

超声波辅助提取变叶海棠中总黄酮工艺优化及抗氧化活性研究

温馨,田甜,沈悦,张婷,刁智文,张志清*

四川农业大学食品学院,雅安 625014

摘要:采用单因素试验和正交试验研究超声辅助碱液提取变叶海棠总黄酮的最优工艺条件,以料液比、超声温度、功率、时间为考察因素,以黄酮提取率为指标,并测定了最优条件下的提取物抗氧化活性。结果表明,最优工艺条件为料液比 60:1 mL/g,超声温度 35 °C,超声时间 8 min,超声功率 126.5 W。最优工艺条件下黄酮提取率可达 13.1432%。抗氧化分析表明,提取物有较强的还原力,清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值为 2.39 mg/L,清除羟基自由基的 IC₅₀ 值为 0.45 mg/L,且活性大小与黄酮的质量浓度呈明显的量效关系。

关键词:变叶海棠;总黄酮;超声提取;抗氧化

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.3.024

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction and Antioxidant Activity of Flavonoids from *Malus toringoides*

WEN Xin, TIAN Tian, SHEN Yue, ZHANG Ting, DIAO Zhi-wen, ZHANG Zhi-qing*

College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: In this study, total flavonoids from *Malus toringoides* were ultrasonically extracted by alkaline water. The effects of solid to liquid ratio, ultrasonic temperature, power and time on the extraction yield of flavonoids were investigated and these parameters were optimized using single factor and orthogonal experiments. In addition, the content and antioxidant activity of the extracted total flavonoids were determined. The results showed that the optimal extraction conditions were solid to liquid ratio of 60:1 mL/g, ultrasonic temperature of 35 °C, ultrasonic time of 8 min, ultrasonic power of 126.5 W. Under the optimized conditions, the content of flavonoids was 13.1432%. Antioxidant analysis showed that the extract had strong reducibility and scavenging capacity against DPPH free radicals with an IC₅₀ value of 2.39 mg/L and hydroxyl free radicals with an IC₅₀ value of 0.45 mg/L, and these activities were concentration dependent.

Key words: *Malus toringoides*; flavonoids; ultrasonic extraction; antioxidant activity

变叶海棠 [*Malus toringoides* (Rehd.) Hughes], 属蔷薇科苹果属植物^[1], 在甘孜州炉霍县形成一个典型的天然分布区, 在当地称为“俄色”树, 并作为一种辅助治疗高血压、高血脂的药用植物被当地民众使用。初步研究证明其醇提液中含有较高黄酮类化合物^[2], 并具有降血糖的功效^[3,4]。

目前对于植物中黄酮类化合物的提取一般使用乙醇等有机溶剂法, 有的辅以超声或微波处理^[5-7], 但是有机溶剂与碱水溶剂相比, 污染重, 成本高, 安全性较低, 由于黄酮在 pH 值为 8~9 时, 其酚羟基易离子化, 水溶性增强^[8], 超声波的辅助作用更能充分提取黄酮, 提取效率高, 工艺简单, 易扩大化生

产, 所以使用超声波辅助碱水提取法是一种较好的方法。目前碱水提取法中的 pH 调节剂基本为 Ca(OH)₂^[9,10], 且所需浓度较高。虽然 Ca(OH)₂ 作为食品用加工助剂, 残留量不需限定, 但较高浓度的 Ca(OH)₂ 造成的较高 pH 值会对后续加工产品风味产生负面影响且不易从溶液中除去, 所以使用 0.2% 柠檬酸钠溶液 (pH = 8) 作为提取溶剂, 柠檬酸钠可在各种食品中按生产需要适量使用, 安全无毒, 一般作酸度调节剂和稳定剂^[11], 不需除去。

本研究采用超声辅助碱水提取法, 以黄酮提取率为指标, 利用正交试验对变叶海棠中黄酮物质的提取条件进行优化, 并通过分析提取物的总还原力、对 DPPH 自由基和羟基自由基的清除能力初步探究了提取物的抗氧化活性, 以期对川西变叶海棠的商业化产品开发提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与仪器

变叶海棠,采集自甘孜州炉霍县,经四川农业大学生命科学院丁春邦教授鉴定为 *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes 变叶海棠,自然风干。

无水乙醇、 NaNO_2 、 $\text{Al}(\text{NO}_2)_3$ 、 NaOH 、柠檬酸钠、三氯乙酸、铁氰化钾、 FeCl_3 、 H_2O_2 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、水杨酸(均为分析纯,成都科龙化工试剂厂),DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼,美国 Sigma 公司),芦丁标准品(纯度 $\geq 98\%$,中国食品药品检定所,批号 100080-200707)。

UV-3100PC 型紫外-可见分光光度计,上海美普达仪器有限公司;FW-100 型粉碎机,北京中兴伟业仪器有限公司;HH-2 数显恒温水浴锅,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;DHG-9031 型电热恒温干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;JY92-2D 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的制备

精密称取芦丁标准品 10.84 mg,用 60% 乙醇水溶液超声辅助溶解,放冷后定容至 100 mL 容量瓶中,配制芦丁标准溶液(0.10 mg/mL)。精密吸取标准溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 分别置于 10 mL 比色管中,加入 60% 乙醇水溶液补足至 5 mL;加入 10% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL,混匀,静置反应 6 min;加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,混匀,静置反应 6 min;加入 8% 氢氧化钠溶液 2 mL,用 60% 乙醇溶液补足至 10 mL,混匀,静置反应 15 min,以第一管为空白对照,于 510 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标(Y),芦丁浓度为横坐标(X)绘制标准曲线。所得回归曲线方程为 $Y = 0.0128X + 0.0011$ ($r = 0.9999$),在 0~50 mg/mL 范围内线性关系良好。

1.2.2 变叶海棠中总黄酮提取工艺

取变叶海棠干叶,剔除杂质,粉碎,过 100 目筛,70 °C 烘干至恒重,常温密封保藏备用。精密称取样品 0.5 g 于 50 mL 离心管中,加入一定体积的 0.2% 柠檬酸钠溶液,以一定的超声温度、超声时间、超声功率提取,过滤,取上清液备用,采用芦丁作为标准品,按照 1.2.1 中 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 法在 510 nm 处测定吸光度,带入标准曲线回归方程计算总黄酮含量。提取率计算公式如下:

$$\text{黄酮提取率}(\%) = \frac{\text{提取液中总黄酮质量}(g)}{\text{变叶海棠样品质量}(g)} \times 100\%$$

1.2.3 单因素试验

1.2.3.1 液料比

固定超声温度 50 °C,超声时间 30 min,超声功率 195 W,选择液料比 10、20、30、40、50、60 (mL/g)。按 1.2.2 的方法提取变叶海棠中的总黄酮,考察液料比对黄酮提取率的影响。

1.2.3.2 超声温度

固定液料比 60 mL/g,超声时间 30 min,超声功率 195 W,选择超声温度 10、25、40、55、70 °C。按 1.2.2 的方法提取变叶海棠中的总黄酮,考察超声温度对黄酮提取率的影响。

1.2.3.3 超声时间

固定液料比 60 mL/g,超声温度 40 °C,超声功率 195 W,选择超声时间 5、10、15、25、35 min。按 1.2.2 的方法提取变叶海棠中的总黄酮,考察超声时间对黄酮提取率的影响。

1.2.3.4 超声功率

固定液料比 60 mL/g,超声温度 40 °C,超声时间 10 min,选择超声功率 65、130、195、260、325 W 按 1.2.2 的方法提取变叶海棠中的总黄酮,考察超声功率对黄酮提取率的影响。

1.2.4 正交试验设计

采用正交设计助手软件(V3.1 版本)采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,考察液料比、超声温度、超声时间、超声功率对提取液中黄酮含量的影响,以确定最优黄酮提取工艺,在前期单因素实验的基础上确定正交试验因素的水平。因素水平编码见表 1,每组平行试验 3 次。数据采用 SPSS 19.0 软件进行显著性分析,0.01 < P < 0.05 为差异显著,P < 0.01 为差异极显著。

1.2.5 变叶海棠提取物抗氧化活性分析

以芦丁、Vc 作对照,分别采用 Fe^{3+} 还原法、DPPH 自由基清除法和 Fenton 反应法测定正交最优水平所得的变叶海棠黄酮提取物总还原力及其对 DPPH 自由基和羟基自由基的清除率。数据采用 SPSS 19.0 软件进行显著性分析,0.01 < P < 0.05 为差异显著,P < 0.01 为差异极显著。

1.2.5.1 总还原力

参考文献^[12]加以修改。分别取 1.2.2 中样品溶液 0.0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 加入 10 mL 比色管中,以蒸馏水补足 2.5 mL。分别加入 pH 为

表1 正交试验设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Levels	因素 Factors			
	A 液料比 Solid to liquid ratio (mL/g)	B 超声温度 Ultrasonic temperature (°C)	C 超声时间 Ultrasonic time (min)	D 超声功率 Ultrasonic power (W)
1	40	35	8	162.5
2	50	40	10	195.0
3	60	45	12	227.5

6.6 的 PBS 缓冲液 2.5 mL、1% 铁氰化钾溶液 2.5 mL、50 °C 水浴 20 min。分别加入 10% TCA 溶液 2.5 mL, 混匀。分别取混合液 2 mL 加入至 10 mL 比色管中, 加蒸馏水 4 mL、0.1% 三氯化铁溶液 0.1 mL, 混匀, 静置 10 min。以蒸馏水调零, 在 700 nm 处测定吸光度, 测 3 组平行试验。吸光值越大, 还原能力越强。

1.2.5.2 DPPH 自由基清除能力

参考文献^[13]加以修改。分别取 1.2.2 中样品溶液 0.0、0.8、1.6、2.4、3.2、4.0 mL, 用 0.2% 柠檬酸钠溶液补足到 4.0 mL, 分别加入 0.004% DPPH 的乙醇溶液 4.0 mL, 室温避光反应 30 min, 以 4.0 mL 柠檬酸钠溶液与 4.0 mL 无水乙醇混合作调零管, 在 517 nm 处测定吸光度, 测 3 组平行试验, 计算公式:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_s - A_c) / A_0] \times 100\%$$

式中, A_s 为 4.0 mL 不同浓度样品溶液与 4.0 mL DPPH 溶液的吸光度; A_c 为 4.0 mL 不同浓度样品溶液与 4.0 mL 无水乙醇的吸光度, 是样品的本底吸光度; A_0 为 4.0 mL 柠檬酸钠溶液与 4.0 mL DPPH 溶液的吸光度, 为空白对照。

1.2.5.3 羟基自由基清除能力

参考文献^[14]加以修改。分别取 9 mmol/L 硫酸亚铁溶液 2 mL、9 mmol/L 水杨酸-乙醇 2 mL 加至 10 mL 比色管中。分别加入 1.2.2 中样品溶液 0.0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL, 用蒸馏水补平至 2.0 mL。再分别加入 8.8 mmol/L 过氧化氢溶液 2 mL, 37 °C 水浴 30 min。以蒸馏水调零, 在 510 nm 处测定吸光值, 测 3 组平行试验, 计算公式:

$$\text{羟基自由基清除率}(\%) = [1 - (A_s - A_c) / A_0] \times 100\%$$

式中, A_s 为加入不同量样品溶液, 进行反应后的吸光值。 A_c 为加入不同量样品溶液, 其余试剂由蒸馏水代替的吸光值, 是样品的本底吸光度。 A_0 为 2 mL 蒸馏水代替样品溶液, 其余试验条件不变测得

的吸光值, 为空白对照。

2 结果与分析

2.1 各单因素对变叶海棠黄酮提取率影响

由图 1(A) 可知, 随着液料比的增大, 溶剂与浸提物的接触越充分, 总黄酮的提取率也增大, 两者呈正相关关系, 但增大的速率逐渐减小, 在 40 mL/g 后增大的不明显, 说明黄酮可能已经被充分提取。在实际生产中, 要综合考虑到提取剂用量、加工器械容量及后续可能需要蒸发浓缩料液产生的加工成本, 液料比不能过高, 可以取在 40 到 60 mL/g 之间。

由图 1(B) 可知, 随着超声温度的增大, 当温度升高到 25 °C 与 40 °C 时, 黄酮提取率较高, 40 °C 后温度再升高, 黄酮得率呈下降趋势。原因可能是随着温度升高黄酮物质的溶出速度加快, 黄酮的溶解度也在提高, 而较高温度可能使蛋白质变性, 生物膜的通透性改变, 使黄酮不易析出^[15], 同时考虑到高温对后续加工产品的感官性状有不良影响, 设备能耗也比较高, 可以选取 40 °C 进行下一步试验。

由图 1(C) 可知, 随着超声时间的延长, 变叶海棠中黄酮得率逐渐增大, 当时间达到 10 min 时, 黄酮得率最高。10 min 之后时间再增加, 黄酮得率呈下降趋势。原因可能是随着时间的增加, 细胞破碎率越高, 促进了黄酮析出。时间过长, 析出的某些物质变性或与黄酮反应, 也可能是超声时间过长产生的热效应对黄酮类化合物的稳定性有一定影响, 使得率下降^[16]。总体来看短时超声的总黄酮得率比长时超声的得率高, 因此选择超声时间 10 min 为宜。

由图 1(D) 可知, 随着超声功率的增大, 变叶海棠中黄酮得率逐渐增大, 当功率达到 195 W 时, 黄酮得率最高。195 W 之后功率再升高, 黄酮得率呈下降趋势。原因可能是随着功率的升高, 细胞破碎率越高, 促进了黄酮析出。而较高功率超声波与介

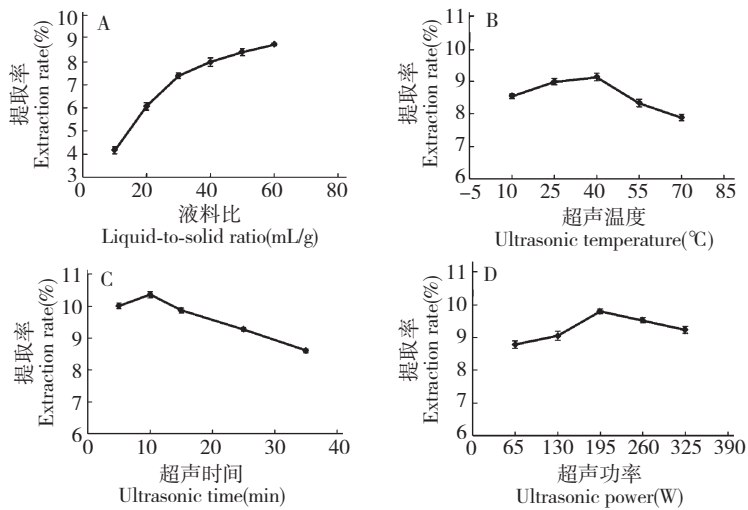


图1 液料比(A)、超声温度(B)、超声时间(C)及超声功率(D)对变叶海棠黄酮提取率影响

Fig. 1 Effects of liquid-to-solid ratio (A), ultrasonic temperature (B), ultrasonic time (C) and ultrasonic power (D) on extraction rate of total flavonoids from *M.*

质相互作用程度不同,提取率反而下降^[17]。但是总体来看,超声功率变化对黄酮提取的影响并不明显,在实际生产中还要考虑到节能省电,可选取 195 W 为宜。

2.2 正交试验优化变叶海棠黄酮提取方法

从表 2 的正交试验结果可知,影响总黄酮提取

率的顺序为:料液比 > 超声时间 > 超声功率 > 超声温度,其中料液比、超声时间对总黄酮提取率影响较显著,故变叶海棠中总黄酮的提取的最佳工艺参数为 A₃B₁C₁D₁,即料液比 60 mL/g,超声温度 35 °C,超声时间 8 min,超声功率 126.5 W。

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

试验号 No.	A 液料比 Solid to liquid ratio (mL/g)	B 超声温度 Ultrasonic temperature (°C)	C 超声时 Ultrasonic time (min)	D 超声功率 Ultrasonic power (W)	提取率 Extraction rate (%)
1	1(40)	1(35)	1(8)	1(162.5)	10.4984
2	1(40)	2(40)	2(10)	2(195.0)	10.0766
3	1(40)	3(45)	3(12)	3(227.5)	8.7953
4	2(50)	1(35)	2(10)	3(227.5)	10.5645
5	2(50)	2(40)	3(12)	1(162.5)	10.2520
6	2(50)	3(45)	1(8)	2(195.0)	11.1504
7	3(60)	1(35)	3(12)	2(195.0)	10.6852
8	3(60)	2(40)	1(8)	3(227.5)	11.3648
9	3(60)	3(45)	2(10)	1(162.5)	11.2008
K ₁	9.7901	10.5827	11.0045	10.6504	
K ₂	10.6556	10.5645	10.6140	10.6374	
K ₃	11.0836	10.3822	9.9108	10.2415	
R	1.2935	0.2005	1.0937	0.4089	

在最适宜的工艺条件下进行从变叶海棠中提取黄酮的验证实验,共进行 3 组平行实验,提取率分别

是 13.1172%、13.0391%、13.2734%,平均值为 13.1432%。

2.3 变叶海棠黄酮提取物抗氧化活性分析

由图2(A~C)可知,根据正交最优条件制得的变叶海棠超声碱水黄酮提取物的还原力、DPPH 自由基清除率、羟基自由基清除率在一定范围内随着总黄酮质量浓度的增大而增大。提取物的抗氧化能力较芦丁稍低但十分接近,芦丁是黄酮分析的主要对照物,本研究的提取方法也主要是针对黄酮类物质的提取,所以其相同浓度的提取物与芦丁溶液的抗氧化能力之间差异不显著($P > 0.05$);其还原力和 DPPH 自由基的清除能力在 0.37~1.85 mg/L 浓度范围内均低于相同浓度 Vc 溶液($P < 0.01$),提取物对 DPPH 自由基的 $IC_{50} = 2.39$ mg/L,但是在此浓度范围内提取物和芦丁对羟基自由基的清除率高于

Vc 溶液,提取物 $IC_{50} = 0.45$ mg/L。抗氧化作用是机体对体内自由基通过清除自由基、抑制自由基的产生与激活机体抗氧化体系等不同机制来实现的,在体外测定抗氧化作用的方法中是基于不同抗氧化剂对 DPPH 自由基,羟基自由基或者 Fe^{2+} 的还原作用来分析其抗氧化能力的高低,由于抗氧化剂结构差异,往往导致其在对不同检测体系中所反映出来的抗氧化能力差异明显^[18,19],研究表明,黄酮类物质 B 环 4'-OH 具有显著的清除羟基自由基的作用,酚羟基对羟基自由基的清除能力大于 Vc 的烯醇羟基^[20]。本研究结果也证明,变叶海棠中提取物主要为黄酮类物质,其抗氧化特性类似芦丁,不同于 Vc。

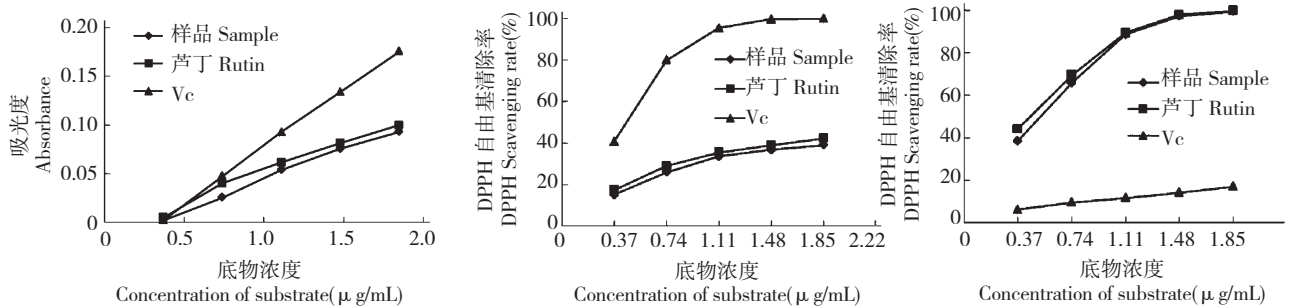


图2 变叶海棠黄酮提取物的总还原力(A)、DPPH 自由基清除率(B)及羟基自由基清除率(C)

Fig. 2 Total reducing power (A), DPPH scavenging rate (B) and $\cdot OH$ scavenging rate (C) of flavonoids from *M. toringoides*

3 结论

在超声碱水辅助提取法的最优条件下,即液料比 60 mL/g,超声温度 35 °C,超声时间 8 min,超声功率 126.5 W 时,变叶海棠中总黄酮含量 13.1432%,其结果相对王道清^[3]的研究结果(2.150%)的超声有机溶剂提取法的提取率高出很多,可能是因为原材料的采收季节、产地不同而形成差异,本试验所用变叶海棠经预处理只保留了嫩叶部位,且烘干至恒重,使得提取率较高。变叶海棠的超声辅助碱水提取物的抗氧化能力与芦丁接近,其总还原力和 DPPH 自由基清除率低于 Vc,其羟基自由基清除率高于 Vc,说明有较好的体外抗氧化活性,其食用、医药方向的开发应用前景广阔。

参考文献

- 1 Wang HY(王海英), Xu Q(徐庆), Fan GQ(樊高强), et al. Progress in the study of *Malus toringoides* and its application prospect. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2009, 25: 155-160.

- 2 Wang DQ(王道清). Pharmacognosy research on Zang medicine "ESe". Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (成都中医药大学), MSc. 2012.
- 3 Li D(李丹), Peng C(彭成), Xie XF(谢晓芳), et al. Effect of three different extracts from *Malus toringoides* in experimental diabetic mice. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2013, 19: 199-203.
- 4 Hua H(华桦), Liao L(廖利), Zhu N(朱宁), et al. Effect of *Malus toringoides* on KK-Ay Mice. *Pharm Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2014, 30(2): 96-98.
- 5 Bi WT, Yoon CH, Row KH. Ultrasonic-assisted enzymatic ionic liquid-based extraction and separation of flavonoids from *Chamaecyparis obtusa*. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2013, 36: 2029-2043.
- 6 Gao PY(高品一), Jin M(金梅), Yang D(杨颀), et al. Optimization of extraction technology of flavonoids from *Rose Laevigata* Michx. and their comparison. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2014, 35: 237-241.
- 7 Routray W, Orsat V. Microwave-assisted extraction of flavonoids: A review. *Food Bioproc Tech*, 2012, 5: 409-424.

(下转第 461 页)