

正交设计优化紫荆果总黄酮醇提工艺

李红平,董方亮

(鹤壁职业技术学院,河南 鹤壁 45803)

摘要:以紫荆果总黄酮提取率为考察指标,采用乙醇浸提法提取紫荆果中总黄酮,对工艺参数通过单因素试验及正交试验进行优化。通过与二丁基羟基甲苯(BHT)的对照实验,初步探究了紫荆果中的总黄酮对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除活性。结果表明:乙醇浸提法最佳工艺为料液比为1.5:60(g:mL),浸提时间为2.5 h,浸提温度为80℃,提取剂乙醇浓度为75%。此条件下总黄酮提取率可高达2.910%。紫荆果中的总黄酮对羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除活性高于相同浓度的BHT。

关键词:紫荆果;总黄酮;提取率;清除活性;羟自由基

中图分类号:S131;S132 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2014.05.0735

Orthogonal Design Optimization for Extraction Process of Total Flavonoids in *Cercis Chinensis*

LI Hong-ping, DONG Fang-liang

(Hebi College of Vocation and Technology, Hebi 458030, China)

Abstract: To optimize the extraction of total flavonoids in *Cercis chinensis* Bunge and study the scavenging effect on hydroxyl radicals, flavonoids from *Cercis chinensis* Bunge were extracted by using ethanol. The preferred extraction conditions were determined by single factor experiment and orthogonal experiment. The result showed that the optimal condition was ethanol concentration 75%, solid-liquid ratio 1.5:60(g:mL), temperature at 85℃ and extraction for 2.5 h. The extraction ratio of flavonoids reached up to 2.910% by using spectrophotometry. Antioxidant effects of flavonoids and BHT were measured to remove hydroxyl radicals by comparative experiments, the effect of the same concentration of flavonoids was better than BHT.

Key words: *Cercis chinensis* Bunge; Flavonoids; Extraction ratio; Scavenging effect; Hydroxyl radicals

黄酮类化合物是一类多酚类物质,广泛存在于高等植物及以植物为原料的食品中,是植物在长期自然选择过程中产生的一些次级代谢产物,参与蛋白质的磷酸化、钙离子的转移、自由基的清除、氧化还原作用、整合作用和基因的表达等生理活动,是一类极具开发前景的天然药物^[1-3]。

紫荆(*Cercis chinensis* Bunge)属豆科植物,其花、果、树皮和木材均可入药,具有活血行气、清热解毒、消肿止痛等功效^[4]。研究发现,紫荆含有丰富的黄酮类化合物^[5],目前已有关于紫荆花及紫荆皮总黄酮提取的研究^[6-7],但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,以总黄酮提取率为考察指标,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,为紫荆在医药领域的综合开发利用提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料 紫荆果,采集于郑州人民公园。

1.1.2 试剂 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、双氧水及氯化铁均为市购优级纯。

1.1.3 仪器设备 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公司)、HH. S11-Ni4 电热恒温水浴锅(北京三二八科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 芦丁标准曲线的绘制 准确吸取 0.2 mg·mL⁻¹ 的芦丁标准液 0, 2.50, 3.50, 4.50, 5.50, 6.50 mL 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, $A = -0.0053 + 0.2458C$, $R^2 = 0.99904$ 。

1.2.2 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 2.000 0 g 的紫荆果粉末,用乙醇溶液作提取剂,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:

收稿日期:2013-11-19

基金项目:河南省科技攻关计划(122102110236)。

第一作者简介:李红平(1966-),男,硕士,副教授,主要从事应用数学研究。E-mail:hbzyjsxy@163.com。

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

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。

1.2.3 紫荆果中总黄酮的提取单因素试验 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℃ 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) 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℃, 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。

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、60、70、80、85、90℃, 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。

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℃, 浸提时间分别为 1.5、2.0、2.5、3.0 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。

1.2.4 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 个因素, 每个因素 3 个水平, 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。

1.2.5 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。计算提取液中总黄酮对羟自由基的清除率, 并以二丁基羟基甲苯(BHT)为对照, 比较两种抗氧化剂对·OH 的清除活性。

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_x - A_{x_0})}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为空白对照溶液吸光度; A_x 为提取液吸光度; A_{x_0} 为不加 H_2O_2 提取液的本底吸光度。

1.3 数据分析

采用 Excel 2003 对数据进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 紫荆果中总黄酮提取单因素试验

2.1.1 乙醇浓度 由图 1 可知, 随着乙醇浓度的增加总黄酮提取率逐渐增加, 当乙醇浓度为 70% 时, 总黄酮提取率最高, 之后提取率逐渐降低, 即紫荆

果中提取总黄酮, 提取剂乙醇的较佳浓度为 70%。

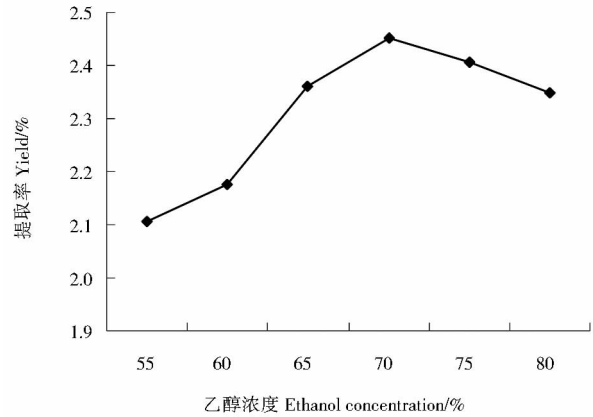


图 1 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响
Fig.1 Effect of ethanol concentration on the extraction ratio of total flavonoids

2.1.2 料液比 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, 结果显示紫荆果中提取总黄酮的较佳料液比为 2.0:60 (g:mL)。

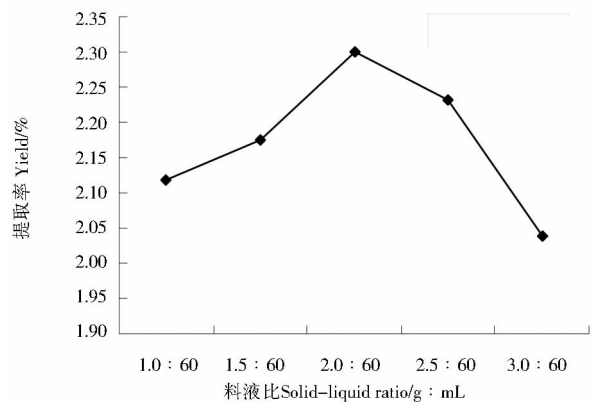


图 2 料液比对总黄酮提取率的影响
Fig.2 Effect of solid-liquid ratio on the extraction ratio of total flavonoids

2.1.3 浸提温度 由图 3 可知, 在 50~80℃, 总黄酮提取率随温度升高而增加, 浸提温度高于 80℃, 总黄酮提取率随着温度升高而降低, 可能是温度升

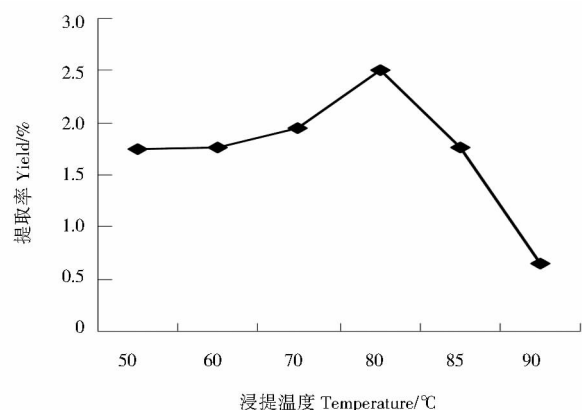


图 3 浸提温度对总黄酮提取率的影响
Fig.3 Effect of temperature on the extraction ratio of total flavonoids

高引起的溶剂挥发损耗。结果表明 80℃ 为较佳的浸提温度。

2.1.4 浸提时间 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,总黄酮提取率随着时间延长而降低。可能是随着时间延长提取剂乙醇的挥发损耗。结果显示紫荆果中总黄酮提取的较佳浸提时间为 2.0 h。

2.2 紫荆果中总黄酮提取条件优化

表 1 可知,4 个考察因素的主次关系为 C > B > A > D,即浸提温度为最重要的因素,其次依次为浸提时间、料液比和乙醇浓度。以总黄酮提取率为考察指标时,最优组合为 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℃,乙醇浓度为 75%。

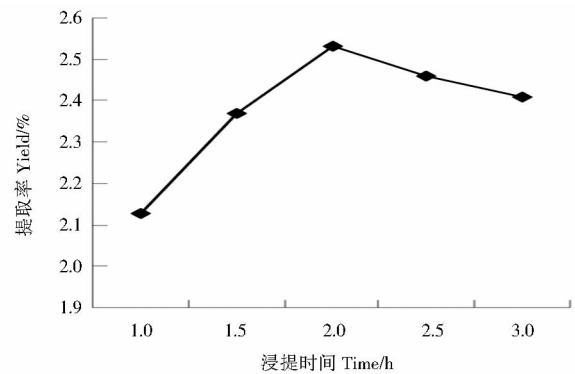


图 4 提取时间对总黄酮提取率影响
Fig. 4 Effect of reflux time on the extraction ratio of total flavonoids

表 1 正交试验结果
Table 1 Result of orthogonal experiment

序号 No.	因素 Factors				总黄酮提取率 Extraction rate/%
	A 料液比 Material to liquid/g:mL	B 浸提时间 Extraction time/h	C 浸提温度 Extraction temperature/℃	D 乙醇浓度 Ethanol concentration/%	
1	1(1.5:60)	1(1.5)	1(70)	1(65)	2.119
2	1	2(2.0)	2(80)	2(70)	2.379
3	1	3(2.5)	3(90)	3(75)	2.244
4	2(2.0:60)	1	2	3	2.029
5	2	2	3	1	1.419
6	2	3	1	2	2.254
7	3(2.5:60)	1	3	2	1.224
8	3	2	1	3	2.219
9	3	3	2	1	2.626
$\sum K_1$	6.742	5.372	6.592	6.164	
$\sum K_2$	5.702	6.017	7.034	5.857	
$\sum K_3$	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	

2.3 验证试验

按照正交试验确定的最佳工艺条件进行 3 次验证性试验,得到紫荆果中总黄酮的提取率为 2.910%。

2.4 紫荆果中总黄酮对羟基自由基的清除作用

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,随着提取液体积增加,清除率也逐渐增加。当加入与提取液相同体积和浓度的 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。

3 结论

采用乙醇浸提法提取紫荆果中的总黄酮,设计单因素试验和 L₉(3⁴) 正交试验初步确定了紫荆果中总黄酮的较佳提取条件:料液比为 1.5:60(g:mL),浸提时间为 2.5 h,浸提温度为 80℃,提取剂乙醇浓度为 75%。在此条件下总黄酮提取率可高达 2.910%。本文还对紫荆果中的总黄酮提取液

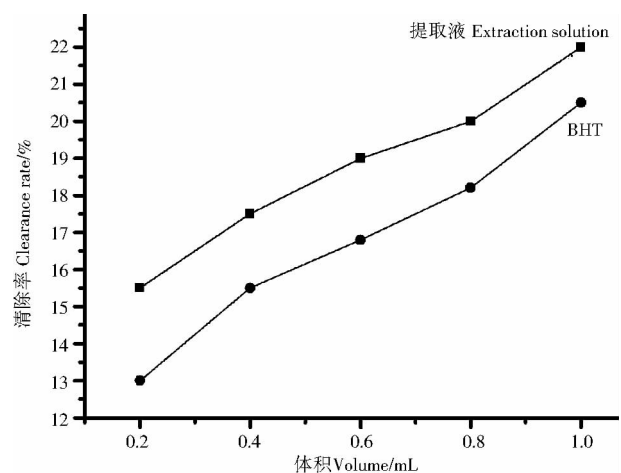


图 5 紫荆果总黄酮提取液对羟基自由基的清除率
Fig. 5 Clearance rate of total flavonoids

清除自由基作用进行了初步探究,结果显示,紫荆果提取液对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除能力要高于二丁基羟基甲苯(BHT)。

(下转第 741 页)

3 讨 论

可溶性大豆多糖是一种酸性多糖,结构类似果胶^[13]。在乳制品中主要依靠侧链形成的空间位阻作用使蛋白质稳定,是一种低粘度的酸性乳饮料稳定剂^[4]。但可溶性大豆多糖自身粘度较低,在清爽型酸性乳饮料中单独添加会有少量的沉淀产生,而通过添加粘度大的稳定剂如果胶、黄原胶、羧甲基纤维素钠又会增加体系的粘度,对酸性乳饮料的口感影响较大。因此找到一种既能提高乳饮料的稳定性,降低沉淀率,又对乳饮料本身的粘度影响较小的稳定剂就显得尤为迫切。

谷氨酰胺转胺酶本身并不是一种乳饮料稳定剂,但是谷氨酰胺转胺酶借助于催化蛋白质分子间形成 ϵ -(γ -谷氨酰)赖氨酸共价键,产生共价交联,生成网络状超大蛋白质分子,从而提高蛋白质的水溶性、乳化性和热稳定性,进而改善食品蛋白质的质构、外观和风味。并且当谷氨酰胺转胺酶酰基受体为水时,谷氨酰胺残基发生水解,进行脱酰胺,生成谷氨酸和氨,该反应可以改变蛋白质的等电点和溶解度,产物谷氨酸可以增强食品的风味。但是谷氨酰胺转胺酶和可溶性大豆多糖的糖蛋白是否发生化学反应进而影响产品的特性还有待研究。

适量的谷氨酰胺转胺酶能显著提高以可溶性大豆多糖为稳定剂的酸性乳饮料的稳定性,并且能够提高乳饮料的外观,对乳饮料本身的粘度没有影响。

参考文献

- [1] Nakamura A, Furuta H, Maeda H, et al. Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soluble soybean polysaccharides [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2002, 66(5): 1155-1158.
- [2] Maeda H, Phillips G O, Williams P A. Soluble soybean polysaccharide [J]. *Handbook of hydrocolloids*, 2000: 309-320.
- [3] Furuta H, Maeda H. Rheological properties of water-soluble soy-

bean polysaccharides extracted under weak acidic condition [J]. *Food Hydrocolloids*, 1999, 13(3): 267-274.

- [4] Nakamura A, Yoshida R, Maeda H, et al. The stabilizing behaviour of soybean soluble polysaccharide and pectin in acidified milk beverages [J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(4): 361-369.
- [5] 李庄. 大豆水溶性多糖的提取与应用研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2005: 20-30. (Li Z. Extraction of water-soluble soybean polysaccharides and its applications [D]. Shanghai: East China Normal University, 2005: 20-30.)
- [6] 张晓华, 任晨刚, 郭顺堂. 可溶性大豆多糖的提取工艺及其应用研究 [J]. *大豆科学*, 2006, 25(1): 28-31. (Zhang X H, Ren C G, Guo S T. The extraction and utilization of soluble soybean polysaccharide [J]. *Soybean Science*, 2006, 25(1): 28-31.)
- [7] 袁海燕, 常忠义, 高红亮, 等. 大豆多糖与常见稳定剂复配在酸乳饮料中的应用 [J]. *大豆科学*, 2008, 27(2): 347-350. (Yuan H Y, Chang Z Y, Gao H L, et al. Application of soybean soluble polysaccharide mixed with other stabilizer in the acidified milk beverage [J]. *Soybean Science*, 2008, 27(2): 347-350.)
- [8] Folk J E. Structural requirements of specific substrates for guinea pig liver transglutaminase [J]. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 1965, 240: 2951-2960.
- [9] 陶红军, 邵虎, 黄亚东, 等. 谷氨酰胺转胺酶的研究进展 [J]. *中国酿造*, 2010(6): 9-12. (Tao H J, Shao H, Huang Y D, et al. Research advance of transglutaminase [J]. *China Brewing*, 2010(6): 9-12.)
- [10] 蔡慧农, 李亚玲, 陈发河. 谷氨酰胺转胺酶对酪蛋白的改性效应 [J]. *食品科学*, 2004, 25(2): 107-111. (Cai H J, Li Y L, Chen F H. Modification study on goat milk casein by transglutaminase [J]. *Food Science*, 2004, 25(2): 107-111.)
- [11] 王齐, 宋小平, 王雅洁, 等. 微生物发酵生产谷氨酰胺转胺酶的研究进展 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2013, 34(5): 732-733. (Wang Q, Song X P, Wang Y J, et al. Latest advance of research on transglutaminases made by microbial fermentation [J]. *Journal of Qiqihar University of Medicine*, 2013, 34(5): 732-733.)
- [12] 熊素英. 花生奶生产过程中稳定性的研究 [J]. *塔里木农垦大学学报*, 1999, 11(1): 21-23. (Xiong S Y. Research of control on stability in processing of peanut milk [J]. *Journal of Talim University of Agricultural Reclamation*, 1999, 11(1): 21-23.)
- [13] 曾令平, 常忠义, 高红亮. 水溶性大豆多糖和果胶作为酸性乳饮料稳定剂的研究 [J]. *中国乳品工业*, 2008, 36(11): 25-28. (Zeng L P, Chang Z Y, Gao H L. Studies of water soluble soybean polysaccharides and pectin on the stabilization of acidified milk beverage [J]. *China Dairy Industry*, 2008, 36(11): 25-28.)

(上接第 737 页)

参考文献

- [1] 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. (Xie B X, Zhang M H. Recent advances on the function and application of flavonoids [J]. *Acta Zoon Utrimenta Sinica*, 2003, 15(2): 11-15.)
- [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. (Xing H W. Antioxidant effect of flavonoids extracts of rose on lard [J]. *Journal of Chongqing Technology Business University(Nature Science Edition)*, 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): 813-818. (Cai B Q, Cai Z Y, Zhang F D, et al. Study on antioxidant activities of flavonoided extracts from rice hull [J]. *Acta Agriculurae Universitatis Jiangxiensis*, 2010, 32(4): 813-818.)
- [4] 钱正清. 最新中药大辞典 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2005: 2365. (Qian Z Q. The latest Chinese medicine dictionary [M]. Beijing: Chinese Press of Traditional Chinese Medicine, 2005: 2365.)

- [5] 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. (Xu M Y, Han Y L, Chen Z H. Optimization study on extraction of total flavonoids from *Cercis chinensis* Bge [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medical Research*, 2007, 30(10): 1252-1255.)
- [6] 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. (Xu M Y, Han Y L, Dong Y G Z, et al. Separation, purification and spectrum analysis of total flavonoids from *Cercis chinensis* [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2007, 30(10): 1252-1255.)
- [7] 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. (Li J L. Optimization of ultrasonic extraction of total flavonoids from *Cercis chinensis* skin [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012, 40(7): 266-267.)
- [8] 黄锁义, 林丹英, 尤婷婷. 韭菜总黄酮的提取及对羟自由基的清除作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(11): 2786-2787. (Huang S Y, Lin D Y, You T T. Extraction of total flavanone from Chinese chives and its scavenging effect on hydroxyl radical [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medical Research*, 2007, 18(11): 2786-2787.)