农业科学,2016,44(8):87-93.
- [7] MANNA C, MIGLIARDI V, GOLINO P, et al. Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion[J].The Journal of Nutritional Biochemistry, 2004,15(8):461-466.
- [8] 吴遵秋,姜友军,苏光灿,等.油橄榄叶中橄榄苦苷的体外抗氧化和抑菌活性[J].食品科学,2014,35(21):94-99.
- [9] 王化,李梦莎,朱良玉,等.木犀科天然抗氧化剂橄榄苦苷的研究进展[J].北方园艺,2018(5):170-177.
- [10] PERUGINI P, Vettor MC, Rona L.Efficacy of oleuropein against UVB irradiation:preliminary evaluation [J]. International Journal of Cosmetic Science,2008,30:113-120.
- [11] ENDANG S, NAFRIALDI A. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension comparison with captopril [J]. Phytomedicine,2011,18:251-258.
- [12] TANIA PM. Andreas busjahn food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins[J]. Phytotherapy Research, 2008,22:1239-1242.
- [13] AZZAWIE H F, ALHAMDANI M S. Andreas busjahn food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins[J].Life Sciences,2006,78(12):1371-1377.
- [14] MICOL V, CATURLA N, P é REZ-FONS L, et al. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against VHSV[J]. Antiviral Research,2005,66(2):129-136.
- [15] HAMDY HK, CASTELLON R. Oleuropein, a non-toxic oliveiridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005,334(3): 1523-1534.
- [16] 谢普军.油橄榄叶高值化利用技术及机理研究[D].北京:中国林业科学研究院,2015.
- [17] 党建章,黄志立,张志安,等.橄榄叶中橄榄苦苷不同提取方法的研究[J].深圳职业技术学院学报,2006(4):34-36.
- [18] ERBAY Z, ICIER F.Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology[J].Journal of Food Engineering,2009,91(4):533-541.