

软枣猕猴桃黄酮的提取及体外抗氧化研究

温 钢, 刘 海 燕, 杨 梅

(吉林化工学院 环境与生物工程学院, 吉林 吉林 132022)

摘 要:以软枣猕猴桃为试材,采用超声辅助乙醇浸提的方法,研究了乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间、超声功率等因素对软枣猕猴桃黄酮提取效率的影响。对黄酮精制纯化后进一步考察软枣猕猴桃黄酮的体外抗氧化能力。结果表明:最佳提取条件是以 70%(V/V)乙醇浓度为提取剂,料液比 1:8 g/mL,提取温度 70℃,提取时间 5 min,超声功率 300 W;软枣猕猴桃黄酮具有很好的 DPPH 自由基的清除能力,也具有一定的对羟基自由基和超氧阴离子自由基清除能力。

关键词:软枣猕猴桃;黄酮;提取;抗氧化

中图分类号:S 665.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0140-04

软枣猕猴桃(*Actinidia arguta*)属猕猴桃科猕猴桃属多年生木质藤本植物,别名软枣子、圆枣子、圆枣、奇异莓,分布于我国东北、华北、西北及长江流域^[1]。软枣猕猴桃果实的果型小巧,果面光滑无毛,种子小,非常适合鲜食和加工成整果罐头、果脯等。软枣猕猴桃果实营养丰富,富含多种功能性成分,如氨基酸、维生素及黄酮等,是开发功能保健食品的绝佳原料^[2-3]。

黄酮类化合物泛指 2 个具有酚羟基的苯环(A-与 B-环)通过中央三碳原子相互连结而成的一系列化合物。黄酮类化合物是一类具有广泛生物活性的物质,有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒,防治心血管疾病及增强人体免疫力等多种生物活性^[4]。该研究应用超声波辅助溶剂萃取的方法提取软枣猕猴桃黄酮,并进一步考察其体外抗氧化活性,以期为其进一步深度开发软枣猕猴桃生产相应黄酮类制品奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试软枣猕猴桃产地为吉林省吉林市;芦丁标准品由中国药品生物制品鉴定所提供;大孔树脂 HPD600 为河北沧州宝恩化工有限公司产品;1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH)为美国 Sigma 公司产品,其它试剂均为国产分析纯。

ALC-1100.2 电子天平(德国赛多利斯股份公司);VIS-7220 可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);DHG-9146A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备

有限公司);HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);ALC-210.4 电子分析天平(德国赛多利斯股份公司);Himac CR-21G 高速冷冻离心机(日本日立公司);scientz-hf1000 超声波循环提取机(宁波新芝科技有限公司);RE-25AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);ALPHA 1-2LD PLUS 冻干机(德国 CHRIST 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 软枣猕猴桃黄酮提取及测定 软枣猕猴桃鲜果洗净后,擦拭吸干果实表面水分并匀浆,准确称取 10.0 g 匀浆,以乙醇为提取剂同时辅以超声波处理,提取结束后,10 000 r/min 离心 15 min,取上清液定容至 100 mL^[5]。以芦丁为标准品,采用 AlCl₃ 比色法^[6]测定总黄酮含量,并计算黄酮提取率。

1.2.2 软枣猕猴桃黄酮的精制 上述提取液减压蒸馏除去乙醇后加适量石油醚(60-90)萃取除去脂溶性杂质,分离水相加正丁醇萃取至无色,取正丁醇相旋转蒸发浓缩至无液体,以适量蒸馏水溶解后,2 mL/min 上样至大孔树脂 HPD600 层析柱(1.6 cm×20 cm),充分平衡后 70%乙醇为流动相进行洗脱,洗脱液流速为 2 mL/min。收集洗脱液,减压蒸馏除去乙醇后冷冻干燥得到棕黄色粉末状软枣猕猴桃黄酮提取物。

1.2.3 软枣猕猴桃黄酮提取条件的考察 提取温度对黄酮提取率的影响:以 70%(V/V)乙醇浓度为提取剂,料液比为 1:8 g/mL,提取时间为 5 min,超声功率 300 W,考察提取温度(40、50、60、70、80℃)对黄酮提取率的影响;料液比对黄酮提取率的影响:以 70%(V/V)乙醇浓度为提取剂,提取温度 70℃,提取时间为 5 min,超声功率 300 W,考察料液比(1:2、1:4、1:6、1:8、1:10 g/mL)对黄酮提取率的影响;提取时间对黄酮提取率的影响:以 70%(V/V)乙醇浓度为提取剂,料液比为

第一作者简介:温钢(1976-),男,硕士,讲师,现主要从事多糖的提取与活性等研究工作。E-mail:315554062@qq.com.

收稿日期:2014-11-10

1:8 g/mL,提取温度 70℃,超声功率 300 W,考察提取时间(2、4、5、6、8、10 min)对黄酮提取率的影响;乙醇浓度对黄酮提取率的影响:料液比为 1:8 g/mL,提取温度 70℃,提取时间 5 min,超声功率 300 W,考察乙醇浓度(50%、60%、70%、80%、90%、100%)对黄酮提取率的影响;超声功率对黄酮提取率的影响:以 70%(V/V)乙醇浓度为提取剂,料液比为 1:8 g/mL,提取温度 70℃,提取时间 5 min,考察超声功率(100、200、300、400、500、600、700 W)对黄酮提取率的影响。

1.2.4 软枣猕猴桃黄酮抗氧化能力考察 清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)能力的测定:取 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2) 4.5 mL,去离子水 4.2 mL,混匀,25℃保温 20 min 后,立即加入 1 mL 待测样品和 25℃预热的 25 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.4 mL,迅速摇匀后于 25℃反应 3 min 后,每隔 30 s 测 1 次 325 nm 吸光度值。以去离子水调零,以抗坏血酸作为阳性对照^[7],计算线性范围内每分钟吸光度值的增加。超氧阴离子自由基清除率(%)=($A_0 - A_t$)/ $A_0 \times 100\%$,式中, A_0 为空白组,即邻苯三酚的自氧化速率; A_t 为加入待测样品溶液后邻苯三酚氧化速率。清除羟基自由基($\cdot OH$)能力的测定:取 9 mmol/L 水杨酸钠-乙醇溶液、9 mmol/L $FeSO_4$ 溶液、8.8 mmol/L H_2O_2 溶液及待测样品各 1 mL,混匀后 37℃保温 30 min,510 nm 下测定各样品吸光度值,以抗坏血酸为阳性对照^[8]。羟自由基清除率(%)=1-[($A_t - A_0$)/ A_0] $\times 100\%$,式中, A_0 为以去离子水代替样品的空白对照吸光度值, A_t 为反应体系中不加 H_2O_2 引发反应的吸光度值; A_t 为体系中加入 H_2O_2 引发反应后的吸光度值。清除 DPPH 自由基能力的测定:取 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液 2 mL,待测样品 1 mL 及 95%乙醇 1 mL,混匀室温反应 30 min,517 nm 下测定吸光值 A_t ,以 95%乙醇为空白对照,测定 A_0 。抗坏血酸为阳性对照^[9]。DPPH 清除率(%)=($A_0 - A_t$)/ $A_0 \times 100\%$,式中, A_0 为空白对照的吸光度值, A_t 为样品的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 软枣猕猴桃黄酮提取条件的考察

2.1.1 提取温度对黄酮提取率的影响 由图 1 可知,在 40~80℃内,提取温度对黄酮提取率的影响变化不大,提取温度为 70℃时,黄酮提取率相对较高。

2.1.2 料液比对黄酮提取率的影响 由图 2 可知,黄酮提取率随着料液比的增加呈现上升趋势,当料液比达到 1:8 g/mL 以后,继续增加料液比,黄酮提取率增幅缓慢,初步确定较适宜的料液比为 1:8 g/mL。

2.1.3 提取时间对黄酮提取率的影响 由图 3 可知,黄酮提取率随着提取时间的增加呈现先急剧上升后缓慢下降的趋势,在提取时间为 5 min 时,提取率达最高值。

2.1.4 乙醇浓度对黄酮提取率的影响 由图 4 可以看出,乙醇浓度在 50%~70%范围时,黄酮提取率随乙醇

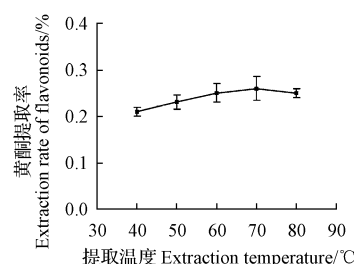


图 1 提取温度对软枣猕猴桃黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on the extraction rate of flavonoids from *Actinidia arguta*

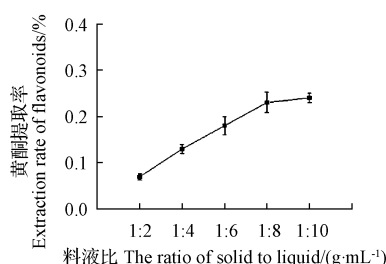


图 2 料液比对软枣猕猴桃黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effect of ratio of solid to liquid on extraction rate of flavonoids from *Actinidia arguta*

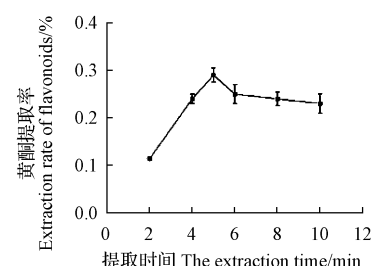


图 3 提取时间对软枣猕猴桃黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on extraction rate of flavonoids from *Actinidia arguta*

浓度的升高而呈现上升趋势,乙醇浓度大于 70%后又随着乙醇浓度的增加又缓慢下降。乙醇浓度变化会影响到提取体系的极性,70%乙醇的极性应该与黄酮极性相近,因此有较高的提取率。

2.1.5 超声功率对黄酮提取率的影响 由图 5 可知,超声功率小于 300 W 时,随超声功率黄酮提取率逐渐增大,超声功率达到 300 W 以后,提取率又逐渐下降。过低的功率,使得样品细胞破碎不充分;过高的功率又有可能破坏黄酮分子,因此 300 W 为适宜的超声功率。

2.2 软枣猕猴桃黄酮抗氧化能力考察

2.2.1 清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)能力 由图 6 可知,试验浓度范围内软枣猕猴桃黄酮具有一定的清除超氧阴离子自由基的能力,且随着黄酮浓度的增加呈现上升趋势,在浓度达到 2 500 mg/L 后清除率不再明显增加,

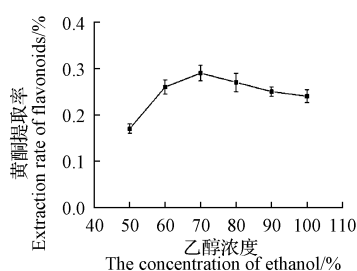


图 4 乙醇浓度对软枣猕猴桃黄酮提取率的影响

Fig. 4 The effect of concentration of ethanol on extraction rate of flavonoids from *Actinidia arguta*

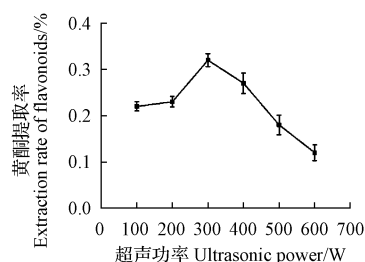


图 5 超声功率对软枣猕猴桃黄酮提取率的影响

Fig. 5 The effect of ultrasonic power on extraction rate of flavonoids from *Actinidia arguta*

最高清除率仅为 29%,在试验测定浓度范围内未达到 EC_{50} 值,而作为阳性对照的抗坏血酸在浓度为 216.5 mg/L 即达到其 EC_{50} 值,在浓度达到 1 500 mg/L 后清除率超过 90%。

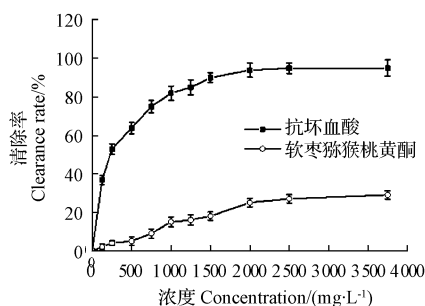


图 6 软枣猕猴桃黄酮清除超氧阴离子自由基能力

Fig. 6 Ability of *Actinidia arguta* flavonoids scavenging superoxide anion

2.2.2 清除羟基自由基($\cdot OH$)能力 由图 7 可知,试验测定浓度范围内软枣猕猴桃黄酮也具有一定的清除羟基自由基的能力,与清除超氧阴离子自由基的能力相似,试验测定浓度范围内未达到 EC_{50} 值,在浓度为 2 500 mg/L 有最高的清除率 33%。对比阳性对照抗坏血酸在 153 mg/L 即达到了 EC_{50} 值而言,软枣猕猴桃黄酮清除羟基自由基的能力也相对较弱。

2.2.3 清除 DPPH 自由基能力 由图 8 软枣猕猴桃黄酮清除 DPPH 自由基能力的考察结果可知,软枣猕猴桃

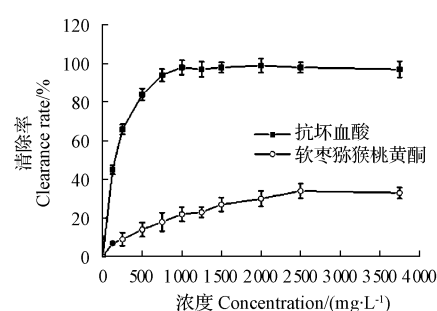


图 7 软枣猕猴桃黄酮清除羟基自由基能力

Fig. 7 Ability of *Actinidia arguta* flavonoids scavenging the hydroxyl radical

桃黄酮具有很好的清除 DPPH 自由基的能力,在相对较低的浓度即可很好的清除 DPPH 自由基。在浓度为 174.2 mg/L 即达到其 EC_{50} 值,与阳性对照抗坏血酸的 EC_{50} 值 107.8 mg/L 接近,在浓度为 750 mg/L 对 DPPH 自由基的清除率已达 90%以上。

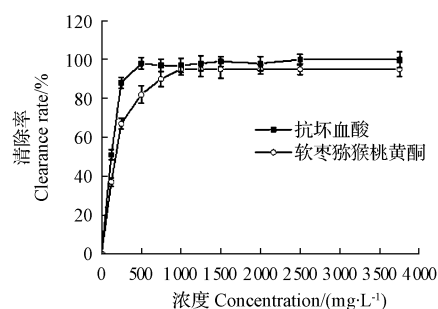


图 8 软枣猕猴桃黄酮清除 DPPH 自由基能力

Fig. 8 Ability of *Actinidia arguta* flavonoids scavenging the DPPH radical

3 结论

该研究表明,在以 70%(V/V)乙醇浓度为提取剂,料液比为 1:8 g/mL,提取温度 70℃,提取时间 5 min,超声功率 300 W 的试验条件下有较高的黄酮提取率,在对提取得到的黄酮类物质进一步精制纯化基础上又考察了软枣猕猴桃黄酮的体外抗氧化能力,结果发现软枣猕猴桃黄酮具有很好的 DPPH 自由基的清除能力,同时也具有一定的对羟基自由基和超氧阴离子自由基清除能力。软枣猕猴桃含有较高的黄酮类物质,如能对其进一步深入开发利用,在可充分利用野生资源的同时,又可以获取经济效益,具有广阔的市场前景和重要意义。

参考文献

- [1] 赵淑兰. 软枣猕猴桃品种简介[J]. 特种经济动植物, 2002(2):35.
- [2] 王菲,许金光,刘长江. 软枣猕猴桃中功能保健成分及其在食品加工中的应用[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8):421-423.
- [3] Matich A J, Young H, Allen J M, et al. *Actinidia arguta*: volatile compounds in fruit and flowers[J]. Phytochemistry, 2003, 63(3):285-301.
- [4] 张培成. 黄酮化学[M]. 北京:化学工业出版社, 2008:227-243.

野生泡囊侧耳的鉴定及其驯化栽培

李 蝶, 吴 浩, 李 红 玉, 雷 雨 霞, 刘 斌

(广西大学 农学院, 应用微生物研究所, 广西 南宁 530003)

摘 要:以采自广西大学校园内泡囊侧耳为试材, 对其进行形态特征、培养特征、ITS 序列 (Gene Bank 登录号为: KJ868811) 等鉴定, 并进行生物学特性研究, 并利用棉籽壳、玉米芯、木糠、甘蔗渣、桑枝屑为主料进行栽培试验, 以期今后的品种使用者提供栽培方面的参考数据。结果表明: 确定该菌株为泡囊侧耳 *Pleurotus cystidiosus*; 在 5 种供试碳源中, 泡囊侧耳的菌丝利用淀粉最好; 在 6 种供试氮源中, 发现利用酵母粉最佳; 泡囊侧耳的菌丝能在碳氮比 10:1~60:1 范围内生长, 但以 40:1 为最好; 最适 pH 7.0; 最适生长温度范围为 25.0~30.0℃, 其中以 27.5℃ 为最佳; 以木糠为主料时其生物学效率最高可达到 43.33%, 单菇重为 79.51 g/袋。

关键词:泡囊侧耳; ITS; 生物学特性; 栽培

中图分类号:S 646.1⁺4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0143-04

泡囊侧耳 (*Pleurotus cystidiosus*) 其在分类学上隶属于真菌门、担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、侧耳科、侧耳属。

第一作者简介:李蝶 (1989-), 女, 硕士, 现主要从事食用菌栽培等研究工作。E-mail: 385726147@qq.com

责任作者:刘斌 (1966-), 男, 博士, 教授, 现主要从事食用菌及植物保护等研究工作。E-mail: liubin@gxu.edu.cn

基金项目:广西科学研究与技术开发计划资助项目 (桂科攻 1222012-1B); 国家食用菌产业技术体系广西创新团队建设专项资助项目。

收稿日期:2014-11-19

又名泡囊状侧耳、台湾平菇、鲍鱼菇、栎侧耳、裂皮侧耳、高温平菇、盖囊菇^[1]。泡囊侧耳是食、药兼用的珍稀食用菌之一^[2], 是一种高温季节发生的珍稀菌类, 是适宜春末、夏季及初秋栽培的新品种^[3], 是我国近年推广的一种高温型侧耳^[4]。泡囊侧耳菇体形态优美, 色泽诱人, 肉质肥厚, 菌柄粗壮, 质脆味美, 营养丰富^[5]。泡囊侧耳蛋白质含量高于大部分蔬菜, 富含维生素及矿物质。泡囊侧耳原产于印第安纳的红枫。台湾栽培的鲍鱼菇曾被报道为侧耳属的一个新种 *Pleurotus abalones*, 后被处理为泡囊侧耳的异名。该研究所用泡囊侧耳采集

[5] 王菲, 栾云峰, 刘长江, 等. 响应面分析法优化微波辅助提取软枣猕猴桃黄酮[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(9): 6-11.

[6] 何书美, 刘敬兰. 茶叶中总黄酮含量测定方法的研究[J]. 分析化学研究简报, 2007, 35(9): 1365-1368.

[7] Yen G C, Chen H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in reaction to their antimutagenicity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(1): 27-32.

[8] Winterbourn C C, Sutton H C. Hydroxyl radical production from hydrogen peroxide and enzymatically generated paraquat radicals: catalytic requirements and oxygen dependence [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1984, 235(1): 116-126.

[9] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(6): 945-948.

Extraction of Flavonoids from *Actinidia arguta* and Its Antioxidant Activity *in vitro*

WEN Gang, LIU Hai-yan, YANG Mei

(School of Environmental and Biological Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin, Jilin 132022)

Abstract: Taking *Actinidia arguta* as test material, ultrasonic assisted extraction method was used to study the ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction temperature, extraction time, ultrasonic power and other factors affecting flavonoid extraction efficiency of *Actinidia arguta*. After purification the flavonoids was used for investigated antioxidant activity *in vitro*. The results showed the appropriate extracted conditions were chosen as follows: ethanol concentration was 70% (V/V), solid-liquid ratio was 1:8 g/mL, extraction temperature was 70℃, extraction time was 5 min, and ultrasonic power was 300 W. *Actinidia arguta* flavonoid showed a good DPPH free radical scavenging activity, and it also had hydroxyl radicals and superoxide anion free radical scavenging ability.

Keywords: *Actinidia arguta*; flavonoids; extraction; antioxidant