

枳椇果梗不同极性多酚及抗氧化活性研究

向进乐^{1,2}, 李志西^{2,*}, 李欢², 吴清华², 郑淑彦²

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003;

2. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以不同极性有机溶剂对枳椇果梗多酚进行萃取分离, 对各部分多酚进行紫外-可见光谱扫描确定其紫外吸收特性; 以FC法测定总酚含量, 通过清除DPPH自由基、ABTS^{•+}能力测定和Fe³⁺还原法, 对不同极性多酚体外抗氧化活性进行评价。结果表明: 液-液萃取可以实现不同极性多酚的有效分离, 枳椇果梗不同极性多酚萃取物均有特征紫外吸收; 不同极性部分的多酚含量、抗氧化活性有显著差异。枳椇果梗多酚含量和抗氧化活性强弱次序为: 水相>正丁醇相>乙酸乙酯相>氯仿相。枳椇果梗多酚以极性酚为主。

关键词: 枳椇果梗; 多酚; 萃取分离; 体外抗氧化活性

Separation and Antioxidant Activity of Polyphenols with Different Polarities from *Hovenia acerba* Fruit

XIANG Jin-le^{1,2}, LI Zhi-xi^{2,*}, LI Huan², WU Qing-hua², ZHENG Shu-yan²

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Different polyphenol extracts (crude methanol extract and its fractions soluble in ethyl acetate, chloroform, *n*-butanol and water) obtained from *Hovenia acerba* fruit stalks using organic solvents with different polarity were tested for their UV absorption characteristics in the range of 200–700 nm and polyphenol contents, and their antioxidant activity was assessed based on the ability to scavenge DPPH and ABTS free radicals and reduce ferric ions *in vitro*. The results indicated that liquid-liquid extraction was a successful method for separating polyphenols with different polarities. The crude extract and its different fractions had different spectral characteristics. A significant difference in total polyphenol content and antioxidant activity was observed among the crude extract and its different fractions. Four different fractions of the crude extract could be ranked in the following order: water-soluble fraction > *n*-butanol-soluble fraction > ethyl acetate-soluble fraction > chloroform-soluble fraction. Therefore, polar polyphenols were dominant in *Hovenia acerba* fruit stalks.

Key words: *Hovenia acerba* fruit; polyphenol; separation; antioxidant activity *in vitro*

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0025-05

枳椇为鼠李科枳椇属(*Hovenia thunb*)植物, 又称拐枣、鸡拐子、半甜夜等。全世界有3个种, 两个变种。我国除东北、内蒙古、新疆、宁夏、青海和台湾外, 各省区均有分布^[1]。枳椇属植物多以枳椇子入药, 即枳椇干燥成熟的种子, 关于枳椇子生物活性成分和生理功能及其作用机制等方面已有诸多报道^[1-2]。枳椇果梗肉质肥大、酸甜, 占枳椇果总质量的90%左右^[4]。但关于的枳椇果梗的研究开发只有零星报道。这可能与其个体小、外形扭曲、残渣多、适口性较差有关。

目前报道的枳椇果梗初级加工制品有枳椇果梗汁饮

料^[3-6]、果酒^[7]、果醋^[8]和酸乳^[9]等产品。本课题组以枳椇果梗为原料, 采用液态深层发酵法酿制出风味独特的枳椇果梗酒、果醋, 并对枳椇醋的保健功能进行了初步研究, 发现枳椇醋具有较强的体外抗氧化作用、良好的减肥降脂作用, 对急性酒精中毒以及由酒精引起的慢性肝损伤也有很好的预防作用^[10]。邹礼根等^[11]也发现枳椇果梗水提物具有一定的解酒效果。对枳椇果梗的化学成分的研究也有少量报道。符树根^[3]、江庆中^[4]对枳椇果梗基本化学组成进行了研究, 发现鲜果中含有大量糖分、有机酸、氨基酸和维生素等, 其中总糖含量35.13%、

收稿日期: 2010-12-07

基金项目: 国家级大学生科技创新项目(091071202)

作者简介: 向进乐(1980—), 男, 讲师, 博士研究生, 主要从事植物活性成分研究。E-mail: xiangjinlexinong@163.com

* 通信作者: 李志西(1958—), 男, 教授, 博士, 主要从事发酵功能食品研究。E-mail: lizhxi@nwsuaf.edu.cn

还原糖 17.23%、总酸 390mg/100g、抗坏血酸 44mg/100g。枳椇果梗中有机酸组成^[12]、多糖^[13]含量测定也有少量报道。

多酚是植物原料的一种重要次生代谢产物,是绝大多数植物性食品和药材的活性成分。枳椇果梗中含有二氢杨梅素等酚类物质^[14],但枳椇果梗多酚物质含量、特性、生理功能等方面的研究尚未见报道。本实验采取液-液萃取法对枳椇果梗不同极性多酚进行分离;以L-抗坏血酸为标准物质,采用3种体外抗氧化方法研究枳椇果梗不同极性多片段段的抗氧化活性,为枳椇属植物进一步综合开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枳椇果梗采自西安市临潼区龙河西岸南姚村。

没食子酸(纯度≥98%) 成都曼斯特生物科技有限公司;Folin-Ciocalteu 试剂 上海荔达生物科技有限公司;DPPH、ABTS 美国 Sigma 公司;L-抗坏血酸、铁氰化钾、三氯化铁、甲醇、K₂S₂O₈、Na₂CO₃等常规试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-2550 双光束紫外分光光度计、UVmini 1240 单孔紫外分光光度计 日本岛津公司;旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;KH5200B 超声清洗机 昆山禾创超声设备有限公司;电子天平 北京塞多利斯天平有限公司;电热恒温水浴锅 北京科伟永兴仪器有限公司;HZS-H 恒温水浴振荡器 哈尔滨东明医疗仪器厂;移液器 上海大龙医疗设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 不同极性提取物的制备

枳椇果梗干样→80% 甲醇超声提取 30min,重复3次→合并滤液减压浓缩

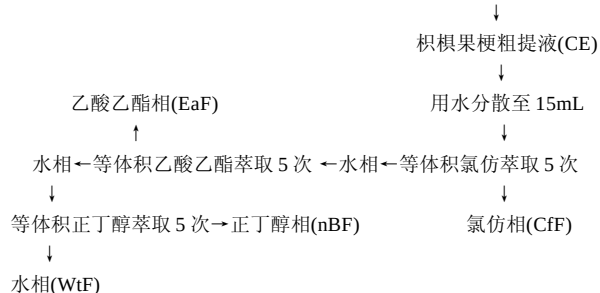


图1 枳椇果梗不同极性萃取物制备流程

Fig.1 Extraction and separation of polyphenols with different polarities from *Hovenia acerba* fruit stalks

参考 Liu 等^[15]的方法略有改动。称取2份样品各1g加20mL 80% 甲醇水溶液40℃超声提取30min,低速离心得滤液,滤渣重复提取两次,合并滤液,减压蒸干。

一份加甲醇溶解定容至5mL得粗提物(CE)备用,分析前用甲醇稀释。另一份用水分散至15mL左右得枳椇果梗多酚粗提取水溶液,依次用等体积氯仿、乙酸乙酯、正丁醇依次恒温振荡萃取5min,重复萃取5次,合并各萃取相,减压浓缩去除有机溶剂,不同极性萃取物甲醇溶解定容至5mL,得氯仿相(CfF)、乙酸乙酯相(EaF)、正丁醇相(nBF)、水相(WtF)样品溶液。萃取流程见图1。

1.3.2 不同极性萃取物的紫外光谱扫描

将枳椇果梗甲醇粗提取物和不同极性萃取物分别稀释适当倍数,参考 Neo 等^[16]的方法,在波长190~700nm范围扫描,分别记录其紫外-可见光谱图。

1.3.3 多酚含量的测定

总酚含量采用Folin-Ciocalteu法测定,参考 Zhou 等^[17]的方法略有改动。分别取样0.1mL加水稀释至1mL,加Folin-Ciocalteu试剂0.6mL混匀,3min后加20%的Na₂CO₃溶液1.5mL,定容至10mL,30℃避光反应60min,测定反应体系在波长750nm处的吸光度。以没食子酸做标准曲线,线性回归方程为 $y = 0.1192x + 0.011$ ($R^2 = 0.9995$),线性范围1.21~8.47mg/L。枳椇果梗不同极性萃取物多酚含量以没食子酸计(mg/L)。

1.3.4 不同极性多酚的VC(mg/100mL)等量抗氧化能力(VC eqval antioxidant capacity, VCEAC)测定

1.3.4.1 L-VC标准曲线的绘制^[18]

VC标准溶液的DPPH标准曲线:配制0、2、4、6、8、10、12、14mg/100mL的L-VC标准溶液,分别取150μL标准溶液加到4.85mL DPPH甲醇溶液中,避光反应30min后以甲醇做对照在波长517nm处测定吸光度,空白以相同体积甲醇代替标准溶液反应,计算不同质量浓度标准溶液DPPH自由基清除率。以L-VC质量浓度(mg/100mL)为横坐标,对DPPH自由基清除率(%)为纵坐标作图,得出标准曲线方程: $y = 6.2414x - 1.0151$ ($R^2 = 0.9993$),线性范围为2~14mg/100mL。

VC标准溶液的ABTS标准曲线:配制0、2、4、6、8、10mg/100mL的L-VC标准溶液,取200μL不同质量浓度标准溶液加4.8mL ABTS溶液混匀,避光反应15min,以无水乙醇为对照测定吸光度,空白以相同体积甲醇代替样品反应,计算不同质量浓度标准溶液ABTS⁺清除率。以L-VC质量浓度(mg/100mL)为横坐标,ABTS⁺清除率(%)为纵坐标作图,得出标准曲线方程: $y = 9.9099x - 1.4916$ ($R^2 = 0.9977$),线性范围为2~10mg/100mL。

VC标准溶液还原Fe³⁺能力标准曲线:配制0、2、4、6、8、10mg/100mL的L-VC标准溶液,取1mL不同质量浓度标准溶液,加入2.5mL磷酸盐缓冲液(0.2mol/L,

pH6.6)混匀,再加入1%铁氰化钾2.5mL混匀,50℃恒温反应20min后,加1mL 10%三氯乙酸混匀,3000r/min离心10min;取上清液2.5mL,加水2.5mL稀释,再加入0.1% FeCl₃ 0.5mL,避光反应10min后在波长700nm处测定吸光度,计算不同质量浓度标准溶液还原Fe³⁺能力。以L-抗坏血酸质量浓度(mg/100mL)为横坐标,还原Fe³⁺反应后体系吸光度为纵坐标作图,得出标准曲线方程: $y=0.0959x-0.0736(R^2=0.9816)$,线性范围为2~10mg/100mL。

1.3.4.2 清除DPPH自由基能力测定

参考Kim等^[19]的方法略有改动。25mg DPPH溶解到甲醇溶液中,定容到100mL,使用时稀释10倍到25mg/L,现配现用。取150μL样品(根据质量浓度适当稀释)加到4.85mL DPPH甲醇溶液中,避光反应30min后以甲醇作对照在波长517nm处测定吸光度,空白以相同体积甲醇代替样品反应,计算样品DPPH自由基清除率,最终结果以VC(mg/100mL)等量抗氧化能力VCEAC表示。

1.3.4.3 清除ABTS⁺·能力测定

参考Re等^[20]方法略有改动,ABTS⁺·的产生使用ABTS与K₂S₂O₈反应体系。ABTS⁺·由5mL 7mmol/L ABTS溶液和88μL 140mmol/L K₂S₂O₈水溶液避光反应12~16h后生成。使用前用无水乙醇稀释至吸光度在波长734nm处为1.00±0.02,当天使用。200μL样品(根据浓度适当稀释)加4.8mL ABTS溶液混匀,避光反应15min,以无水乙醇为对照测定吸光度,空白以相同体积甲醇代替样品反应,计算样品ABTS⁺·清除率,最终结果以VC(mg/100mL)等量抗氧化能力VCEAC表示。

1.3.4.4 还原Fe³⁺能力测定

参考Rai等^[21]方法略有改动。分别取样品溶液(根据质量浓度取不同体积)加水稀释至1mL,加入2.5mL磷酸盐缓冲液(0.2mol/L, pH6.6)混匀,再加入1%铁氰化钾2.5mL混匀,50℃恒温反应20min后,加1mL 10%三氯乙酸混匀,3000r/min离心10min;取上清液2.5mL,加水2.5mL稀释,再加入0.1% FeCl₃ 0.5mL,避光反应10min后在波长700nm处测定吸光度,计算样品还原Fe³⁺能力,最终结果以VC(mg/100mL)等量抗氧化能力VCEAC表示。

1.3.5 统计分析

实验重复3次,采用DPS6.55数据处理软件对实验结果进行分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性差异以A、B、C、D($P < 0.01$)不同字母表示。

2 结果与分析

2.1 枳椇果梗不同极性萃取物的紫外光谱特征

枳椇果梗不同极性萃取物在190~700nm范围的紫外

扫描图如图2所示。枳椇果梗甲醇粗提物及其不同极性萃取组分在紫外区均有特征吸收,粗提物(CE)最大吸收波长为287nm、氯仿相(CfF)为281nm、乙酸乙酯相(EaF)为292nm、正丁醇相(nBF)为279nm、水相(WtF)为278nm。5个不同萃取物的紫外光谱特征均具有多酚物质的紫外吸收特性。其中,强极性的正丁醇相和水相紫外光谱图非常相似。另外,氯仿相在可见区还有两个特征吸收峰,分别在波长664nm和410nm处。因为即使是完全成熟的枳椇果梗,表皮仍然呈现绿色,波长664nm处符合叶绿素a的可见吸收特征,波长410nm处可能为胡萝卜素或叶黄素的特征吸收^[22]。

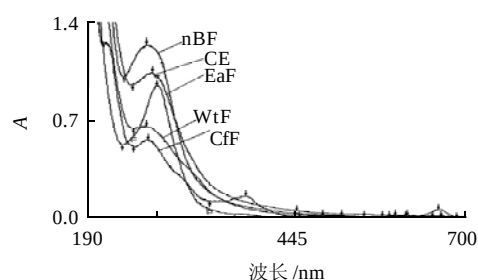
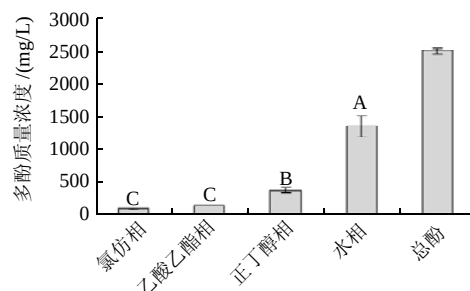


图2 枳椇果梗粗提物(CE)、氯仿相(CfF)、乙酸乙酯相(EaF)、正丁醇相(nBF)、水相(WtF)紫外光谱特征

Fig.2 UV-visible absorption spectra of crude methanol extract and its fractions from *Hovenia acerba* fruit stalks

2.2 多酚含量



字母不同表示差异显著($P < 0.01$)。下同。

图3 不同极性萃取物多酚含量

Fig.3 Total polyphenol contents of crude methanol extract and its fractions *Hovenia acerba* fruit stalks

总酚含量以Folin-Ciocalteu法测定,结果根据标准曲线计算,枳椇果梗提取物总酚质量浓度为2513.28mg/L,氯仿相为84.17mg/L,乙酸乙酯相为129.37mg/L,正丁醇相为379.05mg/L,水相为1357.22mg/L。由图3可以看出,极性与弱极性萃取物总酚含量具有显著差异($P < 0.01$)。溶剂极性越强,总酚含量越高。根据相似相溶原理可知枳椇果梗多酚以极性酚为主,极性酚显著高于弱极性酚含量。由于萃取过程中的损失,溶剂萃取物

总酚含量为 1949.8mg/L, 小于枳椇果梗提取物总酚含量 2513.28mg/L。

2.3 清除 DPPH 自由基能力

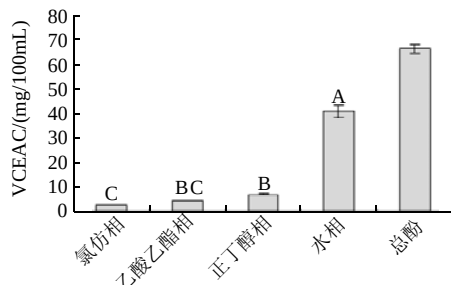


图4 不同极性萃取物清除 DPPH 自由基能力

Fig.4 DPPH scavenging activities of crude methanol extract and its fractions from *Hovenia acerba* fruit stalks

DPPH 自由基是一种很稳定的以氮为中心的自由基, 若受试物能将其清除, 则表明受试物具有降低羟自由基、烷基自由基或过氧化自由基的有效浓度和打断脂质过氧化链的作用^[23]。采用 1.3.4.2 节的方法测定不同极性枳椇果梗多酚对 DPPH 自由基的清除作用, 根据标准曲线, 计算不同极性样品溶液清除 DPPH 自由基能力的 VC 当量浓度(VCEAC)分别为氯仿相 2.57mg/100mL、乙酸乙酯相 4.09mg/100mL、正丁醇相 6.82mg/100mL、水相 40.76mg/100mL、粗提物 66.37mg/100mL。由图 4 可知, 水相清除 DPPH 自由基能力最强, 与其他 3 相均具有显著差异($P < 0.01$)。极性酚清除 DPPH 自由基能力强, 可能与枳椇果梗多酚以极性酚为主有关。

2.4 清除 ABTS⁺· 能力

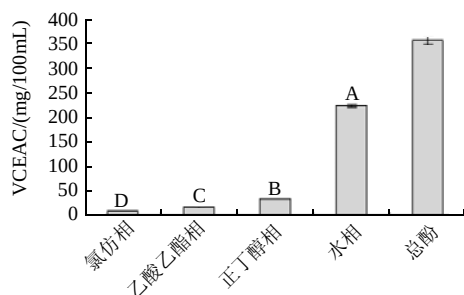


图5 不同极性萃取物清除 ABTS⁺· 能力

Fig.5 ABTS scavenging activities of crude methanol extract and its fractions from *Hovenia acerba* fruit stalks

ABTS 与一定浓度的过硫酸钾避光反应 12~16h, 经活性氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基 ABTS⁺·。若提取物具有抗氧化活性, 则会与 ABTS⁺· 发生反应而使反应体系褪色^[23]。

以 L-VC 为标准物质, 计算不同极性样品溶液清

除 ABTS⁺· 能力 VC 当量浓度(VCEAC)分别为氯仿相 7.89mg/100mL、乙酸乙酯相 16.46mg/100mL、正丁醇相 35.02mg/100mL、水相 225.25mg/100mL、粗提物 358.02 mg/100mL。由图 5 可以看出, 4 种不同极性多酚萃取物清除 ABTS⁺· 能力相互间均具有显著差异($P < 0.01$)。清除 ABTS⁺· 能力表现出类似清除 DPPH 自由基能力的趋势。

2.5 还原 Fe³⁺ 能力

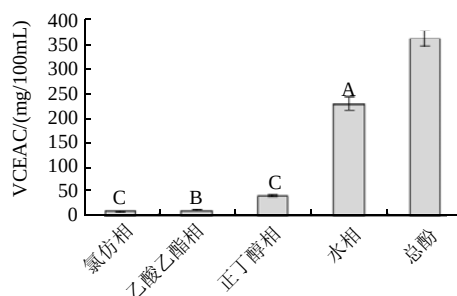


图6 不同极性萃取物还原 Fe³⁺ 能力

Fig.6 Ferric reducing power of crude methanol extract and its fractions from *Hovenia acerba* fruit stalks

抗氧化剂供应电子使 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺, 根据测定的吸光度大小可反映出样品的还原能力, 吸光度越大, 还原 Fe³⁺ 能力越强^[23]。以 L-VC 为标准物质, 计算不同极性样品溶液还原 Fe³⁺ 能力 VC 当量浓度(VCEAC)分别为氯仿相 9.02mg/100mL、乙酸乙酯相 11.24mg/100mL、正丁醇相 41.11mg/100mL、水相 230.11mg/100mL、粗提物 365.22mg/100mL。由图 6 可以看出, 极性多酚与弱极性多酚对 Fe³⁺ 还原能力具有显著差异($P < 0.01$), 氯仿相与乙酸乙酯相的还原能力较弱, 两者无显著差异。不同极性多酚对 Fe³⁺ 的还原能力表现出与清除 DPPH 自由基和 ABTS⁺· 相似的趋势。

3 结 论

采取有机溶剂萃取能将不同极性枳椇果梗多酚分离, 不同极性枳椇果梗多酚溶液具有显著的紫外特征吸收, 枳椇果梗粗提物(CE)最大吸收波长为 287nm、氯仿相(CfF)为 281nm、乙酸乙酯相(EaF)为 292nm、正丁醇相(nBF)为 279nm、水相(WtF)为 278nm。

枳椇果梗不同极性萃取物总酚含量、抗氧化活性差异显著, 极性越大多酚含量越高、抗氧化活性越强, 即: 水相>正丁醇相>乙酸乙酯相>氯仿相。枳椇果梗多酚以极性酚为主。枳椇果梗多酚的组成、鉴定以及其他生理活性有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 张晶, 李慧萍, 弓晓杰, 等. 枳椇属植物化学成分及生物活性研究进

- 展[J]. 天然产物研究与开发, 2006(18): 674-680.
- [2] 嵇扬, 陆红. 枳椇子研究进展[J]. 中草药, 2002, 39(9): 5-7.
- [3] 符树根, 江庆中. 枳椇果梗特性与饮料开发研究[J]. 中国林副特产, 2007(6): 21-23.
- [4] 江庆中, 符树根. 枳椇综合利用研究[J]. 江西林业科技, 2004(6): 3-6.
- [5] 黎继烈, 吴耀辉. 枳椇保健饮料的研制[J]. 食品与机械, 2004, 20(6): 54-56.
- [6] 李维新, 何志刚, 林晓姿, 等. 拐枣的营养保健功能及其果汁饮料的研制[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 249-251.
- [7] 黎继烈. 枳椇果梗酒的酿制工艺[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(12): 71-73.
- [8] 邵伟, 乐超银, 唐明, 等. 野生拐枣保健醋的开发研究[J]. 中国调味品, 2002 (11): 16-18.
- [9] 黎继烈, 吴耀辉. 枳椇酸乳加工工艺研究[J]. 经济林研究, 2004, 22 (2): 27-29.
- [10] 赵晓野. 枳椇醋解酒护肝减肥降脂功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [11] 邹礼根, 柳爱春, 刘超, 等. 拐枣水提取液对小白鼠解酒的作用[J]. 浙江农业科学, 2010(1): 109-110.
- [12] 贾春晓, 熊卫东, 毛多斌, 等. 拐枣果梗中有机酸成分的GC-MS分析[J]. 中国食品学报, 2005, 5(1): 72-74.
- [13] 朱炯波, 赵虹桥, 董爱文, 等. 拐枣中多糖的提取与含量测定[J]. 林产化工通讯, 2005, 39(1): 27-30.
- [14] YOSHIKAWA M, UEDA T, MURAOKA O, et al. Absolute stereostructures of hovenidulcosides A1 and A2, bioactive novel triterpene glycosides from *Hoveniae semen seu Fructus*, the seeds and fruit of *Hovenia dulcis* Thunb[J]. Chem Pharm Bull, 1995, 43: 532-534.
- [15] LIU Lixiang, SUN Yi, LAURA T, et al. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng[J]. Food Chemistry, 2009, 112: 35-41.
- [16] NEO Y P, ARIFFIN A, TAN C P. Determination of oil palm fruit phenolic compounds and their antioxidant activities using spectrophotometric methods[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2008, 43: 1832-1837.
- [17] ZHOU Kequan, YU Liangli. Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in *Colorado*[J]. LWT, 2006, 39: 1155-1162.
- [18] 叶挺祥. 丹酚酸 B 对血管内皮细胞 NO 合成的影响[D]. 天津: 天津大学, 2006.
- [19] KIM D O, LEE K W, LEE H J, et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity(VCEAC)of phenolic phytochemicals[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50 (13): 3713-3717.
- [20] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9/10): 1231-1237.
- [21] RAI A K, PRAKASH M, APPAIAH K A A. Production of *Garcinia* wine: changes in biochemical parameters, organic acids and free sugars during fermentation of *Garcinia must*[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 45(7): 1330-1336.
- [22] 陈新香, 蔡碧琼, 蔡珠玉. 芦荟皮叶绿素的提取及稳定性研究[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(1): 175-180.
- [23] 杜国荣. 猕猴桃(*Actinidia*)、柿(*Diospyros kaki* L.)和苹果(*Malus domestica* Borkh.)果实的抗氧化能力及其抗氧化活性成分的分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.