

# 龙眼壳黄酮的微波提取及体外抗氧化活性研究

刘焕云\*, 王海燕, 梁燕

河北经贸大学生物科学与工程学院, 石家庄 050061

**摘要:**研究了微波辅助提取龙眼壳黄酮的工艺条件,并对其进行抗氧化性能的研究。正交试验结果表明最佳提取工艺为:V(70%乙醇):m(龙眼壳粉)=30 mL:1 g,微波功率480 W处理20 s后,于水浴30℃浸提30 min,龙眼壳黄酮得率为3.465%。抗氧化试验表明龙眼壳黄酮对亚硝酸盐具有良好的清除能力,其效果优于Vc,对卵磷脂蛋白质过氧化及羟基自由基具有明显的抑制作用,其效果分别弱于对照物2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)和Vc。

**关键词:**龙眼壳;微波辅助提取;黄酮;抗氧化活性

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.03.013

## Microwave-assisted Extraction of Flavonoids from Longan Pericarp and Its Antioxidant Activity Study

LIU Huan-yun\*, WANG Hai-yan, LIANG Yan

College of Biology and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China

**Abstract:** Flavonoids was extracted from Longan Pericarp by microwave-assisted method and its antioxidant activities were measured. The conditions of extraction were optimized by orthogonal test design  $L_9(3^4)$ . The results showed the optimum conditions as follows: Longan Pericarp(1 g) was soaked in 30 mL of 70% ethanol at 30℃ water bath for 30min after being dealt with 480 W microwave for 20 s. The flavonoids yield was 3.465%. Then its antioxidant activity was evaluated by three different assays *in vitro*. Comparing with the scavenging ability of Vc, it had better function to nitrite system. However the inhibition of the extract to lipid peroxidation of yolk lipoprotein and hydroxyl radical was lower than that of butylated hydroxytoluene(BHT) and Vc, respectively.

**Key words:** Longan Pericarp; microwave-assisted extraction; flavonoids; antioxidant activity

龙眼(*Dimocarpus longan Lour*, 俗称桂圆),为著名的水果和重要的药材,在我国具有悠久的种植和食用历史,近年来一些研究<sup>[1,2]</sup>表明龙眼壳中含有丰富的黄酮类物质,具有抗菌、抗病毒、镇痛、保护血管、抗氧化、清除自由基等生物活性,也是一类具有广泛开发前景的天然抗氧化剂。目前国内外对天然抗氧化剂研究较多<sup>[3-6]</sup>,但龙眼壳黄酮抗氧化研究上未见报道。为充分利用每年大量废弃的龙眼壳植物资源,有必要对龙眼壳中总黄酮的提取及抗氧化活性进行较为系统的研究,为其进一步开发利用提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材 料

新鲜干龙眼(品种“石硖”,产于广西贵港)、鸡蛋;芦丁标准品(中检所);乙醇、甲醇、丙酮、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、硫酸亚铁、30%双氧水、邻二氮菲、亚硝酸钠、对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺、三氯乙酸(TCA)、硫代巴比妥酸(TBA)等,以上试剂均为分析纯,配置用水为二次蒸馏水。

#### 1.1.2 仪 器

粉碎机(温岭市大德中药机械有限公司);723型分光光度计(上海光谱仪器有限公司);TU-1810PC型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);WD-800B格兰仕微波炉(顺德格兰仕电器公司);离心机(上海安亭科学仪器厂);电子天平;恒温水浴锅;烘箱等。

### 1.2 试验方法

收稿日期:2013-08-03 修回日期:2013-12-26

基金项目:河北省教育厅科学研究计划(22009422)

\* 通讯作者 E-mail: huanyunliu@sina.com

### 1.2.1 龙眼壳提取物中总黄酮含量的测定

参照文献<sup>[7]</sup>,以芦丁为标准品测定龙眼壳提取物中总黄酮含量,测得标准曲线的回归方程为: $A = 0.0048 + 12.687c$  ( $A$  为吸光度值, $c$  为芦丁的质量浓度  $\text{mg/mL}$ ),  $R^2 = 0.9974$ 。

### 1.2.2 龙眼壳黄酮微波提取工艺的确定

称取过 60 目筛的干燥龙眼外壳粉末(准确至

0.0001 g),置于具塞三角瓶中,按一定料液比加入所选的浸提溶剂,微波处理后再于 30 °C 水浴中浸提 30 min,减压过滤得到提取液,定容至 50 mL。吸取 1.00 mL,显色测定吸光度值,计算总黄酮的含量。

对于选定溶剂,采用正交设计试验  $L_9(3^4)$  确定较佳微波辅助提取的工艺条件,因素及水平见表 1。每一处理平行测定二次。

表 1 正交试验因素水平设置表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factors			
	A 料液比 Ratio of material to solvent (g/mL)	B 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	C 微波功率 Microwave power (W)	D 微波时间 Treatment time (s)
1	1:20	50	160	10
2	1:30	60	320	20
3	1:40	70	480	30

### 1.2.3 龙眼壳总黄酮抗氧化活性的测定

#### 1.2.3.1 清除亚硝酸盐能力

吸取  $5\mu\text{g/mL}$  的  $\text{NaNO}_2$  2.00 mL 置于各试管中,再加入不同质量浓度的龙眼壳黄酮类化合物溶液,对照用体积分数 70% 的乙醇,最后用蒸馏水补足到 4 mL,摇匀。反应 10 min 后,各管加入质量分数 0.4% 的对氨基苯磺酸 2.00 mL,摇匀反应 5 min,再加入质量分数 0.2% 的盐酸萘乙二胺 1.00 mL,摇匀 15 min 后于波长 538 nm 处测定吸光度,根据吸光度计算清除率<sup>[8]</sup>,同时用等质量浓度的抗坏血酸代替样品作为阳性对照。

#### 1.2.3.2 对卵黄脂蛋白脂质过氧化物的抑制作用

用 0.1 mol/L pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)配制体积分数 3.85% 的卵黄悬液,分别吸取卵黄悬液 0.20 mL,加入不同质量浓度的龙眼壳黄酮类化合物溶液,对照为体积分数 70% 的乙醇。各管再加入 0.20 mL 浓度为 25 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$ ,用 0.1 mol/L pH 值 7.4 的 PBS 补充至 2 mL,37 °C 恒温振荡 15 min。取出后分别加入 0.50 mL 质量分数 20% 的三氯乙酸(TCA),3500 rpm 离心 10 min。再分别吸取上清液 2.00 mL 于试管中,加入质量分数 0.8% 的硫代巴比妥酸(TBA)1.00 mL,加塞,放入沸水浴中 15 min。冷却后于波长 532 nm 处测定吸光度,根据吸光度计算抑制率<sup>[9]</sup>,同时以等质量浓度的 BHT 代替样品作为阳性对照。

#### 1.2.3.3 清除羟基自由基·OH 的实验

取 5 mmol/L 的邻二氮菲溶液 1.50 mL,加入

pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液 2.00 mL,充分混匀后,加入 7.5 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  溶液 1.00 mL,立即混匀,再加入 1.0 mL/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  1.00 mL,最后以蒸馏水补充至 10.00 mL,37 °C 保温 1 h,在 510 nm 处测定吸光度(此为损伤管吸光度  $A_1$ );之后加入不同浓度的龙眼壳黄酮类化合物溶液 1.00 mL,再加 1.0 mL/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  1.00 mL;未损伤管不加提取物和  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。按下式计算清除率<sup>[10-11]</sup>:

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = (A_2 - A_1 / A_0 - A_1) \times 100$$

式中:  $A_0$ —未损伤管的吸光度;

$A_1$ —损伤管的吸光度;

$A_2$ —加提取物的吸光度

## 2 结果与分析

### 2.1 龙眼壳总黄酮提取工艺的测定

#### 2.1.1 提取溶剂的确定

按 1.2.2 的方法,用不同的溶剂从龙眼壳中提取黄酮,结果见表 2。可见乙醇溶液浸提效果较甲醇及丙酮溶液好。其中以 60% 乙醇的浸提得率为最高,故选择乙醇溶液作为浸提剂。

#### 2.1.2 正交试验确定最佳提取工艺

按 1.2.2 的方法,对浸提料液比、乙醇溶液浓度、微波功率、微波时间四个参数进行正交试验,结果见表 3 和表 4。方差分析表明,A、B、C 3 种因素对黄酮提取得率有极显著影响,D 因素对龙眼壳黄酮提取得率有显著影响。4 种因素影响大小的顺序为:C > B > A > D。微波辅助提取龙眼壳黄酮较佳

表 2 不同溶剂对龙眼壳黄酮浸提效果的影响

Table 2 Effects of different extractive solution on yield of Longan Pericarp

溶剂 Solvent	60% 乙醇 60% Ethanol	蒸馏水 Distilled water	50% 丙酮 50% Acetone	95% 乙醇 95% Ethanol	50% 甲醇 50% Methanol
吸光度 Absorbance	0.441	0.117	0.054	0.279	0.262
得率 Yield(%)	3.438	0.884	0.388	2.161	2.027

工艺条件为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>, 即龙眼壳粉中加入 30 倍浓度 20s。按此较佳条件进行提取, 龙眼壳黄酮得率为 70% 乙醇溶液, 然后于微波功率 480 W 处理 3.465%。

表 3 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验结果Table 3 Results of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal experiment

编号 No.	A 料液比 Ratio of material to solvent(g/mL)	B 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	C 微波功率 Microwave power (W)	D 微波时间 Treatment time(s)	得率 Yield(%)	
					w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>
1	1	1	1	1	1.862	1.752
2	1	2	2	2	2.524	2.505
3	1	3	3	3	3.115	2.973
4	2	1	2	3	2.450	2.542
5	2	2	3	1	3.225	3.323
6	2	3	1	2	2.839	2.923
7	3	1	3	2	3.050	2.986
8	3	2	1	3	2.603	2.786
9	3	3	2	1	2.839	2.934
K <sub>1</sub>	2.455	2.440	2.461	2.656		
K <sub>2</sub>	2.884	2.828	2.632	2.805		
K <sub>3</sub>	2.866	2.937	3.112	2.745		
R	0.429	0.497	0.651	0.149		

表 4 正交试验的方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal experiment

变异来源 Source	Ⅲ型平方和 Type III Sum of Squares	自由度 df	均方 Mean Square	F 值	显著性 Sig.
A	0.706	2	0.353	60.881	0.0001
B	0.818	2	0.409	70.521	0.0001
C	1.367	2	0.684	117.893	0.0001
D	0.067	2	0.034	5.792	0.0242
误差 Error	0.052	9	0.006		

注: F<sub>0.05(2,9)</sub> = 4.26; F<sub>0.01(2,9)</sub> = 8.02。

## 2.2 龙眼壳总黄酮抗氧化活性的测定

### 2.2.1 对亚硝酸盐的清除率

亚硝胺是目前所知最强的化学致癌物之一, 亚硝酸盐是亚硝胺合成的前体物质, 因此清除体内亚硝酸盐是防止癌症的有效途径之一。由图 1 可知,

龙眼壳黄酮类化合物对亚硝酸盐具有较高的清除率, 随着龙眼壳黄酮类化合物质量浓度的增大, 对亚硝酸盐的清除作用增强, 量效关系明显。在同等条件下龙眼壳黄酮类化合物对亚硝酸盐的清除率比抗坏血酸稍强。

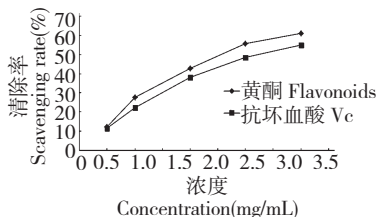


图1 龙眼壳总黄酮质量浓度对亚硝酸盐的清除率曲线

Fig. 1 Effect curve of mass concentration of Longan Pericarp flavonoids on scavenging rate of nitrite

### 2.2.2 对卵黄脂蛋白脂质过氧化的抑制率

以卵黄脂蛋白溶液为脂质过氧化体系,测定了龙眼壳黄酮类化合物对脂质过氧化的抑制作用。从图2可看出,龙眼壳黄酮类化合物对 $Fe^{2+}$ 诱导的卵黄脂蛋白脂质过氧化有抑制作用,并且随着其质量浓度的增加,抑制率逐渐增大。在同等质量浓度水平下龙眼壳黄酮类化合物对卵黄脂蛋白脂质过氧化的抑制作用弱于BHT。

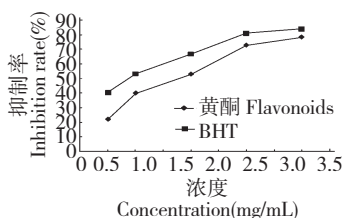


图2 龙眼壳总黄酮对卵黄脂蛋白脂质过氧化的抑制率影响曲线

Fig. 2 Effect curve of mass concentration of Longan Pericarp flavonoids on inhibition rate of lipid peroxidation of yolk lipoprotein

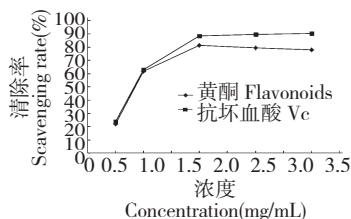


图3 龙眼壳黄酮对羟基自由基的清除效果

Fig. 3  $\cdot OH$  scavenging activity of flavonoids from the Longan Pericarp

### 2.2.3 清除羟基自由基 $\cdot OH$ 的能力

羟基自由基是最活泼的自由基,也是毒性最大的自由基,它可与活细胞中的任何分子发生反应而造成损害,且反应速度快。细胞内的 $H_2O_2$ 能与 $Fe^{2+}$ 或 $Cu^{2+}$ 离子反应生成羟基自由基,另外,紫外

线也能使 $H_2O_2$ 均裂生成羟基自由基,这也许是 $H_2O_2$ 有毒性的真正原因<sup>[12]</sup>。分别配制不同浓度梯度的龙眼壳黄酮样液和Vc溶液,按1.2.3.3方法采用510 nm为测定波长进行清除 $\cdot OH$ 能力试验。以质量浓度mg/mL为横坐标,清除率(%)为纵坐标做图3。结果表明,试样在浓度(0.5~4 mg/mL)范围内对 $\cdot OH$ 有清除作用,并且随浓度增加,其清除 $\cdot OH$ 的作用先增强后又降,说明试样含氢供体,具有提供氢质子的能力,可使具有高度氧化性的自由基还原,从而能终止自由基连锁反应,起到清除或抑制自由基的目的。但是在相同浓度下,试样清除 $\cdot OH$ 的作用明显弱于Vc,在2.0 mg/mL浓度左右,Vc的清除率已达到88.49%,而试样的清除率为81.48%。当试样的浓度大于2.0 mg/mL时,试样清除 $\cdot OH$ 的能力反而下降。

## 3 结束语

与蒸馏水、丙酮、甲醇等提取溶剂相比乙醇溶液效果较佳。微波辅助法提取龙眼壳黄酮的较佳工艺条件为:浸提乙醇溶液的较佳浓度为70%,料液比为1:30 g/mL,在微波功率480 W处理20 s,于30℃水浴浸提30 min,龙眼壳黄酮得率3.465%。

体外抗氧化试验结果表明,龙眼壳黄酮对亚硝酸盐具有良好的清除能力,其作用效果强于Vc,龙眼壳黄酮类化合物对卵黄脂蛋白脂质过氧化有明显的抑制作用,但作用效果弱于BHT,对羟基自由基也有明显的清除作用,但低于抗坏血酸的清除作用。以上实验结果表明没有纯化的龙眼壳黄酮类化合物已表现出良好的抗氧化作用,作为天然抗氧化剂具有很好的开发潜力。

## 参考文献

- 1 Wang JH(王健慧),Duan JY(段静雨). Research on the extraction of flavonoids from Wastes. *Chin Resour Comprehensive Utilization*(中国资源综合利用),2009,27(6):18-19.
- 2 Zheng GM(郑公铭),Liang HD(梁红冬),He CD(何春娣),et al. Study of antioxidation of extract from Longan Pericarp. *Chem & Bioeng*(化学与生物工程),2007,24(5):32-33.
- 3 Liu SF,Sun J,Yu L,et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of *Holotrichia parallela* Mutschulsky extracts. *Food Chem*,2012,3:91.