

正交试验优化紫荆果总黄酮提取及其抗氧化性

陈园

郑州大学信息工程学院, 河南 郑州 450001

摘要: 为筛选紫荆果总黄酮的最佳提取工艺条件, 研究紫荆果总黄酮提取液对羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除活性, 本文采用乙醇浸提法提取紫荆果中总黄酮, 考察乙醇浓度、料液比、浸提温度、浸提时间四个单因素对紫荆果总黄酮提取率的影响, 设计 $L_9(3^4)$ 正交实验确定最佳提取工艺条件。与二丁基羟基甲苯(BHT)对照, 初步探究紫荆果总黄酮对羟自由基的清除活性。结果显示, 紫荆果总黄酮的提取率在料液比 1.5:60 g/mL, 浸提时间 2.5 h, 温度 80 °C, 乙醇浓度 75%条件下为 2.910%。对羟自由基清除活性高于同浓度的 BHT, 且随浓度升高而增大。

关键词: 紫荆果; 总黄酮; 提取率; 抗氧化性

中图分类号: S131; S132

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2016)01-0043-04

Flavonoids Extracted from *Cercis chinensis* Bunge Fruit with an Orthogonal Test and Its Antioxidant

CHEN Yuan

School of Information Engineering/Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: To optimize the extraction of total flavonoids in *Cercis chinensis* Bunge and study on the scavenging effect on hydroxyl radicals, the preferred extraction conditions were determined by a single factor and orthogonal test. The results showed that the extraction ratio of flavonoids reached up to 2.910 % at ethanol concentration of 75%, solid-liquid ratio of 1.5:60 mg/mL, temperature 85 °C and extraction time 2.5 h. Antioxidant effect of flavonoids was higher than BHT and it was increasing with the concentration.

Keywords: *Cercis chinensis* Bunge fruit; flavonoids; extraction ratio; antioxidant

黄酮类化合物是一类多酚类物质, 在自然界中广泛分布, 属于植物次级代谢产物^[1]。它是大多数自由基的清除剂^[2], 有较强的抗氧化活性^[3], 具有抗菌、消炎、清热解毒、镇静、利尿等作用^[4]。黄酮类化合物安全、无毒, 在医药、食品加工等方面已被广泛应用^[5]。

紫荆(*Cercis chinensis* Bunge), 属豆科植物, 因“其木似黄荆而色紫, 故名。又名, 满条红、乌桑、箩筐树、紫金盘、扁头翁。根皮(紫荆根皮)、木部(紫荆木)、花(紫荆花)、果实(紫荆果)供药用, 其树皮和木材可入药, 具有活血行气、清热解毒、消肿止痛等功效。紫荆花可用于治疗风湿骨痛、鼻中疳疮。紫荆果可治疗咳嗽^[6]。研究发现, 紫荆含有丰富的黄酮类化合物^[7]。目前为止, 已有从紫荆花和紫荆皮中提取总黄酮的研究, 尚未发现有关紫荆果中总黄酮的研究报道, 本研究对紫荆果中总黄酮的含量进行了测定, 并以总黄酮得率为考察指标, 优化其醇沉提取工艺, 并初步探究提取物的抗氧化性质, 即对羟自由基的清除活性, 为紫荆在医药及食品等领域的应用提供数据参考。

1 材料与仪器

紫荆果, 采集于郑州人民公园, 洗净, 烘干, 粉碎(备用)。

无水乙醇、芦丁、二丁基羟基甲苯、水杨酸、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠、硫酸亚铁、双氧水、氯化铁。均为市购, 优级纯。

CP214C 电子天平(德国赛多利斯)、722N 可见分光光度计(上海光学仪器厂)、SHSG-3050 型高速多功能粉碎机(上海硕光科技有限公司)、202-0A 电热恒温干燥箱(北京金志业仪器设备有限责任公司)、HHS11-Ni4 电热恒温水浴锅(北京三二八科学仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 芦丁标准曲线的绘制

准确吸取 0.2 mg/mL 的芦丁标准液 0.00 mL、2.50 mL、3.50 mL、4.50 mL、5.50 mL、6.50 mL

收稿日期: 2013-11-19

修回日期: 2014-01-13

作者简介: 陈园(1964-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 计算机应用. E-mail: hbzyjsxy@163.com

数字优先出版: 2016-01-04 <http://www.cnki.net>

分别置于 50 mL 容量瓶中, 各加入 5%亚硝酸钠溶液 0.40 mL, 摇匀, 静置 6 min; 加 10%硝酸铝溶液 0.40 mL, 摇匀, 静置 6 min; 加 4%氢氧化钠溶液 5.00 mL, 用浓度为 70%的乙醇溶液定容至 50.00 mL, 摇匀, 静置 10 min。在 510 nm 波长处以试剂空白为参比测定吸光度, 绘制标准曲线得回归方程, $A=-0.0053+0.2458C$, $R^2=0.99904$ 。

2.2 紫荆果总黄酮的提取

将紫荆果洗净, 干燥至恒重, 磨碎, 过 40 目筛。准确称取 2.0000 g 的紫荆果粉末, 用乙醇溶液做提取剂, 水浴浸提, 提取液过滤, 用相同浓度的乙醇溶液洗涤并定容至 50 mL 容量瓶中, 即得总黄酮提取液。

用分光光度法在 510 nm 波长处测紫荆果提取液的吸光度, 按下式计算总黄酮提取率:

$$\text{总黄酮提取率(\%)} = \frac{C \times V_1}{M \times V_2} \times 50 \times 10^{-3} \times 100\%$$

式中: V_1 为第二次定容后提取液的体积 50 mL; V_2 从母液中量取的提取液体积 0.50 mL; C 为提取液中总黄酮浓度; M 为样品(紫荆果)质量。

2.3 紫荆果中总黄酮的提取单因素试验

2.3.1 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响 准确称取 2.000 0 g 的紫荆果粉末, 固定料液比为 2:60, 改变提取剂乙醇浓度分别为 55%、60%、65%、70%、75%、80%, 在 80 °C 恒温水浴中浸提 2 h, 将提取液冷却至室温过滤、洗涤、合并提取液和洗涤液, 并用与提取剂相同浓度的乙醇溶液在 50 mL 容量瓶中定容。在 510 nm 波长处测其吸光度, 做 3 组平行试验。将吸光度的平均值代入线性回归方程, 计算提取液中总黄酮浓度和紫荆果中总黄酮提取率, 选择较佳的提取剂浓度。

2.3.2 料液比对总黄酮提取率的影响 准确称取 2.000 0 g 的紫荆果粉末, 固定提取剂乙醇的浓度为 70%, 提取温度 80 °C, 提取时间 2 h, 改变料液比分别为: 1.0:60, 1.5:60, 2.0:60, 2.5:60, 3.0:60, 以总黄酮提取率为指标, 考察料液比对紫荆果总黄酮提取率的影响。

2.3.3 浸提温度对总黄酮提取率的影响 准确称取 2.000 0 g 的紫荆果粉末, 固定提取剂乙醇浓度为 70%, 料液比为 2.0:60, 提取时间 2 h, 提取温度分别为 50 °C、60 °C、70 °C、80 °C、85 °C、90 °C, 以总黄酮提取率为指标, 考察提取温度对紫荆果总黄酮提取率的影响。

2.3.4 浸提时间对总黄酮提取率的影响 准确称取 2.000 0 g 的紫荆果粉末, 固定提取剂乙醇的浓度为 70%, 料液比为 2.0:60, 提取 80 °C, 浸提时间分别为 1.5 h、2 h、2.5 h、3 h, 以总黄酮提取率为指标, 考察提取时间对紫荆果总黄酮提取率的影响。

2.4 紫荆果总黄酮最佳提取工艺优化

在单因素试验结果基础上, 以黄酮提取率为综合考察指标, 选定料液比、浸提时间、浸提温度、乙醇浓度 4 因素 3 水平, 设计 $L_9(3^4)$ 表进行正交试验, 优化紫荆果中总黄酮提取工艺条件。

2.5 总黄酮对羟自由基的清除作用

参考 Fenton 反应体系, 加入不同体积的总黄酮提取液, 在 510 nm 波长处测定吸光度^[8]。扣除提取液的本底吸收。按下式计算提取液中总黄酮对羟自由基的清除率, 并以 BHT(二丁基羟基甲苯)为对照, 比较两种抗氧化剂对·OH 的清除活性。

$$\cdot\text{OH 清除率(\%)} = [A_0 - (A_x - A_{x0})] / A_0 \times 100\%$$

式中: A_0 为空白对照溶液吸光度; A_x 为提取液吸光度; A_{x0} 为不加 H_2O_2 提取液的本底吸光度。

3 结果与分析

3.1 紫荆果中总黄酮提取单因素实验及结果分析

3.1.1 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响 乙醇浓度对总黄酮提取率影响见图 1。

由图 1 可知, 乙醇浓度在 55%~70%之间, 吸光度值逐渐增加, 乙醇浓度在 70%~80%之间, 吸光度值逐渐降低。实验结果表明, 当乙醇浓度为 70%时, 吸光度值达到最大, 总黄酮提取率最高。

即紫荆果中提取总黄酮, 提取剂乙醇的最佳浓度为 70%。

3.4.2 料液比对总黄酮提取率的影响 料液比对总黄酮提取率影响见图 2。

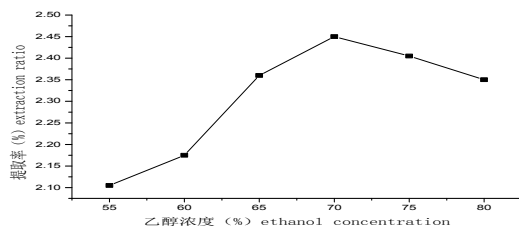


图 1 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响
Fig.1 Effect of ethanol concentrations on the extraction ratio of flavonoids

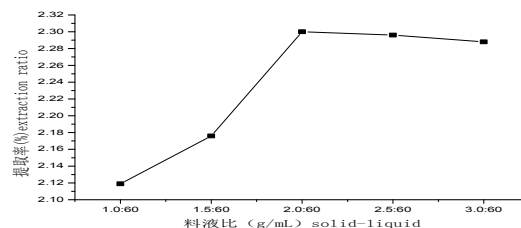


图 2 料液比对总黄酮提取率的影响
Fig.2 Effect of solid-liquid ratio on the extraction ratio of total flavonoids

由图 2 可知, 料液比为 2.0:60 g/mL 时, 测定提取液的吸光度值最大, 即总黄酮提取率最高。

3.4.3 浸提温度对总黄酮提取率的影响 浸提温度对总黄酮提取率影响见图 3。

由图 3 可知, 在 50 °C~80 °C 之间, 总黄酮提取率随温度升高而增加, 浸提温度高于 80 °C, 总黄酮提取率随着温度升高而降低, 可能是由于提取物的热不稳定性, 温度升高引起提取物热分解增加。

3.4.4 浸提时间对总黄酮提取率的影响 浸提时间对总黄酮提取率的影响见图 4。

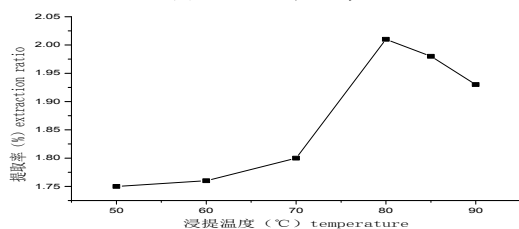


图 3 浸提温度对总黄酮提取率的影响
Fig.3 Effect of temperatures on the extraction ratio of total flavonoids

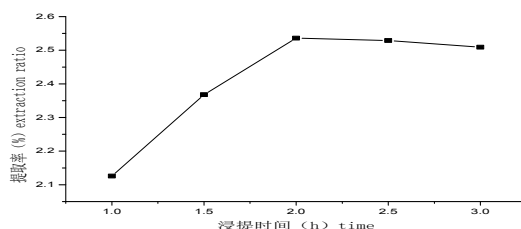


图 4 提取时间对总黄酮提取率影响
Fig.4 Effect of leaching times on the extraction ratio of total flavonoids

由图 4 可知, 总黄酮提取率开始随着时间延长而增加, 当时间超过 2.0 h 后, 总黄酮提取率不再增加, 甚至随着时间延长而降低。探究其原因可能是随着时间延长提取剂乙醇的挥发损耗。实验结果显示紫荆果中总黄酮提取的较佳浸提时间为 2.0 h。

3.5 正交实验及结果分析

因素水平见表 1, 正交实验结果见表 2。

表 1 L₉(3⁴)正交实验因素与水平设计
Table 1 Factors and levels in the orthogonal test

水平 Levels	因素 Factors			
	(A)料液比 (g/mL) Solid-liquid ratio	(B)浸提时间 (h) Leaching time	(C)浸提温度 (°C) Temperature	(D)乙醇浓度 (%) Ethanol concentration
1	1.5:60	1.5	70	65
2	2.0:60	2.0	80	70
3	2.5:60	2.5	90	75

表 2 正交实验结果
Table 2 The result of the orthogonal test

实验号 NO.	(A)料液比(g/mL) Solid-liquid ratio	(B)浸提时间(h) Time	(C)浸提温度(°C) Temperature	(D)乙醇浓度(%) Ethanol concentration	提取率(%) Extraction ratio
1	1.5:60	1.5	70	65	2.119
2	1.5:60	2.0	80	70	2.379
3	1.5:60	2.5	90	75	2.244
4	2.0:60	1.5	80	75	2.029
5	2.0:60	2.0	90	65	1.419
6	2.0:60	2.5	70	70	2.254
7	2.5:60	1.5	90	70	1.224
8	2.5:60	2.0	70	75	2.219
9	2.5:60	2.5	80	65	2.626
∑K ₁	6.742	5.372	6.592	6.164	
∑K ₂	5.702	6.017	7.034	5.857	
∑K ₃	6.069	7.124	4.887	6.492	
K ₁	2.247	1.791	2.197	2.054	
K ₂	1.901	2.006	2.345	1.952	
K ₃	2.023	2.375	1.629	2.164	
极差 R	0.346	0.584	0.716	0.212	

从表 2 可以看出, 本实验中 A、B、C、D 四个单因素的主次关系是 C>B>A>D, 即 C (浸提温度) 为最重要的因素, 其次是 B (浸提时间), 再次是 A (料液比), D (乙醇浓度), 影响最小。正交实验结果显示, 以总黄酮提取率为考察指标, 最优实验条件组合是 A₁B₃C₂D₃。即料液比为 1.5:60 g/mL, 浸提时间为 2.5 h, 浸提温度为 80 °C, 提取剂乙醇浓度为 75%。

按照正交实验所确定的最佳提取条件进行验证性实验, 做三次平行实验, 计算得到紫荆果中总黄酮提取率为 2.910%。

3.6 紫荆果中总黄酮对羟基自由基的清除作用

紫荆果中总黄酮对羟基自由基的清除实验结果见图 5。

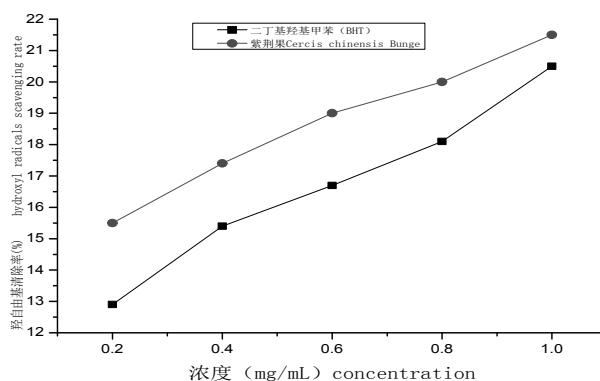


图 5 紫荆果总黄酮对羟基自由基的清除率

Fig.5 The rate of hydroxyl radicals scavenged by flavonoids in *Cercis chinensis* Bunge fruit

由图 5 可知: 紫荆果中的总黄酮提取液对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 有清除能力, 随着提取液浓度增加, 清除率也逐渐增加。当加入与提取液相同体积的同浓度 BHT 情况下, 紫荆果中的总黄酮提取液对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除率要高于 BHT (二丁基羟基甲苯) 对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除率。

4 讨论

本论文利用乙醇单次浸提紫荆果中总黄酮, 采用分光光度法测得总黄酮含量为 2.910%。与文献中报道的通过醇沉法提取纯化紫荆花中黄酮类化合物, 测得总黄酮回收率为 7.32%^[8]。提取液的抗氧化实验结果显示, 紫荆果中总黄酮对羟基自由基有较强的清除活性。紫荆果与花、皮一样^[9], 同样具有较高的利用价值, 有待开发。

5 结论

紫荆果总黄酮最佳提取条件为: 料液比 1.5:60 g/mL, 浸提时间 2.5 h, 浸提温度 80 °C, 提取剂乙醇浓度 75%。在此条件下总黄酮提取率可高达 2.910%。

本文还对紫荆果总黄酮提取液抗氧化性质做了初步探究, 将紫荆果中的总黄酮提取液和 BHT 对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 清除活性作了比较。结果显示, 紫荆果提取液对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除能力略高于 BHT (二丁基羟基甲苯)。

参考文献

- [1] 宋秋华, 张磊, 梁飞, 等. 黄酮类化合物提取和纯化工艺研究进展[J]. 山西化工, 2007, 27(4): 24-27
- [2] 幸宏伟. 玫瑰花醇提取物对油脂的抗氧化作用[J]. 重庆工商大学学报: 自然科学版, 2006, 23(2): 150-153
- [3] 蔡碧琼, 蔡珠玉, 张福娣, 等. 稻壳中黄酮提取物的抗氧化性质研究[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(4): 0813-0818
- [4] 谢棒祥, 张敏红. 生物类黄酮生理功能及其应用研究进展[J]. 动物营养学报, 2003, 15(2): 11-15
- [5] 张胜帮, 赵玲玲. 黄酮类化合物的提取纯化研究进展[J]. 温州大学学报: 自然科学版, 2007, 45(5): 25-28
- [6] 钱正清. 最新中药大辞典[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2005: 23-65
- [7] 徐美奕, 韩雅莉, 陈志红. 紫荆花总黄酮提取工艺的优化研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2712-2713
- [8] 徐美奕, 韩雅莉, 东野广智, 等. 紫荆花总黄酮的分离纯化与光谱分析[J]. 中药材, 2007, 30(10): 1252-1255
- [9] 李君玲. 紫荆皮总黄酮超声提取工艺优化[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(7): 266-267