

小叶女贞总黄酮的提取及对橄榄保鲜效果的研究

周相助, 叶清华, 张舒婷, 陈清西*, 钟凤林*

福建农林大学园艺学院, 福州 350002

摘要: 本试验研究小叶女贞叶片总黄酮的高效提取方法及其对橄榄果实的保鲜效果, 通过单因素和正交试验, 得出用超声法提取总黄酮的最佳工艺条件, 并将总黄酮分别稀释成 2、4、8 倍用于橄榄的涂膜保鲜。得出总黄酮最佳提取工艺条件为液固比 25:1 (mL/g)、功率 540 W、乙醇浓度 60%、提取时间 4 h, 提取得率为 4.71%; 橄榄经总黄酮处理 69 d 后, 好果率最高为稀释 8 倍、其次是 4 倍且与对照差异显著, 2 倍显著低于对照, 另外, 橄榄鲜食品质也均好于对照, 可溶性总糖含量下降延缓, 糖酚比提高, 多酚含量下降加速。研究结果为利用小叶女贞总黄酮提供了试验依据。

关键词: 小叶女贞; 总黄酮; 橄榄; 保鲜

中图分类号: TS255.3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.1.018

Extraction of Total Flavonoids from *Ligustrum quihoui* Carr and Its Preservative Effects on Chinese Olive

ZHOU Xiang-zhu, YE Qing-hua, ZHANG Shu-ting, CHEN Qing-xi*, ZHONG Feng-lin*

College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: In this study, an efficient method for the extraction of total flavonoids from the leaves of *Ligustrum quihoui* was developed, the preservative effects of the extracted flavonoids on Chinese olives were investigated. The extraction conditions were optimized by single factor and orthogonal experiments. The 2 times, 4 times and 8 times diluents of the extracted flavonoids, were subjected to fresh Chinese olives. The experimental results showed that the optimal extraction conditions were liquid-solid ratio of 25:1 (mL/g), ultrasonic power of 540 W, ethanol concentration of 60%, extraction time of 4 h, under these conditions, the extraction yield of flavonoids from *L. quihoui* was 4.71%. The Chinese olives were dealt after 69 days by the total flavonoids diluents. The experimental results showed that the highest rate of good fruit was 8 times diluent, followed the 4 times diluent. They were significantly superior to that of control, but the good fruit rate of 2 times diluent was significantly inferior to that of control. In addition, the quality of fresh-eating was also significantly superior to that of control. The decreasing of soluble total sugar content was delayed, the ratio of polyphenol and sugar was increased, and the content of polyphenol was slowly declined. These results can be applied for the analysis of total flavonoids from the leaves of *L. quihoui*.

Key words: *Ligustrum quihoui* Carr; total flavonoids; Chinese olive; fresh-keeping

小叶女贞 (*Ligustrum quihoui* Carr.) 为木犀科女贞属植物, 药用价值高, 能清热解毒, 是一种值得开发的植物资源, 李晓蒙^[1] 等的研究表明, 小叶女贞的化学成分主要是萜类、总黄酮类物质等。其中总黄酮是一类多酚类化合物, 具有抗肿瘤^[2]、抗氧化功能^[3], 能够有效地抑菌^[4]、清除氧自由基, 防止细

胞衰老、退化等多方面的积极作用, 有研究^[5,6] 表明将总黄酮提取液用于水果的保鲜可以取得较好的保鲜效果。本试验在前人的基础上研究了小叶女贞叶片总黄酮的高效提取方法及其对橄榄 (Chinese olive) 果实的保鲜。橄榄在采摘、运输、储藏过程中容易因摩擦而导致果实品质变差; 目前多采用较传统的保鲜技术或直接用化学药剂保鲜, 不仅保鲜效果较差而且还严重影响果实口感风味; 橄榄属于果皮果肉同食型水果, 化学药剂残留会对人体造成不同程度的伤害, 为保证橄榄鲜食安全性, 本试验研究了植物天然成分总黄酮对橄榄果实的保鲜, 为天然保

收稿日期: 2015-07-28 接受日期: 2015-12-03

基金项目: 国家科技支持计划 (2007BAD07B01); 福建省科技重大专项 (2013NZ0002-4); 福建省自然科学基金 (2012D085); 福州市科技计划 (2009-N-55)

* 通讯作者 Tel: 86-591-83789299; E-mail: cqx0246@fafu.edu.cn

鲜剂的开发利用提供了重要的理论依据。

1 材料与仪器

1.1 试验材料

新鲜小叶女贞叶(2013年11月采自福建农林大学校园)、橄榄果实采自闽侯县城关农场。

1.2 仪器

电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),BPG-9140A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司),FW177 中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),KQ-600DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),DK-S24 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司),艾柯实验室专用超纯水机(成都唐氏康宁科技发展有限公司),高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司),TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.3 试剂

$C_{12}H_{22}O_{11}$ 、蒽酮、 $CH_3COOC_2H_5$ 、 H_2SO_4 (浓)、双蒸水、 $C_6H_2(OH)_3COOH$ 、无水乙醇(AR)、芦丁(BR)、 $NaNO_2$ (AR)、 $Al(NO_3)_3$ (AR)、 $NaOH$ (AR),试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 芦丁标准曲线的绘制

芦丁标准曲线绘制参考刘江邹等^[7]的方法,在最大吸收波长(510 nm)下分别测定不同质量芦丁的吸光度。以芦丁质量 C 对吸光度 A 进行回归,得回归方程 $y = 1.2556x + 0.0054$ (y 为吸光度, x 为芦丁质量,单位是 mg/mL) 和相关系数 $R^2 = 0.9994$ 。

2.2 小叶女贞总黄酮的提取

本实验用超声法作为小叶女贞总黄酮提取的方法,并以乙醇作为提取试剂。本试验研究了4个因素即液固比、乙醇浓度、超声功率、提取时间对总黄酮提取得率的影响,并设置3个水平进行正交试验。再根据试验设计条件组合对小叶女贞总黄酮进行提取,总黄酮提取方法如下:准确称取小叶女贞粉末 0.400 g,根据试验组合加入乙醇,在一定功率下超声一定时间,然后在 10000 rpm 下离心 5 min,分离上清液,得总黄酮提取液。

2.3 小叶女贞总黄酮的含量测定

总黄酮含量测定的方法,参照魏永生^[8]的分光光度法:取小叶女贞叶片总黄酮提取液 1 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入 1 mL 5% $NaNO_2$ 溶液,摇匀后静置 6 min 后,加入 1 mL 10% $Al(NO_3)_3$,摇匀静置 6 min 后再加入 5 mL 4% 的 $NaOH$ 溶液,混匀,用 70% 乙醇定容至刻度,15 min 后测定其在 510 nm 处的吸光度。并根据回归方程求得总黄酮含量,并按如下公式计算提取得率:

$$\text{总黄酮提取得率} = \frac{C \times V_T \times N}{m \times V_S} \times 100\%$$

式中,C 表示依据标准曲线计算出的总黄酮含量(mg), V_T 为提取液体积(mL), N 为稀释倍数, m 为小叶女贞干重(mg), V_S 测定时样品提取液体积(mL)。

2.4 小叶女贞总黄酮提取工艺正交试验

通过对单因素试验结果分析,用乙醇浓度、液固比、提取时间、超声功率四个因素作为参考指标,进行 $L_9(3^4)$ 的正交试验(表 1)。最后对试验结果进行数据分析,得出小叶女贞总黄酮提取的最优工艺。

表 1 超声法提取工艺参数

Table 1 Factors and levels of ultrasonic extraction

水平 Level	因素 Factors			
	(A)乙醇浓度(%) Ethanol concentration	(B)液固比 Liquid-solid ratio	(C)时间(h) Time	D 功率(W) Power
1	60	15:1	3.0	420
2	70	20:1	3.5	480
3	80	25:1	4.0	540

2.5 小叶女贞总黄酮对橄榄的保鲜研究

用最佳的总黄酮提取工艺条件大量提取总黄酮并制备一定体积的母液,然后将其稀释成 2 倍、4

倍、8 倍(总黄酮浓度为 942、471、236 mg/L)的总黄酮稀释液,用于橄榄的浸果,同时用 ddH₂O 浸果作为对照组。将浸泡 10 min 后的橄榄包装好置于室

温环境中贮藏,每隔 6 d 取一次样,进行好果率和影响橄榄鲜食品质指标(可溶性总糖、多酚、糖酚比)的测定,其中好果率的测定方法参考刘江邹^[7]等人的试验、橄榄可溶性总糖含量的测定采用蒽酮比色法,具体参考王学奎^[9]标准线性方程多酚标准曲线的绘制方法、橄榄多酚的测定方法参考谢倩等^[10,11]的橄榄多酚含量测定方法的比较,并绘制标准曲线。

2.6 数据统计分析

本试验数据的方差分析和回归分析采用 SPSS Statistics 数据处理系统,并结合 Microsoft Excel2013。

表 2 超声法正交试验结果

Table 2 Orthogonal experimental results of ultrasonic extraction

处理号 No.	A	B	C	D	提取得率 Extraction yield(%)
1	1	1	1	1	3.31
2	1	2	2	2	4.13
3	1	3	3	3	4.71
4	2	1	2	3	3.71
5	2	2	3	1	3.27
6	2	3	1	2	3.83
7	3	1	3	2	2.88
8	3	2	1	3	3.27
9	3	3	2	1	2.92
k1	4.05	3.30	3.47	3.17	
k2	3.60	3.56	3.59	3.61	
k3	3.02	3.82	3.62	3.90	
R	1.03	0.52	0.15	0.73	

3.2 小叶女贞总黄酮对橄榄保鲜效果

橄榄贮藏室内的温湿度变化如图 1 所示。贮藏室内 T 比较稳定,但 RH 变化较大,这对橄榄的贮藏有一定的影响。橄榄果实在贮藏过程中,光泽度、饱满度略有降低以及后期果实皮表略微皱缩,但均比对照好,因此说明小叶女贞提取液能在一定程度上

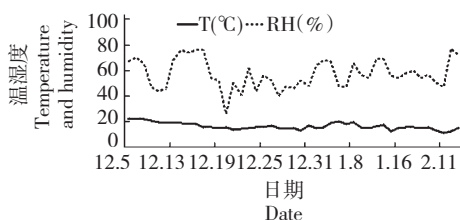


图 1 橄榄贮藏室内的温湿度变化

Fig. 1 Variation of temperature and humidity in the storage room of Chinese Olives

3 实验结果

3.1 小叶女贞总黄酮提取

超声法的正交试验结果见表 2,第 3 组 $A_1B_3C_3D_3$ 提取得率最大,为 4.71%,即提取条件为:乙醇浓度 60%、液固比 25:1 (mL/g)、时间 4.0 h、功率 540 W。由极差 R 可知,各单因素对小叶女子总黄酮提取的影响程度为:乙醇浓度 > 提取功率 > 液固比 > 时间。故选第 3 组 $A_1B_3C_3D_3$ 为超声法提取小叶女贞总黄酮的最优条件。

起到保鲜效果。

由表 3 可知,不同浓度处理对好果率影响不同, A_2 、 A_3 处理均能提高橄榄好果率,前期对好果率影响不是很突出,但是对后期贮藏效果影响较大,好果率之间差异显著,贮藏 69 d 时, A_3 好果率最高,其次为 A_2 , A_1 好果率始终显著低于对照,所以不适宜橄榄果实的保鲜。由试验可知小叶女贞提取液可在一定程度上延长橄榄果实的贮藏期,但提取液需在一定的浓度范围之内。

如图 2 知,在整个贮藏期间,橄榄可溶性总糖变化趋势随时间的延长而基本呈下降趋势。 A_2 处理的果实在贮藏 19 d 时果实糖含量显著低于对照组,在第 7 d、49 d 时, A_2 处理的果实总糖含量显著高于对照,且高于其他处理。

表3 好果率的变化

Table 3 Variations of good fruit rate

编号 No.	稀释倍数 Dilution multiple	好果率 Good fruit rate (%)			
		贮藏 19 d Storage 19 d	贮藏 31 d Storage 31 d	贮藏 42 d Storage 42 d	贮藏 69 d Storage 69 d
A1	2	98.33c	95.56c	90.00d	73.33d
A2	4	100.00a	98.89a	97.22a	82.22b
A3	8	100.00a	98.33b	96.67b	84.44a
CK	对照 Control	99.44b	98.33b	96.11c	78.33c

* 字母不同表示 0.05 水平差异显著。

* Different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

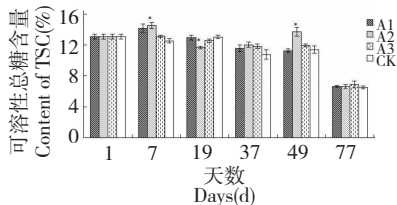


图2 可溶性总糖的变化

Fig. 2 Variations of total saccharides

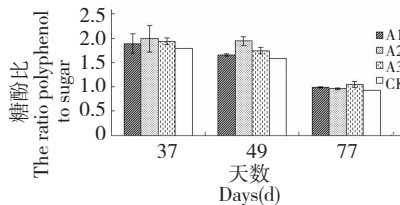


图4 糖酚比的变化

Fig. 4 Variations of polyphenol to saccharide ratio

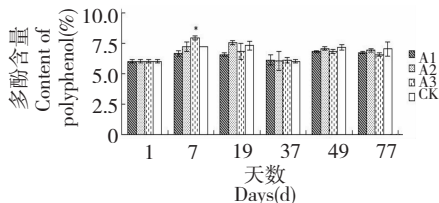


图3 多酚的变化

Fig. 3 Variations of polyphenol

多酚含量与橄榄鲜食品质密切相关,影响橄榄鲜食苦涩味,多酚含量高时,橄榄入口较涩,不利于鲜食。由图3可知,各处理的橄榄果实多酚含量变化趋势基本相似,贮藏前19 d,多酚含量均呈上升趋势,而后迅速下降,在37 d后多酚含量又呈现迅速上升趋势。在贮藏期间除第7 d的A3处理的橄榄果实多酚含量基本差异不显著。

由林玉芳^[12]等对福建省20个橄榄品种(系)相关鲜食品质因子进行研究,提出多酚、总糖评价橄榄鲜食品质的主要指标,在一定范围内,越高糖酚比的橄榄越适宜鲜食。由图5可知,在整个贮藏期间,糖酚比值均呈下降趋势,相较于对照,不同提取液均可在一定程度上延缓橄榄果实糖酚比下降趋势,且贮藏不同期间糖酚比均高于对照,说明不同稀释倍数的女贞提取液有利于改善橄榄鲜食品质。在处理后的第77 d时,糖酚比最高为A3,其次为A1、A2,但差异不显著。

4 讨论与结论

结果表明,超声法最佳提取工艺条件为A₁B₃C₃D₃水平组合,即液固比25:1(mL/g)、功率540 W、乙醇浓度60%、提取时间4 h,提取得率为4.71%,其中4个因素对总黄酮提取得率的影响程度为:乙醇浓度>功率>液固比>时间。戴一^[13]等同样用超声法提取女贞子中的总黄酮,提取得率为6.06%,比小叶女贞叶片中的总黄酮含量高1.35个百分点,这可能是女贞子中的黄酮含量本身就较女贞叶片的高。葛水莲^[14]等用超声法提取小花鬼针草中的总黄酮,提取得率为4.54%,低于小叶女贞叶片中的总黄酮含量,说明不同植物总黄酮含量有一定的差异。

保鲜试验结果表明,小叶女贞叶片总黄酮提取液处理橄榄果实,能起到一定的保鲜作用,但提取液浓度需在一定的浓度范围内。本试验连续观察小叶女贞总黄酮提取液对橄榄果实保鲜效果的影响69 d,其中A1即稀释2倍的总黄酮提取液处理的果实除在第19 d好果率显著高于对照外其余时间段好果率均显著低于对照,因此不适宜橄榄的贮藏保鲜,其他处理在整个保鲜期间好果率均显著高于对照,表明了A2、A3处理均可提高新鲜橄榄果实好果率,其中好果率最高为A3即稀释8倍的女贞提取液。周玮婧^[15]等的试验表明荔枝皮中的总黄酮有着较

强的抑菌性和杀菌功能,葛水莲^[16]等的试验研究也表明小花鬼针草中的总黄酮提取液稀释一定浓度后对草莓有一定的保鲜效果,并且总黄酮浓度越高保鲜效果也越好,而与本试验结果相反,由于目前将总黄酮用于水果保鲜上的研究报道较少,所以具体原因尚未知晓。

目前各种天然保鲜剂层出不穷,其中胡溪育^[15]的研究表明壳聚糖的无毒、安全、环保、易成膜、抗菌等性能在水果保鲜中有着许多优越性,近年来受到了较为广泛的关注和应用。但壳聚糖广泛存在于低等生物菌类、藻类的细胞、节肢动物虾、蟹、昆虫的外壳等中^[17],提取不易,供不应求。天然植物提取液保鲜机理主要是通过控制微生物的生长环境,降低果实中相关酶活力以达到减缓微生物活动,从而达到保鲜的作用^[18]。本试验表明小叶女贞黄酮提取液处理不仅可延缓果实可溶性总糖含量下降,加剧多酚含量下降,提高橄榄果实的糖酚比,改善果实的鲜食品质,且操作方便,成本低,无化学药剂残留,食用安全可靠,具有较高的应用价值。

参考文献

- Li XM (李晓蒙), Cai ZP (蔡志蓬). Studies on chemical constituents of *Ligustrum quihoui* Carr. *Acad J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 1998, 14(2): 93-94.
- Wang YL (王宇翎), Zhang Y (张艳), Fang M (方明), et al. Immunomodulatory effects of total flavones of *Hedyotis diffusa willd.* *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2005, 21: 444-447.
- Feng XQ (冯小强), Li XF (李小芳), Yang S (杨声), et al. Optimization of extraction technologies for extracting flavonoid from orange peel and its activity of antioxidation. *J Hunan Agric Sci* (湖南农业科学), 2013, 11: 86-88.
- Wei FL (韦方立), Liang YZ (梁云贞), Huang QC (黄秋婵). Study on antimicrobial effect of the flavonoids in *Clausena indica* (Datz). *Oliv. Fruits. J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2011, 39: 15932-15933.
- Tu YH (屠宴会), Gao NN (高南南). Survey in study on chemical constituents and pharmacologic action of liqustituents. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2007, 18: 1228-1230.
- Ruan SQ (阮尚全), Wang ZP (王志鹏), Huang QH (黄雀宏), et al. Study on extraction technology of the flavonoids ultrasonic by wave and aqueous two-phase system in the Durio Zibethinus peel. *Mod Food Sci Tech* (现代食品科技), 2012, 28: 1722-1725.
- Liu JZ (刘江邹), Zhou RQ (周荣琪). Improved meansuration for general flavone of bamboo leaves extract. *Food Sci Tech* (食品科技), 2005, 7: 76-78.
- Wei YS (魏永生), Wang YN (王永宁), Shi YP (石玉平), et al. A study on experimental conditions in determining total flavonoids by spectrophotometry. *J Qinghai Univ* (青海大学学报), 2003, 21(3): 61-63.
- Wang XK (王学奎). The Principle and Technology of Plant Physiological Experiment. Beijing: High Education Press, 2006. 5.
- Xie Q (谢倩), Wang W (王威), Chen QX (陈清西), et al. Comparative study on three different methods for the determination of total phenolics in Chinese olive. *Food Sci* (食品科学), 2014, 35: 204-207.
- Jemai H, Bouaziz M, Fki I, et al. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *J Chem-Biol Interactions*, 2008, 2: 88-98.
- Lin YF (林玉芳). Studies on some functional components and quality indexes for Chinese olive fruits in Fujian province. Fuzhou: Fujian Agricultural University (福建农林大学), MSc. 2012.
- Dai Y (戴一), Cao DJ (曹殿洁), Wang H (汪会). Study on ultrasonic extraction techniques of total flavonoids from Fructus Ligustri. *J Shantou Univ* (汕头大学学报), 2014, 3: 36-40.
- Ge SL (葛水莲), Chen JZ (陈建中), Xing HC (邢浩春), et al. Extraction condition and preservation effect to strawberry of *Bidens parviflora* Willd. flavonoids. *Food Sci Tech* (食品科技), 2014, 39: 210-215.
- Zhou WJ (周玮婧), Lv GH (侣国涵), Sun ZD (孙智达), et al. Antimicrobial activity and mechanism of flavonoids from Litchi pericarp. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23: 332-336.
- Hu XY (胡溪育). Chitosan on the research progress of fruit preservation role. *J Heilongjiang Sci* (黑龙江科学), 2014, 6: 133-134.
- Chen ZX (陈彰旭), Jiang W (姜伟), Chen ZB (陈志彬), et al. Progress in application studies of chitosan complex on fruit refreshing. *Chem Ind Eng Prog* (化工进展), 2011, 12: 2724-2727.
- Yue J (岳进), Yang GY (杨贵芸), Deng Y (邓云), et al. Research advances in antimicrobial action of plant extracts and their applications in food. *J Shanghai Jiaotong Univ, Nat Sci* (上海交通大学学报), 2013, 31(5): 36-42.