

响应面法优化新疆若羌大枣总黄酮提取工艺及抗氧化活性

刘 伟, 南光明, 李紫薇, 腊 萍, 欧阳艳*
(伊犁师范学院化学与生物科学学院, 新疆 伊宁 835000)

摘 要: 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、提取温度、料液比为自变量, 进行三因素三水平Box-Behnken试验设计, 利用响应面分析法优化新疆若羌大枣总黄酮提取条件; 将粗提物进一步分级萃取并对其抗氧化部位进行考察。结合实际可操作性得出大枣中总黄酮较优提取工艺为乙醇体积分数45%、提取温度90℃、料液比1:35(g/mL)、提取时间90min, 总黄酮提取量为14.34mg山奈酚/g, 达到预测值(14.647mg山奈酚/g)的97.9%。乙酸乙酯萃取物具有显著的抗氧化活性, 与抗氧化剂BHT活性相当。

关键词: 新疆大枣; 响应面分析法; 总黄酮; 抗氧化活性

Total Flavonoids from Xinjiang Ruoqiang Jujubes: Optimization of Extraction Conditions Using Response Surface Methodology and Antioxidant Activity

LIU Wei, NAN Guang-ming, LI Zi-wei, LA Ping, OUYANG Yan*
(College of Chemistry and Biological Science, Yili Normal University, Yining 835000, China)

Abstract: This study was undertaken to optimize condition for the extraction of total flavonoids from Xinjiang Ruoqiang jujubes. One-factor-at-a-time method was used to investigate the effects of ethanol concentration, temperature, extraction time and solid-to-solvent ratio on the extraction yield of total flavonoids. Maximum extraction yield of total flavonoids was reached after 90 min of extraction. Using a three-variable, three-level Box-Behnken experimental design coupled with response surface methodology, ethanol concentration, temperature and solid-to-solvent ratio were optimized to be 45%, 90 °C and 1:35 (g/mL), respectively. Under the optimized conditions, the actual extraction yield of total flavonoids was 14.34 mg kaempferol equivalent/g, which was 97.9% as compared to the predicted value (14.647 mg kaempferol equivalent/g). The obtained extract had an ethyl acetate fraction that revealed potent antioxidant activity and was comparable to BHT.

Key words: Xinjiang Ruoqiang jujube; response surface methodology; total flavonoids; antioxidant activity

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)22-0123-04

大枣为鼠李科植物枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)的果实, 在我国有着悠久的药用和食用历史^[1]。早在2000多年前, 我国第一部药学专著《神农本草经》就已经将大枣列入“上品”, 它含有丰富的营养物质^[2-4], 具有补脾和胃, 益气生津的功效, 因此被称为功能性食品^[5-6]。近年来研究发现, 大枣主要含有黄酮、多糖、环磷酸腺苷、五环三萜类及多酚类物质^[7-11], 而药理活性研究则集中在补气生血、抗氧化、保肝护肝、提高免疫力、降血压和降血脂等方面^[12-13]。黄酮类化合物是自然界普遍存在的一类次生代谢产物, 具有很好的生理活性, 其提取工艺的优化可为新疆大枣的深度开发利用创造新的途径^[14-15]。目前, 国内对新疆

若羌大枣多糖的研究较多^[16-17], 采用响应面法优化其总黄酮提取工艺的研究鲜有报道。本实验以若羌大枣为原料, 通过响应面法优化大枣总黄酮的提取工艺条件, 并通过分级萃取对其抗氧化部位进行考察, 以期新疆大枣资源的利用及天然抗氧化剂的开发提供研究依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

新疆若羌大枣购于伊犁汉人街巴扎, 经伊犁师范学院资源与生态研究所欧阳艳教授鉴定, 切片、烘干、粉

收稿日期: 2012-06-29

基金项目: 伊犁师范学院科研计划项目(2012YB010)

作者简介: 刘伟(1985—), 男, 助教, 硕士, 研究方向为天然产物有效成分。E-mail: ncuiwei@126.com

*通信作者: 欧阳艳(1965—), 女, 教授, 博士, 研究方向为绿色有机化学。E-mail: oyy@ylsy.edu.cn

碎后过40目筛;山奈酚 上海源叶生物科技有限公司; 1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH) 长城生物化学工程有限公司; 无水乙醇、石油醚、正丁醇、乙酸乙酯、氯仿、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 (均为分析纯) 天津市大茂化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

UV-2550紫外-可见分光光度计 日本岛津分析仪器厂; SY-2000旋转蒸发仪、SHZ-III循环水真空泵、BAO-150AG型电热恒温干燥箱 上海亚荣生化仪器厂; FA2104电子天平 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; DF-101S集热式磁力加热搅拌器 金坛市医疗仪器厂; KQ-250DB数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 大枣总黄酮的提取

称取烘干并粉碎的大枣粉末置于圆底烧瓶中,加入适量的石油醚于50℃条件下回流1h进行脱脂处理,所得样品重新干燥。准确称取脱脂后的大枣粉末2g,加入一定体积分数的乙醇溶液,按照相应的提取条件回流、合并、浓缩、定容。采用标准曲线法计算样品中的总黄酮提取量。

1.3.2 大枣总黄酮的检测方法

据文献[18]报道大枣中含有多种槲皮素和山奈酚衍生物等黄酮类物质,通过全波长扫描,大枣提取液在波长350nm附近有最大吸收峰,故本实验选用山奈酚为标准品。

参照文献[19]方法并稍加修改,精密称取干燥至质量恒定的山奈酚标准品25mg,置于25mL容量瓶中,加50%乙醇至刻度,摇匀。分别精密吸取山奈酚标液(1mg/mL) 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40mL于25mL具塞比色管中,各加入1.5% AlCl_3 溶液8mL和醋酸-醋酸钠缓冲液(pH5.7)4mL,并用50%乙醇溶液定容,静置30min后摇匀于波长350nm处测吸光度,每个质量浓度梯度平行测定3次。以山奈酚标液质量浓度(X)为横坐标、吸光度(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程: $Y = 0.04177X + 0.01481$ ($r = 0.9996$),在4~16 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内线性关系良好。

准确量取0.4mL大枣提取液于25mL比色管中,按山奈酚标准品测定方法,于350nm波长处测定吸光度,计算总黄酮提取量(mg山奈酚/g)。

1.4 单因素试验

固定乙醇体积分数60%、料液比1:30(g/mL)、提取时间60min、温度70℃进行单因素试验,考察温度(50、60、70、80、90℃);乙醇体积分数(30%、45%、60%、75%、90%);料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50);提取时间(30、60、90、120、150min)对总黄酮提取量的影响。

1.5 大枣总黄酮提取工艺响应面试验优化

在单因素试验的基础上,以提取液中总黄酮质量浓度为响应值,采用Box-Behnken设计三因素三水平试验并

结合响应面分析法对新疆若羌大枣总黄酮的提取工艺进行优化,因素水平设计见表1。

表1 大枣总黄酮提取工艺优化响应面试验因素及水平表
Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in Box-Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
A 乙醇体积分数/%	30	45	60
B 提取温度/℃	70	80	90
C 料液比(g/mL)	1:20	1:30	1:40

1.6 粗提物的分级萃取

取200g的大枣粉末,在最优条件下提取、减压浓缩合并得到浸膏38g。取浸膏30g悬浮于适量的蒸馏水中,依次用等量的氯仿、乙酸乙酯、正丁醇各萃取3次,回收溶剂后真空干燥得2.1g氯仿萃取物(Chlorform Fr.)、4.9g乙酸乙酯萃取物(EtOAc Fr.)、3.5g正丁醇萃取物(*n*-BuOH Fr.)和2.8g水层(R-H₂O Fr.)。

1.7 清除DPPH自由基实验

参照文献[20]方法并稍加修改:取不同质量浓度(100、150、200、250 $\mu\text{g/mL}$)的分级萃取物和BHT各0.5mL于10mL的比色皿中,分别加入0.5mL浓度0.6mmol/L的DPPH乙醇溶液,将混合液用乙醇定容到5mL,取0.5mL的DPPH缓冲液用乙醇定容到5mL做对照试验。室温下避光放置30min,以乙醇溶液做空白试验,测定混合物在517nm处的吸光度,每组样品进行3次平行试验。DPPH自由基清除率按如下公式计算:

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

式中: A_c 为DPPH缓冲液的吸光度, A_s 为加入受试样品后DPPH混合液的吸光度。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取温度对总黄酮提取量的影响

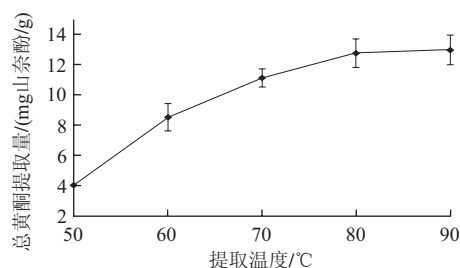


图1 提取温度对总黄酮提取量的影响
Fig.1 Effect of extraction temperature on the extraction yield of total flavonoids

由图1可知,在实验温度范围内,总黄酮提取量随着温度升高而增加。原因可能是温度升高加快黄酮类物质的溶出速率,考虑到温度过高提取物中活性成分易被破坏,提取温度以80℃为宜。

2.1.2 乙醇体积分数对总黄酮提取量的影响

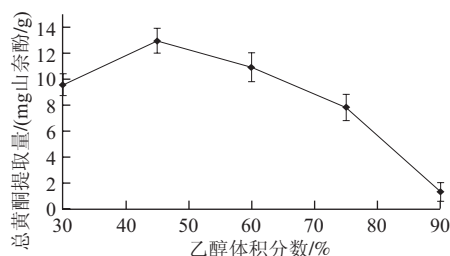


图2 乙醇体积分数对总黄酮提取量的影响

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

一般而言低浓度的乙醇溶液适合提取极性黄酮类化合物,而高浓度的乙醇溶液适于提取非极性黄酮类化合物。由图2可知,总黄酮提取量随乙醇体积分数在30%~45%范围内升高而增加,之后开始下降。原因可能是大枣黄酮的主要成分为黄酮苷类等极性大的化合物,高浓度乙醇不利于提取黄酮苷类化合物。

2.1.3 料液比对总黄酮提取量的影响

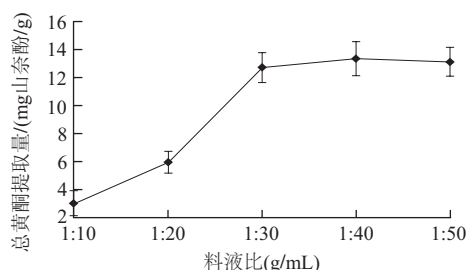


图3 料液比对总黄酮提取量的影响

Fig.3 Effect of solid-to-solvent ratio on the extraction yield of total flavonoids

由图3可知,在实验范围内总黄酮提取量随着提取剂用量增大而逐渐升高,当料液比达到1:30时,继续增加提取液的比例,对总黄酮提取量的影响并不明显。

2.1.4 提取时间对总黄酮提取量的影响

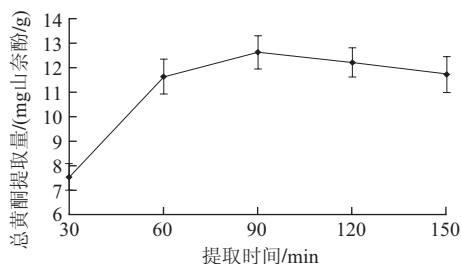


图4 提取时间对总黄酮提取量的影响

Fig.4 Effect of extraction time on the extraction yield of total flavonoids

由图4可知,在90min内,总黄酮提取量随着提取时间的延长而增大,之后总黄酮提取量趋势变化不显著且略有降低,原因可能是随着提取时间延长,部分黄酮类化合物水解。

2.2 响应面法优化总黄酮提取条件

在单因素实验基础上,固定提取时间90min,以乙醇体积分数、提取温度、料液比为自变量,大枣总黄酮提取量为响应值(Y),设计17次试验,其中析因部分试验12次,中心点重复试验5次。试验设计及结果见表2,方差分析结果见表3。

实验以随机次序进行,利用Design Expert 8.0软件对数据进行多元回归拟合,得到以总黄酮提取量Y为目标函数: $Y = 14.18 + 0.12A + 0.40B + 0.92C + 0.013AB + 0.018AC - 0.19BC - 1.42A^2 - 0.15B^2 - 0.61C^2$ 。

表2 大枣总黄酮提取工艺优化响应面试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	A	B	C	Y 总黄酮提取量/(mg山奈酚/g)
1	0	1	-1	12.9717
2	1	-1	0	12.6115
3	0	-1	1	14.2250
4	0	0	0	13.9903
5	1	0	1	12.8130
6	0	1	1	14.8270
7	-1	0	-1	11.5074
8	0	0	0	14.0254
9	-1	-1	0	11.9820
10	-1	0	1	12.9386
11	0	0	0	14.6021
12	0	-1	-1	11.6260
13	0	0	0	14.1727
14	-1	1	0	12.5673
15	1	0	-1	11.3098
16	0	0	0	14.0852
17	1	1	0	13.2503

表3 回归方程各项的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

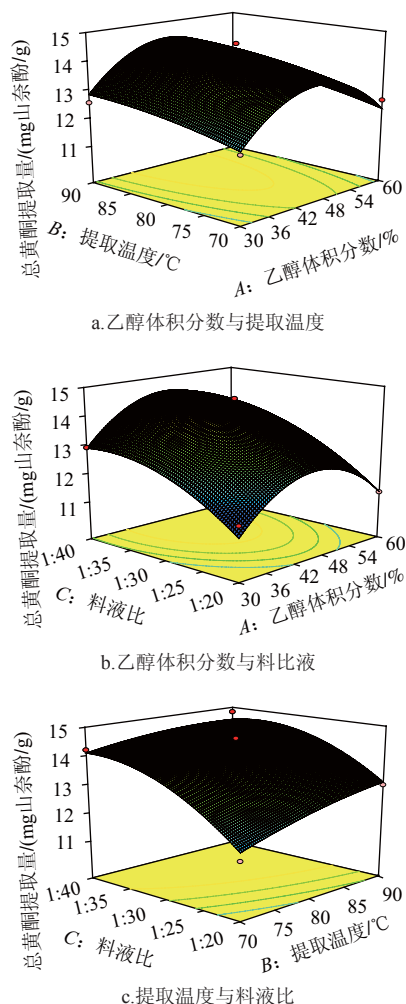
参数	自由度	平方和	F值	P值	显著性
总模型	9	2.13	15.91	0.0007	**
A	1	0.12	0.92	0.3706	
B	1	1.26	9.41	0.0181	*
C	1	6.82	51.06	0.0002	**
AB	1	0.00072	0.00535	0.9437	
AC	1	0.0013	0.00969	0.9247	
BC	1	0.14	1.03	0.3430	
A ²	1	8.51	63.64	0.0001	**
B ²	1	0.096	0.72	0.4245	
C ²	1	1.58	11.79	0.0109	*
失拟项	3	0.69	3.72	0.1185	

注: **. 差异极显著, $P < 0.01$; *. 差异显著, $P < 0.05$ 。

由表3可知,总模型F值为15.91,表明模型显著;水平 $P = 0.0007 < 0.05$,方程显著。由P值可知交互项不显著,表明总黄酮提取量与自变量非简单的线性关系;检验的F值为3.72,表明数据拟合效果较好,因此可以采用此模型对回归方程进行检验。

由图5可知,回归方程存在最大值,由Design Expert 8.0软件分析得到最佳提取条件为乙醇体积分数45.8%、提取温度89.4℃、料液比1:36.1,理论总黄酮提取量为

14.647mg山奈酚/g。为方便操作,总黄酮提取优化工艺参数选为乙醇体积分数45%、提取温度90℃、料液比1:35、提取时间90min。在此条件下进行3次平行实验,总黄酮提取量为14.34mg山奈酚/g。这表明响应面法优化大枣中总黄酮的提取工艺准确可靠,具有一定的实用价值。



固定水平:乙醇体积分数45%,提取温度80℃,料液比1:30。

图5 不同自变量交互作用对总黄酮提取量影响的响应面和等高线图
Fig.5 Response surface and contour plots for the interaction effects of three independent variables on the extraction yield of total flavonoids

2.3 各级萃取物抗氧化活性

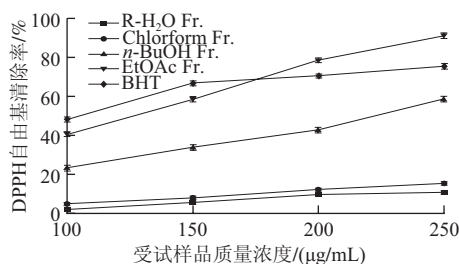


图6 分级萃取物清除DPPH自由基能力

Fig.6 DPPH radical scavenging activity of different solvent fractions of crude total flavonoids

由图6可知,各萃取组分的抗氧化能力有明显差异,其中乙酸乙酯萃取物抗氧化活性最强,当质量浓度200μg/mL时,其DPPH自由基清除率为(78.17±1.29)%,较抗氧化剂BHT强;其次是正丁醇萃取物,而氯仿萃取物和水层抗氧化活性较弱。

3 结论

在单因素试验基础上,采用响应面分析法对大枣中总黄酮的提取工艺进行优化,结合实际可操作性得出较优工艺条件为乙醇体积分数45%、提取温度90℃、料液比1:35(g/mL)、提取时间90min,总黄酮提取量为14.34mg山奈酚/g。将大枣粗提物分级萃取后进行抗氧化活性考察,结果表明乙酸乙酯萃取物为主要抗氧化活性部位,为进一步分离纯化若羌大枣中活性物质提供了较好的参考。

参考文献:

- [1] YU L, JIANG B P, LUO D, et al. Bioactive components in the fruits of *Ziziphus jujuba* Mill. against the inflammatory irritant action of *Euphorbia* plants[J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(3): 239-244.
- [2] CHOI S H, AHN J B, KOZUKUE N, et al. Distribution of free amino acids, flavonoids, total phenolics, and antioxidative activities of jujube (*Ziziphus jujuba*) fruits and seeds harvested from plants grown in Korea[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 52(19): 6594-6604.
- [3] MAHAJAN R T, CHOPDA M Z. Phyto-pharmacology of *Ziziphus jujuba* Mill-a plant review[J]. *Pharmacognosy Reviews*, 2009, 3(6): 320-329.
- [4] LI Jinwei, FAN Liuping, DING Shaodong, et al. Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube[J]. *Food Chemistry*, 2007, 103(2): 454-460.
- [5] 樊君, 吕磊, 尚红伟. 大枣的研究与开发进展[J]. *食品科学*, 2003, 24(4): 161-163.
- [6] 刘西建, 张艳. 大枣药用历史沿革[J]. *陕西中医*, 2011, 32(3): 352-353.
- [7] CHENG Gong, BAI Yanjing, ZHAO Yuying, et al. Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa*[J]. *Tetrahedron*, 2000, 56(45): 8915-8920.
- [8] 林勤保, 赵国燕. 不同方法提取大枣多糖工艺的优化研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(9): 368-371.
- [9] 李明, 杨国林, 米沙, 等. 大枣环磷酸腺苷(cAMP)提取工艺的研究[J]. *中药材*, 2007, 30(9): 1143-1145.
- [10] XUE Ziping, FENG Weihua, CAO Jiankang, et al. Antioxidant activity and total phenolic contents in peel and pulp of Chinese jujube (*Ziziphus Jujuba* Mill) fruits[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2009, 33(5): 613-629.
- [11] 王蓉珍, 赵子青, 林勤保, 等. 大枣功效成分检测的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(4): 423-426.
- [12] 牟德华, 朱艳丽, 张艳芳, 等. 大枣环腺苷酸及其生物学功能[J]. *食品科技*, 2007, 32(5): 273-275.
- [13] 王伟, 武运. 新疆哈密大枣汁浸提工艺及提取物抗氧化活性的研究[J]. *包装与食品机械*, 2011, 29(3): 12-15.
- [14] LI Yanling, FANG Hao, XU Wenfang. Recent advance in the research of flavonoids as anticancer agents[J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2007, 7(7): 663-678.
- [15] LEE C H, LIN Yang, JIN Zexu, et al. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides[J]. *Food Chemistry*, 2005, 90(4): 735-741.
- [16] 吴娜, 杨洁, 许海燕, 等. 若羌大枣多糖的分离纯化及抗氧化活性的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2009, 21(2): 319-323; 345.
- [17] 吴娜, 朱放兰, 徐保红, 等. 若羌大枣多糖提取及分离工艺研究[J]. *生物技术*, 2007, 17(6): 60-62.
- [18] LEE Y L, YANG J H, MAU J L. Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(3): 1127-1137.
- [19] PAWLOWSKA A M, CAMANGI F, BADE A, et al. Flavonoids of *Zizyphus jujuba* L. and *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits[J]. *Food Chemistry*, 2009, 112(4): 858-862.
- [20] LIU Wei, YU Yanying, YANG Ruzhen, et al. Optimization of total flavonoid compound extraction from *Gynura medica* leaf using response surface methodology and chemical composition analysis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11(11): 4750-4763.