文章编号:1001-6880(2014)7-1136-06

响应面优化大蒜总黄酮提取及抗氧化研究

张　鑫,张海悦*,李　鹏,亓付祥

长春工业大学化学与生命科学学院,长春 130012

摘　要:本实验通过单因素试验探讨了乙醇浓度、料液比、超声时间、超声温度对大蒜总黄酮得率的影响,然后进一步通过响应面分析确定了超声波辅助乙醇提取大蒜总黄酮的最佳工艺条件为:乙醇浓度 80%,料液比 1∶16,超声时间 18 min,超声温度 53 ℃。在最佳工艺条件下,大蒜总黄酮得率达到 3.99%。最后进行邻苯三酚自氧化试验,发现大蒜提取液对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的抑制率为 60.43%,表明大蒜总黄酮有较强的抗氧化活性。

关键词:大蒜;总黄酮;响应面;抗氧化

中图分类号:TQ929.2　　**文献标识码**:A

Optimization of Extraction Conditions of Garlic Flavonoids Using Response Surface Methodology and Their Antioxidant Property Investigation

ZHANG Xin, ZHANG Hai-yue*, LI Peng, QI Fu-xiang

College of Chemical and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China

Abstract: The effect of ethanol concentration, material-to-solvent ratio, ultrasonic time and ultrasonic temperature on the extraction yield of total garlic flavonoids was investigated by single factor test in this study. The ultrasonic-assisted extraction conditions were further optimized by the response surface analysis and were determined to be ethanol concentration of 80%, material-to-solvent ratio of 1∶16, ultrasonic time of 18 min and ultrasonic temperature of 53 °C. Under the optimal extraction conditions, the yield of total garlic flavonoids reached 3.99%. In addition, the pyrogallol autoxidation test indicated that the inhibition rate of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) of the garlic extract was 60.43%. The result proved that garlic total flavonoids had relative strong antioxidant activity.

Key words: garlic; total flavonoids; response surface; antioxidant activity

大蒜在我国资源丰富,是我们常见的一种香辛料,也是重要的药用植物,其中含有黄酮类化合物、大蒜素、大蒜精油等多种活性成分[1]。其中黄酮类化合物是普遍存在于植物中天然物质,人体内不能合成,只能从食物中摄取,对于调节生理机能,提高生命运动质量,具有极其重要的意义[2]。研究表明,黄酮类化合物具有心血管系统活性、抗菌及抗病毒活性、抗肿瘤活性、抗氧化自由基活性、抗炎、镇痛活性、保肝等多种生物活性[3]。国外的 Koohhui Miean[4]应用甲醇溶液提取了大蒜中黄酮类化合物;Anna Maria Nuutila[5]对大蒜总黄酮的抗氧化活性进行了研究。而我国关于大蒜中黄酮类物质的提取及活性研究的报道较少[6],本实验采用的超声波辅助乙醇回流提取法,大蒜中提取出的黄酮没有刺激性气味,将来可以作为功能性食品的基础原料。这对于合理、充分利用丰富大蒜资源具有重要意义。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

新鲜大蒜,市售。试剂:芦丁标准品,上海友思生物技术有限公司;无水乙醇、盐酸、镁粉、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、邻苯三酚均为分析纯;甲醇,色谱纯;溴化钾,光谱纯。仪器:JY3002 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精密试验设备有限公司);RE52-98 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);DK-8D 型电热恒温水浴锅(北京光明医疗仪器厂);UV754 紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司);AB-8 大孔吸附树脂(天津市光复

收稿日期:2012-07-04　　接受日期:2014-04-22

*通讯作者 E-mail:zhhaiyue@163.com

精细化工研究所);HF 发散式循环超声提取机(北京弘祥隆生物技术开发有限公司)。

1.2　试验方法

1.2.1　大蒜总黄酮的提取工艺流程

新鲜大蒜剥皮、切碎→烘干→粉碎→超声波处理→乙醇回流提取→抽滤→黄酮粗提液→浓缩→干燥→大蒜黄酮粉末。

1.2.2　最大吸收波长的确定

取少量纯化后的大蒜提取物放在小烧杯中,用 20 mL 甲醇溶液将其溶解。用甲醇溶液做空白对照试验,将样品溶液在 200 ~ 800 nm 进行全波长扫描。

1.2.3　芦丁标准曲线的绘制[7]

准确称取芦丁标准品 5 mg(P_2O_5 干燥 24 h),置于50 mL 容量瓶中,用乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配置成 0.1 mg/mL 的芦丁标准液备用。准确吸取 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 的芦丁标准液分别置于 10 mL 的容量瓶中,加水 2 ~ 4 mL,加 5% 亚硝酸钠 0.4 mL,摇匀,放置 6 min,加入 10% 硝酸铝 0.4 mL,摇匀,放置 6 min,加入 4% 氢氧化钠 4.0 mL,再加水至刻度、摇匀,放置 15 min,以空白试剂作对比参照。用最小二乘法做线性回归,求得芦丁浓度(Y)与吸光度(A)的关系曲线。

1.2.4　单因素试验

准确称取 30 g 大蒜粉末,按照一定的料液比,与一定浓度的乙醇溶液中,在一定温度的超声波环境下处理一定时间后,在 75 ℃水浴中,回流提取 2 h,取出,减压抽滤。冷却后,以乙醇溶液为空白样,在最大吸收波长下测其吸光度,重复三次,取平均值,选择最合适的乙醇浓度、料液比、超声时间和超声温度。

1.2.5　响应面法对提取工艺参数的优化与验证

在单因素试验结果的基础之上,分别选择乙醇浓度(A)、液料比(B)、超声时间(C)、超声温度(D)作为自变量,以大蒜总黄酮的得率(A_1)作为响应值设计响应面试验,因素水平取值见表 1。

表 1　响应面设计因素和水平

Table 1　Levels and factors of response surface analysis

水平 Levels	因素 Factors			
	A	B	C	D
-1	75	1∶14	15	45
0	80	1∶16	20	50
1	85	1∶18	25	55

1.2.6　邻苯三酚自氧化法对抗氧化能力的测定

邻苯三酚自氧化速率的测定[8-10]:取 4.5 mL 50 mmol/L 的 Tris-盐酸缓冲溶液(pH 8.2)与 4.2 mL 蒸馏水混匀后在 25 ℃水浴中保温 20 min,取出后立即加入在 25 ℃预热过的 3 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.3 mL,迅速摇匀后倒入比色皿中,在 320 nm 下每隔 30 s 记录吸光度,计算线性范围内每分钟吸光度的增加,以 10 mmol/L 盐酸溶液作为对照。

加入大蒜黄酮溶液邻苯三酚自氧化速率的测定:按照上述步骤在加入邻苯三酚前先分别加入 0.1 mL 不同浓度的样品液,同样以 10 mmol/L 盐酸溶液作空白对照,测定吸光度。抑制率按下公式计算。

$$抑制率(\%) = (\triangle A_1/\triangle t - \triangle A_2/\triangle t)/(\triangle A_1/\triangle t) \times 100\%$$

式中:$\triangle A_1/\triangle t$ 为邻苯三酚自氧化时反应速率;$\triangle A_2/\triangle t$ 为加入样品液后邻苯三酚自氧化时反应速率。

2　结果与分析

2.1　最大吸收波长的确定

由图 1 看出,大蒜总黄酮提取液在 430 nm 附近有最大吸收峰。此后试验中以 430 nm 处的吸光度值来衡量提取效果的差异。

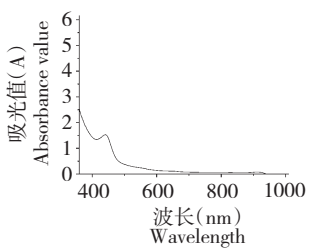

图 1　大蒜提取物的紫外吸收图谱

Fig. 1　UV spectrum of garlic extract

2.2　标准曲线的绘制结果

分别配置一系列浓度的芦丁标准液在 430 nm 处测定吸光度,参比液为试剂空白,以吸光度为纵坐标,以芦丁标准溶液浓度作为横坐标,绘制标准曲线,其回归方程为:$Y = 10.325X + 0.0100$, $R^2 = 0.9995$,表明了芦丁在浓度 0 ~ 0.05 mg/mL 之内线性关系最好。

2.3　单因素试验结果

2.3.1　乙醇浓度的选择

由图 2(A)可以看出:随着乙醇浓度的升高总

黄酮得率呈上升的趋势,当乙醇浓度达到 85% 时,总黄酮得率随着乙醇浓度的增大呈下降的趋势,因而乙醇的最佳浓度为 85%。如果浓度过高,容易挥发,乙醇浓度依然会降低,得率就会降低。

2.3.2 液料比的选择

由图 2(B)可以看出:随着料液比的增加,大蒜中总黄酮得率不断增大,但当料液比大于 1∶18 时,总黄酮得率开始下降,因此料液比应为 1∶18 最好。随料液比的增大,浓度差提高,有利于传质,所以在总体上表现为料液比增加,总黄酮得率也增高。但这种影响不是无限的,当料液比增高达到一定值后总黄酮得率不再增加,这是因为大蒜中总黄酮含量是一定的。

2.3.3 超声时间的选择

由图 2(C)可以看出:随着超声波作用时间的增加,大蒜总黄酮的得率升高;但当时间大于 20 min 后总黄酮得率趋于平稳。所以本实验选择超声时间 20 min 为宜。如果超声时间太长,可能会破坏黄酮类化合物的结构,使其分解,所以得率反而下降。

2.3.4 超声温度的选择

由图 2(D)可以看出:随着超声温度的升高总黄酮得率呈上升的趋势,当温度达到 55 ℃时,总黄酮得率随着温度的升高呈下降的趋势。因而应选用 55 ℃左右的温度进行提取为宜。温度升高到一定程度会破坏样品中黄酮类物质的结构造成样品中黄酮类物质的损失,并且会导致提取液的大量挥发。

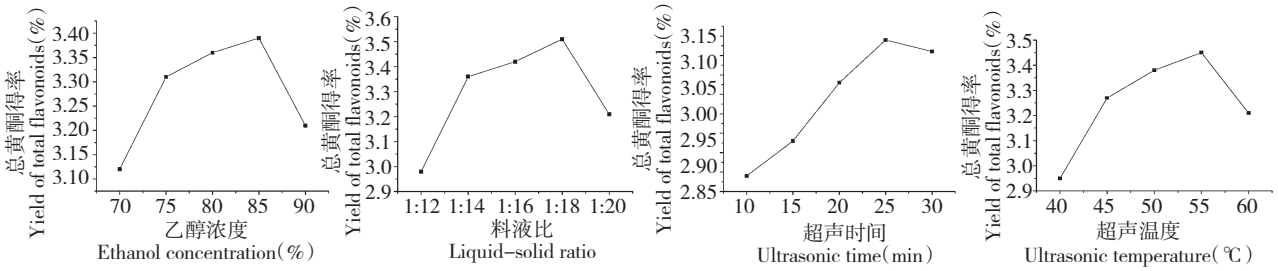

图 2 乙醇浓度(A)、料液比(B)、超声时间(C)及超声温度(D)对大蒜总黄酮得率的影响

Fig. 2 Effects of ethanol concentration (A), liquid-solid ratio (B), ultrasonic time (C) and ultrasonic temperature (D) on yield of garlic total flavonoids

2.4 响应面法确定大蒜总黄酮的最佳提取条件

2.4.1 响应面法试验设计及结果

选择乙醇浓度(A)、液料比(B)、超声时间(C)及超声温度(D)作为自变量,以大蒜总黄酮的得率(A_1)作为响应值设计响应面试验,结果见表 2。

表 2 响应面试验结果

Table 2 Result of response surface design

实验编号 No.	A 乙醇浓度 Ethanol concentration(%)	B 液料比 Liquid-to- solid ratio	C 超声时间 Ultrasonic time(min)	D 超声温度 Ultrasonic temperature(℃)	得率 Yield(%)
1	80	16	15	45	2.36
2	75	16	20	45	2.19
3	75	16	15	50	2.21
4	85	18	20	50	2.43
5	85	16	20	55	2.47
6	75	14	20	50	2.31
7	80	18	20	55	2.45
8	80	16	20	50	3.78
9	80	14	20	55	2.35
10	80	16	20	50	3.77
11	80	16	25	55	2.49
12	80	18	25	50	2.41

13	80	16	20	50	3.79
14	80	16	25	45	2.35
15	85	14	20	50	2.34
16	75	16	20	55	2.39
17	80	18	20	45	2.34
18	80	14	15	50	2.15
19	80	18	15	50	2.34
20	85	16	25	50	2.44
21	80	16	20	50	3.78
22	80	16	20	50	3.78
23	80	16	15	55	2.29
24	85	16	20	45	2.31
25	75	18	20	50	2.35
26	80	14	20	45	2.16
27	75	16	25	50	2.31
28	80	14	25	50	2.31
29	85	16	15	50	2.36

利用 Design Expert 软件对表 2 的数据进行回归分析,拟合后得到 A、B、C、D 的二次多项回归模型为:

$$A_1 = -311.23833 + 4.58450A + 5.95750B + 1.11767C + 2.87083D + 1.25000E\text{-}003AB - 2.00000E\text{-}004AC - 4.00000E\text{-}004AD - 2.25000E\text{-}003BC - 2.00000E\text{-}003BD + 2.10000E\text{-}003CD - 0.028567A^2 - 0.18385B^2 - 0.029017C^2 - 0.028367D^2$$

由表 3 可知,上述模型的一次项 A、B、C、D 为显著;二次项 A^2、B^2、C^2、D^2 极为显著;交互项 CD 为显著。模型的 F 值为 303.85,整体模型的显著水平 $P<0.0001$,表明该模型显著。模型的 R^2 为 0.9812,R^2(Adj)为 0.9934,说明回归方程的拟合程度良好,失拟较小,可以用该方程代替真实试验点进行分析。

表 3　回归模型方差分析

Table 3　Variance analysis of regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	*F* 值 *F* value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	8.77	14	0.63	303.85	<0.0001	**
A-乙醇浓度 A-Ethanol concentration	0.029	1	0.029	14.07	0.0021	*
B-料液比 B- Solid-to-liquid ratio	0.041	1	0.041	19.81	0.0005	*
C-超声时间 C-Ultrasonic time	0.030	1	0.030	14.55	0.0019	*
D-超声温度 D-Ultrasonic temperature	0.044	1	0.044	21.54	0.0004	*
AB	6.250E-004	1	6.250E-004	0.30	0.5906	
AC	1.000E-004	1	1.000E-004	0.049	0.8289	
AD	4.000E-004	1	4.000E-004	0.19	0.6663	
BC	2.025E-003	1	2.025E-003	0.98	0.3384	
BD	1.600E-003	1	1.600E-003	0.78	0.3932	
CD	0.011	1	0.011	5.35	0.0365	*
A^2	3.31	1	3.31	1604.96	<0.0001	**
B^2	3.51	1	3.51	1701.90	<0.0001	**

C^2	3.41	1	3.41	1655.93	<0.0001	**
D^2	3.26	1	3.26	1582.57	<0.0001	**
剩余残渣 Residual	0.029	14	2.061E-003			
失拟项 Lack of Fit	0.029	10	2.866E-003	57.32	0.0007	*
理论误差 Pure Error	2.000E-004	4	5.000E-005			
校正相 Cor Total	8.80	28				

注：* $P<0.05$，** $P<0.0001$。
Note: * $P<0.05$, ** $P<0.0001$.

按得到的数学模型绘制响应曲面图，各因子的交互作用效应可以从响应曲面的坡度变化得到反映。响应面曲面的坡度的平缓与陡峭程度直接的反映了在处理条件下发生变化时大蒜总黄酮提取量的响应灵敏程度，如果响应面曲面坡度相对平缓，表明提取率可以忍受处理条件的变化，响应值不敏感；反之，如果响应面坡度非常陡峭，表明对于处理条件的变化，响应值非常敏感。从图 3 可知，超声时间与超声温度的交互作用较为显著。

2.4.2 条件优化

根据响应面分析表明：最佳提取工艺理论值是乙醇浓度 77.94%，料液比 1∶15.69，超声时间 18.01 min，超声温度 52.73 ℃。考虑到实际操作的便利，将大蒜中总黄酮提取的最佳工艺条件修正为：乙醇浓度 80%，料液比 1∶16，超声时间 18 min，超声温度 53 ℃。按照修正后的条件下进行 5 次验证试验。结果如表 4 所示，可以得到大蒜总黄酮得率由 3.79% 上升到 3.99%。

表 4 试验验证相应面优化条件

Table 4 Conformation results of the optimized extraction conditions

项目 Item	序号 No.					
	1	2	3	4	5	平均值 Mean
总黄酮得率(%) Yield of garlic total flavonoid	4.02	3.96	3.99	4.04	3.95	3.99

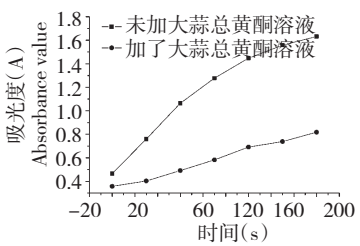

图 4 大蒜总黄酮抗氧化功能

Fig. 4 Antioxidant activity of garlic total flavonoid

2.5 抗氧化实验的结果分析

根据每隔 30 s 所测邻苯三酚自氧化的吸光度和加入大蒜总黄酮后邻苯三酚自氧化的吸光度作图，见图 4。经计算得：邻苯三酚自氧化速率 $\Delta A_1/\Delta t = 6.47\times10^{-3}/s$；加入大蒜黄酮样品后邻苯三酚自氧化平均速率 $\Delta A_2/\Delta t = 2.56\times10^{-3}/s$，邻苯三酚的自氧化速率明显降低，说明大蒜黄酮具有较强的抗氧化活性。抗氧化试验测得大蒜黄酮对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的平均抑制率约为 60.43%，说明大蒜黄酮具有一定抗氧化功能。

3 结论

用超声波辅助乙醇提取法提取大蒜总黄酮，根据中心组合设计原理，采用 4 因素 3 水平的响应面分析，得出了大蒜总黄酮的最佳提取工艺条件。结果表明：最佳乙醇浓度为 80%，最佳料液比为 1∶16，最佳超声时间为 18 min，最佳超声温度为 53 ℃。采用邻苯三酚自氧化法对大蒜总黄酮的抗氧化能力进行检测，发现大蒜提取液对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的抑制率为 60.43%。

参考文献

1 Yan MM(闫淼淼), Xu Z(许真), Xu C(许蝉), *et al*. Progress of functional components in garlic. *Food Sci*(食品科学), 2010, 12: 312-318.

2 Wang W(王玮), Wang L(王琳). Research progress on flavonoids. *J Shenyang Med Coll*(沈阳医学院学报), 2002, 4: 115-119.

3 Xu RS(徐任生). Natural Products Chemistry. Beijing: Science Press, 2004.

(下转第 1153 页)