

文章编号:1673-1689(2009)01-0081-05

金莲花黄酮微波辅助提取及其抗氧化性

赵二劳, 赵小花, 范建凤

(忻州师范学院 化学系, 山西 忻州 034000)

摘要: 采用单因素分析结合正交试验的方法, 研究了金莲花黄酮微波辅助提取的工艺条件, 以清除 DPPH 自由基法, 对金莲花黄酮的抗氧化性进行了分析, 并比较了金莲花黄酮、VC 和 BHT 的抗氧化能力。实验结果表明:微波辅助提取金莲花黄酮的最佳工艺条件是体积分数 60% 乙醇为溶剂, 每克料浸提剂体积为 20 mL, 微波功率 600 W, 温度 60 ℃, 提取时间 2 min。在此工艺下, 金莲花黄酮提取率为 83.7%; 金莲花黄酮能有效地清除 DPPH 自由基, 具有较强的抗氧化能力, 与 VC 和 BHT 相比, 其抗氧化能力为 VC > 金莲花黄酮 > BHT。另外, 研究发现金莲花黄酮与 VC 和金莲花黄酮与 BHT 均具有一定的抗氧化协同效应。

关键词: 金莲花; 黄酮; 微波; 抗氧化性; 协同

中图分类号: R 284.1

文献标识码: A

Study on the Extraction and Antioxidation of Flavone from *Trollius chinensis* Bunge

ZHAO Er-lao, ZHAO Xiao-hua, FAN Jian-feng

(Department of Chemistry, Xinzhou Normal University, Xinzhou 034000, China)

Abstract: In this study, microwave-assisted extraction techniques of flavone from *Trollius chinensis* Bunge were studied by the single factor analysis and orthogonal test, then the property of antioxidation of the flavonone was also investigated through comparing the eliminating effect to the free-radical of DPPH with VC and BHT. The optimum conditions were achieved and demonstrated as follows: ethanol solution (volume fraction as 60 %) as extraction solution, the ratio of materials to solution as 1 : 20 (g : mL), microwave power as 600 W and 2 min extraction time. By the optimum conditions, the yield (83.7%) of flavone from *Trollius chinensis* Bunge was obtained at 83.7%. The flavone from *Trollius chinensis* Bunge can efficient eliminate DPPH, this indicated that the property of antioxidatant of flavone from *Trollius chinensis* Bunge was results higher, by compared with VC and BHT; VC > flavone from *Trollius chinensis* Bunge > BHT. Moreover, the flavone from *Trollius chinensis* Bunge exhibited synergistic effect with VC and BHT.

Key words: *Trollius chinensis* Bunge, flavone, microwave, antioxidation, synergy

收稿日期: 2008-01-17

基金项目: 山西省高校科技开发研究项目(200611041)。

作者简介: 赵二劳(1952-), 男, 山西原平人, 副教授, 主要从事天然产物活性成分研究。

Email: zel0350@sina.com.

诸多疾病的发生和发展与自由基导致的机体细胞氧化损伤密切相关^[1-3],抗氧化性物质的使用可有效抑制生物体内的过氧自由基,阻断由过氧自由基参与的不良反应。目前,尽管许多人工合成的抗氧化剂,如2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)和丁基羟基茴香醚(BHA)等可以抑制过氧自由基反应的发生,但随着人们对其潜在危害的不断认识,研究开发安全可靠,且兼有营养作用的天然抗氧化剂倍受关注^[4-6]。天然抗氧化剂普遍取自天然可食用物质中,诸如:蔬菜、水果、中药材、农业或食品工业下脚料以及某些微生物发酵产品等。金莲花(*Trollius chinensis* Bunge),俗称旱金莲,是毛茛科植物金莲花的干燥花及花蕾,中国主产于河北、吉林、辽宁、山西等地,资源丰富。金莲花主要活性成分为黄酮类化合物,具有抗癌、抗肿瘤、抗心血管疾病、抗炎抑菌、抗突变、抗辐射等作用 and 增强免疫力等广谱生理活性^[7]。近年来,对金莲花的研究多集中在对其化学成分分析和有效成分的分离提取上^[8],而对金莲花黄酮的微波辅助提取及抗氧化性研究鲜见报道。作者研究了微波辅助提取金莲花黄酮的工艺条件,并用清除 DPPH 自由基法^[9,10]评价了金莲花黄酮的抗氧化能力,以期开发一种新的天然抗氧化剂,为金莲花的合理利用提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料及仪器

1.1.1 材料 金莲花:购于忻州市土特产店,用药材粉碎机粉碎,过60目筛,装瓶,备用;1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH):东京化成工业株式会社产品;芦丁标准品;其余试剂均为国产分析纯;实验用水为二次蒸馏水。

1.1.2 仪器 XH-100A微波催化合成/萃取仪:北京祥鸽科技发展有限公司产品;722型光栅可见分光光度计:上海分析仪器总厂产品;UV-2550型紫外可见分光光度计:日本岛津公司产品;AL104型电子天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品;药材粉碎机:浙江武义屹立工具有限公司产品。

1.2 标准曲线的绘制

将芦丁于120℃下干燥至恒重,准确称取10.4 mg,无水乙醇溶于50 mL的容量瓶,得质量浓度为0.208 mg/mL的芦丁标准溶液。准确量取芦丁标准液0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mL于8支25 mL的比色管中,加入质量分数5% NaNO₂溶液1 mL,静置6 min,再加入质量分数10% Al

(NO₃)₃溶液1 mL,静置6 min,最后加入质量分数4%的NaOH溶液10 mL,用体积分数60%乙醇定容至刻度,静置15 min,以试剂空白为参比,在确定的最大吸收波长510 nm处测定其吸光度,以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标作图,得回归方程: $A=0.012c+0.013$, $R^2=0.999$ 。式中,A为样品液在波长510 nm处的吸光度值;c为黄酮质量浓度(g/mL)。在8.32~58.24 μg/mL的范围内,质量浓度与吸光度呈良好线性关系。

1.3 金莲花黄酮的微波辅助提取工艺

试验以定容于相同总体积的金莲花黄酮提取液的吸光度值为指标,由单因素试验确定微波功率、提取温度、微波作用时间和浸提剂体积等因素的试验范围,然后通过正交试验确定微波辅助提取金莲花黄酮的最优工艺参数。

1.4 金莲花黄酮提取率、回收率的计算

在最佳提取条件下,分别多次提取1.0 g的金莲花,直到提取液中检测不到黄酮为止,然后收集合并提取液,测定其总体积 $V_{\text{总}}$ 和总吸光度 $A_{\text{总}}$,并测定某次提取液的体积 V_i 和吸光度 A_i ,则提取率的计算公式为:

$$\text{提取率} = \frac{A_i \times V_i}{A_{\text{总}} \times V_{\text{总}}} \times 100\%$$

在最佳条件下提取1.0 g的金莲花,过滤,提取液定容于50 mL容量瓶中。量取0.2 mL提取液3份于25 mL的干燥比色管中,分别加入0.208 mg/mL芦丁标准溶液0.2、0.3、0.4 mL,按1.2的方法测吸光度值,计算回收率。

1.5 抗氧化性的测定

采用清除DPPH自由基法评价金莲花黄酮的抗氧化性,其原理^[9]是:DPPH自由基是一种稳定的自由基,在517 nm处有一强吸收(深紫色),当DPPH自由基与自由基清除剂的电子配对时,使其吸收逐渐消失,其褪色程度与其接受的电子数成定量关系,因而可用分光光度法进行定量分析,评价其抗氧化性。实验按文献^[11]的方法测定并计算清除率,公式为:清除率= $[1-(A_i-A_j)/A_0] \times 100\%$, A_0 为DPPH·溶液与一定量样品溶剂的吸光度, A_i 为DPPH·溶液与一定量样品溶液的吸光度, A_j 为与DPPH·溶液等量的无水乙醇与一定量样品溶液的吸光度。

1.5.1 金莲花黄酮、VC和BHT对DPPH自由基清除率的测定 加入2.5 mL浓度为 6.4×10^{-5} mol/L的DPPH·溶液和一定量的金莲花黄酮提取液,定容至5 mL,反应20 min后,测 A_i ;加入2.5

mL 的无水乙醇和一定量的金莲花黄酮提取液,定容至 5 mL,反应 20 min 后,测 A_1 ;加入 2.5 mL 浓度为 6.4×10^{-5} mol/L 的 DPPH· 溶液和一定量的体积分数 60% 乙醇,定容至 5 mL,反应 20 min 后,测 A_0 ;计算清除率,用来评价金莲花黄酮对 DPPH· 的清除能力。同理,测定 VC 和 BHT。

1.5.2 半清除率的测定 半清除率 (IC_{50})^[12] 指对 DPPH 自由基清除率为 50% 时所需抗氧化剂的质量浓度。它可根据由不同浓度抗氧化剂对 DPPH 自由基清除率作曲线,再由曲线求出。 IC_{50} 越小,则表明该物质的抗氧化能力越强。

1.5.3 金莲花黄酮与 VC、BHT 抗氧化协同作用的研究^[13] 取 3 支 10 mL 的比色管,各加入金莲花黄酮提取液 0.2 mL,然后分别加入 0.01 g/L 的 VC 溶液 0.2、0.4、0.6 mL,定容至 5 mL,按 1.5.1 的操作,测其吸光度,计算清除率。同理,取 3 支 10 mL 的比色管,各加入金莲花黄酮提取液 0.2 mL,然后分别加入 0.2 g/L 的 BHT 溶液 0.1、0.2、0.3 mL,定容至 5 mL,按 1.5.1 的操作,测其吸光度,计算清除率。

2 结果与讨论

2.1 金莲花黄酮微波辅助提取最佳工艺参数的确定

称取 3.0 g 的金莲花,根据单因素试验的结果,以微波功率、微波作用时间,提取温度和浸提剂体积为 4 个因素,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,结果见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验结果
Tab. 1 The results of orthogonal test

试验号	微波功率 A/W	浸提剂体积 B/mL	微波温度 C/°C	微波时间 D/min	吸光度 A
1	400	10	40	1	0.543
2	400	20	50	2	0.706
3	400	30	60	3	0.686
4	500	10	50	3	0.654
5	500	20	60	1	0.686
6	500	30	40	2	0.655
7	600	10	60	2	0.738
8	600	20	40	3	0.647
9	600	30	50	1	0.665
K_1	1.935	1.935	1.872	1.894	
K_2	1.995	2.066	2.025	2.099	
K_3	2.077	2.006	2.110	2.014	
R	0.047	0.044	0.079	0.068	

由表 1 极差分析可知,在正交试验的 4 个因素中以温度对黄酮提取率的影响最大,其顺序依次为 $C > D > A > B$ 。综合分析正交试验结果,确定最佳提取工艺条件为 $A_3 B_2 C_3 D_2$,即以体积分数 60% 乙醇为提取剂,每克料提取剂体积为 20 mL,微波功率 600 W,温度 60 °C,微波提取 2 min。

2.2 金莲花黄酮提取率、回收率

按 1.4 的方法测定计算得微波辅助提取金莲花黄酮平均提取率为 83.7% ($n=3$)。回收率的实验结果见表 2。

表 2 金莲花黄酮的回收率

Tab. 2 The recovery of flavone from *Trollius chinensis* Bunge

提取质量/mg	加标质量/mg	加标后测得质量/mg	回收率/%
0.408	0.0416	0.452	105.8
0.408	0.0624	0.467	94.6
0.408	0.0832	0.489	97.4

由表 2 可知,在实验条件下,金莲花黄酮回收率在 94.6%~105.8% 之间。

2.3 各种抗氧化剂对 DPPH· 清除率

按 1.5.1 的方法分别进行金莲花黄酮、VC 和 BHT 对 DPPH 自由基清除率的测定,结果见图 1~3。

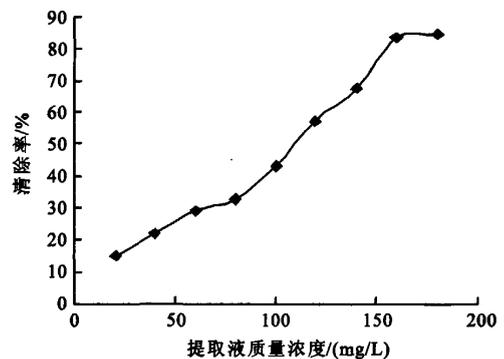


图 1 金莲花黄酮对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 1 The eliminating rate of flavone from *Trollius chinensis* Bunge to DPPH

由图 1 可知,金莲花黄酮对 DPPH 自由基的清除率随着金莲花黄酮浓度的增加而逐渐增大,但当质量浓度增加到 157.6 mg/L 时,清除率提高缓慢,并由图 1 可读出当 DPPH· 的清除率为 50% 时,金莲花提取液质量浓度为 112 mg/L,即 IC_{50} 为 112 mg/L。

由图 2 知,VC 溶液对 DPPH· 的清除率开始随着质量浓度的增加而增加,但当质量浓度达到 240 mg/L 时,清除率提高缓慢,并由图 2 可读出当 DPPH· 的清除率为 50% 时,VC 溶液质量浓度为

92.5 mg/L,即 IC_{50} 为 92.5 mg/L。

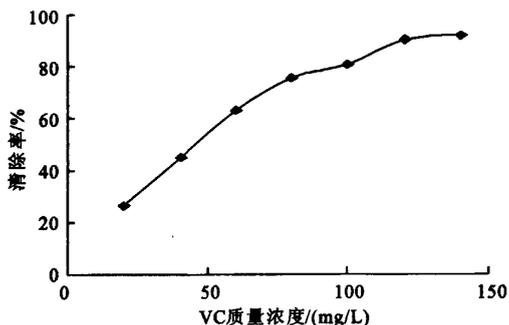


图2 VC对DPPH自由基的清除率

Fig. 2 The eliminating rate of VC to DPPH

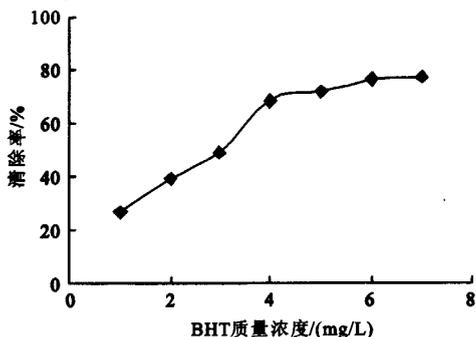


图3 BHT对DPPH自由基的清除率

Fig. 3 The eliminating rate of BHT to DPPH

由图3知,BHT溶液对DPPH自由基的清除率开始随着质量浓度的增加而增加,但当质量浓度达到20 mg/L时,清除率提高缓慢,并由图3可读出当DPPH·的清除率为50%时,BHT溶液质量浓度为12.8 mg/L,即 IC_{50} 为12.8 mg/L。比较金莲花黄酮、VC和BHT的 IC_{50} 值可知,抗氧化能力大小依次为:VC>金莲花黄酮>BHT。

2.4 金莲花黄酮与VC、BHT的抗氧化协同作用

2.4.1 金莲花黄酮与VC的协同作用 按1.5.3的方法实验,结果见表3。

表3 金莲花黄酮与VC协同对DPPH·的清除率

Tab. 3 Eliminating rate of flavone from *Trollius chinensis* Bunge and VC synergistic to DPPH·

提取液 体积/mL	VC溶液 体积/mL	复合组分的 清除率/%	单一组分清除率 的代数和/%
0.2	0.0	—	15.0
0.0	0.2	—	26.6
0.0	0.4	—	45.0
0.0	0.6	—	63.0
0.2	0.2	42.0	41.6
0.2	0.4	65.0	60.0
0.2	0.6	79.0	78.0

结果表明:金莲花黄酮与VC组成的复合抗氧化剂对DPPH自由基的清除率强于两者在添加浓度下清除率的代数和,即说明两者之间存在协同抗氧化作用。

2.4.2 金莲花黄酮与BHT的协同作用 按1.5.3的方法实验,结果见表4。

表4 金莲花黄酮与BHT协同对DPPH·的清除率

Tab. 4 Eliminating rate of flavone from *Trollius chinensis* Bunge and BHT synergistic to DPPH·

提取液 体积/mL	BHT溶液 体积/mL	复合组分的 清除率/%	单一组分清除率 的代数和/%
0.2	0.0	—	15.0
0.0	0.1	—	26.8
0.0	0.2	—	39.3
0.0	0.3	—	48.9
0.2	0.1	45.4	41.8
0.2	0.2	59.4	54.3
0.2	0.3	67.9	63.9

结果表明:金莲花黄酮与BHT组成的复合抗氧化剂对DPPH自由基的清除率强于两者在添加浓度下清除率的代数和,即两者之间存在协同抗氧化作用。

同时,由表3和表4可知:金莲花黄酮与VC协同抗氧化作用大于金莲花黄酮与BHT协同抗氧化作用。

3 结语

微波辅助提取金莲花中黄酮的最佳工艺条件为:体积分数60%乙醇为提取剂,每克料浸提剂体积比为20 mL,微波功率600 W,温度60℃,微波提取时间2 min。在此工艺下,金莲花黄酮的平均提取率为83.7%。

金莲花黄酮能有效地清除DPPH自由基,其质量浓度与对DPPH自由基的清除率成正相关;金莲花黄酮具有较强的抗氧化能力;金莲花黄酮、VC和BHT的抗氧化能力大小依次为VC>金莲花黄酮>BHT;实验同时发现,金莲花黄酮与VC、金莲花黄酮与BHT之间均具有一定的抗氧化协同作用,且金莲花黄酮与VC的协同作用大于其与BHT的协同作用,说明各种抗氧化剂的复合使用有助于提高抗氧化能力,增强抗氧化效果。

参考文献(References):

- [1] Mitchell JB, Xavier S, Deluca M, et al. A low molecular weight antioxidant decreases weight and lowers tumor incidence [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003, 34 (1):93-102.
- [2] 郑德勇,安鑫南.植物抗氧化剂的研究概况与发展趋势[J].林产化学与工业 2004,24 (3): 113-118.
ZHENG De-yong, AN Xin-nan. Progress and development trend of researches on plant antioxidants [J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2004, 24 (3): 113-118. (in Chinese)
- [3] Taubert D, Breitenbach T, Lazar A, et al. Reaction rate constants of superoxide scavenging by plant antioxidants[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003, 35(12): 1599-1607.
- [4] 张京芳,王冬梅,周丽,等. 香椿叶抗氧化物提取工艺优化与抗氧化活性分析[J].农业机械学报, 2007,38(8): 97-100.
ZHANG Jing-fang, WANG Dong-mei, ZHOU Li, et al. Extraction of antioxidants from toona sinensis leaves and its antioxidant activities[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2007, 38 (8): 97-100. (in Chinese)
- [5] 许钢.红薯中黄酮提取及抗氧化研究[J].食品与生物技术学报,2007,26(4):22-27.
XU Gang. Studies on the extracting and antioxidant activities of flavonoids in sweet potatoes[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(4):22-27. (in Chinese)
- [6] 郭憬憬,职润,张娜,等.关白附多糖体外抗氧化性研究[J].食品与生物技术学报,2007,26 (1): 43-45.
GUO Jing-jing, ZHI Run, ZHANG Na, et al. Study on the antioxidative effect of aconitum coreanum polysaccharides[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(1): 43-45. (in Chinese)
- [7] 罗丽荣,蒋柏泉,白兰莉.金莲花有效药用成分提取研究[J].江西化工,2006(3): 96-98.
LUO Li-rong, JIANG Bo-quan, BAI Lan-li. Extraction of effective drag component from trollius [J]. *Jiangxi Chemical Industry*, 2006(3): 96-98. (in Chinese)
- [8] 范新田,傅强,李凤丽,等.金莲花研究现状与展望[J].北华大学学报:自然科学版,2006,7(2): 131-134.
FAN Xin-tian, FU Qiang, LI Feng-li, et al. Actuality and expectation of research in trollius chinensis bge[J]. *Journal of Beihua University:Natural Science*, 2006,7(2): 131-134. (in Chinese)
- [9] 彭长连,陈少薇,林植芳,等.用清除有机自由基 DPPH 法评价植物抗氧化能力[J].生物化学与生物物理进展,2000,27 (6):658-661.
PENG Chang-lian, CHEN Shao-wei, LIN Zhi-fang, et al. Detection of antioxidative capacity in plants by scavenging organic free radical DPPH [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2000,27(6):658-661. (in Chinese)
- [10] Fauconneau B, Huguet F, Barrier L, et al. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from vitis vinifera cell cultures using in vitro tests[J]. *Life Sciences*,1997,61(21):2103-2110.
- [11] 许申鸿,杭瑚.用 DPPH·分析法研究野生植物抗氧化活性[J].青岛大学学报:自然科学版,1999,12 (3):75-78.
XU Shen-hong, HANG Hu. Study of antioxidative activities of wild plants by DPPH· assay [J]. *Journal of Qingdao University:Natural Science*, 1999,12 (3):75-78. (in Chinese)
- [12] 徐清萍,敖宗华,陶文沂.恒顺香醋 DPPH 自由基清除活性成分的研究[J].中国调味品,2004(7):19-23.
XU Qing-ping, AO Zong-hua, TAO Wen-yi. Study on DPPH· radical scavenging capacity of Hengshun aromatic vinegar [J]. *China Condiment*, 2004(7):19-23. (in Chinese)
- [13] 郝晓丽,许申鸿,杭瑚. TBHQ 与 V_E 抗氧化协同作用的研究[J].青岛大学学报:工程技术版,2003, 18(3): 53-55.
HAO Xiao-li, XU Shen-hong, HANG Hu. Synergistic antioxidant effect of TBHQ and VE[J]. *Journal of Qingdao University:Engineering & Technology Edition*, 2003, 18(3): 53-55. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)