

微波辅助法提取柿子黄酮及抗氧化活性研究

王恒超, 严 静, 陈锦屏*, 张增帅, 符 恒

(陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西西安 710062)

摘要:采用微波辅助法提取柿子黄酮,探讨提取过程中各因素对黄酮提取量的影响,并测定了柿子黄酮的抗氧化活性。结果表明,微波辅助法提取柿子黄酮的最佳工艺条件为:乙醇浓度70%、微波功率600W、提取时间150s、料液比1:30,黄酮提取量为42.4mg/g;柿子黄酮具有良好的还原能力,其还原能力随着浓度的增大而增大,但弱于V_C;柿子黄酮对羟基自由基有一定清除作用,清除率在样品浓度为0.6mg/mL时达到最大,为68.70%。该法简便、快捷、重复性好,可用于柿子黄酮的提取和测定。

关键词:微波辅助法, 柿子, 黄酮, 提取, 抗氧化活性

Study on micro-assisted extracting and antioxidant activity of flavonoids from the persimmon fruit

WANG Heng-chao, YAN Jing, CHEN Jin-ping*, ZHANG Zeng-shuai, FU Heng

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The optimum process conditions of extracting flavonoids from the persimmon fruit by microwave aided method were studied through factor analysis method and orthogonal experiment, and the antioxidant activity was determined. Results showed that the optimum extraction parameters were identified as follows: ethanol concentration of 70%, microwave power of 600W, microwave time of 150s, material-to-liquid ratio of 1:30, and the extraction amount of flavonoids was 42.4mg/g. The total antioxidant ability of persimmon flavonoids became greater with the concentration range increasing, but inferior to V_C. The persimmon flavonoids had certain scavenging action to the hydroxyl free radical, the clearance rate reached 68.70% when the sample density was 0.6mg/mL. This method was simple, repeatable and convenience, and could be used for the extraction and determination of total flavonoids from persimmon.

Key words: microwave aided method; persimmon; flavonoids; extraction; antioxidant activity

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)18-0232-04

柿子原产中国, 双子叶柿树科柿属植物, 是我国五大水果之一, 主要分布在中国、日本和韩国。柿子营养价值很高, 含有大量的胡萝卜素、维生素C、葡萄糖、果糖及碘、钙、磷、铁等矿物元素, 享有“果中至品”之美誉。柿子还含有丰富的芦丁、果胶、单宁酸、黄酮及瓜氨酸、无色花青素等物质^[1], 其中黄酮类物质对心脑血管疾病有良好的疗效^[2-3]。目前对柿叶中黄酮类物质的提取工艺研究较多, 但对柿子果中活性物质的研究较少。微波提取在黄酮类物质的提取上具有良好的效果, 可以加快反应速度, 有效提高收率, 而且操作简单、副产物少、产率高、产物易提纯^[4]。李仁杰^[5]研究了柿子中单宁类物质对原花青素(生物类黄酮)测定的影响, 证实其对黄酮类物质测定干扰

不大。王青豪等^[6]研究了微波辅助提取绞股蓝黄酮工艺; 廉琪^[7]通过微波辅助提取芦笋粉中总黄酮; 邓斌等^[8]通过微波辅助提取花生壳黄酮类化合物; 均取得良好效果。本研究旨在通过单因素实验和正交实验, 确定微波辅助法提取柿子黄酮的最佳工艺, 同时对柿子黄酮的抗氧化活性进行测定, 以期对柿子的有效开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛心柿 2011年7月取自陕西省周至县, -20℃冷藏, 防霉变; 芦丁 中国医药上海化学试剂公司; 甲醇、乙醇、盐酸、氢氧化钠、亚硝酸盐、硝酸铝、磷酸、铁氰化钾、三氯乙酸 均为分析纯, 天津市化学试剂三厂。

TU-1800紫外分光光度计 北京普析仪器有限公司; JD200-2电子天平 上海精密仪器有限公司; 722可见光分光光度计 上海光谱仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 提取工艺 牛心柿→清洗→切碎→榨碎→乙醇提

收稿日期: 2012-03-29 * 通讯联系人

作者简介: 王恒超(1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与贮藏。

基金项目: 科技部农业推广项目(2011GB23600017); 陕西省教育厅科学研究计划项目(11JK0635); 西安市科技计划项目(CYX1129); 陕西师范大学勤助科研创新基金项目(QZZD12066)。

取→抽滤→浓缩→总黄酮提取液

1.2.2 柿子总黄酮含量的测定

1.2.2.1 芦丁标准曲线回归方程的建立^[9-10] 精密称取干燥至恒重的芦丁标准品20.0mg,用30%乙醇溶解定容至100mL容量瓶中,得到0.2mg/mL的标准溶液。精密量取标准溶液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0mL置于10mL具刻度试管中,用30%乙醇定容至5mL,分别加入5%亚硝酸钠溶液0.3mL,摇匀,静置5min,加入1.0mol/L氢氧化钠溶液4mL,用30%乙醇定容至10mL,摇匀,静置15min,以不加对照样品液为空白,于510nm处测定吸光度,以吸光值(A)为纵坐标,芦丁标准品溶液浓度(x, mg/mL)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为: $A=10.3096x+0.3682$, $R^2=0.9995$ 。

1.2.2.2 黄酮含量的测定 精密吸取1.0mL提取液,按照1.2.4的方法在510nm波长下测定其吸光度值,根据标准回归方程计算总黄酮的含量。

1.2.3 单因素和正交实验设计 在普通浸提法的基础上,选取微波功率、乙醇浓度、料液比、提取时间进行单因素实验,以提取量为衡量指标,在单因素实验的基础上进行正交实验设计,确定微波辅助法提取柿子总黄酮的最佳工艺条件。各因素与水平设计见表1。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in orthogonal array design

水平	因素			
	A 微波功率 (W)	B 提取时间 (s)	C 乙醇浓度 (%)	D 料液比 (m:v)
1	240	90	40	1:25
2	360	120	50	1:30
3	480	150	60	1:35
4	600	180	70	1:40

1.2.4 柿子黄酮总还原能力的测定^[11-14] 在10mL试管中依次加入2.5mL pH为6.6的磷酸缓冲溶液,1.0mL不同浓度提取液和1.0mL质量分数为1%的铁氰化钾溶液,摇匀,50℃水浴加热20min,急速冷却,再加入2.5mL质量分数为10%的三氯乙酸溶液并摇匀,精确量取5mL置于具塞试管中,再加入5mL蒸馏水和1.0mL质量分数为1%的氯化铁溶液,混匀后静置10min,于可见光700nm处测定吸光值,蒸馏水调零,吸光度越大,说明还原能力越强。以 V_c 作为对照。

1.2.5 柿子黄酮清除羟基自由基能力测定^[15-18] 移取25mL 2mmol/L $FeSO_4$ 溶液和,25mL 6mmol/L H_2O_2 溶液置于250mL的锥形瓶中,混合均匀后加入75mL 6mmol/L水杨酸溶液,36℃恒温水浴15min,于510nm处测其吸光值 A_0 。从 A_0 值的测定体系中取24mL,放入25mL比色管中,加入1.0mL不同浓度的提取液,36℃恒温水浴15min后于510nm处测其吸光值 A_x ,以 V_c 作为对照, $\cdot OH$ 清除率(%) = $(A_0 - A_x) / A_0 \times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 微波功率对柿子总黄酮提取量的影响 准确称取处理好的柿子10.0g,在70%乙醇、料液比1:20、提取时间120s的条件下,选择微波功率分别为120、240、360、480、600W,研究微波处理对柿子黄酮提取量的影响,结果如图1所示。随着微波功率的增大,黄

酮提取量出现先增大后减小的趋势,在微波功率为480W时,黄酮提取量达到最大值39.31mg/g。这可能是由于微波功率过大易造成温度过高使黄酮类化合物分解,且温度过高时乙醇易挥发,进而降低黄酮的提取量。

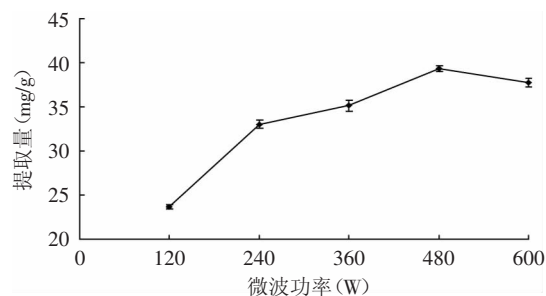


图1 微波功率对柿子总黄酮提取量的影响

Fig.1 The effect of the microwave power on extraction of flavonoids from persimmon

2.1.2 提取时间对柿子总黄酮提取量的影响 准确称取处理好的柿子10.0g,在微波功率480W、70%乙醇、料液比1:20的条件下,选取提取时间分别为30、60、90、120、150、180s,研究提取时间对柿子总黄酮提取量的影响,结果如图2所示。黄酮提取量随着提取时间的增加而增大,在提取时间为120s达到最大,为40.50mg/g,而后逐渐降低。这可能是由于黄酮提取量达到最大之后,继续进行微波,可能导致黄酮类物质分解或转化为其他物质,进而影响黄酮提取量。

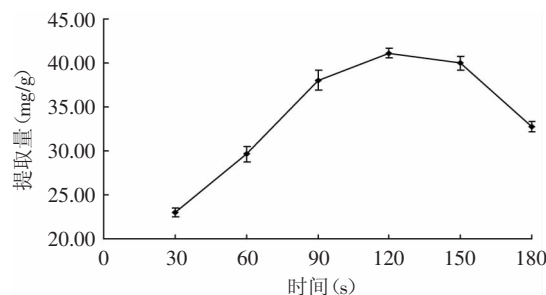


图2 微波时间对柿子总黄酮提取量的影响

Fig.2 The effect of the microwave time on extraction of flavonoids from persimmon

2.1.3 料液比对柿子总黄酮提取量的影响 准确称取处理好的柿子10.0g,在70%乙醇、微波功率480W、提取时间120s的条件下,选取料液比分别为1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40,研究料液比对柿子总黄酮提取

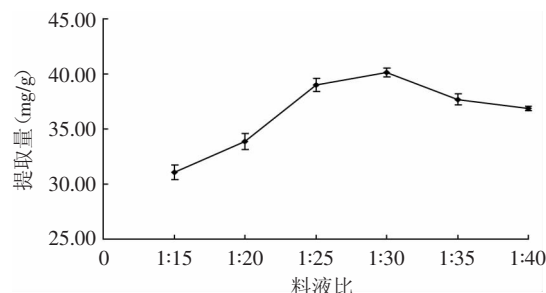


图3 料液比对柿子总黄酮提取量的影响

Fig.3 The effect of the solid-solvent ratio on extraction of flavonoids from persimmon

量的影响,结果如图3所示。由图3可以看出,随着料液比的不断增大,黄酮提取量逐渐增大趋势,在料液比为1:30时达到最大值。若料液比太大会增加成本,且会使后续浓缩过程变的复杂,效率降低,因此采用1:30为最佳料液比。

2.1.4 乙醇浓度对柿子总黄酮提取量的影响 准确称取处理好的柿子10.0g,在微波功率480W、提取时间120s、料液比1:30的条件下,选择乙醇浓度分别为30%、40%、50%、60%、70%、80%,研究乙醇浓度对柿子总黄酮提取量的影响,结果如图4所示。结果显示,随着乙醇浓度的增大,黄酮提取量出现先增大后减小的趋势,当乙醇浓度达到60%时,总黄酮的提取量达到最高,可能是因为黄酮类化合物在高乙醇浓度中溶解度下降,其他杂质溶出量增加所致。

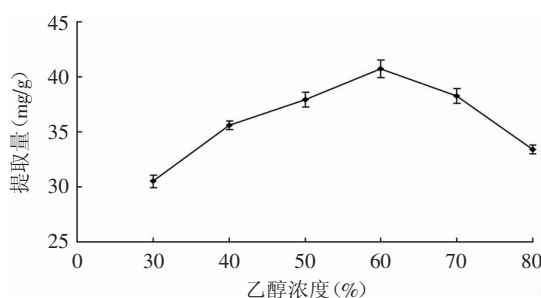


图4 乙醇浓度对柿子总黄酮提取量的影响

Fig.4 The effect of the ethanol on extraction of flavonoids from persimmon

2.2 正交实验优化柿子总黄酮提取条件

根据单因素实验结果,按照 $L_{16}(4^3)$ 正交表进行正交实验,正交因素水平如表1所示,实验结果及数据分析见表2,方差分析见表3。

由表2极差分析可知,微波辅助提取柿子总黄酮的最佳工艺条件为 $A_4B_3C_4D_2$,即微波功率600W、乙醇

表2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal array design results

试验号	A	B	C	D	空白	提取量(mg/g)
1	1	1	1	1	1	28.05
2	1	2	2	2	2	36.42
3	1	3	3	3	3	38.71
4	1	4	4	4	4	39.09
5	2	1	2	3	4	29.17
6	2	2	1	4	3	34.73
7	2	3	4	1	2	39.19
8	2	4	3	2	1	37.97
9	3	1	3	4	2	31.13
10	3	2	4	3	1	38.50
11	3	3	1	2	4	39.21
12	3	4	2	1	3	34.42
13	4	1	4	2	3	35.27
14	4	2	3	1	4	38.98
15	4	3	2	4	1	39.62
16	4	4	1	3	2	37.91
k_1	35.57	30.91	34.98	35.16	36.04	
k_2	35.27	37.16	34.91	37.22	36.16	
k_3	35.82	39.18	36.70	36.07	35.78	
k_4	37.95	37.35	38.01	36.14	36.16	
R	2.68	8.27	3.10	2.06	0.38	

表3 方差分析表

Table 3 Variance analysis table

因素	偏差平方和	自由度	F值	F临界值	显著性
A	17.827	3	12.303	9.280	*
B	156.621	3	108.089	9.280	*
C	26.772	3	18.476	9.280	*
D	8.503	3	5.868	9.280	
误差	1.45	3			

浓度70%、微波时间150s、料液比1:30。各因素对柿子黄酮提取量的影响顺序为:提取时间(B)>乙醇浓度(C)>微波功率(A)>料液比(D)。从表3方差分析可知微波功率、提取时间和乙醇浓度差异性显著,而料液比未表现出显著差异性。

2.3 验证实验

正交实验中提取量最高的组合为 $A_4B_3C_2D_4$,正交表分析得出最佳组合为 $A_4B_3C_4D_2$,对两组工艺进行验证实验,分别重复三次,取平均值,结果表明,最优组合 $A_4B_3C_4D_2$ 黄酮提取量为42.4mg/g,组合 $A_4B_3C_2D_4$ 提取量为39.6mg/g,因此微波辅助法提取柿子总黄酮的最佳工艺条件为微波功率600W、乙醇浓度70%、微波时间150s、料液比1:30。

2.4 柿子黄酮总还原能力测定结果

以 V_C 作为对照,测定了柿子黄酮的总还原能力,结果如图5所示。在测定浓度范围内,柿子黄酮和 V_C 的还原能力随着浓度的增大逐渐增强;柿子黄酮具有良好的还原能力,但其总还原能力在测定范围内弱于 V_C 。

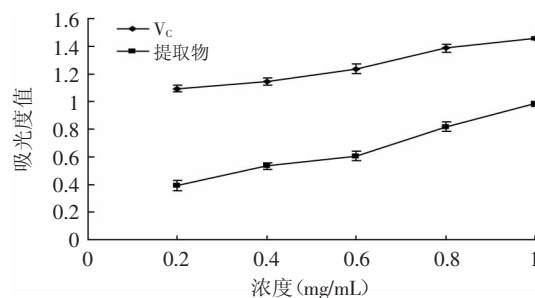


图5 柿子黄酮和 V_C 的总抗氧化能力

Fig.5 Deoxidization capability of persimmon flavonoids

2.5 柿子黄酮清除羟基自由基能力测定结果

以 V_C 作为对照,测定了柿子黄酮清除羟基自由基能力,结果如图6所示。柿子黄酮对羟基自由基有一定清除作用。当样品浓度在0.2~0.6mg/mL的范围内,清除能力随浓度的增大而增大;当样品浓度大于

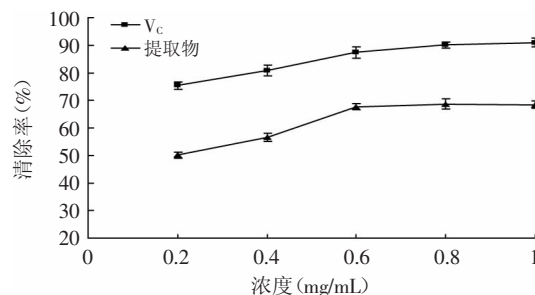


图6 柿子黄酮和 V_C 对羟基自由基的清除能力

Fig.6 Scavenging effects of persimmon flavonoids on hydroxyl radical

0.6mg/mL时,其清除率变化不大,其机理有待进一步研究。在测定浓度范围内柿子黄酮的清除羟基自由基能力弱于 V_c 。

3 结论

通过微波辅助法提取柿子总黄酮具有良好效果,正交实验显示各因素对柿子黄酮提取量的影响顺序为:提取时间>乙醇浓度>微波功率>料液比,方差分析可知微波功率、提取时间和乙醇浓度差异性显著,而料液比未表现出显著差异性。通过验证实验可知微波辅助提取柿子黄酮的最佳提取工艺为:微波功率600W、乙醇浓度70%、微波时间150s、料液比1:30,黄酮提取量为42.4mg/g,远远大于普通热回流浸提法。总还原能力测定结果显示柿子黄酮具有良好的还原能力,随着浓度的增大,还原能力逐渐增强,但弱于 V_c ;柿子黄酮对羟基自由基有一定清除作用,清除率在样品浓度为0.6mg/mL时达到最大,为68.70%。

参考文献

- [1] 周坚,万楚筠,沈汪洋,等. 甜柿的营养及功能特性[J]. 武汉工业学院学报,2004,23(4):15-17.
- [2] 马兰花. 柿子药用成分分析及研究[J]. 山西林业,2001(4):29-30.
- [3] 姚新生. 天然药物化学[M]. 北京:北京卫生出版社,1998:207-208.
- [4] 马长雨,杨悦武,郭治昕,等. 微波萃取在中药提取和分析中的应用[J]. 中草药,2004,35(11):127-130.
- [5] 李仁杰. 月柿生理落果原花青素提取工艺研究[D]. 西安:陕西师范大学,2011.
- [6] 王青豪,方芳,张熊禄. 微波辅助提取绞股蓝黄酮工艺研究[J]. 食品科学,2010,31(22):149-152.
- [7] 康琪,郑学芳,彭友舜,等. 微波辅助提取芦笋粉中总黄酮的研究[J]. 中国酿造,2011(12):85-87.
- [8] 邓斌,王存娣. 微波辅助提取花生壳黄酮类化合物及其抗氧化性研究[J]. 中国油脂,2009,34(3):54-57.
- [9] 严静,陈锦屏. 复合酶解法提取青柿子落果中黄酮类化合物的研究[J]. 食品工业科技,2011,32(6):315-317.

- [10] 王基云,姚瑶,肖旭,等. 沙枣花黄酮成分的含量测定及其药理作用的初步研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(4):812-814.
- [11] 刘爱青. 蝗虫黄酮的提取分离和生物活性研究[D]. 西安:陕西师范大学,2007.
- [12] Siriporn Okonogi, Chadarat Duangrat, Songyot Anuchpreeda, et al. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels[J]. Food Chemistry, 2007, 103(3):839-846.
- [13] Nathan M Gavin, Michael J, Durako. Localization and antioxidant capacity of flavonoids from intertidal and subtidal *Halophila johnsonii* and *Halophila decipiens*[J]. Aquatic Botany, 2011, 95(3):242-247.
- [14] 韩雅慧,顾赛麒,陶宁萍,等. 甘草总黄酮提取工艺及总抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2012,33(2):239-242.
- [15] Cheng Ning Abraham Leong, Masakuni Tako, Isao Hanashiro, et al. Antioxidant flavonoid glycosides from the leaves of *Ficus pumila* L[J]. Food Chemistry, 2008, 109(2):415-420.
- [16] 陈学丽,叶立斌,励建荣,等. 杨梅渣黄酮类化合物提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2011,32(2):85-90.
- [17] Sudip Chaudhuri, Anwesh Banerjee, Kaushik Basu, et al. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2007, 41(1):42-48.
- [18] 丁利君,黄泽华. 微波-纤维素酶联合提取芒果黄酮及抗氧化研究[J]. 食品科技,2011,36(1):172-176.
- [19] 刘小莉,周剑忠,单成俊,等. 蓝莓叶总黄酮的微波提取及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2011,32(3):44-46.
- [20] 陈地灵,徐大量,林辉. 玉竹总黄酮体内外抗氧化作用的实验研究[J]. 今日药学,2008,18(6):13-14.
- [21] 杨月琴,彭敏,胡凤祖,等. 青藏高原藏木香总黄酮提取工艺研究及含量测定[J]. 食品工业科技,2011,32(2):251-253.
- [22] 孙化鹏,钟晓红,陆英,等. 柿叶黄酮化合物分离制备[J]. 食品科学,2011,32(2):57-61.
- [23] 李蜀眉,付忠实,兰海龙,等. 黄酮类化合物抗氧化物性能的比较研究[J]. 内蒙古农业大学学报,2011,32(4):290-292.
- [24] 李鹏靖,柳旭光,龙海荣,等. 超声波辅助提取菱角壳总黄酮及抗氧化性研究[J]. 食品科技,2011,36(1):167-171.

(上接第223页)

- 性能研究[J]. 食品与机械,2010,26(3):14-17.
- [6] 吴海波,张兰威,黄艳玲. 不同地域发酵蔬菜分离的乳酸菌抑菌效果及降亚硝酸盐能力的研究[J]. 食品工业科技,2009,30(2):80-83.
- [7] GB 5009.33-2010食品安全国家标准食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,2010.
- [8] 夏岩石,孙春风. 乳酸菌降解亚硝酸盐的动态研究[J]. 湖南科技学院学报,2008,29(8):44-46.
- [9] 李春,韩建春,郑凯. 乳酸菌混合生长降解亚硝酸盐能力的研究[J]. 工业微生物,2008,38(6):23-26.
- [10] 蒋欣茵,李晓晖,张伯生,等. 腌制食品中降解亚硝酸盐的乳酸菌分离与鉴定[J]. 中国酿造,2008(1):13-16.
- [11] 商军,钟方旭,王亚林,等. 几种发酵蔬菜中乳酸菌的分离

- 与筛选[J]. 食品科学,2007,28(4):195-199.
- [12] 周彬,孟宪军,张忠泽. 白菜乳酸菌混菌发酵的研究[J]. 微生物学杂志[J]. 2002(3):33-35.
- [13] Nancy J G, Tony S. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixture[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 64:261-275.
- [14] Tamang J P, Tamang B, Schillinger U, et al. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105:347-356.
- [15] 张冬梅. 接种发酵萝卜及挥发性风味物质的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2009.