

商洛产粗榧叶总黄酮提取工艺和抗氧化活性研究

刘晓娇^{1,2},李彬¹,王娟³,吕欣^{2*}

(1. 商洛学院 生物医药与食品工程学院,陕西 商洛 726000;2. 西北农林科技大学 食品科学与工程学院,陕西 杨陵 712100;
3. 西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨陵 712100)

摘要:对商洛产粗榧叶总黄酮乙醇浸提工艺的研究,并测定其抗氧化活性。以总黄酮得率为依据,通过提取时间、料液比、乙醇浓度、提取温度的单因素和正交试验确定最佳醇提工艺,以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,C₁₈H₁₂N₅O₆)清除率测定总黄酮的抗氧化活性。结果表明,粗榧叶中乙醇浸提工艺的最佳条件为:55%乙醇(V/V)80℃提取 2.5 h,料液比 1:15、浸提 3 次。粗榧叶中总黄酮得率 5.910%,且具有良好的抗氧化活性。

关键词:粗榧;黄酮;乙醇浸提;正交试验

中图分类号:S718.43 文献标志码:A 文章编号:1001-7461(2017)02-0225-05

Extraction Process and Antioxidant Activity of Total Flavononoids of *Cephalotaxus sinensis* Leaves from Shangluo

LIU Xiao-jiao^{1,2}, LI Bin¹, WANG Juan³, LYU Xin^{2*}

(1. School of Biomedicine and Food Engineering, Shangluo University, Shangluo, Shaanxi 726000, China;
2. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
3. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The aims of this study were to establish optimal ethanol extraction process from the leaves of *Cephalotaxus sinensis*, and to measure the antioxidant activity of the extracts. The optimal ethanol extraction conditions were obtained as ethanol concentration: 55% (V/V), extraction temperature: 85℃, extraction time: 2.5 h, material to solvent ratio: 1:15, times of extraction: 3, by which the extraction yield of total flavonoids was 5.910%, and presenting good anti-oxidant activity.

Key words: *Cephalotaxus sinensis*; flavonoid; ethanol extraction process; orthogonal experiment

粗榧(*Cephalotaxus sinensis*)为我国特有树种,属于三尖杉科植物。我国陕西、云南、浙江、贵州、四川等地为该种植物的主要分布区^[1]。该属植物中含有黄酮、生物碱和二萜类等多种化学成分,具有抗癌、抗肿瘤、治疗白血病和除草等多种生物学活性^[2-3],其中对生物碱的研究最多^[4]。在进行抗糖尿病中药筛选中发现,粗榧乙醇提取物具有明显降低糖尿病大鼠血糖的作用,该功能与所含黄酮类化合物相关^[5],游离的黄酮类化合物一般难溶或不溶于水,能溶于甲醇、乙醇、乙醚与乙酸乙酯等有机溶剂或稀碱中^[6]。由于

乙酸乙酯、乙醚、甲醇具有一定的毒性,因此,乙醇提取法成为总黄酮提取的常用方法。在杜仲叶、对叶大戟、吊石苣苔、沙棘叶、大豆等植物总黄酮的提取中均有研究报道^[7-11]。目前有关海南粗榧研究较多,鲜见陕西商洛粗榧资源的相关报道。此前已对粗榧种子油脂的提取及抗氧化活性进行了分析^[12],为了更全面地提高秦岭特色中药资源——粗榧的利用率,针对商洛产粗榧叶总黄酮乙醇提取工艺进行研究,并进行抗氧化活性测定,为进一步合理利用粗榧资源提供一定的数据支持和理论依据。

收稿日期:2016-07-15 修回日期:2016-07-26
基金项目:商洛学院 2012 年服务地方经济社会发展专项项目(12sky-fwd007)。
作者简介:刘晓娇,女,讲师,在读博士,研究方向:食品分析与检测。E-mail:78xlj@163.com
* 通信作者:吕欣,男,博士生导师,研究方向:食品微生物。E-mail:xinlu@nwsuaf.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料:粗榧采自商洛市镇安县木王国家森林公园(33°26′42.61″N,108°39′39.02″E),经商洛学院生物医药与食品工程学院李筱玲鉴定为粗榧(*Cephalotaxus sinensis*)。

试剂:芦丁标准品(购自国家标准物质中心网)、CH₃CH₂OH、NaNO₂、Al(ON)₃、NaOH、石油醚等均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

MC 京制电子天平,北京时代山峰科技有限公司;高速万能粉碎机,北京科伟永兴仪器有限公司;HHS 型电热恒温水浴锅,上虞市鑫达实验设备厂;SHZ-DⅢ循环水真空泵,上海英化仪器设备有限公司;7230G 可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;DHG-9132A 电热恒温鼓风干燥箱,常州迈科诺仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 原料脱脂处理 将粗榧叶水洗后晾干,置于烘箱中 60℃干燥至恒重,粉碎。取 10 g 粗榧叶粉末加入 80 mL 石油醚浸泡 1.5 h,水浴 70℃加热回流 1.5 h,过滤除去滤液,向残渣中加入 60 mL 石油醚加热回流 1 h,过滤弃去石油醚,干燥后的残渣用于提取总黄酮^[12]。

1.3.2 总黄酮含量的测定

1.3.2.1 标准曲线的制作^[13] 准确称取 0.0500 g 烘干至恒重的芦丁标准品,加入 85%(V:V)乙醇溶解,并定容至 100 mL 容量瓶中,质量浓度为 0.5 mg/mL。精确吸取该浓度芦丁标准溶液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 和 3.0 mL 于 7 支 25.0 mL 的比色管中,用 85%乙醇稀释到 10.0 mL 处,加 0.80 mL 浓度为 5%的亚硝酸钠溶液,混匀,静置 10 min;加 0.80 mL 质量浓度为 10%硝酸铝溶液,混匀,静置 10 min;再加 10.00 mL 质量浓度为 4%的氢氧化钠溶液,用 85%乙醇溶液补齐至刻度,混匀,静置 10 min 后在 510 nm 处测定吸光度,以不加标准溶液的比色管为空白对照,以吸光度为纵坐标,芦丁标准溶液质量浓度(mg/mL)为横坐标绘制标准曲线。

1.3.2.2 样品中总黄酮得率的测定 准确称取 3.000 g 脱脂后的粗榧叶样品,用乙醇浸提总黄酮后除去乙醇,将浓缩液定容至 100 mL 容量瓶中。吸取 0.50 mL 提取液于 25.00 mL 比色管中,然后按 1.3.2.1 方法进行测定,由标准曲线计算总黄酮浓度,按式(1)计算总黄酮得率。

$$\text{总黄酮得率}=\times\frac{C_0\times V\times A}{1000\times M}\times 100\% \tag{1}$$

式中,C₀:样品中黄酮的浓度,mg/mL;A:稀释倍数;V:提取液体积,mL;M:粗榧叶质量,g。

1.3.3 乙醇浓度、提取时间、提取温度、料液比对粗榧叶总黄酮得率的影响

1.3.3.1 乙醇浓度对总黄酮得率的影响 取 5 份 3.000 g 脱脂后的粗榧叶,分别加入 60 mL 100%、80%、60%、40%、20% 乙醇在 80℃下回流提取 3 h,测定总黄酮得率,以下试验均重复 3 次。

1.3.3.2 提取时间对总黄酮得率的影响 取 5 份 3.000 g 脱脂后的粗榧叶,均加入 60 mL、80%的乙醇,在 80℃下分别回流提取 1、2、3、4 h 和 5 h,测定总黄酮得率。

1.3.3.3 提取温度对总黄酮得率的影响 取 5 份 3.000 g 脱脂后的粗榧叶,分别在 50℃、60℃、70℃、80℃、90℃的水浴温度下用 60 mL、80%乙醇回流提取 3 h,测定总黄酮得率。

1.3.3.4 料液比对总黄酮得率的影响 取 5 份 3.000 g 脱脂后的粗榧叶,分别用 30、45、60、75 mL 和 90 mL 的 80%乙醇溶液在 80℃下对 3 g 粗榧叶样品回流提取 3 h,测定总黄酮得率。

1.3.4 不同组合因子对粗榧叶总黄酮得率的影响 根据单因素试验结果,设计 L₉(3⁴)正交试验,具体设计见表 1。

表 1 正交试验设计

Table 1 Orthogonal experimental design

水平	因素			
	乙醇 A/%	料液比 B	提取 时间 C/h	提取 温度 D/℃
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁
2	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂
3	A ₃	B ₃	C ₃	D ₃

1.3.5 最佳提取次数的确定 在最佳提取工艺条件下,对脱脂后的粗榧叶样品回流提取 4 次,分别测定总黄酮得率,重复 3 次。

1.3.6 抗氧化活性的测定^[14] 用无水乙醇溶解 DPPH,配成浓度为 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液。配制浓度为 0.05~1.00 mg/mL 的粗榧叶总黄酮样品液和维生素 C 溶液。在试管中加入 2 mL 总黄酮提取液和 DPPH 溶液,摇匀,暗处静置 30 min 后在 510 nm 处测定其吸光度 A_{sample};2 mL 测试样品溶液与 2 mL 无水乙醇混合后的吸光度作为 A_{blank};2 mL 蒸馏水溶液与 2 mL DPPH 混合后的吸光度为 A_{control},用 Vc 溶液(1.0 mg/mL)做对照。DPPH 自由基清除能力用式(2)表示:

清除率 = $(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}}}) \times 100\%$ (2)

2 结果与分析

2.1 芦丁标准曲线的制作

由图 1 可知,当标准品含量为 0.01~0.06 mg · mL⁻¹时,与吸光度值有良好的线性关系。

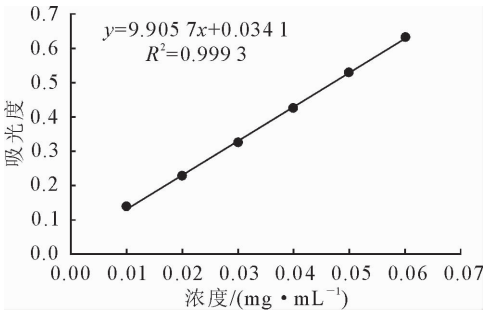


图 1 芦丁标准曲线
Fig. 1 Rutin standard curve

2.2 乙醇浓度、提取时间、提取温度、料液比对粗榧叶总黄酮得率的影响结果

2.2.1 乙醇浓度对粗榧叶总黄酮得率的影响 在浸提温度 80℃、料液比 1 : 20、浸提时间 3 h 的条件下,乙醇浓度对粗榧叶总黄酮得率的影响如图 2 所示。

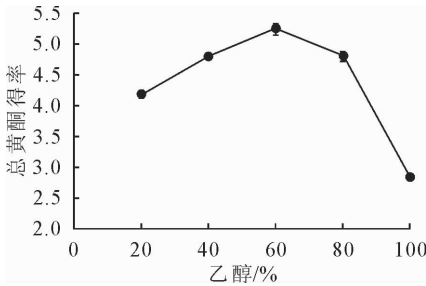


图 2 乙醇浓度对粗榧叶总黄酮得率的影响
Fig. 2 Influence of ethanol concentration on the extraction rate of the total flavonoids from the leaves of *C. sinensis*

由图 2 可知,当乙醇浓度逐渐增加时,粗榧叶总黄酮得率先增加然后逐渐减小,当乙醇浓度为 60% 时,粗榧叶中总黄酮提取率最高。因此,选择 55%、60%、65% 作为正交试验乙醇浓度的 3 个水平。

2.2.2 提取时间对粗榧叶总黄酮得率的影响 在浸提温度 80℃、料液比 1 : 20、乙醇浓度 80% 的条件下,不同提取时间对粗榧叶中总黄酮得率的影响如图所示 3。

由图 3 可知,当提取时间为 1~3 h 时,粗榧叶总黄酮得率随时间延长而增加,当提取时间为 3 h 时,得率最高,当提取时间 > 3 h 时,得率反而下降。基于此,本研究选择 2.5、3.0 h 和 3.5 h 为正交试

验浸提时间的 3 个水平。

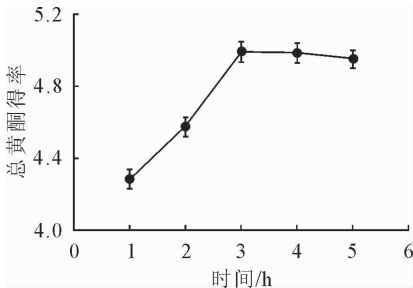


图 3 提取时间对粗榧叶总黄酮得率的影响
Fig. 3 Influence of extraction time on the extraction of the total flavonoids from the leaves of *C. sinensis*

2.2.3 提取温度对粗榧叶总黄酮得率的影响 在浸提时间 3 h、料液比 1 : 20、乙醇浓度 80% 的条件下,浸提温度对粗榧叶总黄酮得率的影响如图 4 所示。

由图 4 可知,当逐渐提高提取温度时,粗榧叶中总黄酮得率也渐渐增大,在 80℃ 时得率最高。因此,选择 75、80℃ 和 85℃ 为正交试验浸提温度的 3 个水平。

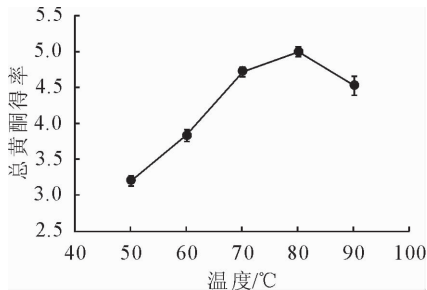


图 4 提取温度对粗榧叶总黄酮得率的影响
Fig. 4 Influence of extraction temperature on the extraction of the total flavonoids from the leaves of *C. sinensis*

2.2.4 料液比对粗榧叶总黄酮得率的影响 在浸提时间 3 h、浸提温度 80℃、乙醇浓度 80% 的条件下,料液比对粗榧叶中总黄酮得率的影响见图 5。

由图 5 可知,当料液比达到 1 : 20 时,粗榧叶总黄酮得率达到最大。因此选择 1 : 15、1 : 20、1 : 25 为正交试验料液比的 3 个水平。

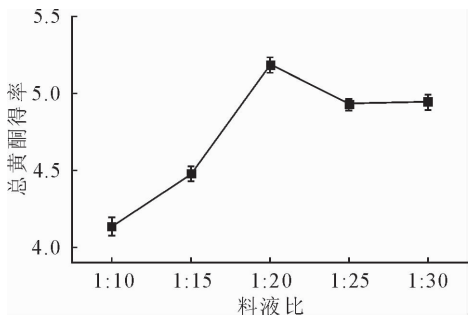


图 5 料液比对粗榧叶总黄酮得率的影响
Fig. 5 Influence of solid-liquid ratio on the extraction of the total flavonoids from the leaves of *C. sinensis*

2.3 不同因子组合对粗榧叶总黄酮得率的影响

2.3.1 正交试验结果 由表 2 可知,C(提取时间)对粗榧叶总黄酮得率的影响最大,B(料液比)最小。4 个因素的最佳组合为 $A_1B_1C_1D_1$ 。从表 2 计算的 k 值得得,最佳水平组合为 $A_1B_1C_1D_2$ 。

由表 3 可知,在 $\alpha=0.05$ 的条件下, $F_{0.05}(2,27)=3.35$, F_A 、 F_B 、 F_C 、 F_D 均大于 $F_{0.05}(2,27)$,根据 F 值和 $Sig.$ 值大小判断,以上 4 个因素对粗榧叶总黄酮提取效果影响均显著。

表 2 正交试验结果

Table 2 Result of orthogonal experiment

序号	因素				总黄酮得率/%
	乙醇 A /%	料液比 B	提取时间 C/h	提取温度 D/℃	
1	1	1	1	1	5.230
2	1	2	2	2	4.733
3	1	3	3	3	4.348
4	2	1	2	3	4.270
5	2	2	3	1	4.255
6	2	3	1	2	4.653
7	3	1	3	2	4.538
8	3	2	1	3	4.474
9	3	3	2	1	4.423
k_1	4.770	4.679	4.486	4.636	
k_2	4.393	4.487	4.475	4.641	
k_3	4.478	4.475	4.380	4.364	
R	0.377	0.204	0.406	0.277	

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

方差来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F	Sig.
A	1.281	2	0.641	79.216	0
B	0.071	2	0.036	4.404	0.028
C	1.433	2	0.716	88.594	0
D	0.409	2	0.204	25.264	0
误差	0.146	18	0.008		
总计	569.335	27			

2.3.2 验证试验 以正交试验得出的最佳水平组合 $A_1B_1C_1D_2$ 做验证性试验,以总黄酮得率为考察指标确定最佳工艺条件。验证试验结果见表 4。

表 4 表明, $A_1B_1C_1D_2$ 条件下,粗榧叶中总黄酮得率为 5.910%,高于 $A_1B_1C_1D_1$ 工艺条件下的 5.230%。所以粗榧叶总黄酮提取最佳工艺为 $A_1B_1C_1D_2$,即乙醇溶液浓度为 55%,料液比为 1:15,提取时间为 2.5 h,提取温度为 80℃。

2.3.3 最佳提取次数的确定 在已确定的最佳工艺条件对 3.000 g 粗榧叶样品回流提取 1、2、3 次和 4 次,测定黄酮得率(图 6)。由图 6 可知,当提取第 3 次和第 4 次时,粗榧叶中总黄酮得率趋于 0%,则其最佳提取次数为 3 次。

表 4 验证试验结果

Table 4 Results of verification experiment

序号	黄酮得率/%
1	5.903
2	5.898
3	5.915
平均值	5.910

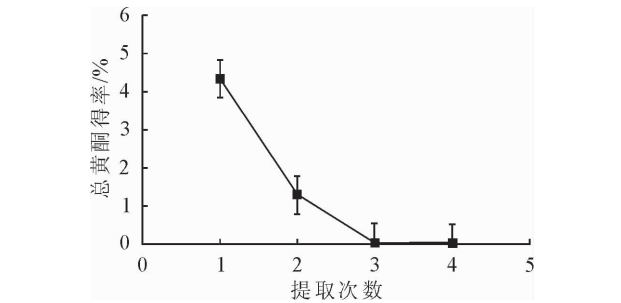


图 6 总黄酮得率与提取次数的关系
Fig. 6 Relationship between extraction rate of total flavonoids and extraction times

2.4 抗氧化活性的测定

由图 7 可知,粗榧总黄酮提取液和 Vc 溶液对 DPPH 的清除率均随浓度的增加而增大,且同浓度的粗榧总黄酮样品溶液对 DPPH 的清除率要高于 Vc 溶液,说明粗榧叶总黄酮有良好的抗氧化能力。

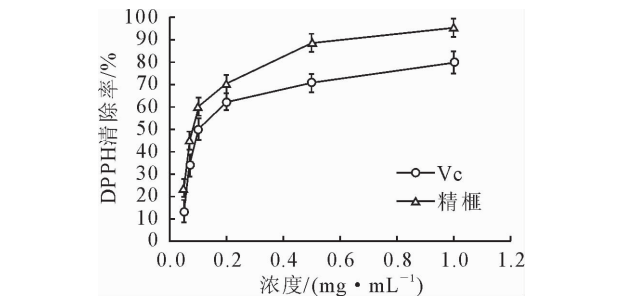


图 7 DPPH 清除率与样品浓度的关系
Fig. 7 Relationship between DPPH free radical scavenging rate and concentration of sample solution

3 结论与讨论

研究乙醇浸提商洛产粗榧叶中总黄酮的工艺条件,结果表明最佳提取工艺为:乙醇溶液浓度为 55%,料液比为 1:15,提取时间为 2.5 h,提取温度为 80℃,在此基础上确定了其最佳提取次数为 3 次。由于目前未见有关粗榧总黄酮提取的相关文献,因此将该研究结果与其他试验材料总黄酮提取的文献进行比较,经分析发现,该提取条件与目前报道的有关总黄酮提取的文献未见完全一致,但部分提取条件一致。如陈艳^[13]等在其研究中发现总黄酮最佳提取条件:提取温度 50℃,提取时间 2 h,乙醇质量分数 60%,料液比 1:20。这是因为不同试

验材料所含成分不同,总黄酮存在形式也不尽相同,所以提取条件存在差异。为了有效利用商洛产粗榧进行抗氧化应用,因此有必要对其总黄酮的提取工艺进行研究。

在最佳提取条件下,粗榧叶总黄酮得率为 5.910%,远高于陈艳^[13]等、高红岩^[15]、陈建福^[16]等,研究其具有良好的抗氧化活性,说明粗榧是一种良好的抗氧化物质提取的材料。该研究弥补了有关商洛产粗榧总黄酮提取的研究空白,为进一步开发利用粗榧资源提供了一定的研究基础和数据支持。

总黄酮提取的方法除了乙醇浸提法,还有超声波法、微波协同酶法、闪式提取法、索氏提取法等^[17-19],后期可以比较不同方法对商洛产粗榧叶总黄酮的提取效果,以期确定更有效的商洛产粗榧叶总黄酮提取方法。

参考文献:

[1] 周玫,马琳,郝小江,等. 黔产三尖杉抗肿瘤活性成分研究[J]. 中国药科大学学报,2009,40(3):209-212.
ZHOU M, MA L, HAO X J, *et al.* Antitumor activities of chemical constituents of *Cephalotaxus fortunei* in Guizhou province[J]. Journal of China Pharamaceutical University, 2009,40(3):209-212. (in Chinese)

[2] 蒋丹,张永谦,戴荣继,等. 制备高效液相色谱法快速纯化粗榧中的山茶苷[J]. 分析仪器,2012,23(5):35-38.
JIANG D,ZHANG Y Q,DAI R J, *et al.* Quickly purification of camellia glycosides a from *Cephalotaxus sinensis* by preparative HPLC[J]. Analytical Instrumentation, 2012, 23 (5): 35-38. (in Chinese)

[3] 拓亚琴,慕小倩,郝又红. 中国粗榧生物碱除草活性[J]. 农药,2006,45(1):52-53.
TUO Y Q,MU X Q,HAO S H. The herbicidal activity of alkaloids from *Cephalotaxus sinensis*[J]. Chinese Journal of Pesticides,2006,45(1):52-53. (in Chinese)

[4] 蒋丹,戴荣继,邓玉林,等. 粗榧中低含量黄酮类化学成分的研究[J]. 安徽农业科学,2013,41(9):3848-3849.

[5] 李伟,禹玉洪,戴荣继,等. HPLC-DAD 及 HPLC-MS 研究干燥工艺对中药粗榧化学成分的影响[J]. 精细化工,2007,24(4):350-354.
LI W,YU Y H,DAI R J, *et al.* Effect of drying on the chemical constituents of *Cephalotaxus sinensis* extract by HPLC-DAD and HPLC-MS[J]. Fine Chemical, 2007, 24 (4): 350-354. (in Chinese)

[6] 王海燕,刘阳,余海忠,等. 襄麦冬总黄酮体外抑菌活性试验研究[J]. 食品研究与开发,2016,37(6):31-33.

[7] 罗飞华,杨莉,张萍,等. 杜仲叶中总黄酮抗氧化性能研究[J]. 应用化工,2016,45(5):868-859,865.
LUO F H,YANG L,ZHANG P, *et al.* Study on the antioxidant activity of flavones from *Eucommia ulmoides* leaves[J]. Applied Chemical Industry,2016,45(5):868-859,865. (in Chinese)

[8] 再乃普古丽·伊斯马伊力,外塔尼古丽·卡米力,阿布拉江·克依木.“对叶大戟”总黄酮的提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2016,37(9):132-137.

[9] 汪志勇,刘红,徐红,等. 黔产吊石苣苔中总黄酮提取工艺优化[J]. 安徽农业科学,2016.44(10):163-165.

[10] 安乐,郁长治,郭小娜. 沙棘叶中总黄酮提取纯化工艺研究[J]. 安徽农业科学,2016,44(11):154-155.

[11] 杨云舒,李荣,姜子涛,等. 月桂叶黄酮的微波提取及抗氧化性能的细胞模型法评价[J]. 食品工业科技,2016,37(8):290-294.

[12] 刘锡建,王艳辉,李平,等. 沙棘果渣中总黄酮提取的研究[J]. 北京化工大学学报,2004,31(1):18-21.
LIU X J,WANG Y H,LI P, *et al.* Extraction of total flavones from marc of *Sea buckthorn*[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology,2004,31(1):18-21. (in Chinese)

[13] 陈艳,陈键. 穿心莲总黄酮乙醇提取工艺的研究[J]. 安徽化工,2009,35(2):35-38.
CHEN Y, CHEN J. Ethanol extraction processing of flavonoids from *Herba andrographitis*[J]. Anhui Chemical Industry,2009,35(2):35-38. (in Chinese)

[14] 陆英,吴朝比,蒋华军,等. 红薯叶黄酮分离纯化工艺及抗氧化性研究[J]. 食品科学,2009,30(14):114-118.
LU Y,WU C B,JIANG H J, *et al.* Extraction, purification and antioxidation of total flavonoids from sweet potato leaves[J]. Food Science,2009,30(14):114-118. (in Chinese)

[15] 高红岩. 生姜中总黄酮的提取工艺及其稳定性的研究[J]. 食品科技,2016,41(4):204-207.
GAO H Y. The extraction methods of total flavonoids from *ginger* and their stability in different menstruum[J]. Food Science,2016,41(4):204-207. (in Chinese)

[16] 陈建福,林洵,陈美慧,等. 超声波辅助提取石橄榄总黄酮的工艺[J]. 上海交通大学学报,2016,34(2):33-39.
CHEN J F,LIN X,CHEN M H, *et al.* Study on ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Pholidota chinensis* Lindl[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, 2016, 34 (2):33-39. (in Chinese)

[17] 王飞,樊金拴,冯慧英,等. 青扦针叶总黄酮超声提取及抗氧化活性[J]. 西北林学院学报,2016,31(1):243-249.
WANG F,FAN J S,FENG H Y, *et al.* Ultrasound assisted extraction and antioxidant activities of total flavonoids in the needles of *Picea wilsonii*[J]. Journal of Northwest Forestry University,31(1):243-249. (in Chinese)

[18] 王晓林,钟方丽,薛健飞,等. 微波协同酶法提取刺玫叶总黄酮工艺研究[J]. 西北林学院学报,2015,30(4):246-250.
WANG X L,ZHONG F L,XUE J F, *et al.* Extraction technology of total flavonoids in the leaves of *Rosa davurica* with microwave assisted enzymes method[J]. Journal of Northwest Forestry University,2015,30(4):246-250. (in Chinese)

[19] 彭金年,李银保,程庚金生,等. 菟丝子总黄酮不同提取方法的比较[J]. 西北林学院学报,2010,25(2):140-142.
PENG J N,LI Y B,CHENGGENG J S, *et al.* Extraction of total flavonoids from *Cuscuta chinensis*[J]. Journal of Northwest Forestry University,2010,25(2):140-142. (in Chinese)