

长白山刺果甘草中黄酮类化合物 提取工艺优化与活性研究

常桂英^{1,2}, 孙立梅¹, 赵雪¹

(1. 吉林农业科技学院 生物工程学院, 吉林 吉林 132101; 2. 吉林省高校长白山动植物资源利用与保护重点实验室, 吉林 吉林 132101)

摘要:以长白山刺果甘草为试材,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验的方法研究不同提取条件对长白山刺果甘草中黄酮类化合物提取工艺的影响;采用邻苯三酚自氧化体系进行 O_2^- 体外清除试验,研究刺果甘草中黄酮类化合物对抗氧化活性的影响,并与抗坏血酸的抗氧化能力进行比较。结果表明:刺果甘草中黄酮类化合物的最佳提取工艺条件为料液比 1:30 g/mL,提取温度 80℃,提取时间 3.5 h;在试验测定浓度范围内,刺果甘草中黄酮类化合物和抗坏血酸清除自由基的能力均随浓度增加而加强,对 O_2^- 的最大清除率分别是 79.6%、75.5%,说明刺果甘草中黄酮类化合物的抗氧化效果略高于抗坏血酸。

关键词:刺果甘草;黄酮;正交实验;抗氧化

中图分类号:S 543+.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)03-0116-03

刺果甘草(*Glycyrrhiza pallidiflora* Maxim.) 属豆科甘草属植物,又名土甘草、野甘草,是国家重点保护的野生固沙植物^[1]。黄酮类化合物是植物中重要的次生代谢产物之一,甘草黄酮具有明显的清除自由基、抗氧化作用,可以预防肿瘤的发生,对胃溃疡、肝损害和病原微生物等也有明显的药理作用,尤其是发现其具有抗爱滋病毒作用后,甘草黄酮类化合物的研究引起了人们的广泛关注和重视^[2]。研究表明,长白山刺果甘草与甘草具有相近含量的黄酮类化合物^[3],但对黄酮类化合物的提取工艺优化和活性研究尚鲜见报道。现以长白山刺果甘草根为试材,在优化黄酮类化合物提取工艺的基础上对其抗氧化活性进行研究,以期对长白山刺果甘草的品质特性分析及进一步开发利用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

刺果甘草根采于松花江边长白山流域,经孙仓教授鉴定为刺果甘草(*Glycyrrhiza pallidiflora* Maxim.),阴干后用粉碎机粉碎,过 80 目筛。

主要试剂有芦丁(南京替斯艾么中药研究所,批号:TCM027-090216)、95%乙醇、石油醚、乙醚、15%~30%

氨水、1 mol/L 盐酸、1 mol/L 氢氧化钠溶液、邻苯三酚、维生素 C 等,以上试剂均为分析纯试剂。

主要设备有索氏提取器、HH-S 1-8 数显恒温水浴锅(金坛市正基仪器有限公司)、UV-1800 紫外/可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司)、精密电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)、9FZ15 型粉碎机等。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线制作 以硝酸铝显色法^[4]于 510 nm 处测定不同浓度标准品芦丁溶液的吸光度。根据所测得的芦丁溶液的吸光度,用最小二乘法作线性回归,得芦丁浓度(C)与吸光度(A)的关系为: $C=19.788A+0.1101$, $R^2=0.99$ 。样品中的黄酮含量测定皆参照标准曲线制作的测定方法测定吸光度,由回归方程计算出黄酮浓度 C,并计算黄酮类化合物的提取率。提取率(%)= $CV/M \times 100\%$,式中,V 是提取液体积,M 是样品重量。

1.2.2 单因素试验 不同料液比对长白山刺果甘草黄酮类化合物提取率的影响:称取 5 份刺果甘草材料各 4 g,乙醚充分脱脂后挥去乙醚,用 75%乙醇时以 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL 的不同料液比在 80℃提取 3 h,过滤,等体积石油醚萃取,比色法测定吸光度代入芦丁标准曲线求出黄酮类化合物提取率。不同提取温度对长白山刺果甘草黄酮类化合物提取率的影响:称取 5 份刺果甘草材料各 4 g,乙醚充分脱脂后挥去乙醚,按 1:30 g/mL 加入 75%的乙醇,在 50、60、70、80、90℃下水浴提取 3 h,过滤,等体积石油醚萃取,比色法测吸光度,代入芦丁标准曲线求出黄酮类化合物提取率。不同提取

第一作者简介:常桂英(1965-),女,吉林人,硕士,教授,研究方向为生物化学。E-mail:cgyl650607@126.com.

基金项目:2013 年吉林省高校长白山动植物资源利用与保护重点实验室资助项目(吉农院合字[2013]第 S013 号)。

收稿日期:2014-09-09

时间对长白山刺果甘草黄酮类化合物提取率的影响:称取 5 份刺果甘草材料各 4 g, 乙醚充分脱脂后挥去乙醚, 以 1:30 g/mL 加入 75% 的乙醇, 80℃ 水浴提取 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h, 过滤, 等体积石油醚萃取, 比色法测定吸光度代入标准曲线求出黄酮类化合物提取率。

1.2.3 正交设计优化长白山刺果甘草中黄酮类化合物提取工艺 在上述的单因素基础上, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计对长白山刺果甘草中黄酮类化合物提取工艺进行优化, 正交实验因素与水平见表 1。

表 1 正交实验因素与水平

水平	因素		
	A 料液比 (g·mL ⁻¹)	B 提取温度 /℃	C 提取时间 /h
1	1:20	70	2.5
2	1:30	80	3.0
3	1:40	90	3.5

1.2.4 长白山刺果甘草中黄酮类化合物抗氧化活性研究 取 4.5 mL 50 mmol/L pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 加入 4.2 mL 蒸馏水, 混匀, 25℃ 保温 20 min 后, 立即加入 25℃ 预热的 0.3 mL 40 mmol/L 邻苯三酚溶液, 迅速摇匀后, 于 325 nm 波长下每隔 30 s 测定吸光度, 5 min 后计算线性范围内每分钟吸光度的增加值 ΔA_0 , 制作邻苯三酚自氧化标准曲线^[5]; 用 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚作为空白, 在加入邻苯三酚前加入不同浓度的长白山刺果甘草黄酮化合物样品溶液, 作为待测液, 以抗坏血酸作为对照按照上述步骤测定每分钟吸光度的增加值 ΔA 。O₂⁻ 自由基清除率的计算公式如下: O₂⁻ 的清除率(%) = $(\Delta A_0 - \Delta A) / \Delta A \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 料液比对刺果甘草黄酮类化合物提取率的影响

由图 1 可知, 料液比为 1:30 g/mL 时, 黄酮类化合物提取率最高, 随料液比增加, 黄酮类化合物提取率略有降低, 料液比为 1:40 g/mL 以后, 黄酮类化合物的提取率有所下降, 因此选择 1:20、1:30、1:40 g/mL 的料液比做进一步的优化提取条件范围。

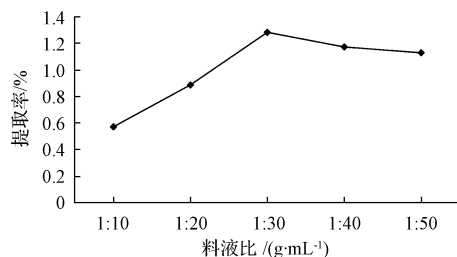


图 1 不同料液比对刺果甘草中黄酮类化合物提取率的影响

2.2 提取温度对刺果甘草总黄酮提取率的影响

由图 2 可知, 当提取温度为 80℃ 时, 黄酮类化合物的提取率最高, 当达到 90℃ 时, 黄酮类化合物的提取率

有所降低, 因此选择 70、80、90℃, 做进一步的优化提取条件范围。

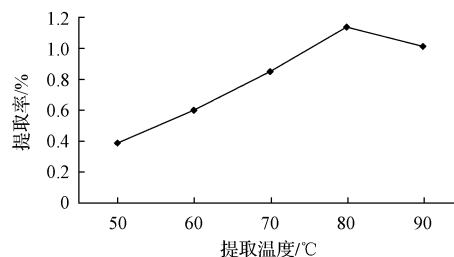


图 2 不同提取温度对刺果甘草中黄酮类化合物提取率的影响

2.3 提取时间对刺果甘草总黄酮提取率的影响

由图 3 可知, 随着提取时间的延长, 黄酮类化合物的提取率增加, 当达到 3.0 h 时, 黄酮的提取率最高, 3.5 h 时, 黄酮的提取率有所降低, 因此选择 2.5、3.0、3.5 h 做进一步的优化提取条件范围。

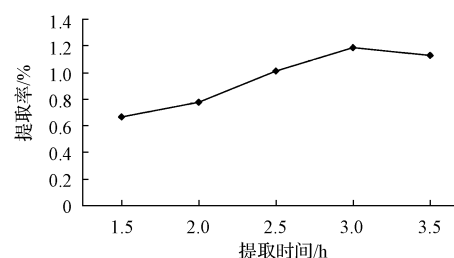


图 3 不同提取时间对刺果甘草中黄酮类化合物提取率的影响

2.4 正交实验设计结果

由表 2 可知, 因为 $R_A > R_B > R_C$, 所以 $A > B > C$, 即在提取黄酮时, 料液比最重要, 其次是提取温度和提取时间。按 $A_2B_2C_3$ 设定的条件从刺果甘草中提取黄酮化合物提取率最高。所以刺果甘草黄酮类化合物最佳提取工艺条件为料液比 1:30 g/mL, 提取温度 80℃, 提取时间 3.5 h。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验方案及结果

水平	因素			黄酮类化合物 提取率/%
	A 料液比 (g·mL ⁻¹)	B 提取温度 /℃	C 提取时间 /h	
1	A ₁	B ₁	C ₁	0.97
2	A ₁	B ₂	C ₂	1.26
3	A ₁	B ₃	C ₃	1.21
4	A ₂	B ₁	C ₂	1.47
5	A ₂	B ₂	C ₃	1.33
6	A ₂	B ₃	C ₁	1.41
7	A ₃	B ₁	C ₃	1.37
8	A ₃	B ₂	C ₁	1.29
9	A ₃	B ₃	C ₂	1.30
K_{1j}	3.44	3.81	3.67	
K_{2j}	4.21	3.88	2.73	
K_{3j}	2.66	2.62	3.91	
R	1.55	1.26	1.18	

2.5 刺果甘草中黄酮类化合物的抗氧化作用

图4为邻苯三酚自氧化曲线。碱性条件下邻苯三酚可迅速自氧化产生 O_2^- 和在325 nm处有最大吸收的有色产物, O_2^- 的浓度决定自氧化的速率,自由基清除剂通过清除 O_2^- 达到抗氧化的目的。该试验利用这一原理研究刺果甘草中黄酮类化合物对 O_2^- 的清除能力,结果如图5所示。

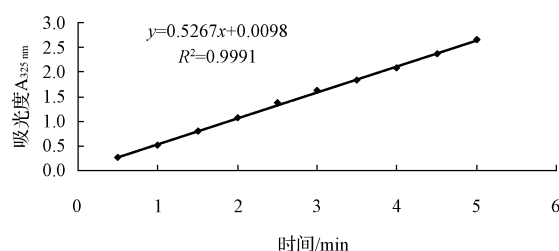
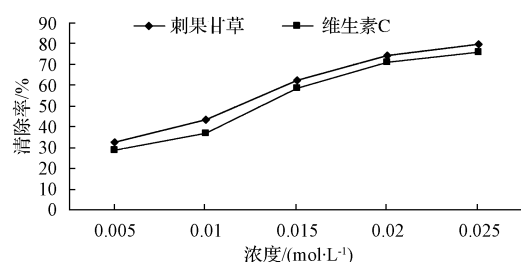


图4 邻苯三酚自氧化曲线

由图5可知,刺果甘草黄酮类化合物和维生素C均具有一定的清除 O_2^- 的能力,二者在0.005~0.025 mg/mL

图5 刺果甘草黄酮类化合物对 O_2^- 自由基的清除作用

浓度范围内清除率均随浓度增加而增强,0.025 mg/mL的刺果甘草黄酮类化合物对 O_2^- 的清除率是79.6%,而相同浓度维生素C对 O_2^- 的清除率是75.5%,可见刺果甘草中黄酮类化合物的清除 O_2^- 能力略高于维生素C。

3 结论

该试验以黄酮类化合物的提取率为指标,采用单因素试验,确定单因素的合适范围,在此基础上进行正交设计优化提取工艺。试验结果表明,刺果甘草的最佳的提取工艺条件为:料液比1:30 g/mL,提取温度为80℃,提取时间为3.5 h。

在试验测定浓度范围内,刺果甘草中黄酮类化合物和维生素C清除自由基的能力均随浓度增加而加强,对 O_2^- 的最大清除率分别是79.6%、75.5%,说明刺果甘草中黄酮类化合物的抗氧化效果略高于维生素C。

参考文献

- [1] 张继,杨永利,白贞芳,等. 乌拉尔甘草与刺果甘草茎叶营养成分的比较[J]. 西北师范大学学报(自然科学版),2002,38(3):61-63.
- [2] 邢国秀,李楠,王童,等. 甘草中黄酮类化学成分的研究进展[J]. 中国中药杂志,2003,28(7):593-597.
- [3] 常桂英,孙立梅,赵雪,等. 长白山刺果甘草与甘草化学成分的比较研究[J]. 北方园艺,2014(10):146-148.
- [4] 杨云,张品,陈云婷. 天然药物化学成分提取分离手册[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:168-169.
- [5] 尤小梅,李远志,廖有传,等. 春砂仁根和叶提取物抗氧化活性研究[J]. 食品科技,2012,37(2):226-228.

Extraction Process Optimization and Activity Study on Total Flavonoids from Changbai Mountain *Glycyrrhiza pallidiflora*

CHANG Gui-ying^{1,2}, SUN Li-mei¹, ZHAO Xue¹

(1. Department of Bioengineering, College of Jilin Agriculture Science and Technology, Jilin, Jilin 132101; 2. Key Laboratory of the Animal and Plant Resources of Changbai Mountain Conservation and Utilization, College of Jilin Province, Jilin, Jilin 132101)

Abstract: Optimization of the extraction process of total flavonoids from Changbai Mountain *Glycyrrhiza pallidiflora* were studied by $L_9(3^4)$ Orthogonal test. At the same time, the antioxidative activity of total flavonoids from *Glycyrrhiza pallidiflora* was also studied by the method of pyrogallol autoxidation system, and the results were also compared with the effect of antiscorbic acid. The results showed that the optimal process parameters were as follows: the ratio of solid-liquid 1:30 g/mL, the extraction temperature 80℃ and the extraction time 3.5 hours; the abilities of flavonoids and antiscorbic acid to scavenging O_2^- increased as well as its concentration, and the maximum scavenging rate was 79.6% and 75.5% for flavonoids and antiscorbic acid respectively. So the flavonoids from roots of *Glycyrrhiza pallidiflora* possessed better antioxidative activity than antiscorbic acid.

Keywords: *Glycyrrhiza pallidiflora*; flavonoid; orthogonal test; antioxidant