

枸杞总黄酮提取工艺优化及其体外抗氧化活性分析

禄璐, 米佳, 罗青, 李越鲲, 梁晓婕, 闫亚美*

(宁夏农林科学院枸杞工程技术研究所, 宁夏银川 750002)

摘要:为了优化黄果枸杞黄酮提取工艺,比较三种黄果枸杞体外抗氧化活性,本文采用响应面试验设计,以“宁农杞5号”黄果枸杞为原料,优化黄果枸杞黄酮提取工艺,并对三种代表性黄果枸杞的黄酮提取物进行抗氧化活性测定与分析,同时以红果枸杞、黑果枸杞作为对照。结果表明:水浴温度是影响黄酮提取的主要因素,黄果枸杞黄酮提取的最佳参数为乙醇浓度70%、添加乙醇体积40倍、水浴温度70℃、水浴时间90min,此时黄酮含量为(175.21±1.69) μg/g;体外抗氧化活性分析表明,三种黄果枸杞中“宁农杞5号”对ABTS和DPPH自由基清除能力最强,分别为27.71%±0.66%、15.3%±0.84%,高于红果枸杞(22.72%±0.50%、12.55%±1.20%),但不及黑果枸杞(33.33%±0.49%、81.61%±1.25%);通过相关性分析可知,总黄酮含量与ABTS清除率呈显著正相关,与DPPH清除率和FRAP值呈极显著正相关;总酚含量与ABTS清除率、DPPH清除率呈显著正相关。综合表明,黄酮类化合物是黄果枸杞表现抗氧化活性的主要成分。

关键词:枸杞,总黄酮,抗氧化,提取

Optimization of Extraction Process of Flavonoids from *Lycium barbarum* L.var. *Auranticarpum* K.F.Ching and Its Antioxidant Activities *in Vitro*

LU Lu, MI Jia, LUO Qing, LI Yue-kun, LIANG Xiao-jie, YAN Ya-mei*

(Wolfberry Engineering Research Center, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China)

Abstract: Optimization of extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. var. *auranticarpum* K.F.Ching, and comparing antioxidant activity *in vitro* of three *Lycium barbarum* L. var. *auranticarpum* K.F.Ching. In this paper, using the response surface experiment design to optimize extraction of flavonoids with ‘Ningnongqi 5’ as raw material, measure and analysis of the antioxidant activity of flavonoids extracts of three representative *Lycium barbarum* L. var. *auranticarpum* K.F.Ching, compared with *Lycium barbarum* L. and *Lycium ruthenicum* Murray simultaneously. Results showed that the temperature of water bath was the main factors influencing the flavonoids extraction, the best parameter of flavonoids extraction was 70% ethanol concentration, volume ratio of 40 times, water bath temperature 70℃ with 90 min, the flavonoids content was (175.21±1.69) μg/g. Antioxidant activity analysis *in vitro* indicated that ‘Ningnongqi 5’ has strong clearance ability of ABTS and DPPH, 27.71%±0.66% and 15.3%±0.84% respectively, which was higher than *Lycium barbarum* L. (22.72±0.50%, 12.55±1.20%), but not as good as *Lycium ruthenicum* Murray (33.33%±0.49%, 81.61%±1.25%). Through correlation analysis, total flavonoids content had a significant positive correlation with ABTS clearance rate, extremely significant positive correlation with DPPH clearance rate and FRAP value. The total phenol content had a significant positive correlation with ABTS clearance rate and DPPH clearance, which showed that flavonoids were main ingredients of *Lycium barbarum* L. var. *auranticarpum* K.F. Ching exhibiting antioxidant activity.

Key words: wolfberry; total flavonoids; antioxidant; extraction

中图分类号: TS251.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)24-0165-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.24.027

引文格式: 禄璐, 米佳, 罗青, 等. 枸杞总黄酮提取工艺优化及其体外抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(24): 165-171.

收稿日期: 2019-04-08

作者简介: 禄璐(1989-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 农产品加工与贮藏, E-mail: lulubing8901@163.com。

* 通讯作者: 闫亚美(1982-), 女, 博士研究生, 副研究员, 研究方向: 枸杞加工与贮藏, E-mail: yanyamei@163.com。

基金项目: 宁夏农林科学院对外合作专项(DWX-2018029); 宁夏农林科学院科技平台建设提升项目(NKYP-19-13); 宁夏回族自治区自然科学基金(2018AAC03187)。

黄果枸杞是近年来新发掘的枸杞品种,属于宁夏枸杞的变种^[1],果实呈黄色,酸甜可口,含氨基酸、多糖、类胡萝卜素、多酚等多种营养及功效成分,目前主要集中在宁夏地区示范推广种植^[2-3]。

黄酮是一类重要的天然有机化合物,结构复杂多样,具有很强的药理作用。大量研究表明,黄酮类化合物具有较强的抗氧化作用,可广泛影响心血管系统、免疫系统和消化系统^[4-7],对保护肝损伤亦有显著疗效^[8]。黄果枸杞富含黄酮类化合物,如芦丁、柚皮素、香叶木素、儿茶素、表儿茶素、槲皮素、山奈酚、柚皮素-7-O-葡萄糖苷等。一般提取黄酮的方法有水提法、醇提法、超声波/微波辅助提取法、亚临界乙醇提取法、生物酶提取法等等^[9-11],通过对溶剂的选择、提取水温、提取时间的调控与优化,提高黄酮得率^[12-14]。但目前由于黄果枸杞尚未形成规模化种植和管理,因此,黄果枸杞的诸多基础研究,如功效成分的提取与鉴定、功效评价等方面的工作还未开展。

本研究基于黄果枸杞中丰富的黄酮物质,采用响应面方法优化黄酮提取工艺,并对不同种质枸杞黄酮提取物进行体外抗氧化活性测定分析,以期为枸杞的基础研究及资源的开发利用提供科学依据和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黄果枸杞(“宁农杞4号”、“宁农杞5号”、“宁夏黄果”)、红果枸杞(“宁杞1号”)、黑果枸杞 国家枸杞工程技术研究中心种质资源圃(宁夏,银川),经国家枸杞工程技术研究中心种质资源室鉴定。取样时,随机摘取枸杞树不同位置的果实,果实八成熟,并保持成熟度相对一致,采后迅速置于-80℃超低温冰箱速冻备用;维生素C、没食子酸、芦丁标准品 成都曼思特生物科技有限公司;无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、福林酚、丙酮、浓盐酸、醋酸钠、冰乙酸、过硫酸钾、ABTS、DPPH、甲醇、三吡啶三吡嗪(TPTZ)等 均为国产分析纯。

BS224S分析天平 德国赛多利斯公司;TU1810紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;恒温水浴锅 北京长源实验设备厂;SHZ-D(Ⅲ)循环水式多用真空泵 天津华鑫仪器厂;全数字超声波发生器 武汉嘉鹏电子有限公司;Centrifuge 5810 R 冷冻型台式大容量高速离心机 德国艾本德公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黄果枸杞黄酮提取工艺优化 以“宁农杞5号”黄果枸杞作为优化提取黄酮工艺的试验材料。称取超低温速冻的黄果枸杞3.0g于研钵中,迅速研磨至果泥状,转入烧杯中,加入一定浓度、一定体积倍数的乙醇溶液溶解,搅拌混合均匀后在一定的温度下加热一定时间,再置于300W超声波下辅助提取30min,冷却后,3000r/min离心5min,取上清液,得到黄酮提取液,随即测定总黄酮的含量。

1.2.2 单因素试验 采用控制变量法,按照1.3.1黄酮提取工艺,考察乙醇浓度(50%、60%、70%、80%、

90%)、乙醇体积倍数(乙醇添加体积与样品质量的倍数,10、20、30、40、50)、水浴温度(40、50、60、70和80℃)、水浴时间(30、50、70、90和110min,)对提取总黄酮含量的影响。考察某一因素时,其他因素条件固定为:乙醇浓度70%,乙醇体积倍数40,水浴温度70℃,水浴时间90min。

1.2.3 响应面优化试验 在单因素试验的基础上,利用Design-Expert 8.06软件Box-Behnken设计,进行响应面优化设计,以乙醇浓度(A)、乙醇体积倍数(B)、水浴温度(C)、水浴时间(D)为因变量,以总黄酮含量为响应值,设计四因素三水平响应面优化试验,中心试验重复5次,共29组试验,具体如表1所示。

表1 Box-Behnken设计因素与水平表

Table 1 Variables and levels in Box-Behnken central composite design

水平	因素			
	A 乙醇浓度 (%)	B 乙醇体积倍数	C 水浴温度 (°C)	D 水浴时间 (min)
-1	60	30	60	70
0	70	40	70	90
1	80	50	80	110

1.2.4 黄果枸杞黄酮提取物体外抗氧化活性测定

1.2.4.1 黄果枸杞黄酮提取物成分测定 以三种种质黄果枸杞为研究对象,以红果枸杞(宁杞1号)、黑果枸杞为对照组,按照优化后的黄酮提取方法,进行黄酮化合物提取,并对不同种质的黄酮提取物进行总黄酮、总酚含量的测定。

总黄酮含量采用硝酸铝显色法测定总黄酮含量^[15]。取提取液10mL于25mL容量瓶中,加5%NaNO₂溶液0.5mL摇匀,放置6min,加入10%Al(NO₃)₃溶液0.5mL摇匀,放置6min,加4%NaOH4mL,再用30%乙醇定容,摇匀,放置10min,于510nm处测定样品吸光值。以不同浓度芦丁标准品溶液绘制所得标准曲线为: $y = 0.1066x - 0.0017$, $R^2 = 1.0000$, x 为吸光值, y 为芦丁含量($\mu\text{g/mL}$),以此计算样品中总黄酮的含量($\mu\text{g/g}$ 鲜重,以芦丁计)。

总酚含量测定采用Folin-Ciocalteu法测定^[16]。称取2.00g样品于250mL圆底烧瓶,加入40mL体积分数60%乙醇溶液,搅拌均匀,在恒温水浴锅中75℃水浴,提取50min。提取液以3000r/min离心200min,取上清液1mL加入福林酚试剂1mL,摇匀后再加入质量分数12%Na₂CO₃溶液2mL,用水定容至25mL,摇匀,室温下避光反应2h后,765nm波长下测定吸光值。同法制备不同浓度没食子酸标准溶液,绘制所得标准曲线为: $y = 0.0904x + 0.0012$, $R^2 = 0.9982$, x 为吸光值, y 为没食子酸含量($\mu\text{g/mL}$),并由此计算总酚含量(mg/g 鲜重,以没食子酸计)。

1.2.4.2 ABTS自由基清除能力测定 参照Oyazu^[15]测定方法。将7mmol/LABTS⁺溶液与2.45mmol/LK₂S₂O₈混合,置于暗处反应16h制成ABTS⁺储备

液,用甲醇稀释 ABTS⁺ 溶液至吸光度为 0.70 ± 0.02 (波长 734 nm) 制成 ABTS⁺ 工作液。取 30 μL 黄酮提取液,加入 3 mL ABTS⁺ 溶液涡旋 10 s 混匀,6 min 后测量其在波长 734 nm 处的吸光度,ABTS⁺ 清除率(A)计算公式如下:

$$A(\%) = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A₂ 为加入提取物的吸光度; A₁ 为本底吸收的吸光度; A₀ 为空白溶液的吸光度。

配置不同浓度 V_c 标品溶液,以 V_c 的质量(mg)为横坐标,清除率(%)为纵坐标,得到 V_c 清除 ABTS⁺ 自由基的标准曲线, y = 9959.4485x - 0.4185, R² = 0.9934。将样品清除率代入标曲,结果表示为每克鲜黄果枸杞的 V_c 当量(mg V_c eq./g 鲜重)。

1.2.4.3 DPPH 自由基清除能力测定 参照 Atoui^[16] 测定方法。吸取黄酮提取液 0.5 mL,加入 0.1 mmol/L DPPH 自由基溶液 4.0 mL,用甲醇定容至 6 mL 摇匀,放置 30 min。以 60% 甲醇调零,517 nm 处测定吸光度。DPPH 自由基清除率(B)计算公式如下:

$$B(\%) = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A₂ 为加入提取物的吸光度; A₁ 为本底吸收的吸光度; A₀ 为空白溶液的吸光度。

以 V_c 的质量(mg)为横坐标,清除率(%)为纵坐标,得到 V_c 清除 DPPH 自由基的标准曲线, y = 2454.2697x - 1.7252, R² = 0.9932。将样品清除率代入标准曲线,结果表示为每克鲜黄果枸杞的 V_c 当量(mg V_c eq./g 鲜重)。

1.2.4.4 还原力测定(FRAP) 参照 Wang^[17] 测定方法。取 10 mmol/L TPTZ 溶液 10 mL,0.3 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH = 3.6)100 mL,20 mmol/L 的 FeCl₃ 溶液 10 mL 混合均匀后置于 35 °C 水浴中孵化 30 min 后使用,现用现配。吸取不同浓度 V_c 标准品溶液 0.1 mL,加入 TPTZ 工作液 0.9 mL,醋酸钠缓冲液 9 mL。于 35 °C 水浴中反应 30 min,分别测定 597 nm 波长处吸光值,FRAP 值以吸光值表示。

以 V_c 的质量(mg)为横坐标,吸光值为纵坐标,得到 V_c 标准溶液 FRAP 标准曲线, y = 24.5559x + 0.0411, R² = 0.9933。样品的测定方法同标曲,将样品吸光值代入标曲,结果表示为每克鲜黄果枸杞的 V_c 当量(mg V_c eq./g 鲜重)。

1.2.5 相关性分析 分析比较不同黄果枸杞黄酮提取物的抗氧化活性与其总黄酮、总酚含量的相关性。

1.3 数据处理

采用 SPSS 21.0 统计软件、Origin 8.5 绘图软件进行数据方差显著性处理和分析,测定数据以平均值 ± 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇浓度对总黄酮含量的影响 如图 1 所示,总黄酮含量随着提取剂乙醇浓度的增大而升高,当乙醇浓度为 70% 时,总黄酮含量最高;当其浓度大于 70% 时,总黄酮含量逐渐减少。黄酮类物质在一定

的乙醇-水体系下容易溶出,而当乙醇浓度过大时,其他醇溶性色素、亲脂溶性物质溶出增多,这些成分与黄酮类化合物竞争同乙醇-水分子结合^[9-10],从而抑制黄酮类物质的溶出,导致总黄酮含量下降。

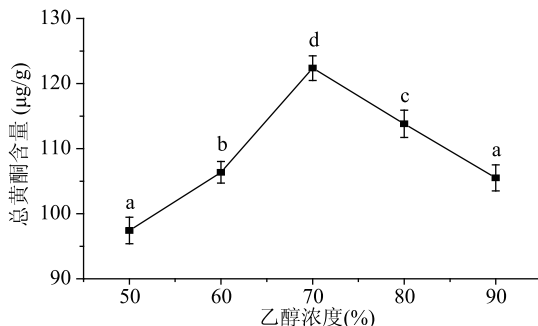


图 1 乙醇浓度对总黄酮含量的影响

Fig.1 Effects of ethanol concentration on total flavonoids content

注:图中不同字母表示差异显著(P < 0.05),图 2~4 同。

2.1.2 乙醇体积对总黄酮含量的影响 提取溶剂的量是提取天然产物过程中尤为重要的因素之一。如图 2 所示,随着乙醇体积的增加,总黄酮含量呈现先升高后下降趋势,这表明溶剂体积的增加,能够促进物料和溶剂更加充分的接触和反应,使黄酮类物质更易溶出;当乙醇体积倍数达到 40 时,提取的总黄酮含量最高。

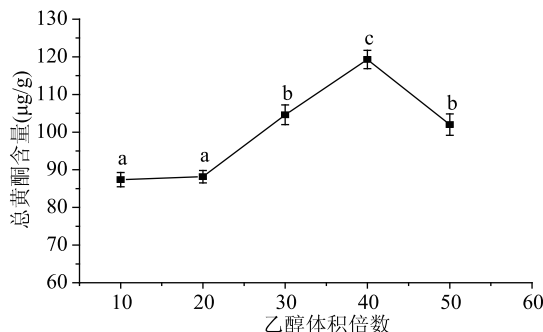


图 2 乙醇体积对总黄酮含量的影响

Fig.2 Effects of ethanol volume on total flavonoids content

2.1.3 水浴温度对总黄酮含量的影响 如图 3 所示,随着水浴温度从 40 °C 向 70 °C 升高,总黄酮含量随之升高,当温度达到 80 °C 时,黄酮含量略微下降(但不显著),适当水浴升温可增加分子动能,增强渗透

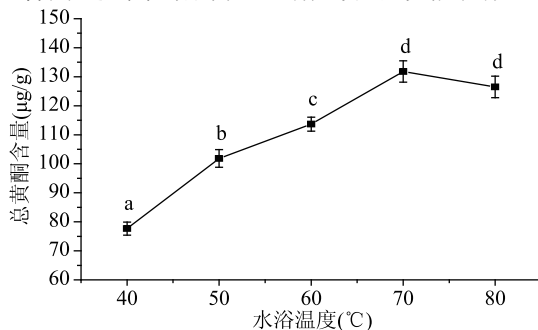


图 3 水浴温度对总黄酮含量的影响

Fig.3 Effects of water bath temperature on total flavonoids content

扩散能力,利于物质溶出。因此,水浴温度应控制在70℃。

2.1.4 水浴时间对总黄酮含量的影响 总黄酮含量随着水浴时间延长而不断升高,当高于90 min后,总黄酮含量显著下降,分析原因可能是由于水浴时间过长,乙醇挥发较多,使总黄酮的提取下降,也可能是黄酮类物质已经基本溶出,此时延长水浴时间,不仅引起其他物质溶出,还会使部分热敏化合物发生降解反应^[17-18]。

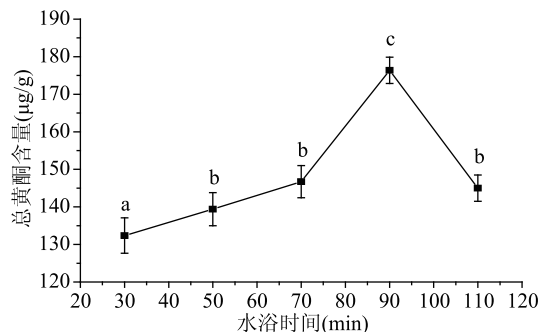


图4 水浴时间对总黄酮含量的影响

Fig.4 Effects of water bath time on total flavonoids content

2.2 响应面试验结果分析

基于单因素试验确定的适宜范围,依据响应面设计原理,设计四因素三水平黄果枸杞黄酮提取优化试验,共29组试验,试验结果如表2所示。

经 Design-Expert 8.06 软件回归拟合,建立提取工艺参数回归模型,得到总黄酮含量(Y)对乙醇浓度(A)、乙醇体积倍数(B)、水浴温度(C)、水浴时间(D)的二次多项回归方程: $Y = 175.22 + 0.43A + 3.36B + 29.44C - 2.57D - 7.09AB + 23.10AC + 13.64AD + 3.27BC + 8.93BD - 2.17CD - 22.15A^2 - 14.2B^2 - 41.75C^2 - 32.65D^2$ 。

对上述回归方程进行方差分析及显著性检验,如表3所示。结果表明:回归方程模型极显著($P < 0.01$);失拟项不显著($P > 0.05$),模型相关系数为0.9957,调整确定系数为0.9914,预测模型系数为0.9873,说明模型与实际试验拟合程度良好,误差较小,模型成立,可用来优化分析、预测黄果枸杞黄酮提取工艺及其含量。

除乙醇浓度因素不显著外,体积倍数(B)、水浴温度(C)、水浴时间(D)均显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$);各因素对提取总黄酮的影响强弱顺序依次为:水浴温度(C) > 乙醇体积倍数(B) > 水浴时间(D) > 乙醇浓度(A)。其中,乙醇浓度与体积倍数(AB)、乙醇浓度与水浴时间(AD)、乙醇浓度与水浴温度(AC)、体积倍数与水浴时间(BD)因素之间交互作用极显著($P < 0.01$),如图5所示。

由 Design-Expert 8.06 软件预测出的最佳提取工艺参数为:乙醇浓度为72.10%、体积倍数为41.17、水浴温度为72.08℃、水浴时间为90.13 min,此条件下,总黄酮含量为181.556 µg/g,为验证模型的可靠性,考虑到实际操作条件,调整工艺参数为:乙醇浓度70%、体积倍数40倍、水浴温度70℃、水浴时间90 min,进行五组试验,得到总黄酮含量为 (175.21 ± 1.69) µg/g,理论值与预测值相差3%,误差较小,说明此模型可以有效用于黄果枸杞中的黄酮提取工艺优化。

2.3 体外抗氧化活性分析

2.3.1 不同枸杞抗氧化活性分析 “宁农杞4号”、“宁农杞5号”和“宁夏黄果”是黄果枸杞品系中最具代表性的三个品种,以红果枸杞(“宁杞1号”)和黑果枸杞作为对照组,均按照上述“宁农杞5号”响应面优化后的黄酮最佳提取方法制备,获得不同品种枸杞黄酮提取液,并比较不同品种枸杞黄酮提取物的抗氧化活性,结果如图6所示。对 ABTS 自由基的

表2 响应面优化试验结果

Table 2 Results of response surface experiments

试验号	A	B	C	D	Y 总黄酮含量 (µg·g ⁻¹)	试验号	A	B	C	D	Y 总黄酮含量 (µg·g ⁻¹)
1	0	0	0	0	176.58	16	0	0	0	0	168.38
2	0	1	0	-1	126.20	17	0	0	-1	-1	73.68
3	0	0	0	0	174.10	18	0	0	0	0	175.64
4	0	0	0	0	181.38	19	-1	0	1	0	117.55
5	0	-1	1	0	143.83	20	-1	1	0	0	149.69
6	0	-1	0	1	112.89	21	0	1	1	0	155.56
7	0	0	1	1	124.13	22	1	1	0	0	136.87
8	-1	-1	0	0	127.19	23	0	-1	0	-1	137.40
9	0	0	1	-1	132.57	24	-1	0	0	1	104.50
10	-1	0	-1	0	103.25	25	1	-1	0	0	142.74
11	1	0	0	-1	108.33	26	1	0	0	1	130.97
12	-1	0	0	-1	136.43	27	1	0	1	0	165.80
13	0	1	-1	0	87.43	28	1	0	-1	0	59.09
14	0	0	-1	1	73.91	29	0	-1	-1	0	88.77
15	0	1	0	1	137.40						

表3 回归方程系数显著性检验和结果
Table 3 Test of significance for regression coefficient and results

模型来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	30248.40	14	2160.60	230.28	<0.0001	**
A	2.24	1	2.24	0.24	0.6323	
B	135.54	1	135.54	14.45	0.0019	*
C	10402.33	1	10402.33	1108.71	<0.0001	**
D	79.10	1	79.10	8.43	0.0116	*
AB	201.21	1	201.21	21.45	0.0004	**
AC	2134.90	1	2134.90	227.54	<0.0001	**
AD	744.47	1	744.47	79.35	<0.0001	**
BC	42.71	1	42.71	4.55	0.0511	
BD	318.80	1	318.80	33.98	<0.0001	**
CD	18.79	1	18.79	2.00	0.1789	
A ²	3181.72	1	3181.72	339.12	<0.0001	**
B ²	1308.41	1	1308.41	139.45	<0.0001	**
C ²	11307.75	1	11307.75	1205.21	<0.0001	**
D ²	6913.72	1	6913.72	736.88	<0.0001	**
残差	131.35	14	9.38			
失拟项	43.34	10	4.33	0.20	0.983	
误差	88.01	4	22.00			
总和	30379.75					

$R^2 = 0.9957$ $R_{Adj} = 0.9914$ $R_{pred} = 0.9873$

注: ** 表示差异极显著, $P < 0.01$; * 表示差异显著, $P < 0.05$ 。

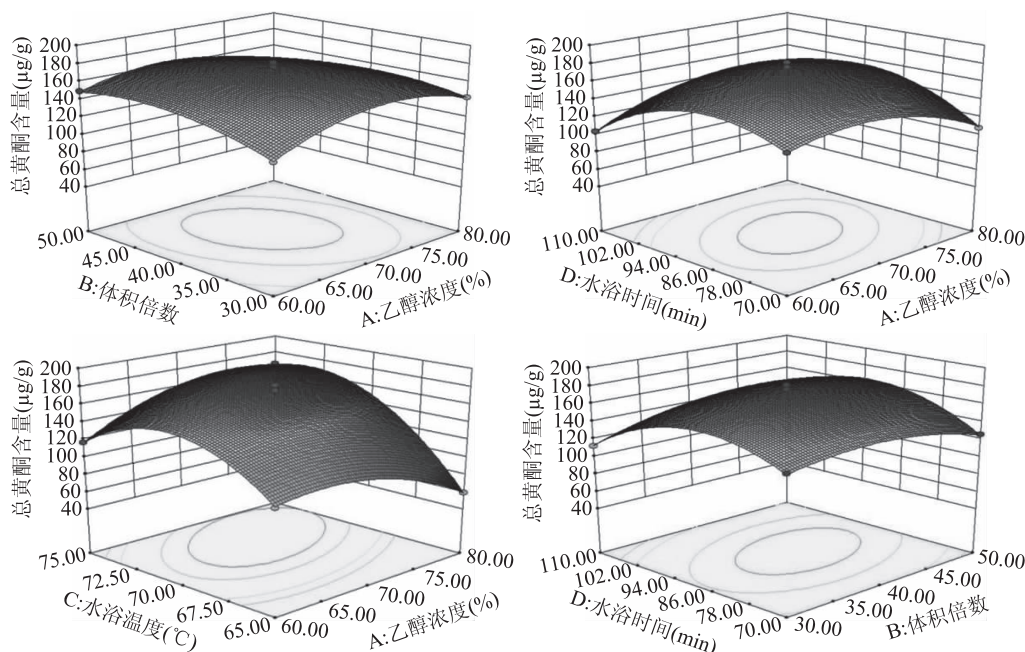


图5 黄酮提取优化试验响应面图

Fig.5 Response surface plots for flavonoids extraction yield

清除能力由强到弱依次为:黑果枸杞 > 宁农杞 5 号 > 宁夏黄果 > 宁杞 1 号 > 宁农杞 4 号,其中宁夏黄果与宁杞 1 号差异不显著 ($P > 0.05$), DPPH 清除能力结果与 ABTS 结果一致; Fe^{3+} 还原能力由强到弱依次为:黑果枸杞 > 宁杞 1 号 > 宁农杞 4 号 > 宁农杞 5 号 > 宁夏黄果,其中宁农杞 4 号、宁农杞 5 号和宁夏黄果差异不显著 ($P > 0.05$)。

将上述抗氧化活性结果转换成 V_c 当量,得到

表 4,结合图 6 可知,五种枸杞中,黑果枸杞和“宁农杞 5 号”黄果枸杞具有较强的清除 $ABTS^+$ 和 DPPH 自由基的能力。

2.3.2 不同抗氧化活性与活性成分的相关性分析 由表 5 可知,三种黄果枸杞中,“宁农 5 号”总黄酮及总酚含量最高,其中总黄酮含量是其他两种黄果枸杞的 1.4~2.3 倍,是红果枸杞的 1.7 倍,对照组红果枸杞(“宁杞 1 号”)总酚含量最低。黑果枸杞由于

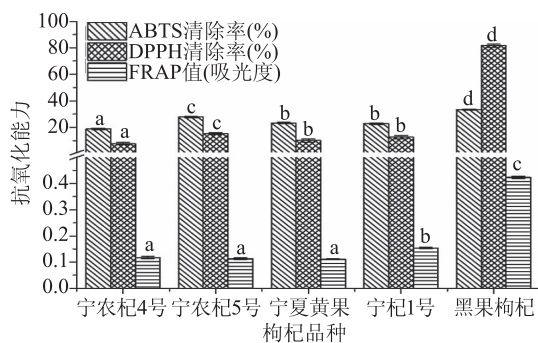


图6 不同枸杞黄酮提取物体外抗氧化能力比较

Fig.6 Comparison of antioxidant activity of flavonoids extract from different wolfberry *in vitro*表4 不同抗氧化指标对应的V_c当量Table 4 V_c equivalent of different antioxidant indexes

样品	V _c 当量(eq mg/g 鲜重)		
	ABTS ⁺	DPPH	FRAP
宁农4号	0.63 ± 0.010 ^a	0.88 ± 0.035 ^a	1.13 ± 0.017 ^a
宁农5号	0.94 ± 0.015 ^c	2.31 ± 0.032 ^c	0.98 ± 0.010 ^a
宁夏黄果	0.79 ± 0.007 ^b	1.74 ± 0.022 ^b	0.94 ± 0.011 ^a
宁杞1号	0.77 ± 0.010 ^b	2.21 ± 0.028 ^b	1.53 ± 0.014 ^b
黑果枸杞	1.100 ± 0.008 ^d	11.603 ± 0.028 ^d	5.456 ± 0.022 ^c

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

其种质特殊性,含有丰富且独特的花色苷成分,因此总黄酮和多酚含量在几种枸杞果实中含量最高。已有研究表明,不同黄酮化合物组成对抗氧化活性影响较大,酚羟基及内氢键数目是黄酮类化合物表现抗氧化活性的重要影响因素,7-O位黄酮衍生物具有较母体化合物强的生物活性,特别是山奈酚衍生物和槲皮素衍生物,是黄酮类化合物表现抗氧化、抗癌等生物活性的重要物质组成^[18-20],但目前黄果枸杞中的黄酮组成还不明晰,有待进一步研究。

表5 不同枸杞黄酮提取物组成

Table 5 Compose of flavonoids extract of different wolfberry

样品	总黄酮含量(μg/g)	总酚含量(μg/g)
宁农4号	84.96 ± 1.95 ^a	1336.44 ± 4.31 ^b
宁农5号	175.01 ± 2.32 ^d	1612.74 ± 7.10 ^c
宁夏黄果	120.45 ± 1.43 ^c	1437.13 ± 9.75 ^b
宁杞1号	101.13 ± 0.93 ^b	1149.27 ± 4.28 ^a
黑果枸杞	547.58 ± 4.244 ^e	2378.36 ± 3.26 ^d

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

表6 不同枸杞黄酮提取物组成与抗氧化能力的相关性

Table 6 Correlation between flavonoids extract and antioxidant capacity of different wolfberry

抗氧化活性	相关系数(r)	
	总黄酮含量	总酚含量
ABTS ⁺ 自由基清除率	0.909 [*]	0.903 [*]
DPPH 自由基清除率	0.992 ^{**}	0.907 [*]
FRAP 值	0.969 ^{**}	0.861

注:表中“*”表示相关性显著($P < 0.05$);“**”表示相关性极显著($P < 0.01$)。

如表6所示,总黄酮含量与ABTS⁺清除率呈显著正相关($P < 0.05$),相关系数为0.909,与DPPH清除率和FRAP呈极显著正相关($P < 0.01$)相关系数分别为0.992和0.969;总酚含量与ABTS⁺清除率、DPPH清除率呈显著正相关($P < 0.05$),相关系数分别为0.903和0.907。综合表明,黄酮是黄果枸杞表现抗氧化活性的主要成分^[21-22]。

3 结论

黄酮类化合物是黄果枸杞功效物质的重要组成部分,试验结果表明,水浴温度是影响黄果枸杞黄酮提取的主要因素,最佳提取工艺参数为:乙醇浓度70%、乙醇体积倍数40倍、水浴温度70℃、水浴时间90 min,此时黄酮含量为(175.21 ± 1.69) μg/g;体外抗氧化活性分析表明,黄果枸杞中“宁农杞5号”对ABTS⁺清除率和DPPH清除能力最强,高于红果枸杞(“宁杞1号”),但不及黑果枸杞;通过相关性分析可知,总黄酮含量与ABTS⁺清除率呈显著正相关,与DPPH清除率和FRAP值呈极显著正相关;总酚含量与ABTS清除率、DPPH清除率呈显著正相关。综合表明,黄酮类化合物是黄果枸杞表现抗氧化活性的主要成分。后续将对黄果枸杞中的黄酮化合物进行进一步分离鉴定,为黄果枸杞的综合开发与利用提供理论支撑。

参考文献

- [1]梁晓婕,王亚军,安巍.黄果枸杞种质资源的研究进展[J].浙江农业科学,2017,58(8):1376-1378,1382.
- [2]赵建华,述小英,李浩霞,等.不同果色枸杞鲜果品质性状分析及综合评价[J].中国农业科学,2017,50(12):2338-2348.
- [3]王亚军,郭素娟,安巍,等.5种枸杞的果实性状及主要营养成分[J].森林与环境学报,2016,36(3):367-372.
- [4]Lunzhao Yi, Shasha Ma, Dabing Ren. Phytochemistry and bioactivity of Citrus flavonoids: A focus on antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and cardiovascular protection activities [J]. Phytochemistry Reviews, 2017, 16(3): 479-511.
- [5]Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(15): 6185-6205.
- [6]Somerville Vaughan S, Braakhuis Andrea J, Hopkins Will G. Effect of flavonoids on upper respiratory tract infections and immune function: A systematic review and meta-analysis [J]. Advances in Nutrition, 2016, 7(3): 488-497.
- [7]Hoensch Harald Peter, Weigmann Benno. Regulation of the intestinal immune system by flavonoids and its utility in chronic inflammatory bowel disease [J]. World Journal of Gastroenterology, 2018, 24(8): 877-881.
- [8]Lin Wan, Jian-Guo Jiang. Protective effects of plant-derived flavonoids on hepatic injury [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 44: 283-291.
- [9]Wang Yongqiang, Gao Yujie, Ding Hui, et al. Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity [J]. Food chemistry, 2017, 218:

152-158.

[10] 方芳, 王凤忠. 植物黄酮醇提取方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 323-328.

[11] Awraris Derbie Assefa, Ramesh Kumar Saini, Young Soo Keum. Extraction of antioxidants and flavonoids from yuzu (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) peels: A response surface methodology study[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2017, 11(2): 364-379.

[12] Snežana Filip, Branimir Pavlić, Senka Vidović, et al. Optimization of microwave - assisted extraction of polyphenolic compounds from oicum basilicum by response surface methodology [J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(7): 2270-2280.

[13] Zhenyu Zhao, Pinghuai Liu, Shenglin Wang, et al. Optimization of ultrasound, microwave and Soxhlet extraction of flavonoids from *Milletia speciosa* Champ. and evaluation of antioxidant activities *in vitro* [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2017, 11(4): 1947-1958.

[14] Hanan S Afifi, Isameldin B Hashim, Sabreen I Altubji. Optimizing extraction conditions of crude fiber, phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity of date seed powder [J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54(13): 4149-4161.

[15] Tri Vo Dinh A, Periaswamy Sivagnanam Saravana, et al. Ionic liquid - assisted subcritical water enhances the extraction of phenolics from brown seaweed and its antioxidant activity [J].

(上接第 164 页)

rhizoma and evaluation of their *in vitro* antioxidant activities [J]. Molecules, 2012, 17(6): 6769-6783.

[14] 李多, 白宝清, 张锦华, 等. 响应面优化藜麦糠黄酮类化合物的提取及其抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(23): 199-204.

[15] 项昭保, 伍晓玲, 钟雪. 响应面优化超声波辅助乙醇提取橄榄叶总黄酮的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(10): 217-221.

[16] 闫蕊, 赵桦. 黄花油点草总黄酮超声提取工艺的响应面优化及抗氧化性分析 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(10): 190-196.

[17] Wen C, Zhang J, Zhang H, et al. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops - A review [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2018, 48: 538-549.

[18] Chemat F, Rombaut N, Sicaire A G, et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 34: 540-560.

[19] Su X Y, Wang Z Y, Liu J R. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds [J]. Food Chemistry, 2009, 117(4): 681-686.

Separation and Purification Technology, 2018, 196: 287-299.

[16] Atoui A K, Mansouri A, Boskou G, et al. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile [J]. Food Chemistry, 2005, 89(1): 27-36.

[17] Wang Y, Yang Z, Wei X. Antioxidant activities potential of tea polysaccharide fractions obtained by ultra filtration [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50(3): 558-564.

[18] 刘瑞. 三种天然黄酮结构修饰及其生物活性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.

[19] Pietta P G. Flavonoids as antioxidants [J]. Journal of Natural Products, 2000, 63(7): 1035-1042.

[20] F R Marín, M J Frutos, J A Pérez-Alvarez, et al. Flavonoids as nutraceuticals: Structural related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation [J]. Studies in Natural Products Chemistry, 2002, 26: 741-778.

[21] 李洋, 马文平, 倪志婧. 宁夏枸杞体外抗氧化机理研究 [J]. 食品科学, 2014, 35(1): 79-84.

[22] Wang Yue, Qian Jing, Cao Jinping, et al. Antioxidant capacity, anticancer ability and flavonoids composition of 35 citrus (*Citrus reticulata* Blanco) Varieties [J]. Molecules, 2017, 22(7): 1114-1120.

[23] 吴霞明. 枸杞黄酮的研究进展 [J]. 中国食物与营养, 2018, 24(8): 9-13.

[24] 郎宇曦, 马岩, 李斌, 等. 黄酮类化合物与其他化合物相互作用的进展 [J]. 食品科学, 2018, 39(9): 258-264.

[20] Wang H, Gao X D, Zhou G C, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit [J]. Food Chemistry, 2008, 106(3): 888-895.

[21] 何琳. 陕北荞麦麸皮中黄酮类化合物的提取及纯化研究 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2011.

[22] Xiong L, Hu W B, Yang Z W, et al. Enzymolysis - ultrasonic assisted extraction of flavanoid from *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinskaja: HPLC profile, antimicrobial and antioxidant activity [J]. Industrial Crops and Products, 2019, 130: 615-626.

[23] Zhou J, Zhang L, Li Q, et al. Simultaneous optimization for ultrasound - assisted extraction and antioxidant activity of flavonoids from *Sophora flavescens* using response surface methodology [J]. Molecules, 2019, 24(1): 112.

[24] Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, et al. Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* bloom [J]. Molecules, 2012, 17(2): 1203-1218.

[25] 邹淑君, 于子惠, 许树军, 等. 橙皮苷及橙皮素清除自由基活性的研究 [J]. 中医药学报, 2013, 41(1): 65-67.

[26] 董媛琪, 黄凤华, 姚依兰, 等. 柚皮苷的提取及抗氧化活性研究 [J]. 农业开发与装备, 2017(6): 83-84.