

陈燕芹,刘红,蔡丽. 蕨菜总黄酮的提取及抗氧化性[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):299-301.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.101

蕨菜总黄酮的提取及抗氧化性

陈燕芹,刘红,蔡丽

(毕节学院化学化工实验教学中心/贵州省应用化学特色重点实验室,贵州毕节 551700)

摘要:为了探明蕨菜中黄酮类物质提取工艺及其抗氧化性,为进一步开发利用蕨菜提供依据。以蕨菜为原料,采用单因素试验和正交试验,研究了超声波提取温度、提取时间、乙醇浓度、料液比等工艺参数对蕨菜总黄酮提取率的影响。结果表明,蕨菜总黄酮的超声提取工艺为:料液比 1 g : 45 mL、提取温度 70 ℃、提取时间 20 min、乙醇浓度 80%,该条件下提取率为 2.45%。蕨菜总黄酮的抗氧化性随着浓度的升高而增强,当总黄酮浓度为 0.89 mg/L 时,对羟基自由基清除率达到 65.1%;当总黄酮浓度为 11.15 mg/L 时,对 DPPH 自由基的清除率达到 86.5%。

关键词:蕨菜;黄酮;超声提取;正交试验;提取工艺;抗氧化性

中图分类号: TS207.3;R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0299-03

野生蕨菜在自然界中广泛分布于荒坡、林缘、稀疏针阔叶和灌木丛中,以未展开的叶柄供食,其味道鲜美,质地脆嫩,营养丰富,清香适口,是广大群众喜食的一种山野菜,被当今国内外营养学家誉为森林蔬菜,是市场的畅销品^[1]。蕨菜全株均可入药,有很高的药用价值,有固表止汗、清热解毒、健脾脾胃、降气化痰、润肠驱虫的功效,可治疗高血压、头晕失眠、脱肛、痢疾等^[2],虽然人类食用蕨菜的历史悠久,但对其深入研

收稿日期:2014-01-10

基金项目:贵州省科技厅联合基金(编号:黔科合 J 字 LKB[2013]05 号);贵州省教育厅大学生创新项目(编号:201310668005);毕节学院实验室开放基金。

作者简介:陈燕芹(1976—),女,山东济南人,硕士,副教授,从事光谱分析方法研究及应用工作。E-mail:chenyanqin1227@126.com。

值为 6 时的乳状液填充凝胶的持水率比 pH 值为 4、5 时的高。

在 pH 值为 6、NaCl 浓度为 50 mmol/L 时,以大豆蛋白和酪蛋白为乳化剂制备的乳状液填充蛋白凝胶强度高于以水为溶剂制备的凝胶,以吐温 20 为乳化剂制备的乳状液填充蛋白凝胶强度与以水为溶剂制备的凝胶差异不显著。NaCl 浓度过高(200 mmol/L)不利于凝胶强度的提高,以酪蛋白为乳化剂制备的乳状液填充大豆蛋白凝胶强度较高。

参考文献:

- [1] Dickinson E. Emulsion gels: the structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 28(1):224-241.
- [2] 吴满刚. 脂肪和淀粉对肌原纤维蛋白凝胶性能的影响机理[D]. 无锡:江南大学,2010.
- [3] 安丰富,何志勇,秦昉,等. 预乳化对大豆蛋白-猪肌原纤维蛋白混合凝胶性质的影响[J]. 食品工业科技,2013,34(17):106-109.
- [4] 华晓南. 酪蛋白酸钠预乳化对低饱和脂肪——蛋白质体系乳化凝胶特性的影响[D]. 南京:南京农业大学,2012:45-58.

究较少。黄酮类物质在医学上有很大医用价值,现已成为药学和保健食品学的研究热点,医学界普遍认为黄酮类物质具有抗氧化性,能消除体内过多的自由基,从而在抗衰老、抗肿瘤和糖尿病的治疗方面有一定的医用价值,此外黄酮还具有改善心脑血管循环、降低血清胆固醇、解痉抗过敏等方面的作用^[3]。研究结果表明蕨菜黄酮类物质在消除体内过多自由基方面有良好的作用。本试验对蕨菜中总黄酮的超声提取工艺进行研究,并对其抗氧化性进行探讨,以期对蕨菜功能成分的研究开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9070A,上海秣马恒温设备

- [5] Kim K H, Renkema J, van Vliet T. Rheological properties of soybean protein isolate gels containing emulsion droplets[J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15(3):295-302.
- [6] Ha L E, Choi S J, Moon T W. Characteristics of Sodium caseinate - and soy protein isolate - stabilized emulsion - gels formed by microbial transglutaminase[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(6):C352-C357.
- [7] 刘付. 凝胶样蛋白稳定乳液的形成、流变性能及微结构研究[D]. 广州:华南理工大学,2011:31-41.
- [8] 杨森,唐传核. 微生物转谷氨酰胺酶对大豆分离蛋白乳液凝胶性能的影响[J]. 现代食品科技,2012,28(1):5-8.
- [9] 罗立君,唐传核. 大豆 7S 和 11S 凝胶样乳液流变特性及微观结构的研究[J]. 现代食品科技,2013,29(2):242-246.
- [10] Jiang J X Y, Chen J. pH shifting alters solubility characteristics and thermal stability of soy protein isolate and its globulin fractions in different pH, salt concentration, and temperature conditions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(13):8035-8042.
- [11] McClements D J, Monahan F J, Kinsella J E. Effect of emulsion droplets on rheology of whey protein isolate gels[J]. Journal of Texture Studies, 1993, 24(4):411-422.

厂产品),电磁式矿石粉碎机(DF-4,杭州卓驰有限公司产品),超纯水机(UPT-II-40L,成都超纯水有限公司产品),电子分析天平(BSA224S,德国赛多利斯公司产品),紫外可见分光光度计(Cary 50,美国瓦里安公司产品)。

蕨菜(采自毕节阳山公园);芦丁(国药集团化学试剂有限公司产品,98%);无水乙醇、硫酸亚铁、盐酸、亚硝酸钠、氢氧化钠、硝酸铝、水杨酸、双氧水、DPPH 等试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 蕨菜样品用自来水清洗后,再用超纯水洗涤多次,在 80 ℃ 烘干 24 h 后,用粉碎机粉碎并过 80 目筛,置于干燥器中备用。

1.2.2 芦丁标准曲线绘制 准确称取 22.0 mg 芦丁用 30% 的乙醇配制成 0.22 mg/mL 标准溶液,分别准确吸取标准芦丁溶液 0、2、4、6、8、10 mL,分别置于 25 mL 容量瓶中。依次加入 5 mL 30% 乙醇溶液、1 mL 5% NaNO₂ 溶液,静置 5 min 后,加 1 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液,静置 6 min 后,加入 5 mL 4% NaOH 溶液,用 30% 乙醇溶液定容,静置 10 min 后,在波长为 509.1 nm 处测出标准系列的吸光度,绘制标准曲线^[4]。得标准曲线方程为 $D = 10.7386x + 0.0194$,线性相关系数为 0.9997。

1.2.3 蕨菜总黄酮含量的测定 准确称取 0.5 g 蕨菜粉末于 50 mL 磨口锥形瓶中,加入一定量乙醇,在一定温度下超声波辅助提取一定时间,趁热减压抽滤,用 30% 乙醇定容于 50 mL 容量瓶中,作为待测液。然后,取上述溶液 5 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入 5% NaNO₂ 1 mL,摇匀,静置 6 min,加入 10% Al(NO₃)₃ 1 mL,摇匀,静置 6 min,加入 4% NaOH 10 mL,用 30% 乙醇定容。15 min 后在 509.1 nm 处测定吸光度 D ,以试剂作空白参比。

$$Y = \frac{C \times 25 \times 10}{m \times 1\,000} \times 100\%。$$

式中: m 为样品质量; C 为黄酮溶液浓度; Y 为黄酮得率,10 为所取溶液的倍数。

1.2.4 各因素对蕨菜总黄酮提取率的影响 乙醇浓度,在料液比 1 g : 45 mL、超声温度 60 ℃、超声时间 20 min 的条件下改变乙醇浓度(60%、70%、75%、80%、90%),确定乙醇浓度对蕨菜总黄酮提取率的影响。料液比,在乙醇浓度 80%、超声温度 60 ℃、超声时间 20 min 的条件下改变料液比(1 : 30、1 : 40、1 : 45、1 : 50、1 : 60,g : mL),测定料液比对蕨菜总黄酮提取率的影响。超声温度,在乙醇浓度 80%、料液比 1 g : 45 mL、超声时间 20 min 条件下改变超声温度(30、40、50、60、65、70 ℃),测定超声温度对蕨菜总黄酮提取率的影响。超声时间,在乙醇浓度 80%、料液比 1 g : 45 mL、超声温度 60 ℃ 的条件下改变超声时间(5、8、10、20、30、40 min),测定超声时间对蕨菜总黄酮提取率的影响。

1.2.5 正交试验优化蕨菜总黄酮提取工艺 在单因素试验的基础上,以蕨菜为材料,以超声波作用时间、料液比、乙醇浓度、温度为主要因素,采用 L₉(3⁴) 正交表设计正交试验,以确定蕨菜中总黄酮的最佳提取工艺条件,各因素水平见表 1。

1.2.6 蕨菜总黄酮抗氧化性的测定

1.2.6.1 对 ·OH 的清除率 采用水杨酸比色法测定黄酮

表 1 L₉(3⁴) 正交试验因素水平

水平	因素			
	A:乙醇浓度 (%)	B:料液比 (g : mL)	C:时间 (min)	D:温度 (℃)
1	75	1 : 40	10	60
2	80	1 : 45	20	65
3	90	1 : 50	30	70

对羟基自由基的清除作用。分别取黄酮提取液 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mL 于试管中,依次加入 6 mmol/L FeSO₄ 溶液 2 mL、6 mmol/L H₂O₂ 2 mL,摇匀后静置 10 min。加入 6 mmol/L 水杨酸 2 mL,摇匀后静置 30 min,在 510 nm 波长下测定吸光度,记为 D_i ;用水代替水杨酸测定某浓度黄酮溶液的本底光密度 D_j ;用水代替抗氧化剂时测定的空白对照光密度为 $D^{[5]}$ 。

$$\text{清除率}(S) = [1 - (D_i - D_j) / D] \times 100\%。$$

1.2.6.2 对 DPPH 的清除率^[6] 利用最优化方案提取的总黄酮溶液,配制不同浓度的样品溶液,分别取 2.0 mL,再加入 5 mL 容量瓶中,分别加入浓度为 0.04 mg/mL 的 DPPH 溶液 2.0 mL,混合摇匀,反应 30 min 后在 520 nm 处测定其吸光度 D_1 。以 2.0 mL 无水乙醇代替 DPPH 的吸光度为 D_2 ,以 2.0 mL 的蒸馏水代替样品溶液的吸光度为 D_0 ,以无水乙醇作参比液^[6]。DPPH 自由基清除率 = $[1 - (D_1 - D_2) / D_0] \times 100\%。$

2 结果与分析

2.1 不同因素对蕨菜总黄酮提取率的影响

2.1.1 乙醇浓度 由图 1-A 可知,在其他条件不变时,蕨菜总黄酮提取率开始随乙醇浓度的增大而增加,而当乙醇浓度达到 80% 时,总黄酮的提取率最大;当乙醇浓度再增大时,总黄酮提取率逐渐下降。

2.1.2 超声波提取时间 蕨菜中总黄酮的提取率在提取 10 min 之前,随时间增加而提高,至 10 min 时达到最大值(图 1-B)。

2.1.3 料液比 由图 1-C 可见,蕨菜中总黄酮的提取率在料液比为 1 g : 40 mL 时达到最大,继续增加溶剂,总黄酮的提取率反而下降。

2.1.4 提取温度 蕨菜中总黄酮的提取率随温度的增加逐渐增加,在 60 ℃ 之前随温度的增加提取率的增加较快,而后随温度增加提取率也逐渐增加,但增加趋势较缓慢(图 1-D)。

2.2 最佳提取工艺

正交试验结果(表 2)表明,从极差分析可以看出,在影响蕨菜中总黄酮提取率的 4 个因素中,料液比 > 温度 > 时间 > 乙醇浓度。最佳的提取工艺条件为: A₂B₂C₂D₃,即料液比 1 g : 45 mL、提取温度 70 ℃、提取时间 20 min、乙醇浓度 80%。用最佳工艺进行 3 次平行试验,得平均提取率为 2.45%。

2.3 蕨菜总黄酮对 ·OH 的清除能力

蕨菜总黄酮对 ·OH 的清除结果见图 2。由图 2 可知,添加不同浓度的蕨菜总黄酮,对 ·OH 均有清除作用,随样品浓度的增大,抗氧化性有较明显增大,当样品浓度为 0.89 mg/L

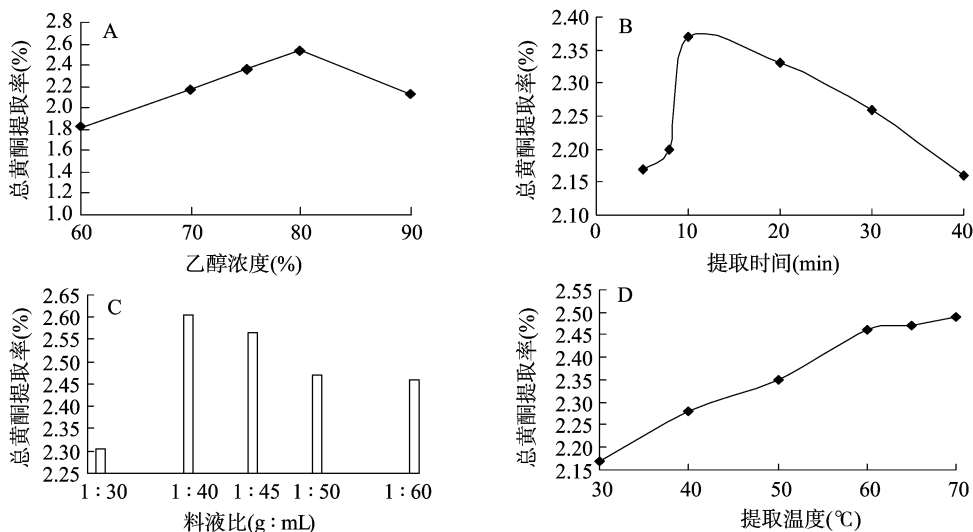


图1 乙醇浓度(A)、固液比(B)、提取时间(C)和提取温度(D)对总黄酮提取率的影响

时,抑制率最高,为 65.1%,此后增加样品浓度抑制率不再增大。

表 2 蕨菜总黄酮提取正交试验结果

试验号	因素				提取率 (%)
	A:乙醇浓度	B:固液比	C:时间	D:温度	
1	1	1	1	1	2.16
2	1	2	2	2	2.36
3	1	3	3	3	2.30
4	2	1	2	3	2.39
5	2	2	3	1	2.44
6	2	3	1	2	2.18
7	3	1	3	2	2.20
8	3	2	2	3	2.43
9	3	3	1	1	2.33
k_1	2.273	2.250	2.257	2.310	
k_2	2.337	2.410	2.360	2.247	
k_3	2.320	2.270	2.313	2.373	
R	0.064	0.160	0.103	0.126	

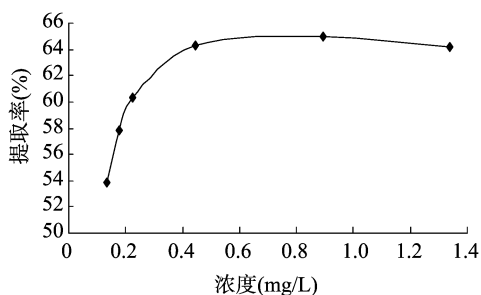


图2 蕨菜总黄酮对羟基自由基的清除作用

2.4 蕨菜总黄酮对 DPPH· 的清除能力

由图 3 可知,蕨菜总黄酮具有清除 DPPH 自由基的作用,其清除能力随着浓度的增加而增大,当总黄酮浓度为 11.15 mg/L 时,清除率为 86.5%,再增加黄酮浓度,清除率变化不大。黄酮浓度与维生素 C 浓度相同时,蕨菜总黄酮的清

除能力与维生素 C 相当。

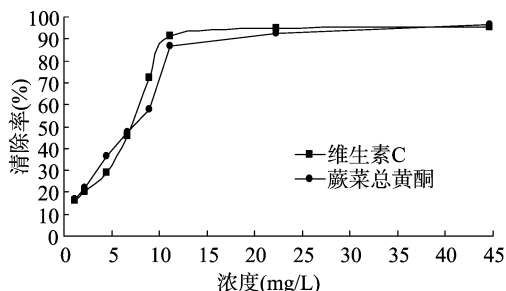


图3 蕨菜总黄酮对DPPH自由基的清除作用

3 结论

试验结果表明,超声辅助法中提取因素对蕨菜总黄酮提取率的影响顺序为料液比 > 温度 > 时间 > 乙醇浓度,最佳提取工艺条件为:料液比 1 g : 45 mL、提取温度 70 °C、提取时间 20 min、乙醇浓度 80%,最佳工艺下的平均提取率为 2.45%。

自由基清除试验结果表明,蕨菜总黄酮具有一定的抗氧化性,且随着浓度的增加而逐渐增加。当总黄酮浓度为 0.89 mg/L 时,羟基自由基清除率达 65.1%,当总黄酮浓度为 11.15 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率为 86.5%。

参考文献:

- [1]杨洪双. 蕨菜种苗快繁及棚栽技术研究[D]. 延吉:延边大学,2007.
- [2]李海丽. H PLC 测定蕨菜中的槲皮素和山萘酚[J]. 华西药学杂志,2009,24(4):398-399.
- [3]江 洪. 野葛异黄酮的提取及其超声强化研究黄酮研究野葛提取异黄酮[D]. 杭州:浙江大学,2004.
- [4]甄文鹏,范比威,周 莉. 微波萃取苦荞壳中总黄酮工艺研究[J]. 天然产物研究与开发,2007(19):119-123.
- [5]邹玉红,寇小燕,韩秋霞. 超声波辅助提取甘草总黄酮及其抗氧化性[J]. 食品研究与开发,2011,32(9):79-81.
- [6]王海敏,虞海霞,董 蕊,等. 苕子蜜总酚酸和总黄酮含量测定及抗氧化活性的研究[J]. 食品科学,2010,31(1):54-57.