

曹叶霞,尹爱萍,王 曼. 野生蕨菜中总黄酮的提取及其抗氧化活性[J]. 江苏农业科学,2017,45(23):194-197.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.055

野生蕨菜中总黄酮的提取及其抗氧化活性

曹叶霞,尹爱萍,王 曼

(忻州师范学院,山西忻州 034000)

摘要:以野生蕨菜为原料,采用超声波辅助提取法,研究不同提取条件对野生蕨菜中总黄酮含量的影响及其清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基的能力。首先在单因素试验基础上考察各因素对野生蕨菜总黄酮提取率的影响,然后采用正交试验优化野生蕨菜总黄酮的提取工艺条件,同时比较其与维生素 C 在清除 DPPH 自由基方面的差异。结果表明,超声辅助提取野生蕨菜中总黄酮的最优条件:超声功率 240 W,料液比 1 g : 35 mL,超声时间 70 min,超声温度 60 ℃。其中的显著影响因素是超声功率、超声温度,在最优条件下超声波辅助提取野生蕨菜中总黄酮的提取率可以达到 3.34%。另外,野生蕨菜黄酮类化合物对 DPPH 自由基的清除率比相同浓度的维生素 C 溶液清除率高,其 IC_{50} 值为 0.005 mg/mL,说明野生蕨菜总黄酮具有很好的抗氧化活性,从而为其综合开发提供了一定的理论依据。

关键词:野生蕨菜;超声提取;总黄酮;正交试验;DPPH

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0194-04

被誉为“山菜之王”的蕨菜自古享有诸多美誉,它富含对人体有益的多种营养成分,并且随着科学技术的发展和研究的进步,人们发现其具有清热化痰的药用价值。据相关文献报道,野生蕨菜中富含黄酮类物质。现代药理研究表明,黄酮是一类天然色素及苷类物质的总称,药用价值很高。黄酮具有清除自由基、抗凝等作用^[1],还具有抗白血病、抗辐射、抗肿瘤等作用^[2],此外,黄酮类化合物对内分泌也有一定的影响。

目前有多种黄酮提取方法,但在众多方法中,有机溶剂提取法存在溶剂成本高、毒性大等缺点,大孔树脂吸附法的重现性差、预处理麻烦,酶提取法、超临界流体提取法都存在成本偏高的劣势,只有超声波辅助提取法能高效地提取蕨菜中的黄酮类物质,既能降低成本,又能缩短提取时间。但是对蕨菜黄酮的超声波辅助提取未见报道,因此本研究以野生蕨菜为对象,采用单因素试验与正交试验相结合的方法,考察超声波辅助提取野生蕨菜总黄酮的优选工艺及其清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基的能力,以期对野生蕨菜的综合开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

野生蕨菜,产自黑龙江伊春。

1.2 试剂与仪器

芸香苷标准品(纯度 >99%),购自成都市科龙化工试剂

厂;DPPH,购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;亚硝酸钠、无水乙醇、维生素 C、硝酸铝等,均为分析纯。试验用水均为二次蒸馏水。

KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;UV-2500 紫外-可见分光光度计,日本岛津公司等。

1.3 试验方法

1.3.1 野生蕨菜的预处理 将野生蕨菜用蒸馏水洗净,然后放于 60 ℃ 烘箱中干燥,最后用粉碎机粉碎并过 100 目筛,装瓶置于阴凉处备用。

1.3.2 最大吸收波长的选择 野生蕨菜中的黄酮类物质中含有游离的羟基,在一定条件下能与金属铝离子形成金属络合物而显色,所以本试验中选择硝酸铝比色法测定野生蕨菜中的总黄酮含量^[3]。

准确称取 100 mg 芸香苷标准品,置于 50 mL 容量瓶中,加约 30 mL 50% 乙醇,在水浴中加热溶解,放冷,加 50% 乙醇稀释到刻度,混合均匀,准确量取 5 mL 上述溶液于 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,混合摇匀,即得 0.100 mg/mL 芸香苷标准乙醇溶液。

准确量取 2.0 mL 芸香苷标准溶液于 25 mL 比色管中,加入 1.0 mL 5% 亚硝酸钠溶液,混合摇匀,静置 6 min 再加 1.0 mL 10% 硝酸铝溶液,混合均匀,静置 6 min,最后加 10.0 mL 4% 氢氧化钠溶液,加 50% 乙醇定容后,混合均匀,静置 15 min。取另一个比色管加 1 mL 5% 亚硝酸钠,再加 1 mL 10% 硝酸铝,最后加 10 mL 4% 氢氧化钠,加 50% 乙醇定容至刻度作为空白对照,在 200~800 nm 波长范围内进行紫外扫描,由图 1 可见,在 513 nm 处有最大吸收峰,因此本试验选择 513 nm 为测定波长。

1.3.3 芸香苷标准曲线的绘制 准确量取芸香苷标准品乙醇溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,分别置于 25 mL 比色管中,加 1.0 mL 5% 亚硝酸钠溶液,混合均匀,静置 6 min,

收稿日期:2016-07-01

基金项目:重点建设学科项目(编号:XK201303);材料与计算化学山西省高等学校重点实验室项目;忻州师范学院科研基金(编号:201130);山西省 1331 工程重点学科建设计划。

作者简介:曹叶霞(1977—),女,山西大同人,副教授,主要从事无机及分析化学研究。E-mail:516941680@qq.com。

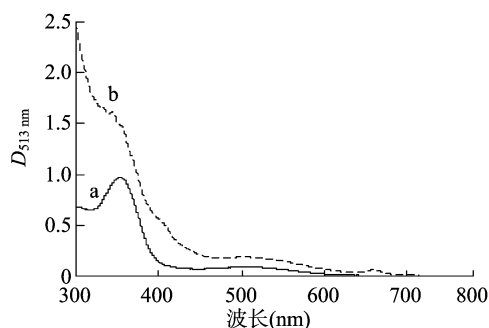


图1 芸香苷(a)及蕨菜黄酮(b)的紫外吸收光谱

然后加 1.0 mL 10% 硝酸铝溶液,混合均匀,静置 6 min,然后再加 10 mL 4% 氢氧化钠溶液,最后加 50% 乙醇定容到刻度,混合均匀,静置 15 min,在波长 513 nm 处测定吸光度。由图 2 可知,回归方程为 $A = 10.993C - 0.0007$, $r^2 = 0.997$ 。结果表明,芸香苷标准品浓度在 4 ~ 24 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,吸光度与浓度线性关系良好。

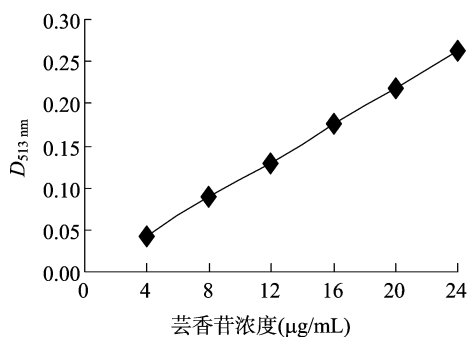


图2 芸香苷标准工作曲线

1.3.4 样品的测定^[4] 准确称取 1.000 0 g 野生蕨菜于锥形瓶中,超声提取,常压过滤,用乙醇溶剂洗至滤液无色即得到待测液。准确移取 2.0 mL 野生蕨菜待测液于 25 mL 比色管中,用“1.3.2”节的显色方法测定吸光度,代入标准方程计算野生蕨菜中总黄酮含量和提取率,其中总黄酮含量的计算公式:总黄酮含量 = (提取液中总黄酮的质量/样品质量) $\times 100\%$ 。

1.3.5 单因素试验^[5] (1) 超声功率对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响。准确称取 5 份野生蕨菜粉末,每份 1.000 0 g,分别加入 30 mL 70% (体积分数) 乙醇,超声温度为 50 $^{\circ}\text{C}$,分别在 160、200、240、280、320 W 的功率下超声提取 40 min,常压过滤至滤液无色,测量提取液体积并取 2.0 mL 提取液于 25 mL 比色管中,采用硝酸铝比色法测定溶液吸光度,计算蕨菜的总黄酮含量。

(2) 料液比对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响。准确称取 5 份野生蕨菜粉末,每份 1.000 0 g,分别加入 25、30、35、40、45 mL 70% (体积分数) 乙醇,在超声温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率为 240 W 的条件下超声提取 40 min,其余步骤同(1)。

(3) 超声时间对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响。准确称取 5 份野生蕨菜粉末,每份 1.000 0 g,分别加入 30 mL 70% (体积分数) 乙醇,分别在 50 $^{\circ}\text{C}$ 超声温度、280 W 超声功率下超声提取 30、50、70、90、110 min,其余步骤同(1)。

(4) 乙醇浓度对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响。准确

称取 5 份野生蕨菜粉末,每份 1.000 0 g,分别加入 30 mL 体积分数为 40%、50%、60%、70%、80% 的乙醇,在 280 W 超声功率、50 $^{\circ}\text{C}$ 超声温度下超声提取 90 min,其余步骤同(1)。

(5) 超声温度对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响。准确称取 5 份野生蕨菜粉末,每份 1.000 0 g,分别加入 30 mL 60% (体积分数) 乙醇,分别在 25、30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 温度下以 280 W 的超声功率超声提取 70 min,其余步骤同(1)。

1.3.6 正交试验^[6] 在单因素基础上,选取超声功率、料液比、超声时间、超声温度作为考察因素,以野生蕨菜中总黄酮含量为目标,每个因素设 3 个水平,采用 $L_9(3^4)$ 的正交设计试验,因素水平设计如表 1 所示。

表1 正交试验因素与水平

水平	因素			
	A: 超声功率 (W)	B: 料液比 (g : mL)	C: 超声时间 (min)	D: 超声温度 ($^{\circ}\text{C}$)
1	240	1 : 25	50	40
2	280	1 : 30	70	50
3	320	1 : 35	90	60

1.3.7 野生蕨菜中总黄酮与维生素 C 分别清除 DPPH 自由基的测定 (1) 蕨菜总黄酮清除 DPPH 自由基测定。准确称取 25 mg DPPH,用无水乙醇定容于 100 mL 棕色容量瓶中,制得 DPPH 母液,于冰箱中避光保存,用时稀释 5 倍,得 50 mg/mL DPPH 溶液。另将野生蕨菜提取液分别配成 0.026 4、0.021 1、0.015 8、0.010 6、0.007 9、0.005 3、0.004 0、0.002 6、0.001 3 mg/mL 9 个浓度,反应 30 min 后于 1 cm 比色皿中测定其在 517 nm 处的吸光度。

(2) 维生素 C 清除 DPPH 自由基测定。准确称取 26.4 mg VC,用 60% 乙醇溶液定容于 50 mL 容量瓶中,制得 VC 母液,取 10 mL 母液稀释于 50 mL 容量瓶中,得 0.052 8 mg/mL VC 溶液。VC 浓度梯度与 DPPH 自由基清除试验中蕨菜浓度一致,反应 30 min 后于 1 cm 玻璃比色皿中测定其在 517 nm 处的吸光度。

按下列公式计算 DPPH 自由基的清除率:清除率 = $[1 - (D_s - D_e)/D_0 \times 100] \times 100\%$,其中抗氧化剂清除自由基能力采用清除率为 50% 时所对应的抗氧化剂溶液浓度 (即 IC_{50} 值) 表示。式中: D_0 为 4.0 mL 50 mg/L DPPH 乙醇溶液 + 1.0 mL 60% 乙醇溶液的吸光度; D_s 为 4.0 mL 50 mg/L DPPH 乙醇溶液 + 1.0 mL 不同浓度样品溶液的吸光度; D_e 为 4.0 mL 无水乙醇溶液 + 1.0 mL 不同浓度样品溶液的吸光度^[7]。

2 结果与分析

2.1 单因素试验分析

2.1.1 超声功率对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响 如图 3 所示,在 160 ~ 240 W 超声功率范围内,野生蕨菜中总黄酮的提取率缓慢升高;在 240 ~ 280 W 超声功率范围内,提取率迅速提高,在 280 W 超声功率处理下,野生蕨菜中总黄酮的提取率达到最大值;但从 280 W 超声功率开始,提取率急剧下降,这可能是由于超声功率达到一定程度时会破坏黄酮类分子的结构,使黄酮含量降低^[6]。因此,确定 280 W 为最佳超声功率。

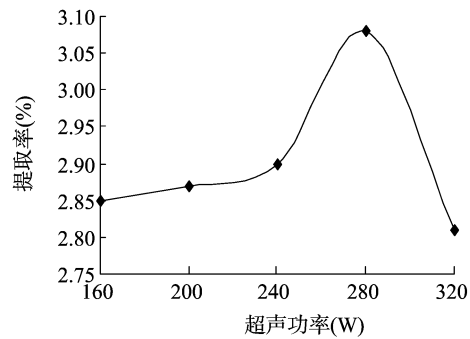


图3 超声功率对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响

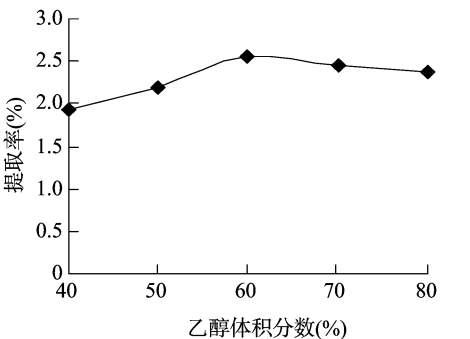


图6 乙醇浓度对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响

2.1.2 料液比对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响 如图4所示,在料液比1 g : 25 mL~1 g : 30 mL 的范围内,野生蕨菜中总黄酮的提取率逐渐提高,但从料液比为1 g : 30 mL 开始,溶剂越多,野生蕨菜中总黄酮的提取率急剧降低。这可能是由于随着溶剂的增多,所溶解的杂质也增多,从而使黄酮提取率降低。综合提取效果与减少溶剂用量等方面^[8],确定最佳料液比为1 g : 30 mL。

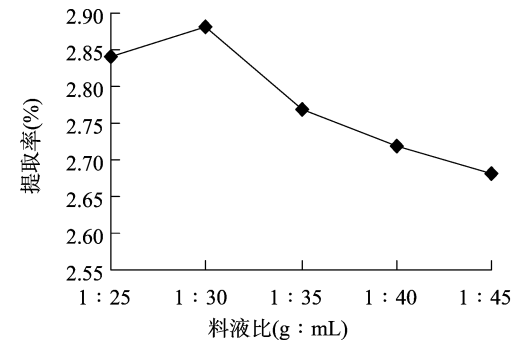


图4 料液比对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响

2.1.3 超声时间对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响 如图5所示,野生蕨菜中总黄酮的提取率随着超声时间的增加呈现先提高后降低的趋势,这可能是由于过长的提取时间破坏了黄酮类化合物的结构,降低了总黄酮的含量。所以,确定最佳超声时间为70 min。

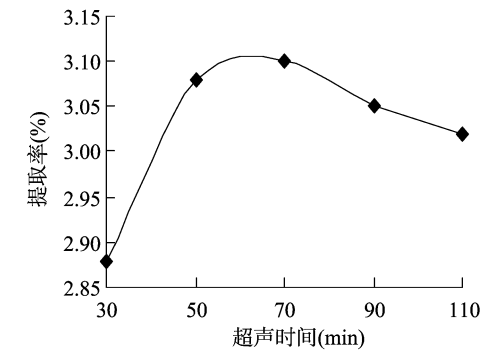


图5 超声时间对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响

2.1.4 乙醇浓度对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响 如图6所示,野生蕨菜中总黄酮的提取率随着乙醇浓度的增加呈现先提高后降低的趋势,这可能是由于高浓度乙醇溶解了部分脂溶性化合物,导致溶解黄酮化合物的能力降低^[5]。因此,确定最佳乙醇浓度为60%。

2.1.5 超声温度对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响 如图

7所示,野生蕨菜中总黄酮的提取率随着超声温度的逐渐上升呈现先提高后降低的趋势,这可能由于温度过高,溶剂挥发,使得野生蕨菜中总黄酮提取率降低^[5]。所以,确定50℃为最佳超声温度。

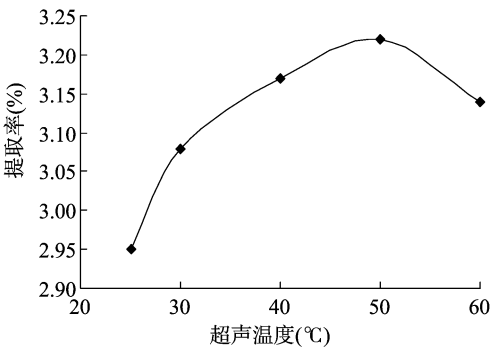


图7 温度对野生蕨菜中总黄酮提取率的影响

2.2 正交试验结果

根据表2正交试验结果可知,各因素对野生蕨菜总黄酮提取率影响大小顺序为D>A>C>B,即超声温度>超声功率>超声时间>料液比,野生蕨菜中总黄酮超声提取最佳的条件组合为A₁B₃C₂D₃,即超声功率240 W,料液比1 g : 35 mL,超声时间70 min,超声温度60℃。由表3分析可知,显著的影响因素是超声功率和超声温度。

表2 正交试验结果

序号	A	B	C	D	提取率(%)
1	1	1	1	1	3.044
2	1	2	2	2	3.100
3	1	3	3	3	3.192
4	2	1	2	3	3.075
5	2	2	3	1	2.801
6	2	3	1	2	2.963
7	3	1	3	2	2.897
8	3	2	1	3	3.031
9	3	3	2	1	2.866
k ₁	3.112	3.005	3.013	2.904	
k ₂	2.946	2.977	3.014	2.987	
k ₃	2.931	3.007	2.963	3.099	
R	0.181	0.030	0.051	0.195	

2.3 验证试验

为了更好地考察正交试验的最优工艺的稳定性,根据分析结果,选取最优提取条件即超声功率240 W,料液比

表 3 方差分析结果

类别	平方和	自由度	均方	F 值	F 临界值	P 值
A	1.126	2	0.563	563	99	<0.01
B	0.002	2	0.001	1	19	
C	0.005	2	0.002 5	0.002 5	19	
D	0.058	2	0.029	29	19	<0.05
误差	0.001	2	0.001			

1 g : 35 mL, 超声时间 70 min, 超声温度 60 ℃, 乙醇浓度 60%, 进行 3 次平行试验。结果表明, 蕨菜总黄酮提取率达到 3.34%, 说明此工艺可行。

2.4 蕨菜中总黄酮与维生素 C 分别清除 DPPH 自由基

DPPH 自由基作为一种十分稳定、能长时间保存的自由基, 当它在适当的介质条件下会被还原^[9-10], 消除了该自由基, 溶液中化合物的颜色会由原来的紫色变成淡黄色^[11]。

如表 4、图 8 所示, 清除 DPPH 自由基的能力随着维生素 C 质量浓度的增加在逐渐增强: 当维生素 C 的质量浓度达到 0.021 1 mg/mL 时, 维生素 C 的清除率达到 75.83%, 其清除能力也趋于稳定状态, 维生素 C 清除率达到 IC₅₀ 值所对应的浓度为 0.014 mg/mL。清除 DPPH 自由基的能力随着蕨菜总黄酮质量浓度的增大而增强, 当质量浓度达到 0.015 8 mg/mL 时, 其清除率达到 87.96%, 且趋于稳定, 野生蕨菜清除率达到 IC₅₀ 值所对应的浓度为 0.005 mg/mL^[12-18]。因此表明, 蕨菜中黄酮类化合物可以较好地清除 DPPH 自由基, 同时也说明其清除能力比维生素 C 强。

表 4 野生蕨菜中总黄酮与维生素 C 清除 DPPH 自由基结果

浓度 (mg/mL)	DPPH 自由基清除率 (%)	
	黄酮类化合物	维生素 C
0.026 4	88.05	76.70
0.021 1	88.04	75.83
0.015 8	87.96	63.00
0.010 6	81.60	45.55
0.007 9	77.31	39.62
0.005 3	53.66	31.68
0.004 0	44.76	30.54
0.002 6	31.41	27.05
0.001 3	19.90	22.69

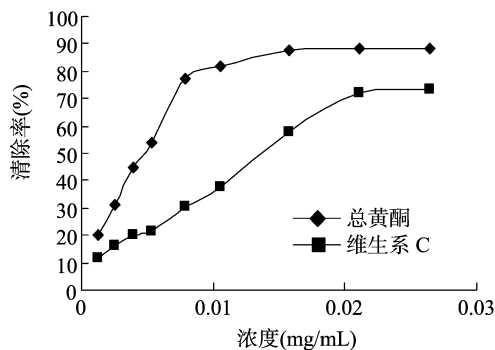


图 8 野生蕨菜中总黄酮、维生素 C 对 DPPH 自由基的清除能力

3 结论

超声辅助提取野生蕨菜总黄酮的最优条件为乙醇浓度 60%, 超声功率 240 W, 料液比 1 g : 35 mL, 时间 70 min, 超声温度 60 ℃。根据正交试验结果分析可知, 超声功率、超声温度对野生蕨菜中总黄酮的提取率具有显著影响。

野生蕨菜总黄酮对 DPPH 自由基具有很好的清除能力, 其 IC₅₀ 为 0.005 mg/mL, 表明野生蕨菜总黄酮具有较强的抗氧化活性。

参考文献:

- [1] 吴雨, 李红艳, 牛灿杰, 等. 竹叶中黄酮类化合物的研究进展[J]. 河南农业科学, 2015, 44(11): 1-4.
- [2] 张晓娟, 胡志萍, 周建军, 等. 蕨菜化学成分及开发应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(3): 119-121.
- [3] 朱慧, 马瑞君, 吴双桃, 等. 薇甘菊总黄酮的提取及清除羟自由基活性的测定[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 70-73.
- [4] 周志娥, 熊建华, 闵嗣璠, 等. 南瓜花黄酮超声波辅助提取工艺的研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(5): 1023-1025.
- [5] 钟姣姣, 李万林. 超声波辅助提取菊花中总黄酮工艺条件研究[J]. 皮革与化工, 2014, 31(3): 17-20, 33.
- [6] 邹玉红, 寇小燕, 韩秋霞. 超声波辅助法提取甘草总黄酮工艺的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(14): 8345-8347.
- [7] 郭英. 亚甲基蓝光度法测定银杏叶提取物的抗氧化活性[J]. 云南化工, 2007, 34(3): 38-40.
- [8] 徐丽娟, 房恒通, 沈景林, 等. 正交试验法优化蕨菜总黄酮的提取工艺[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(34): 19327-19330.
- [9] 李兆君. 3 个荞麦品种黄酮含量及清除自由基活性比较[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 355-356.
- [10] 刘晨, 刘安军, 马艳弘, 等. 蓝莓酒渣花色苷的超声波辅助提取工艺及抗氧化活性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 242-247.
- [11] 田应娟, 朱良, 陈健, 等. 超声强化提取橄榄黄酮类物质及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(1): 17-22.
- [12] 郑义, 邵颖, 陈安徽, 等. 益智仁总黄酮超声辅助提取工艺优化及其抗氧化性活性[J]. 食品科学, 2014, 35(6): 44-49.
- [13] 周功娥, 田呈瑞, 关为, 等. 陕西苦菜叶总黄酮的提取及抗氧化活性的测定[J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 97-102.
- [14] 卢文芸, 许文琴, 于锡忠, 等. 贵州野生蕨菜中总黄酮含量的测定与分析[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(5): 47-49.
- [15] 陈从瑾, 黄克瀛, 李德良, 等. 香椿叶总黄酮的超声波辅助提取及其清除 DPPH 自由基能力的研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 76-80.
- [16] 夏杏洲, 韩维栋, 杨维, 等. 白骨壤叶总黄酮的超声辅助提取及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(14): 20-24.
- [17] 冯学珍, 伍善广, 孔靖, 等. 超声辅助提取石菖多糖工艺优化及其清除 DPPH· 自由基活性研究[J]. 中药材, 2013, 36(11): 1870-1872.
- [18] 许瑞波, 周洪英, 陈林, 等. 地瓜叶总黄酮的超声辅助提取及生物活性研究[J]. 食品科学, 2013, 34(14): 141-146.