杨申明,杨红卫,王振吉,等. 微波辅助提取常春油麻藤花总黄酮工艺及其抗氧化性[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):366-369. doi:10.15889/i.issn.1002-1302.2016.08.106

# 微波辅助提取常春油麻藤花总黄酮工艺及其抗氧化性

杨申明,杨红卫,王振吉,范树国,谢正萍(楚雄师范学院化学与生命科学学院,云南楚雄 675000)

摘要:为了优化微波辅助提取常春油麻藤花总黄酮的提取工艺,并测定其总黄酮的抗氧化性。采用  $NaNO_2$  -  $Al(NO_3)_3$  - NaOH 显色法测定总黄酮含量,通过正交试验  $L_9(3^4)$  优化其总黄酮的提取工艺参数,并就总黄酮对 1,1 - 苯基 - 2 - 苦肼基自由基( $DPH \cdot$ )、羟基自由基( $\cdot$ OH) 和超氧阴离子自由基( $O_2^{-} \cdot$ )的清除能力进行初步研究。结果表明:总黄酮最佳提取工艺参数为乙醇体积分数 75%,料液比 1 g:30 mL,微波时间 3.5 min,微波功率 200 W,在此条件下,总黄酮的平均提取率为 19.77%;微波辅助提取的常春油麻藤花总黄酮具有较强的抗氧化性,对  $DPPH \cdot$ 、羟基自由基和超氧阴离子自由基清除作用明显,且其质量浓度与抗氧化活性是一定的量效关系。

关键词:常春油麻藤花;微波辅助提取;总黄酮;抗氧化性

中图分类号: R151.3 文献标志码: A 文章编号:1002-1302(2016)08-0366-04

常春油麻藤(Mucuna sempervirens Hemsl)为蝶形花科(Papilionaceae)常春油麻藤属植物,别称牛马藤、油麻藤子、绵麻藤<sup>[1]</sup>,在我国主要分布在四川、贵州和云南等地<sup>[2]</sup>,它是一种药食同源植物,其藤茎、花和种子具有活血、通经活络之功效,常用于风湿疼痛、四肢麻木、血虚贫血、月经不调等病症,具有很好的疗效<sup>[1]</sup>。常春油麻藤产花量很多,云南楚雄每年2—5月采花炒食、做汤制作蔬菜食用,风味独特,是当地很受欢迎的一道特色野菜。因此,常春油麻藤花在医药和食品工业领域中具有广泛的利用价值。

目前,国内外对常春油麻藤花的研究主要集中在挥发性成分<sup>[3]</sup>、黄酮类结构鉴定、抗氧化活性成分<sup>[4]</sup>及抗氧化活性成分提取分离<sup>[5]</sup>等方面,其他有关常春油麻藤花的研究鲜见报道。近年来,黄酮类化合物越来越多的生物活性被不断发现,其应用范围正逐步扩大,但对常春油麻藤花中总黄酮含量

收稿日期:2015-12-03

保护作用及其作用机制的研究[J]. 中国药理学通报,2015,31(9):1216-1221.

- [17] 宁啸骏,王丁林,虞成华,等. UPLC MS/MS 同位素内标法测定 食品中对位红、苏丹红 I ~ Ⅳ的研究[J]. 质谱学报,2009,30 (1):41-46.
- [18]张 月,林靖凌,韩丙军,等. 超高效液相色谱 三重四极杆串 联质谱法测定柑橘中 4 种苯甲酰脲类农药残留 [J]. 农药学学报,2014,16(5):614-618.
- [19] 禹松林,方慧玲,张瑞苹,等. 改良超高效液相色谱串联质谱法测定 25 羟基维生素  $D_2$  和 25 羟基维生素  $D_3$  [J]. 检验医学, 2015, 30(10):1021 1026.

测定及提取工艺的研究未见报道。本研究采用微波辅助提取常春油麻藤花中总黄酮,用  $NaNO_2 - Al(NO_3)_3 - NaOH$  显色法测定总黄酮含量,通过正交试验  $L_9(3^4)$  优化提取工艺。同时,以维生素 C 为对照,并就所提取的总黄酮对 DPPH·、羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除作用进行研究,旨在为常春油麻藤花的综合利用提供依据和参考。

# 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

常春油麻藤花采自云南省楚雄市,经鉴定为蝶形花科常春油麻藤属植物;芸香苷标准品由中国药品生物制品检定所生产,1,1-苯基-2-苦肼基自由基(DPPH·)由上海蓝季科技发展有限公司生产,维生素 C 由昆山谱森实验室用品科技有限公司生产,其他所用化学试剂均为分析纯,由天津市风船化学试剂厂生产。

主要仪器: UV - 2100 型紫外分光光度计,上海尤尼柯仪器有限公司;G80F23CN3P - Q5(Q0)型微波炉,广东格兰仕微波炉电器制造有限公司;SE40ZF型电子天平,奥豪斯仪器上海有限公司;HH - S2型恒温水浴锅,金坛市大地自动仪器厂;SHZ - ⅢA型循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;202 - 00型干燥箱,上海市崇明实验仪器厂。

- [20] Esen B A, Bekir K. Identification, synthesis and characterization of process related impurities of benidipine hydrochloride, stress – testing/stability studies and HPLC/UPLC method validations[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2015, 5:256 – 268.
- [21]方慧玲,禹松林,韩建华,等. 中国北方健康人群血清 25 羟维生素 D<sub>3</sub> 和 25 羟维生素 D<sub>2</sub> 水平[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2014,7(3):199-205.
- [22] 胡代花, 张嘉昕, 韩 豪, 等. UPLC 法快速测定婴儿维生素  $D_3$  滴剂、维生素  $D_3$  片、维生素 AD 滴剂及维生素  $D_2$  片中维生素  $D_3$  和维生素  $D_3$  万物分析杂志,2016,36(8);1409 1414.

基金项目:国家自然科学基金(编号:31300370);云南省重点建设学科(编号:05YJJSXK03);云南省高校科技创新团队支持计划(编号:IRTSTYN)。

作者简介:杨申明(1976—),男,云南双柏人,实验师,主要从事天然 有机产物化学研究及教学工作。E-mail:ysm@cxtc.edu.cn。

通信作者:王振吉,博士,副教授,主要从事天然产物化学研究。 E-mail;wangzi@cxtc.edu.cn。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线绘制 采用芸香苷作标准品,用 NaNO<sub>2</sub> – Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> – NaOH 显色法绘制标准曲线,在 502  $\text{nm}^{[6]}$ 波长处测 吸光度,以质量浓度(C) 对吸光度(D) 进行线性回归,得回归方程 D = 7.996 4C + 0.002 9,  $r^2$  = 0.999 5。结果表明芸香苷质量浓度在 0 ~ 0.040 mg/mL 范围内与吸光度早良好的线性关系。

1.2.2 常春油麻藤花总黄酮提取方法 工艺流程:新鲜常春油麻藤花→洗净风干后置于50℃干燥箱烘干→粉碎过40目→用石油醚去除色素和油脂→烘干→得去除色素和油脂的常春油麻藤花干粉(备用)→称量→微波提取→抽滤→定容→测定总黄酮含量。

式中:C 表示根据回归方程计算出的黄酮质量浓度,mg/mL;N 表示稀释倍数;V 表示提取液体积,mL;m 表示常春油麻藤花干粉质量,g。

1.2.3 单因素试验设计 采用微波辅助进行提取,分别考察以下单因素的影响:(1)乙醇体积分数采用 55%、65%、75%、85%、95%的条件下进行比较,料液比 1 g: 40 mL,微波时间 3.0 min,微波功率 200 W;(2)料液比采用 1 g: 20 mL、1 g: 30 mL、1 g: 40 mL、1 g: 50 mL、1 g: 60 mL的条件下进行比较,乙醇体积分数 75%,微波时间 3.0 min,微波功率 200 W;(3)微波时间采用 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 min的条件下进行比较,乙醇体积分数 75%,料液比 1 g: 40 mL,微波功率 200 W;(4)微波功率采用 100、200、300、400、500 W 的条件下进行比较,乙醇体积分数 75%,料液比 1 g: 40 mL,微波时间 3.0 min,从而确定各因素的影响作用。

1.2.4 正交试验设计 根据单因素试验结果,选择乙醇体积分数、料液比、微波时间、微波功率进行 4 因素 3 水平作 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验优化提取条件,因素水平设计,见表 1。

表 1 正交试验因素与水平

水平	A:乙醇体积 分数(%)	B:料液比 (g: mL)	C:微波时间 (min)	D:微波功率 (W)
1	65	1:30	2.5	100
2	75	1:40	3.0	200
3	85	1:50	3.5	300

# 1.2.5 抗氧化活性测定

1.2.5.1 清除 DPPH·能力测定 参照文献[7-8]的方法,向 2.5 mL 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液中加入 1.0 mL 质量浓度分别为 0.003 9、0.007 9、0.015 7、0.031 4、0.062 8 mg/mL 常春油麻藤花黄酮溶液,反应 30 min 后在 517 nm 波长处测吸光度记为  $D_i$ ;同时测定 2.5 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液与 1.0 mL 乙醇溶液混合液的吸光度记为  $D_c$ ;以及 2.5 mL 无水乙醇与 1.0 mL 不同质量浓度 0.003 9、0.007 9、0.015 7、0.031 4、0.062 8 mg/mL 的常春油麻藤花黄酮溶液的吸光度记为  $D_b$ 。同时,以维生素 C 作阳性对照,常春油麻藤花黄酮溶液对 DPPH·的清除率按式(2)计算。

DPPH·清除率 =  $[1 - (D_i - D_b)/D_c] \times 100\%$ 。 (2)

式中: $D_i$  为 DPPH 乙醇溶液与常春油麻藤花黄酮混合液的吸光度; $D_b$  为无水乙醇与常春油麻藤花黄酮混合液的吸光度; $D_c$  为 DPPH 乙醇溶液与无水乙醇混合液的吸光度。

1.2.5.2 清除・OH 能力测定 参照文献[9-10]的方法,分别配质量浓度 0.003 9、0.007 9、0.015 7、0.031 4、0.062 8 mg/mL 的常春油麻藤花黄酮溶液,取 1.0 mL 于试管中,依次各加 2.0 mL 9 mmol/L  $FeSO_4$  溶液、9 mmol/L 水杨酸 - 乙醇溶液、8.8 mmol/L  $H_2O_2$  溶液后,用蒸馏水定容至 10 mL,反应 30 min 后在 510 nm 处测吸光度,以蒸馏水作空白。同时,以维生素 C 作阳性对照,总黄酮提取液对・OH 的清除率按式(3)计算。

・OH 清除率 =  $[D_0 - (D_x - D_{x0})]/D_0 \times 100\%$ 。 (3) 式中, $D_0$  为空白对照液的吸光度, $D_x$  为样品液吸光度, $D_{x0}$ 为不加 H,O, 样品的黄铜提取液吸光度。

1.2.5.3 清除 $O_2$ ·能力测定 参照文献[11]的方法,在 25 mL 比色管中依次加入 50 mmol/L Tris – HCl 溶液(pH 值 为 8.2) 4.50 mL、超纯水 4.20 mL 反应 25 min 后,加入 3 mmol/L 邻苯三酚 0.30 mL(用 0.30 mL 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚作为空白对照),在 325 nm 下每隔 30 s 测 1 次吸光度,直到 5 min 停止。计算空白液吸光度随时间变化率  $F_{-0}$ 

依照上述方法,在 5 支 25 mL 比色管中分别加入 1.0 mL 质量浓度 0.003 9、0.007 9、0.015 7、0.031 4、0.062 8 mg/mL 的常春油麻藤花黄酮溶液后,依次加入 4.50 mL Tris – HCl 溶液(pH 值为 8.2)、3.2 mL 超纯水反应 25 min,再加 3 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.3 mL,在 325 nm 下每隔 30 s 测 1 次吸光度,直到 5 min 时停止。计算对照液吸光度随时间变化率  $F_x$ 。同时,以维生素 C 作阳性对照,总黄酮提取液对  $O_2^-$ ·的清除率按式(4)计算。

 $O_2^-$ ·清除率 =  $(F_o - F_x)/F_o \times 100\%$ 。 (4) 式中: $F_o$  为空白溶液随时间变化率; $F_x$  为对照液随时间变化率。 1.3 数据处理

所有试验重复3次,结果取平均值,运用 Excel 软件作图,并对试验数据进行分析处理。

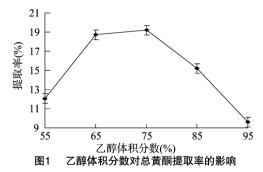
#### 2 结果与分析

#### 2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响 在料液比 1 g: 40 mL、微波时间 3.0 min、微波功率 200 W 的条件下,探 究不同乙醇体积分数 55%、65%、75%、85%、95% 对常春油 麻藤花总黄酮提取率的影响,结果见图 1。由图 1 可知,当乙醇体积分数从 55% 增大至 75% 时,总黄酮提取率由 12.06%增加至 19.21%;当乙醇体积分数从 75%增大至 95%时,总黄酮提取率由 19.21%减小至 9.59%。因此,最佳乙醇体积分数在 75% 附近,选乙醇体积分数 65% ~85% 优化试验。

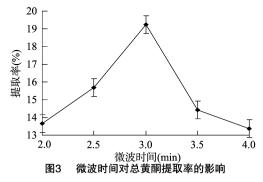
2.1.2 料液比对总黄酮提取率的影响 在乙醇体积分数75%、微波时间3.0 min、微波功率200 W 的条件下,探究不同料液比1g:20 mL、1g:30 mL、1g:40 mL、1g:50 mL、1g:60 mL 对常春油麻藤花总黄酮提取率的影响。由图2可知,当料液比从1g:20 mL 增大至1g:40 mL时,总黄酮提取率由13.47%增加至19.24%;当料液比从1g:40 mL增大至1g:60 mL 时,总黄酮提取率由15.24%减小至17.29%。

因此,最佳料液比在 1 g: 40 mL 附近,选料液比  $1 g: 30 mL \sim 1 g: 50 mL$  优化试验。



20 19 18 提取率(%) 17 16 15 14 13 1:20 1:30 1:40 1:50 1:60 料液比(g: mL) 图2 料液比对总黄酮提取率的影响

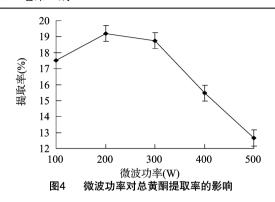
2.1.3 微波时间对总黄酮提取率的影响 在乙醇体积分数75%、料液比1g:40 mL、微波功率200 W的条件下,探究不同微波时间2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 min 对常春油麻藤花总黄酮提取率的影响。由图3可知,当微波时间从2.0 min 延长至3.0 min 时,总黄酮提取率由13.66%增加至19.24%;当微波时间从3.0 min 延长至4.0 min 时,总黄酮提取率由19.24%减小至13.36%。因此,最佳微波时间在3.0 min 附近,选微波时间2.5~3.5 min 优化试验。



2.1.4 微波功率对总黄酮提取率的影响 在乙醇体积分数75%、料液比1g:40 mL、微波时间3.0 min 的条件下,探究不同微波功率100、200、300、400、500 W 对常春油麻藤花总黄酮提取率的影响。由图4可知,当微波功率从100 W 增大至200 W 时,总黄酮提取率由17.50%增加至19.20%;当微波功率从200 W 增大至500 W 时,总黄酮提取率由19.20%减小至12.66%。因此,最佳微波功率在200 W 附近,选微波功率100~300 W 进行优化试验。

### 2.2 正交试验结果

由表 2 可知,对常春油麻藤花总黄酮提取率的影响因素由 大到小为乙醇体积分数 > 料液比 > 微波时间 > 微波功率。由



极差分析得出最佳工艺条件为  $A_2B_1C_3D_2$ ,即乙醇体积分数 75%,料液比1 g: 30 mL,微波时间3.5 min,微波功率200 W。在最佳工艺条件对常春油麻藤花总黄酮进行提取,重复5次,得到总黄酮平均提取率为19.77%(大于正交试验结果中的最高提取率19.62%),相对标准差 RSD 值为1.32%,表明该方法重现性良好,可用于常春油麻藤花中总黄酮的提取。

表 2 常春油麻藤花中总黄酮提取率的正交试验结果

试验序号	A	В	С	D	总黄酮提 取率(%)
1	1	1	1	1	15.32
2	1	2	2	2	15.79
3	1	3	3	3	16.65
4	2	1	2	3	19.62
5	2	2	3	1	19.15
6	2	3	1	2	18.72
7	3	1	3	2	19.35
8	3	2	1	3	17.55
9	3	3	2	1	18.14
$k_1$	15. 92	18. 10	17. 20	17. 54	
$k_2$	19. 16	17.50	17. 35	17. 95	
$k_3$	18. 35	17.84	18.38	17. 94	
R	3.24	1.21	1.18	0.41	
优水平	$A_2$	$\mathrm{B}_1$	$C_3$	$D_2$	

# 2.3 常春油麻藤花总黄酮抗氧化性分析

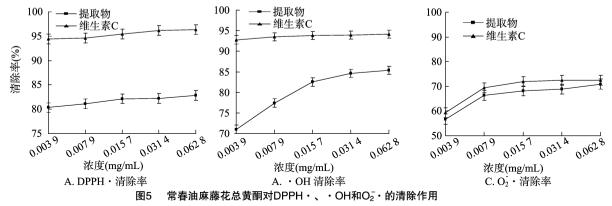
2.3.1 清除 DPPH·的能力评价 DPPH·是一种以氮为中心的稳定自由基,其乙醇溶液呈紫色,在波长 517 nm 处有强吸收峰,当有自由基清除剂存在时其溶液颜色变浅,且溶液褪色程度与清除剂的清除能力及数量呈正相关。因此,可根据褪色程度来间接评价其抗氧化剂的抗氧化性[12]。由图 5-A可知,常春油麻藤花总黄酮质量浓度在 0.003 9~0.062 8 mg/mL 范围内,随质量浓度增大,清除 DPPH·能力增强,当总黄酮质量浓度均大,清除 DPPH·能力增强,当总黄酮质量浓度生素 C相比,总黄酮清除 DPPH·能力稍弱于维生素 C(96.33%),但常春油麻藤花总黄酮依然表现出较强的清除 DPPH·的能力。

2.3.2 清除·OH的能力评价 羟基自由基是活性氧中对生物体危害最大、毒性最强的一种自由基,能与细胞中的分子发生反应,对机体造成损伤,清除羟自由基的能力是评价抗氧化物的重要指标<sup>[13-14]</sup>。由图 5 - B可知,常春油麻藤花总黄酮质量浓度在 0.003 9 ~ 0.062 8 mg/mL 范围内,随质量浓度增大,清除羟基自由基能力增强,当总黄酮质量浓度为

0.062 8 mg/mL,清除率最大为85.36%。与同质量浓度维生素 C 相比,总黄酮清除羟基自由基的能力稍弱于维生素 C (94.14%),但常春油麻藤花总黄酮也表现出较强的清除羟基自由基的能力。

2.3.3 清除Q<sub>2</sub>·的能力评价 超氧阴离子自由基可通过邻苯三酚在碱性条件下发生自氧化产生,并生成一种带有颜色的中间产物,该有色中间产物在325 nm 波长处有特征吸收峰。当加入Q<sub>2</sub>·清除剂时,Q<sub>2</sub>·的生成受到抑制,邻苯三酚

自氧化过程受阻,溶液在 325 nm 处吸收减弱。所以,可通过测定 325 nm 处吸光度推断清除剂对 $O_2^-$  的清除率 [15-16]。由图 5-C 可知,常春油麻藤花总黄酮质量浓度在 0.0039 ~ 0.062 8 mg/mL 范围内,随质量浓度增大,清除超氧阴离子自由基能力增强,当总黄酮质量浓度为 0.0628 mg/mL,清除率最大,为 70.95%。与同质量浓度维生素 C 相比,总黄酮清除超氧阴离子自由基的效果与维生素 C(72.51%)很接近,表明常春油麻藤花总黄酮具有很强的清除羟基自由基的能力。



# 3 结论与讨论

微波辅助提取常春油麻藤花总黄酮中,影响总黄酮提取效果的因素从强到弱依次为乙醇体积分数 > 料液比 > 微波时间 > 微波功率。经过优化后的提取工艺参数为乙醇体积分数75%,料液比 1 g:30 mL,微波时间3.5 min,微波功率200 W。在该条件下进行验证性试验,重复5次,得到常春油麻藤花总黄酮平均提取率为19.77%,相对标准差RSD值为1.32%。该提取方法快速省时、操作简单、重复性好,可用于常春油麻藤花中总黄酮的提取和含量测定。

该研究从 DPPH・、・OH 和 $O_2$ ・自由基的清除能力 3 个方面来评价常春油麻藤花中总黄酮抗氧化性。抗氧化性试验结果表明,在常春油麻藤花总黄酮质量浓度 0.003 9 ~ 0.062 8 mg/mL 范围内,随质量浓度的增大,清除 DPPH・、・OH 和 $O_2$ ・自由基的能力增强。当总黄酮质量浓度为0.062 8 mg/mL 时,对 DPPH・、・OH 和 $O_2$ ・自由基的清除率最大分别为 82.83%、85.36%和 70.95%,表明常春油麻藤花总黄酮具有较强的抗氧化能力。因此,常春油麻藤花可作为一种良好的抗氧化物质资源进行开发利用。

本研究结果表明,常春油麻藤花中富含黄酮类物质,该黄酮类物质具有较强的抗氧化性,是一种具有较大开发价值的药食同源植物,相关研究结果对常春油麻藤花中黄酮类物质的提取及抗氧化活性成分的研究具有重要意义。但常春油麻藤花中黄酮类物质发生抗氧化作用的机理目前还不清楚,有待进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1]云南省药物研究所.云南天然药物图鉴:第2卷[M].昆明:云南科技出版社,2007;402.
- [2] 芦夕芹,彭志金. 常春油麻藤的开发利用[J]. 中国林副特产, 2007,87(2);85-86.

- [3]宋培浪,程 力,何先贵,等. 固相微萃取-气相色谱-质谱法分析常春油麻藤花挥发油成分[J]. 理化检验:化学分册,2010,46(4):354-356.
- [4]杜琪珍,赵永春,李 博. 常春油麻藤花黄酮类化合物结构鉴定及抗氧化活性分析[J]. 食品科学,2011,32(23):111-115.
- [5]陈 辉. 常春油麻藤花中抗氧化活性成分的提取分离[D]. 杭州:浙江工商大学,2010.
- [6]张 凌,刘亚丽,饶志军,等. 正交实验优选常春油麻藤总黄酮提取工艺的研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(4):796-798.
- [7]何 姿,夏道宗,吴晓敏,等. 艾草总黄酮的提取工艺优化及抗氧 化活性研究[J]. 中华中医药学刊,2013,31(7):1550-1552.
- [8] 石青浩,李 荣,姜子涛. 食用鼠曲草黄酮的提取及体外抗氧化性研究[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(3):307-312.
- [9]刘玉芬,夏海涛. 响应面法优化碱黄酮提取工艺及其体外抗氧化作用[J]. 食品科学,2012,33(12):63-68.
- [ 10 ] She G M, Xu C, Liu B, et al. Polyphenolic acids from mint (the aerial of *Mentha haplocalyx* Briq.) with DPPH radical scavenging activity [ J ]. Journal of Food Science, 2010, 75(4): C359 C362.
- [11] 杨申明,王应顺,王振吉. 隔山消总黄酮的提取工艺优化及其抗氧化 特性[J]. 上海大学学报:自然科学版,2015,21(2);220-228.
- [12]张 汇,鄢 嫣,聂少平,等. 黑灵芝不同部位多糖成分分析及 抗氧化活性[J]. 食品科学,2011,32(1):56-61.
- [13]殷 军,葛 青,毛建卫,等. 竹叶多糖的组分及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技,2013,34(2):100-103.
- [14]谢云涛,马国平,何玉凤,等. BPR 硫脲催化光度法对羟基自由基的检测及清除作用[J]. 化学通报:印刷版,2006,69(6):458-461.
- [15] Pan D D, Mei X M. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 12 [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3):908-914.
- [16]张兰杰,王洪宽,李铁纯,等. 盘锦河蟹卵和蟹肉中脂肪酸成分分析及其对超氧阴离子自由基的抑制作用[J]. 食品科学, 2010,31(5);108-110.