

超声波提取芦笋皮中黄酮类化合物 及其抗氧化活性的研究^①

谢建华¹, 胡小华¹, 李志明¹, 庞杰², 郑振峰¹

1. 福建漳州职业技术学院 食品与生物工程系, 福建 漳州 363000; 2. 福建农林大学 食品科技学院, 福州 350002

摘要: 应用超声波技术, 以芦笋皮为原料提取黄酮类化合物, 探讨超声波的提取时间、超声波功率、乙醇浓度、温度及料液比等因素对其总黄酮提取效果的影响. 通过单因素试验与正交试验分析得出最佳提取工艺条件: 超声波强度为 100%、提取时间为 75 min、乙醇浓度 80%、温度为 75 °C、料液比为 1:100. 该工艺条件下提取黄酮类化合物提取含量为 10.23 mg/g. 芦笋皮中黄酮类化合物对氧自由基和羟自由基均有较强的抑制和清除能力, 其抗氧化活性随着样品浓度的增大而增强, 且抗氧化活性强于芦丁和抗坏血酸.

关键词: 芦笋皮; 正交实验; 黄酮类化合物; 超声辅助提取; 抗氧化

中图分类号: TS255.36

文献标志码: A

芦笋(*Asparagus officinalis* L.)是一种营养丰富的蔬菜^[1-2]. 现代医学研究表明, 芦笋含有天冬酰胺及盐类, 还含有黄酮类化合物、抗坏血酸(Vc), 甘露聚糖、胆碱和精氨酸等, 所以具有抗癌作用及改善免疫的功能, 还具有耐疲劳、耐缺氧、镇痛、抗衰老、降血脂及保肝解毒等多项生理功能^[3-7]. 因此, 芦笋是开发医药、保健和绿色食品的重要资源. 但根据最新研究, 从芦笋的皮中发现含有丰富的蛋白质、游离氨基酸、矿物质、维生素、膳食纤维等, 其中黄酮类物质作为功能因子之一起着重要的作用.

目前国内外有关研究芦笋中黄酮类化合物的提取工艺很多, 主要有有机溶剂提取法、热水提取法(仅限于提取苷类)、碱性稀醇或碱性水提取法、系统溶剂提取法等^[8-11]. 在上述的几种提取方法中, 用水作溶剂浸提黄酮类化合物虽然存在无残留溶剂的优点, 但收率是很低的, 并且由于其极性大, 易把蛋白质、糖类、无机盐等易溶于水的成分提取出来, 因此易霉变, 一般提取液存放 10 d 左右就会有发霉、变质现象, 同时还有提取液过滤、浓缩等操作困难且费时, 固体黄酮含量低等缺点. 超声波就具有特殊的生物效应, 选择适当的超声参数可以使植物细胞的细胞壁间形成较多的小孔, 从而可以增强细胞膜的透性和选择性. 针对以上提出的问题以及黄酮类化合物的特性, 应用超声波技术, 以芦笋皮为原料提取黄酮类化合物, 确定超声辅助提取的最佳工艺条件, 并测定了芦笋皮中黄酮类化合物对氧自由基的抑制能力和对羟自由基的清除能力, 以期为进一步开发芦笋皮资源提供理论依据.

1 材料与方法

① 收稿日期: 2011-04-27

基金项目: 漳州市科技项目(z05011).

作者简介: 谢建华(1976-), 男, 福建龙海人, 硕士, 讲师, 主要从事农产品深加工及产品开发生的研究.

通信作者: 庞杰, 博士生导师, 研究员.

1.1 材料与仪器

材料: 芦笋皮, 取于福建紫山集团有限公司, 洗净后于干燥箱中 60~70 °C 烘干 3~4 h, 取出粉碎, 过 100 目筛备用; 芦丁, 生化试剂(西安惠丰生化集团股份有限公司); 乙醇、亚硝酸钠、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、氢氧化钠等均为分析纯(广东西陇化工厂生产)。

仪器: FW100 型粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); SHB-III 循环式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); 电热恒温水浴锅(北京医疗器械厂); 752 型分光光度计(上海分光光度计厂); 电热鼓风干燥箱(上海沪南科学仪器联营厂)。

1.2 试验设计

1.2.1 单因素试验设计

采用超声波辅助法提取芦笋皮中黄酮类化合物, 研究不同超声波功率、乙醇浓度、提取温度、提取时间、料液比等因素对黄酮类化合物提取效果的影响。

1) 不同超声波强度的提取试验

在乙醇浓度 60%, 料液比为 1:60, 提取温度 60 °C, 提取时间 30 min 的条件下, 比较不同超声波强度(总额定功率为 250W 的 20%, 40%, 60%, 80%, 100%)对黄酮类化合物提取效果的影响, 以选取最佳超声波强度。

2) 不同乙醇浓度的提取试验

在超声波强度为 100%, 提取时间为 30 min, 温度为 60 °C, 料液比 1:60 的条件下, 比较不同乙醇浓度(60%, 70%, 80%, 90%, 100%)对黄酮类化合物提取效果的影响, 以选取最佳乙醇浓度。

3) 不同温度的提取试验

在超声波强度为 100%, 料液比为 1:60, 乙醇浓度 80%, 提取时间 30 min 的条件下, 比较不同提取温度(30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C)对黄酮类化合物提取效果的影响, 以选取最佳温度。

4) 不同料液比的提取试验

在超声波强度为 100%, 乙醇浓度 80%, 提取温度 70 °C, 提取时间 30 min 的条件下, 比较不同料液比(1:20, 1:40, 1:60, 1:80, 1:100)对黄酮类化合物提取效果的影响, 以选取最佳料液比。

5) 不同时间的提取试验

在超声波强度为 100%, 乙醇浓度 80%, 料液比 1:80, 提取温度 70 °C 的条件下, 比较不同提取时间(15, 30, 45, 60, 75 min)对黄酮类化合物提取效果的影响, 以选取最佳提取时间。

1.2.2 正交试验设计

在以上单因素的基础上, 以超声波强度、乙醇浓度、提取时间、料液比、温度为因素设计正交试验, 以确定超声波辅助提取芦笋皮中黄酮类化合物的最佳工艺条件。

1.3 试验方法

1.3.1 芦丁标准曲线的绘制

黄酮化合物的测定以芦丁为标样, 采用亚硝酸钠—硝酸铝比色法^[12-13]: 准确吸取芦丁标准液 0, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 mL, 相当于芦丁 0, 75, 150, 300, 450, 600 μg , 移入 25 mL 比色管中加入 30%乙醇溶液至 5 mL, 各加 5%亚硝酸钠 0.3 mL, 混匀, 放置 5 min 后加入 10%硝酸铝 0.3 mL, 摇匀放置 6 min 后加入 4%氢氧化钠 2 mL, 再用 30%乙醇定容至 25 mL, 摇匀, 放置 10 min 后于 510 nm 处比色测定, 得出吸光度值, 得回归方程。

1.3.2 芦笋皮中黄酮化合物提取及测定方法

先准确称取 5.0 g 芦笋皮粉末, 用提取剂按照一定的料液比溶解于 500 mL 容量瓶中, 在一定的条件下进行提取, 同时重复 3 次提取实验, 然后各自定容至 500 mL, 再用循环式多用真空泵抽滤得滤液, 准确移取滤液 5.0 mL 于 25 mL 比色管中加入 5%亚硝酸钠 1 mL, 混匀, 放置 5 min 后加入 10%硝酸铝 1 mL, 摇

匀放置 6 min 后加入 40% 氢氧化钠 10 mL, 再用 30% 乙醇定容至 25 mL, 摇匀, 放置 10 min 后于 510 nm 处比色测定, 得出吸光度值, 以芦丁作参照物利用标准曲线计算样品总黄酮含量.

$$\text{总黄酮含量}(\text{mg/g}) = \frac{nCV}{m \times 1000}$$

式中: C 为从回归方程中求得的芦丁的量(mg/L);

n 为提取液稀释的倍数;

V 为提取液的体积(mL);

m 为芦笋皮的重量(g).

1.3.3 超氧阴离子自由基($\text{O}_2^- \cdot$)清除率的测定方法

此实验利用邻苯三酚自氧化反应测定清除剂对其产生的超氧阴离子自由基的清除作用^[14].

1.3.4 羟自由基清除率测定方法

利用 Fenton 反应检测各种自由基清除剂对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用^[14].

2 结果与分析

2.1 总黄酮标准曲线

以芦丁为标液所测的标准曲线如图 1.

2.2 单因素试验

2.2.1 超声波强度对提取效果的影响

试验结果如图 2 所示:

由图 2 可以看出, 随着超声波强度的升高, 芦笋皮总黄酮提取效果呈上升趋势. 这是由于超声能产生空化效应, 具有粉碎、搅拌等特殊功能, 使其植物组织在溶剂中瞬时产生的空化泡的崩溃, 而使组织中的细胞破裂, 有利于溶剂渗透植物组织内部, 使细胞中的黄酮成分进入乙醇中, 加速相互渗透、溶解, 以增加黄酮在乙醇中的溶解度. 由图 2 看出提取强度在 100% 的条件下所得黄酮类物质的提取量为最高, 所以超声波强度以 100% 为最佳.

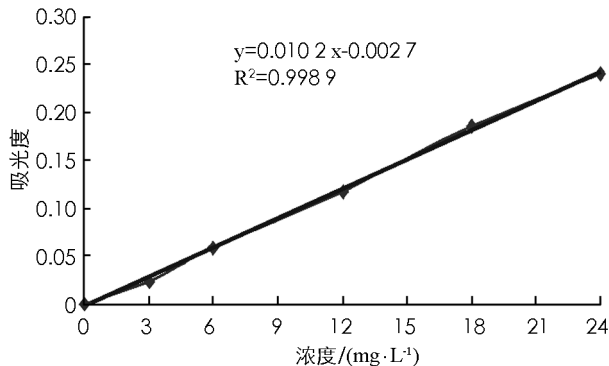


图 1 芦丁标准曲线

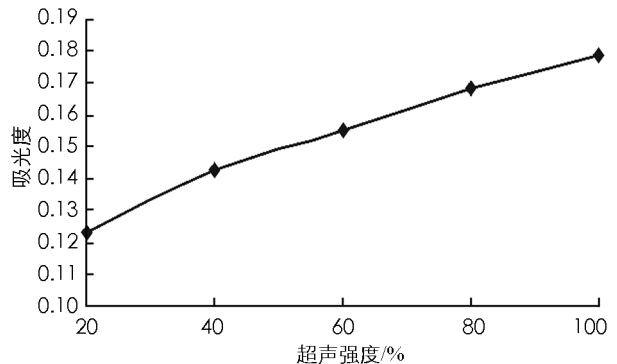


图 2 超声强度对提取效果的影响

2.2.2 乙醇浓度对提取效果的影响

试验结果如图 3 所示:

由图 3 可以看出, 芦笋皮中的黄酮提取效果随乙醇浓度的增加而升高, 但浓度达到 80% 后反而下降. 这可能是由于乙醇浓度过高时, 一些醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分溶出量增加, 与黄酮类化合物竞争或与乙醇结合, 从而导致黄酮类化合物提取效果下降, 因此超声波提取的最适乙醇浓度为 80%.

2.2.3 温度对提取效果的影响

试验结果如图 4 所示:

由图 4 可以看出, 随着提取温度的升高, 芦笋皮总黄酮提取效果呈上升趋势, 提取温度在 70 °C 的条件下所得黄酮类物质的提取量为最高, 所以提取温度以 70 °C 为最佳。

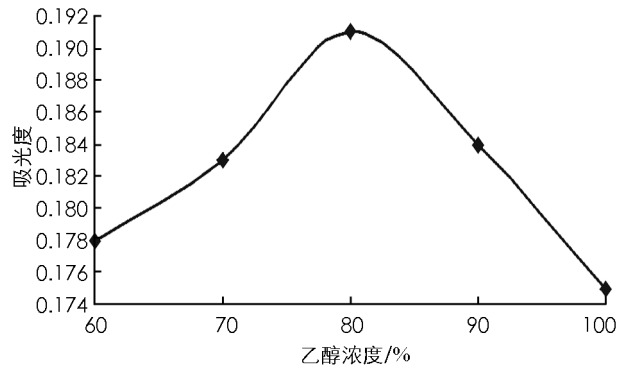


图 3 乙醇浓度对提取效果的影响

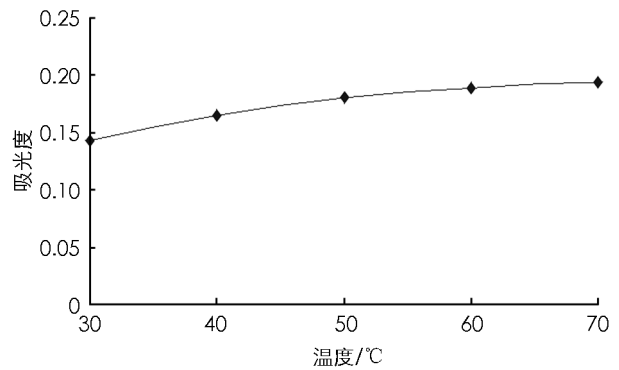


图 4 温度对提取效果的影响

2.2.4 料液比对提取效果的影响

试验结果如图 5 所示:

由图 5 可以看出, 随料液比的增大, 黄酮提取效果随着增加, 在料液比为 1 : 100 的条件下所得黄酮类物质的提取效果最好, 但从 1 : 60 到 1 : 100 的范围内增幅很小, 从节约成本, 综合考虑, 采用 1 : 80 的料液比较合理。

2.2.5 超声提取时间对提取效果的影响

试验结果如图 6 所示:

由图 6 可以看出, 随超声波处理时间的延长, 黄酮提取效果随着增加, 但在 30~60 min 范围内增幅不明显。所以时间为 45 min 比较适合。

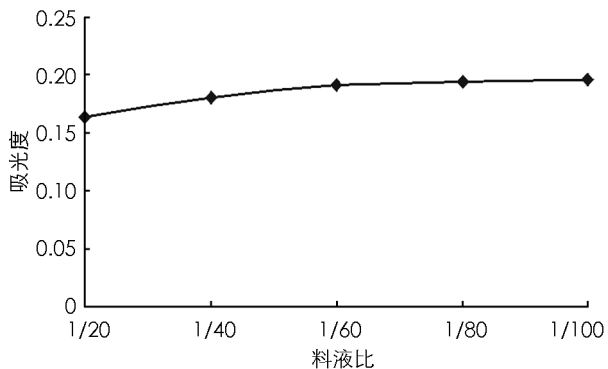


图 5 料液比对提取效果的影响

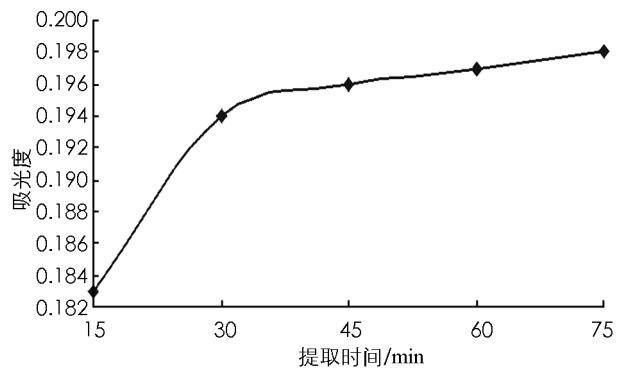


图 6 提取时间对提取效果的影响

2.3 正交试验

在单因素试验基础上, 确定乙醇浓度、超声强度、料液比、提取时间及温度 5 个因素进行正交试验设计^[15], 因子水平见表 1, 试验结果及极差分析见表 2。

表 1 正交实验因素水平表 $L_{16}(4^5)$

水平	因 素				
	A 强度/%	B 乙醇浓度/%	C 温度/°C	D 料液比	E 时间/min
1	70	60	60	1 : 70	30
2	80	70	65	1 : 80	45
3	90	80	70	1 : 90	60

4

100

90

75

1 : 100

75

表 2 超声提取黄酮类化合物正交试验设计与结果

序号	A 强度/%	B 乙醇浓度/%	C 温度/℃	D 料液比	E 时间/min	总黄酮含量/(mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	1	1	7.01
2	1	2	2	2	2	7.06
3	1	3	3	3	3	7.42
4	1	4	4	4	4	7.56
5	2	1	2	3	4	7.39
6	2	2	1	4	3	7.61
7	2	3	4	1	2	7.54
8	2	4	3	2	1	7.07
9	3	1	3	4	2	7.86
10	3	2	4	3	1	8.15
11	3	3	1	2	4	8.79
12	3	4	2	1	3	8.57
13	4	1	4	2	3	9.32
14	4	2	3	1	4	9.23
15	4	3	2	4	1	9.26
16	4	4	1	3	2	8.97
K ₁	29.05	31.58	32.38	32.35	31.49	
K ₂	29.61	32.05	32.28	32.24	31.43	
K ₃	33.37	33.01	31.58	31.93	32.92	
K ₄	36.78	32.17	32.57	32.29	32.97	
\bar{K}_1	7.26	7.90	8.10	8.09	7.87	T=128.81
\bar{K}_2	7.40	8.01	8.07	8.06	7.86	
\bar{K}_3	8.34	8.25	7.90	7.98	8.23	
\bar{K}_4	9.20	8.04	8.14	8.07	8.24	
R	1.93	0.36	0.25	0.11	0.39	

由表 2 可见, 超声波对提取黄酮类化合物效果的影响大小依次为超声强度、时间、乙醇浓度、温度、料液比。最佳条件是超声强度为 100%、提取时间为 75 min、乙醇浓度 80%、温度为 75 ℃、料液比为 1:100。验证实验证明提取工艺 A₄E₄B₃C₄D₁ 得到黄酮类化合物含量为 10.23 mg/g。

2.4 超声波提取黄酮类化合物的抗氧化作用

2.4.1 黄酮类化合物清除超氧阴离子自由基(O₂⁻·)的作用

超氧阴离子自由基是第一个生成的氧自由基, 又是所有氧自由基的前身, 可以转化为其他氧自由基。芦笋皮黄酮类化合物对邻苯三酚-鲁米诺发光体系产生的 O₂⁻ 的清除作用如表 3 和图 7 所示。结果表明, 提取物、芦丁和 Vc 对超氧阴离子都有清除能力, 且清除能力随提取物、芦丁和 Vc 浓度升高而增强。从清除率达 50% 比较看, 提取物清除超氧阴离子自由基的能力均强于芦丁和 Vc, 这说明超声波提取物对超氧阴离子的清除能力较高。

表 3 芦笋皮提取液清除超氧阴离子自由基的能力

提取物	浓度	清除率	IC ₅₀ 值	提取物	浓度	清除率	IC ₅₀ 值	提取物	浓度	清除率	IC ₅₀ 值
	/(mg·L ⁻¹)	/%	/(mg·L ⁻¹)		/(mg·L ⁻¹)	/%	/(mg·L ⁻¹)		/(mg·L ⁻¹)	/(mg·L ⁻¹)	/%
超声波 提取物	30	11.6	96.3	Vc (CK)	30	22.4	107.4	芦丁 (CK)	30	11.3	126.9
	60	23.4			60	25.3			60	23.1	
	90	45.1			90	42.5			90	39.5	
	120	69.9			120	56.3			120	47.6	
	150	79.3			150	74.9			150	60.5	

2.4.2 黄酮类化合物清除羟自由基(OH·)的作用

羟自由基是活性氧中最活泼的氧自由基之一, 它几乎能与活细胞中任何分子发生反应, 可介导机体组

织脂质过氧化, 蛋白质解聚、聚合, 核酸断裂和多糖裂解等生化过程, 引发组织细胞病变而导致各种疾病发生和加速机体衰老. 芦笋皮黄酮类化合物对羟自由基的清除作用如表 4 和图 8 所示, 芦笋皮中提取物、芦丁和 Vc 具有较高的清除(OH·)活性能力, 且其清除能力随着浓度的增加而逐渐递增. 以清除率达 50% 比较看, 提取物清除羟自由基的能力强于芦丁和 Vc.

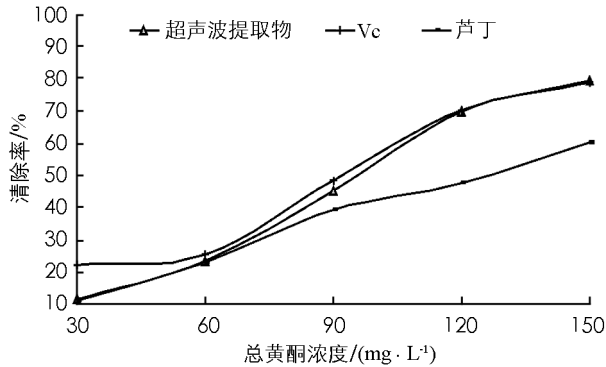


图 7 芦笋提取液对

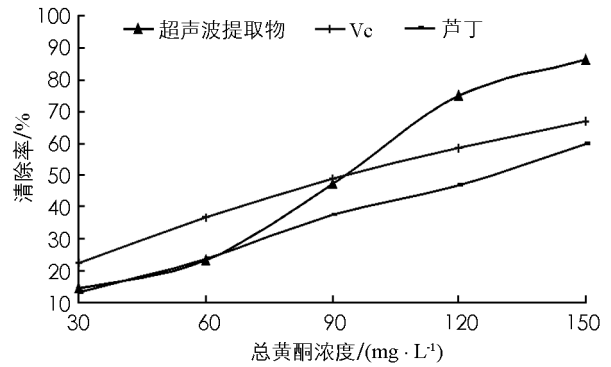
超氧阴离子自由基(O₂⁻·)的清除作用

图 8 芦笋提取液对

羟自由(OH·)的清除效果

表 4 芦笋皮提取液清除清除羟自由基的能力

提取物	浓度 /(mg·L ⁻¹)	清除率 /%	IC ₅₀ 值 /(mg·L ⁻¹)	提取物	浓度 /(mg·L ⁻¹)	清除率 /%	IC ₅₀ 值 /(mg·L ⁻¹)	提取物	浓度 /(mg·L ⁻¹)	清除率 /%	IC ₅₀ 值 /(mg·L ⁻¹)
超声波 提取物	30	14.4	93.3	Vc (CK)	30	22.4	104	芦丁 (CK)	30	13.5	126.5
	60	23.3			60	36.8			60	23.7	
	90	47.3			90	41.9			90	37.6	
	120	74.9			120	58.7			120	46.8	
	150	86.1			150	66.9			150	59.7	

3 结 论

1) 通过单因素实验和正交实验表明, 超声波对提取黄酮类化合物效果的影响大小依次为超声波强度、时间、乙醇浓度、温度、料液比. 最佳条件是超声波强度为 100%、提取时间为 75 min、乙醇浓度 80%、温度为 75 ℃、料液比为 1:100. 验证实验证明提取工艺 A₄E₄B₃C₄D₁ 得到黄酮类化合物含量为 10.23 mg/g. 超声波技术应用于芦笋皮中黄酮类化合物的提取是可行的, 具有高效、节能、无污染、经济效益高等优点, 而且其提取物不易发霉变质, 同时后续操作简便.

2) 通过对芦笋皮黄酮类提取物在体外清除超氧阴离子与羟自由基活性进行了研究. 结果表明黄酮类化合物对超氧阴离子与羟自由基清除能力随浓度升高而增强. 从清除率达 50% 比较看, 芦笋皮黄酮类提取物较对维生素 C 和芦丁强, 其机理有待进一步研究.

参考文献:

- [1] 孙春艳, 赵伯涛, 郁志芳, 等. 芦笋的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2004(5): 1-5.
- [2] 张素华, 夏秋艳, 朱 强. 芦笋营养成分分析与加工品质改善的研究 [J]. 食品工业科技, 2002(6): 16-18.
- [3] 谢建华, 高惠安, 庞 杰, 等. 芦笋皮风味饮料的研制 [J]. 河南科技大学学报: 自然科学版, 2007(5): 54-56.
- [4] 周利亘, 王春辉, 王君虹, 等. 芦笋的活性成分及其生物学功能 [J]. 安徽农学通报, 2006, 12(2): 23-25.
- [5] AMER M, EL-HABIBI E, EL-GENDY A. Effects of Trifolium Alexandrinum Extracts on Streptozotocin-Induced Diabetes in Male Rats [J]. Annals of Nutrition & Metabolism, 2004, 48(5): 343-347.
- [6] PRIOR R L, CAO G. Antioxidant Capacity and Polyphenolic Components of Teas: Implications for Altering in Vivo Antioxidant Status [J]. Proc Soc Exper Biol Med, 1999, 220(4): 255-261.

- [7] RIETVELD A, WISEMAN S. Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials [J]. *The Journal of Nutrition*, 2003, 133(10): 2385—2392.
- [8] 孙春艳. 芦笋茎叶中黄酮类化合物和多糖的提取纯化研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [9] 尹礼国, 钟耕, 张超. 苦竹叶黄酮浸膏制备工艺研究 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2008(1): 114—118.
- [10] 王正云. 芦笋中黄酮类化合物的提取及纯化工艺的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2005.
- [11] 段雅庆. 芦笋中黄酮和多糖的复合提取及其抗氧化活性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [12] 丁利君, 吴振辉, 蔡创海, 等. 金银花中黄酮类物质最佳提取工艺的研究 [J]. *食品科学*, 2002, 23(2): 62—66.
- [13] 王建梅. 芦笋中黄酮类物质的分析方法研究 [J]. *中国食物与营养*, 2003(8): 9—40.
- [14] 雷明. 桂花果类黄酮分离纯化工艺及其抗氧化研究 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2011(4): 77—80.
- [15] 王钦德, 杨坚. *食品试验设计与统计分析* [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 330—361.

Ultrasonic-Assisted Technology for Extracting Flavonoids from the Asparagus Skin and Their Anti-oxidation

XIE Jian-hua¹, HU Xiao-hua¹,
LI Zhi-ming¹, PANG Jie², ZHENG Zhen-feng¹

1. Department of Food and Biology Engineering, Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou 363000, China;

2. College of Food Science And Technology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: The ultrasonic extraction technology was used to extract total flavonoids from asparagus skin, and the influences of extraction time, ultrasonic power, ethanol concentration, temperature and solid-to-liquid ratio on the extraction percent of the flavonoids were analyzed through a single-factor test and an orthogonal experiment. The optimum conditions obtained were: ultrasonic power 60%, time of extraction 100 min, ethanol concentration 80%, temperature for extraction 75 °C and the ratio of material to solvent 1:100. With these technological conditions, the content of flavonoids of the extract was 10.23 mg/g. Flavonoids of asparagus peel was able to scavenge oxygen and hydroxy radicals, their clearing effect was enhanced with increasing flavonoid concentration of the samples, and the extract showed a stronger anti-oxidative activity than rutin and ascorbic acid.

Key words: asparagus skin; orthogonal experiment; flavonoids; ultrasonic-assisted extraction; anti-oxidation

责任编辑 汤振金