

双水相-微波提取苕麻皮中总黄酮及抗氧化性研究

何慧蓉¹, 黄 艺¹, 邓选利¹, 但 梅¹, 刘德兵¹, 阮尚全^{1,2*}

¹内江师范学院化学化工学院; ²四川省高等学校果类废弃物资源化重点实验室, 内江 641112

摘 要:在乙醇-硫酸铵双水相体系中,以苕麻皮为原料,采用微波法提取苕麻皮中的总黄酮。通过单因素实验考察了乙醇浓度、料液比、硫酸铵用量、提取功率、提取时间对提取率的影响。用正交试验确定了最优提取条件,即在料液比 1:50 g/mL、硫酸铵用量为 0.2 g/mL、提取功率为 200 W、提取时间为 120 s,乙醇体积浓度为 70% 时提取率可达 2.442%。采用了水杨酸法和邻苯三酚自氧化法对黄酮抗氧化性进行了研究,结果表明苕麻皮黄酮对 $O_2^{\cdot -}$ 和 $\cdot OH$ 具有较强的清除作用。

关键词:苕麻皮;双水相;微波;总黄酮;抗氧化性

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

Extraction and Antioxidant Activity Investigation of Total Flavonoids from Ramie Skin

HE Hui-rong¹, HUANG Yi¹, DENG Xuan-li¹, DAN Mei¹, LIU De-bing¹, RUAN Shang-quan^{1,2*}

¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Neijiang Normal University; ²Key Laboratory of Fruit

Waste Treatment and Resource Recycling of the Sichuan Provincial College, Neijiang, Sichuan 641112, China

Abstract: In this study, microwave extraction technology integrated with ethanol and aqueous ammonium sulfate solution two-phase separation was applied to extract total flavonoids from Ramie skin. Based on single factor experiment, ethanol concentration, solid-liquid ratio, the concentration of ammonium sulfate, extraction power and the time of extraction on extraction yield of total flavonoids were investigated. By orthogonal experiment, the optimum extracting conditions were optimized as follows: ratio of solid to liquid was 1:50 g/mL, the concentration of ammonium sulfate was 0.2 g/mL, extraction power was 200 W, extraction time was 120 s, the ethanol concentration was 70%, the highest extraction yield reached to 2.442% under the optimized extraction conditions. In addition, the total flavonoids extract showed scavenging activities on $O_2^{\cdot -}$ and $\cdot OH$ in the antioxidant activity assays.

Key words: Ramie skin; microwave; aqueous two-phase; total flavonoids; antioxidant activity

苕麻为荨麻科苕麻属多年草本植物,是一种重要的纤维性经济作物,在我国具有丰富的自然资源,被称为“中国草”,主要用作纺织工业原料,其产量占世界总产量的 80%,四川达州因原麻品质优良已成为苕麻加工企业竞相购买的优质原料^[1-3]。苕麻副产物苕麻皮通常是被作为废弃物处理,因其纤维强度较高,既浪费资源又污染环境,因此将其资源化具有重要的经济价值和生态价值。黄酮类化合物是一类低分子量而广泛分布于植物界多的天然植物成分,为植物多酚类的代谢产物,因具有很好的清除自由基和抗氧化能力,对抗癌肿瘤、内分泌调节具良好

的作用,受到国内外学者高度重视^[4,5]。本实验采用双水相-微波辐射提取了苕麻皮中的黄酮,建立了苕麻皮中黄酮提取的新方法,并对萃取物清除超氧阴离子自由基、羟基自由基的能力进行了初步实验,对苕麻生产中的废弃物利用具有重要的实际意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验所用苕麻皮采于达州市大竹县。芦丁(BR)、亚硝酸钠、硝酸铝、无水乙醇、氢氧化钠、硫酸亚铁、双氧水、水杨酸、三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸二钠均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

Uwave-1000 微波. 紫外. 超声波三位一体合成萃取反应仪(上海新仪); T6 新世纪紫外可见分光光

收稿日期: 2013-04-01 接受日期: 2013-06-21

基金项目: 内江师范学院大学生科研项目(12NSD-2); 四川省教育厅自然科学基金资助重点项目(13ZA0004)

* 通讯作者 Tel: 86-013696067719; E-mail: rsq2009nj@sina.com.

度计(北京普析);TD-5 台式低速离心机(四川蜀科);DFT-100 型中药粉碎机(温岭);AE240 电子分析天平(梅特勒-托利多)。

1.3 实验方法

1.3.1 工艺流程

苈麻皮→烘干→粉碎→过筛→微波提取→分离→定容→显色→测定。

1.3.2 标准曲线的绘制

取芦丁标准样品 0.0200 g 于 100 mL 容量瓶,用 30% 乙醇溶解并定容,取上述溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mL 于 25 mL 比色管中,采用文献[6]方法测定。以吸光度 A 为纵坐标,芦丁标准溶液的浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,用最小二乘法作线性回归曲线。实验测得标准曲线回归方程为: $A = 0.0114C - 0.0019$,相关系数 $R^2 = 0.9993$,芦丁浓度在 8.0 ~ 56.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

1.3.3 黄酮的提取

烘干粉碎样品,准确称取 1.000 g,加入 30 mL 40% 的乙醇溶液和硫酸铵 0.2 g/mL 形成双水相,于微波中提取,微波功率为 200 W,微波时间为 120 s,离心分离,离心液用蒸馏水定容制成 100 mL。取 2 mL 溶液于比色管中,加入 30% 乙醇 8 mL,加入 5% 的亚硝酸钠溶液 1.0 mL,6 min 后加入 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL,6 min 后加 4% 氢氧化钠溶液 10.0 mL,用蒸馏水定容摇匀,于波长 511 nm 处测定吸光度。

1.3.4 抗氧化性研究

1.3.4.1 清除 $\cdot\text{OH}$ 活性

H_2O_2 与 Fe^{2+} 作用产生 $\cdot\text{OH}$,水杨酸能与 $\cdot\text{OH}$ 作用产生在 510 nm 波长处有强吸收的有色物 2,3-二羟基苯甲酸。向反应中加入被测物,则会与水杨酸竞争 $\cdot\text{OH}$,使有色物生成量减少。对 $\cdot\text{OH}$ 清除的测定方法按文献[7]进行实验。

1.3.4.2 清除 $\text{O}_2\cdot^-$ 活性

利用邻苯三酚自身氧化产生 $\text{O}_2\cdot^-$ 和在 420 nm 波长处有吸收峰的有色中间产物,当加入能清除 $\text{O}_2\cdot^-$ 的被测物时, $\text{O}_2\cdot^-$ 的生成受到抑制,有色产物减少,溶液在 420 nm 波长处吸收减弱。对 $\text{O}_2\cdot^-$ 清除的测定方法参照文献[8]测定。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 硫酸铵用量对黄酮提取率的影响

按照 1.3.3 方法,选择不同用量的硫酸铵。实验表明:总黄酮提取率随着硫酸铵用量增加而升高,达饱和后影响不显著。其主要原因是,随着硫酸铵用量的增加,双水相体系的分相能力逐渐增大,故黄酮提取率会增大,但硫酸铵用量饱和与否对提取率影响不大。因此硫酸铵的用量确定为 0.2 g/mL^[9,10]。见图 1。

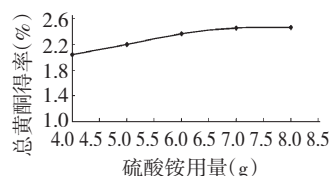


图 1 硫酸铵用量对总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effect of the dosage of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on extraction yield of total flavonoids

2.1.2 乙醇浓度对黄酮提取率的影响

按照 1.3.3 方法,选择不同浓度的乙醇溶液。实验表明:总黄酮提取率随着乙醇浓度的升高而增加,在乙醇浓度 60% 处达到最高,随后又逐渐降低。因为黄酮溶于乙醇,乙醇浓度越高,黄酮更加容易扩散到提取剂中来,故提取率会增加,但在双水相体系中,乙醇的浓度过高,会破坏双水相体系的稳定性,从而降低了黄酮的提取率。因此,确定乙醇浓度 60%。见图 2。

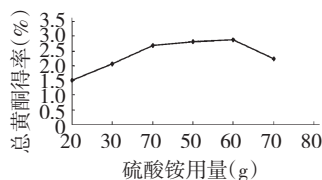


图 2 乙醇浓度对总黄酮得率的影响

Fig. 2 Effect of the concentration of ethanol on extraction yield of total flavonoids

2.1.3 料液比对黄酮提取率的影响

按照 1.3.3 方法,选择不同的料液比。实验表明,总黄酮提取率随着料液比的增大而增加,在加入 40 mL 乙醇溶液时达到最高,随后变化不大。由于黄酮醇溶性好,故增加溶剂的用量有利于黄酮向提取液中扩散,这样黄酮提取率会增加,但原料一定的情况下,多余的乙醇作用不大。所以在料液比 1:40 达到最高,随后变化不大,因此选择料液比 1:40。见图 3。

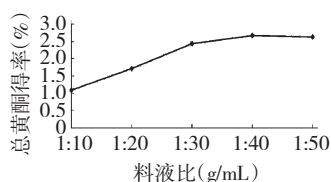


图3 料液比对总黄酮得率的影响

Fig. 3 Effect of ratio of solid solution on extraction yield of total flavonoids

2.1.4 微波功率对黄酮提取率的影响

按照 1.3.3 方法,选择不同微波功率。实验表明,总黄酮提取率随着微波功率的增加而增大,在功率为 150 W 时达到最高,然后降低。微波功率越大对样品作用得越充分,黄酮更易扩散到溶剂中,黄酮提取率会增加,但微波功率过大,则升温速率越大,温度会越高,这样可能导致黄酮被氧化或分解加多,同时也会使乙醇挥发加快,从而使黄酮提取率下降。见图 4。

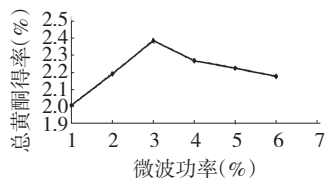


图4 微波功率对总黄酮得率的影响

Fig. 4 Effect of microwave power on extraction yield of total flavonoids

2.1.5 提取时间对黄酮提取率的影响

按照 1.3.3 方法,选择不同提取时间。实验表明,总黄酮提取率随着微波时间的增加而增大,在微波时间为 100 S 时达到最高,之后逐渐降低。延长

提取时间可使目标产物提取更彻底,提取率会增加,但加热时间延过长,可能使黄酮发生分解或氧化,并且时间越长乙醇挥发得越多,故黄酮提取率会降低,因此确定提取时间为 100S。见图 5:

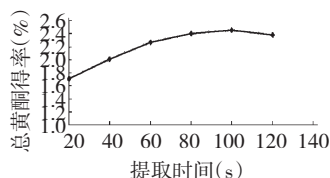


图5 提取时间对总黄酮得率的影响

Fig. 5 Effect of extraction time on extraction yield of total flavonoids

2.2 提取产物的定性鉴定

取 2mL 提取液,加入适量试剂,观察颜色变化见表 1,结果与文献一致^[11],由此具有黄酮类化合物存在。

表 1 黄酮类化合物的鉴定结果

Table 1 Identification results of the flavonoid

试剂 Reagent	1% 三氯化铝 1% AlCl ₃	盐酸-镁粉 HCl-Mg	浓硫酸 H ₂ SO ₄
现象 Result	黄色 Yellow	浅红色 Light red	亮黄色 Bright yellow

2.3 正交实验

单因素实验结果表明,硫酸铵用量对总黄酮提取率影响相对较小,料液比、微波功率、提取时间、乙醇浓度对提取率影响较大,故选取影响较大的因素进行正交试验设计。取三个水平按 L₉(3⁴)设计成正交实验。实验结果见表 1。

表 2 L₉(3⁴) 正交试验因素水平Table 2 Factors and levels of the orthogonal test L₉(3⁴)

水平 Level	A 料液比 A Solid: liquid (g/mL)	B 微波功率 B Microwave power (W)	C 提取时间 C Extraction time (s)	D 乙醇浓度 D Concentration of ethanol (%)
1	1:30	100	80	50
2	1:40	150	100	60
3	1:50	200	120	70

表 3 L₉(3⁴) 正交试验结果Table 3 Result of orthogonal experiment L₉(3⁴)

序号 No.	因素 Factors				总黄酮得率 Yield of total flavonoids (%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.7645

2	2	2	2	1	1.8679
3	3	3	3	1	2.3616
4	1	2	3	2	1.776
5	2	3	1	2	2.2124
6	3	1	2	2	2.0745
7	1	3	2	3	1.9483
8	2	1	3	3	2.2
9	3	2	1	3	2.2698
K ₁	1.830	2.013	2.082	1.998	
K ₂	2.093	1.971	1.964	2.021	
K ₃	2.235	2.174	2.113	2.139	
R	0.405	0.203	0.149	0.141	

实验表明:料液比、微波功率、提取时间、乙醇浓度、硫酸铵用量等因素均对苕麻皮中总黄酮的提取有影响,各因素对总黄酮提取率的影响主次顺序为:A>B>C>D。从苕麻皮中提取黄酮的工艺条件最优组合为A₃B₃C₃D₃,即在硫酸铵用量为0.2 g/mL的条件下:料液比1:50,微波功率200 W,微波提取120 s,乙醇浓度70%时为最佳提取条件。验证试验:在最优条件下进行3次平行实验,苕麻皮的黄酮提取率分别为:2.4075%、2.4879%、2.4305%,平均提取率为2.4420%,RSD为1.6%,表明实验设计合理可行。

2.4 提取物的抗氧化性实验

2.4.1 清除·OH活性的测定

参照1.3.4.1方法进行试验,清除·OH活性的结果如图6。

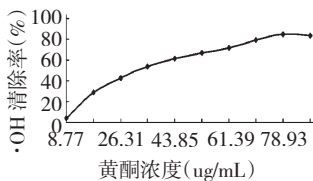


图6 黄酮对·OH清除率

Fig. 6 Scavenging rates of total flavonoids to ·OH

由图可以看出,在8.77~87.7 μg/mL的浓度范围内,其·OH清除率为3.97~83.41%,·OH清除能力随着总黄酮质量浓度的增加而逐渐增强。

2.4.2 清除O₂^{·-}活性的测定

参照1.3.4.2方法进行试验,清除O₂^{·-}活性的结果如图7。

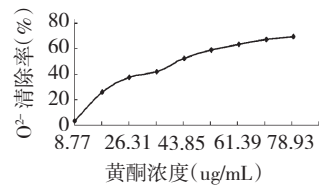


图7 黄酮对O₂^{·-}清除率

Fig. 7 Scavenging rates of total flavonoids to O₂^{·-}

由图可以看出,在8.77~87.7 μg/mL的质量浓度范围内,其O₂^{·-}清除率为3.09~69.33%,O₂^{·-}清除能力随着总黄酮质量浓度的增加而逐渐增强。

3 结论

文章采用单因素和正交试验设计,双水相协同微波法提取了苕麻皮中的总黄酮,并对提取产物试验了清除·OH和O₂^{·-}活性测定。最后试验得最佳工艺条件为:硫酸铵用量0.2 g/mL,料液比1:50,微波功率200 W,微波提取时间120 s,乙醇浓度70%。本法作为一种天然产物黄酮提取的新技术,具有条件温和,快速的特点。苕麻皮中的黄酮具有良好的抗氧化性,实验结果具有一定的适用价值,为今后苕麻产业的发展具有一定的作用。

参考文献

- 1 He B(贺波). Study on extraction of flavonoids from leaves of ramie. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2010, 11 (10):259-262.

(下转第1320页)