

石榴叶总黄酮的提取工艺及抗氧化活性考察

郑丹丹¹, 王京龙¹, 王占一¹, 于定荣^{2*}, 张立华¹, 王玉海¹

(1. 枣庄学院 生命科学学院, 山东 枣庄 277160; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:优化石榴叶总黄酮的提取工艺,并对其体外抗氧化活性进行评价,为该部位的开发提供参考。方法:在单因素试验基础上,选择乙醇体积分数、料液比、超声功率、超声时间为考察因素,石榴叶总黄酮提取率为评价指标,根据 Box-Behnken 设计原理,采用响应面法优化石榴叶总黄酮的提取工艺。通过 DPPH 和·OH 的清除能力考察石榴叶总黄酮的体外抗氧化活性。结果:石榴叶总黄酮最佳超声提取工艺为乙醇体积分数 59.8%,料液比 1:16.3,超声功率 221 W,提取时间 33.45 min;石榴叶总黄酮提取率 0.433%,与理论值偏差很小。当样品质量浓度为 0.6~1.0 g·L⁻¹时,对 DPPH 和·OH 清除率较高,与维生素 C 接近。结论:优选的提取工艺稳定可行、提取率高,石榴叶总黄酮抗氧化性能较强,为该部位的工业化生产提供参考。

[关键词] 石榴叶; 总黄酮; 响应面法; 抗氧化活性; 芦丁

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0012-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060012

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160126.1612.014.html>

[网络出版时间] 2016-01-26 16:12

Optimization of Extraction Technology and Investigation of Antioxidant Activity of Total Flavonoids from *Punica granatum* Leaves

ZHENG Dan-dan¹, WANG Jing-long¹, WANG Zhan-yi¹, YU Ding-rong^{2*}, ZHANG Li-hua¹, WANG Yu-hai¹
(1. College of Life Sciences, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, China;
2. Institute of Chinese Material Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of total flavonoids from *Punica granatum* leaves by response surface methodology and investigate its *in vitro* antioxidant activity. **Method:** On basis of single factor tests and Box-Behnken principle, response surface methodology was used to optimize extraction conditions with ethanol concentration, solid-liquid ratio, ultrasonic power and time as factors, yield of total flavonoids as index. DPPH and ·OH scavenging assays were carried out to verify *in vitro* antioxidant activity of total flavonoids from *P. granatum* leaves. **Result:** Optimum extraction conditions were ethanol concentration of 59.8%, solid-liquid ratio of 1:16.3, ultrasonic power of 221 W, extraction time of 33.45 min; under these conditions, yield of total flavonoids was 0.433%. When the concentration of sample was 0.6-1.0 g·L⁻¹, scavenging rates of DPPH radical and ·OH were high, which approached vitamin C. **Conclusion:** Application of this simple and workable technology to extract total flavonoids from *P. granatum* leaves can improve extraction efficiency, total flavonoids shows a relatively high antioxidant activity.

[Key words] *Punica granatum* leaves; total flavonoids; response surface methodology; antioxidant activity; rutin

石榴叶在中国主要分布在山东枣庄、陕西临潼、安徽怀远、新疆和田、云南巧家和四川会理等地,其

富含黄酮类、有机酸类、多酚类及多种微量元素(Zn, Fe, Mn 等)^[1],其中含量较高的黄酮类物质越

[收稿日期] 20150701(018)

[基金项目] 国家星火计划项目(2012GA740049);山东省自然科学基金项目(ZR2013BL018)

[第一作者] 郑丹丹, 硕士, 助教, 从事中药制剂新技术与新剂型研究, Tel:18265283189, E-mail:zddsd@163.com

[通讯作者] *于定荣, 博士, 助理研究员, 从事中药炮制与制剂研究, Tel:13436821953, E-mail:yudingrong0826@sina.com

来越为人们所关注。而且,黄酮类成分在清除自由基、抗氧化、抗衰老方面发挥着重要作用。近年来,石榴叶总黄酮提取方法的报道有乙醇回流法^[2]、超声波法^[3]、微波萃取法^[4]等,但这些方法存在提取率不高、提取时间长、设备昂贵等不足。在设计方法上,多采用正交试验,难以满足多因素、多水平的实验要求。响应面分析法试验次数少、精度高,已被广泛用于中药提取和制备工艺的研究,相较于正交试验、均匀设计,响应面法更适于多因素多水平的研究^[5]。采用响应面法优化总黄酮的工艺条件已有报道^[6-8]。本实验综合考虑生产成本、时间、提取率等因素,为探索一种成本较低、时间较快、提取率较高的石榴叶总黄酮提取工艺,采用响应面法优化超声波辅助乙醇提取石榴叶总黄酮的工艺条件,并以自由基清除法考察其体外抗氧化活性,为山东枣庄地区石榴叶资源的开发与利用提供参考。

1 材料

JOYN-3000A 型低温超声波萃取仪(上海乔跃电子科技有限公司),8453 型紫外-可见分光光度计(美国 Agilent 公司)。石榴叶采自山东省枣庄市万亩石榴园石榴核心产区,经枣庄学院李思健副教授鉴定为 *Punica granatum* 的新鲜叶;芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100080-201202),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,北京索莱宝科技有限公司),维生素 C 和 H_2O_2 (天津市福晨化学制剂厂),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 石榴叶总黄酮提取率的测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品适量,制成 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品溶液,经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 准确称取石榴叶样品 0.5 g ,经低温干燥、粉碎后得石榴叶粗粉,经石油醚脱脂,抽滤,弃去滤液。残渣经不同体积分数乙醇提取后,过滤,得石榴叶总黄酮提取物。离心($4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, $10\ \text{min}$,下同),取上清液适量,加 60% 乙醇稀释至 $25\ \text{mL}$,即得。

2.1.3 线性关系考察^[9-11] 吸取 **2.1.1** 项下对照品溶液 $0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0\ \text{mL}$,分别置于 $25\ \text{mL}$ 具塞比色管中,依次加入 30% 乙醇 $5\ \text{mL}$ 和 15% 亚硝酸钠 $0.7\ \text{mL}$,摇匀,静置 $6\ \text{min}$,加入 10% 硝酸铝 $0.7\ \text{mL}$,静置 $6\ \text{min}$,加入 4% 氢氧化钠溶液 $5\ \text{mL}$,混匀,加 30% 乙醇定容后静置 $20\ \text{min}$,在 $510\ \text{nm}$ 处测定吸光度 A 。以芦丁的质量浓度(C)

为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $A = 12.5028C - 0.0136$ ($r = 0.9993$),线性范围 $0 \sim 0.08\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.1.4 精密度试验 吸取 **2.1.1** 项下对照品溶液 $2.0\ \text{mL}$,按 **2.1.3** 项下方法于 $510\ \text{nm}$ 处测定 A ,连续测定 5 次,计算 RSD 0.5% ,说明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性考察 精密吸取同一供试品溶液,分别于 $0, 2, 4, 6, 8, 12\ \text{h}$ 按 **2.1.3** 项下方法测定 A ,计算 RSD 1.0% ,证明显色生成的络合物在 $12\ \text{h}$ 内稳定性良好。

2.1.6 重复性考察 称取石榴叶样品 $0.5\ \text{g}$,按 **2.1.2** 项下方法制备供试品溶液 6 份,计算 A 的 RSD 1.1% ,说明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密称取石榴叶 $0.5\ \text{g}$,加入芦丁对照品 $2.20\ \text{mg}$,加 20 倍量 60% 乙醇于 $200\ \text{W}$ 超声提取 $30\ \text{min}$,按 **2.1.2** 项下方法制备供试液,平行制备 6 份,按 **2.1.3** 项下方法测定,计算平均回收率 101.20% ,RSD 1.1% ,说明该方法满足对石榴叶总黄酮的分析测定的要求。

2.2 单因素试验考察

2.2.1 乙醇体积分数 按 **2.1.1** 项下方法处理,设定乙醇体积分数分别为 $40\%, 50\%, 60\%, 70\%, 80\%$,固定其他 3 个因素(料液比 $1:20$,超声功率 $250\ \text{W}$,提取时间 $30\ \text{min}$),按提取率 = 样品中总黄酮质量/样品质量计算石榴叶总黄酮提取率依次为 $0.142\%, 0.250\%, 0.382\%, 0.311\%, 0.270\%$ 。故选择乙醇体积分数 60% 。

2.2.2 料液比 设定料液比分别为 $1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30$,固定其他 3 个因素(乙醇体积分数 60% ,超声功率 $250\ \text{W}$,提取时间 $30\ \text{min}$),按 **2.1.1** 项下方法处理,计算石榴叶总黄酮提取率依次为 $0.293\%, 0.331\%, 0.379\%, 0.387\%, 0.388\%$ 。结合生产成本等考虑,选择料液比 $1:20$ 。

2.2.3 超声功率 设定超声功率分别为 $150, 200, 250, 300, 350\ \text{W}$,固定其他 3 个因素(乙醇体积分数 60% ,料液比 $1:20$,提取时间 $30\ \text{min}$),按 **2.1.1** 项下方法处理,计算石榴叶总黄酮提取率依次为 $0.322\%, 0.345\%, 0.392\%, 0.393\%, 0.395\%$ 。考虑成本问题,超声功率选择 $250\ \text{W}$ 。

2.2.4 提取时间 设定提取时间分别为 $20, 25, 30, 35, 40\ \text{min}$,固定其他 3 个因素(乙醇体积分数 60% ,料液比 $1:20$,超声功率 $250\ \text{W}$),按 **2.1.1** 项下方法处理,计算石榴叶总黄酮提取率依次为 $0.177\%, 0.268\%, 0.387\%, 0.387\%, 0.384\%$ 。故提取时间选择 $30\ \text{min}$ 。

2.3 提取工艺 Box-Behnken 试验分析 为了更好地分析各因素间相互作用对提取效果的影响,结合单因素试验结果,运用 Box-Behnken 试验设计,以石榴叶总黄酮提取率为响应值,选取乙醇体积分数、料液比、超声功率、提取时间为自变量^[12-13]。称取石榴叶 0.5 g,按 2.1.2 项下方法提取石榴叶总黄酮,每组试验平行 3 次。采用 Design-Expert 8.0.5 统计分析软件对所得数据进行多元回归拟合,试验设计与结果见表 1,2。

表 1 石榴叶总黄酮提取工艺 Box-Behnken 试验分析
Table 1 Box-Behnken test analysis of extraction process of total flavonoids from Punica granatum leaves

No.	X_1 乙醇 体积分数 /%	X_2 料液比	X_3 超声 功率 /W	X_4 提取 时间 /min	总黄酮 提取率 (Y)/%
1	60	1:15	250	30	0.433
2	60	1:20	200	30	0.434
3	60	1:25	200	25	0.345
4	70	1:20	150	30	0.330
5	60	1:20	150	35	0.384
6	60	1:15	150	30	0.420
7	70	1:15	200	30	0.361
8	60	1:20	150	25	0.380
9	50	1:20	150	30	0.358
10	70	1:25	200	30	0.347
11	50	1:25	200	30	0.349
12	70	1:20	200	25	0.348
13	70	1:20	250	30	0.393
14	50	1:20	200	35	0.381
15	60	1:20	200	30	0.430
16	60	1:20	200	30	0.434
17	60	1:25	250	30	0.403
18	50	1:20	250	30	0.354
19	60	1:15	200	35	0.412
20	60	1:20	250	35	0.432
21	60	1:15	200	25	0.433
22	50	1:20	200	25	0.344
23	60	1:25	200	35	0.389
24	60	1:20	200	30	0.420
25	60	1:20	200	30	0.423
26	60	1:20	250	25	0.377
27	50	1:15	200	30	0.420
28	60	1:25	150	30	0.377
29	70	1:20	200	35	0.384

表 2 回归方程方差分析
Table 2 Variance analysis of regression equation

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	0.030 0	14	0.002 2	15.76	<0.000 1
X_1	0.000 2	1	0.000 2	1.19	0.307 0
X_2	0.006 0	1	0.006 0	44.00	<0.000 1
X_3	0.001 7	1	0.001 7	12.43	0.003 4
X_4	0.002 0	1	0.002 0	14.61	0.001 9
X_1X_2	0.000 8	1	0.000 8	5.93	0.028 9
X_1X_3	0.001 1	1	0.001 1	8.19	0.012 6
X_1X_4	<0.000 1	1	<0.000 1	0.002	0.966 5
X_2X_3	<0.000 1	1	<0.000 1	0.31	0.587 5
X_2X_4	0.001 1	1	0.001 1	7.71	0.014 9
X_3X_4	0.000 7	1	0.000 7	4.74	0.047 0
X_1^2	0.016 0	1	0.016 0	115.46	<0.000 1
X_2^2	0.000 6	1	0.000 6	4.17	0.060 3
X_3^2	0.001 5	1	0.001 5	11.21	0.004 8
X_4^2	0.002 4	1	0.002 4	17.80	0.000 9
残差	0.001 9	14	0.000 1		
失拟项	0.001 8	10	0.000 2	4.26	0.087 6
误差项	0.000 2	4	<0.000 1		
总离差	0.032 0	28			

由表 2 可知,一次项中, X_2, X_3, X_4 对总黄酮提取率具有显著性影响;二次项中, X_1^2, X_3^2, X_4^2 对总黄酮提取率的影响极显著;交叉项中, $X_1X_2, X_1X_3, X_2X_4, X_3X_4$ 对总黄酮得率影响显著。失拟项不显著,模型充分拟合,受其他因素影响较小^[14-15]。二次回归方程显著性检验中,该模型数值与实际试验结果拟合良好($R^2 = 0.9403$),响应值与自变量的线性关系显著,回归方程 $Y = 0.43 - 0.0036X_1 - 0.022X_2 + 0.012X_3 + 0.013X_4 + 0.014X_1X_2 + 0.017X_1X_3 - 0.0003X_1X_4 + 0.0033X_2X_3 + 0.016X_2X_4 + 0.013X_3X_4 - 0.049X_1^2 - 0.0094X_2^2 - 0.015X_3^2 - 0.019X_4^2$ 。根据二次回归方程所作各影响因素之间的响应面图,见图 1。

运用 Design-Expert 8.0.5 统计分析软件对试验结果进行优化,确定最佳提取工艺条件为乙醇体积分数 59.8%,料液比 1:16.3,超声功率 221 W,提取时间 33.45 min;石榴叶总黄酮提取率的理论值 0.436%。称取石榴叶 0.5 g,共 3 份,按优选的工艺条件进行提取,结果石榴叶总黄酮提取率 0.433%,与理论值相比,相对偏差很小,说明优选的超声波辅助乙醇提取石榴叶总黄酮工艺参数可靠。

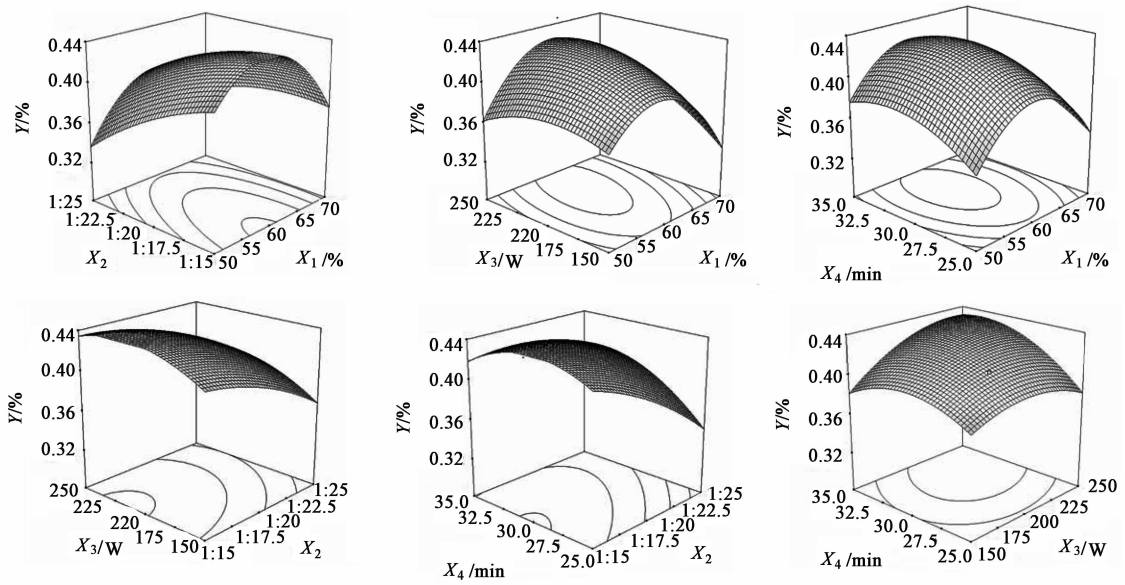


图 1 乙醇体积分数、料液比、超声功率、提取时间交互作用对石榴叶总黄酮提取工艺影响的响应曲面

Fig.1 Response surface plots of interactions among ethanol concentration, solid-liquid ratio, ultrasonic power and time on extraction process of total flavonoids from *Punica granatum* leaves

2.4 石榴叶总黄酮抗氧化性能评价

2.4.1 清除 DPPH 自由基能力

称取提取的石榴叶总黄酮 100 mg,加 60% 乙醇溶解并稀释至 100 mL,得 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 供试品溶液,依次稀释成 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列溶液,备用。精密称取 DPPH 2 mg,用 60% 乙醇溶解并稀释至 100 mL。分别量取上述不同质量浓度的石榴叶总黄酮供试品溶液 1 mL,置 10 mL 具有橡皮塞试管中,作为样品管,加入 DPPH 溶液 3 mL,反应 30 min 后于 525 nm 处测定吸光度,记为 A_1 ;取水 1 mL 置于 10 mL 具有橡皮塞试管中,作为空白管,其余操作同样品管,测定吸光度,记作 A_2 ;另取供试品溶液 1 mL,加入 60% 乙醇 3 mL,作为对照管,反应 30 min 后测定吸光度,记作 A_3 ;精密称取维生素 C 100 mg,加水定容至 100 mL,稀释至规定的系列浓度,分别取 1 mL 置于 10 mL 具有橡皮塞试管中,其余操作同样品管,测定 A ,作为阳性组。以上各组经 3 次平行测量,结果取平均值,按 $[1 - (A_1 - A_3)/A_2] \times 100\%$ 计算清除率^[16]。

不同质量浓度石榴叶总黄酮的 DPPH 清除率依次为 23%, 41%, 62%, 64%, 63%, 而阳性组的 DPPH 清除率依次为 42%, 66%, 68%, 70%, 69%。说明石榴叶总黄酮对 DPPH 的清除率随样品质量浓度升高而增大。当样品质量浓度 $< 0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时清除能力较差;当质量浓度在 $0.6 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对 DPPH 清除率有显著提高,接近维生素 C。提示在

一定范围内,石榴叶总黄酮对 DPPH 的清除能力与其质量浓度呈正相关。

2.4.2 清除羟自由基能力

在 10 mL 具塞试管中加入 $0.75 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻二氮菲溶液 1 mL, $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.4) 2 mL 和水 1 mL,混匀,加入 $0.75 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸亚铁溶液 1 mL,充分混匀后加入 3% H_2O_2 1 mL 启动反应,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 60 min,在 511 nm 处测定 A_1 。将 H_2O_2 置换成样品液 1 mL,按上述方法测定 A_2 。另取同体积样品液 (配制方法同 2.4.1 项) 代替水,按上述方法测定 A_3 。各组试验平行 3 次,结果取平均值,按 $[(A_3 - A_1)/(A_2 - A_1)] \times 100\%$ 计算清除率。结果不同质量浓度石榴叶总黄酮的 $\cdot\text{OH}$ 清除率依次为 38%, 43%, 65%, 72%, 67%, 而阳性对照组的 $\cdot\text{OH}$ 清除率依次为 62%, 76%, 74%, 78%, 76%。说明石榴叶总黄酮对羟自由基清除能力与其质量浓度一定程度上呈正相关。

3 讨论

本文采用芦丁显色法进行石榴叶总黄酮的含量测定,并进行了相关方法学考察,结果均符合含量测定要求。各因素影响石榴叶总黄酮提取率的机制不同,料液比的增加利于提高细胞壁内外物料的浓度差,进而增加细胞内外目标产物的交换容量,当细胞内外浓度接近平衡时,提取率增加缓慢;低功率时,超声波空化作用使得细胞内部快速升温,达到产生膨胀破裂的临界内压,在此范围内破壁能力逐渐增强,但 $> 250 \text{ W}$ 后破壁能力达到极限,溶剂挥发快

速,反而不利于细胞内容物外溢;提取时间过长可能使部分总黄酮开始降解致使提取率降低。

响应面分析结果显示乙醇体积分数与料液比的交互作用对提取结果影响显著,根据相似相溶原理,当提取溶剂的极性恰好与有效成分极性相当时,更有利于提高总黄酮的提取率^[17]。原因可能是提取溶剂浓度对总黄酮提取率的影响与不同体积分数乙醇的极性不同有关。通过对石榴叶总黄酮提取物进行自由基清除试验发现,石榴叶总黄酮是良好的天然抗氧化剂,这与其具有抗癌、抗衰老、抗动脉粥样硬化等功效相符。但体外抗氧化试验并不等同于生物体的体内抗氧化结果,需进一步设计体内抗氧化试验,对石榴叶总黄酮的活性进行比较。

[参考文献]

[1] 林佳,李琰,徐丽珍. 石榴叶的化学成分研究[J]. 中南药学,2005,3(2):70-72.
[2] 索金玲,彭秧,张纵圆. 石榴叶总黄酮提取工艺及体外抗氧化性研究[J]. 生物技术,2009,19(1):63-65.
[3] 买里克扎提·买合木提,阿布都热西提·阿布力克木. 石榴叶中总黄酮提取工艺的研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(29):17867-17868.
[4] 王光,张海林. 番石榴叶总黄酮两种提取方法的比较研究[J]. 商品与质量,2012(5):305-306.
[5] 余小翠,刘高峰. 响应面分析法在中药提取和制备工艺中的应用[J]. 中药材,2010,33(10):1651-1655.
[6] 贺伟强,向天勇,陶昆,等. 响应面法优化超声波辅助提取桑叶总黄酮的工艺研究[J]. 中国农学通报,2012,28(33):296-301.

[7] 边梅娜,李松泽,白红进,等. 响应面法优化赤霞珠葡萄叶总黄酮的提取工艺[J]. 新疆农业科学,2013,50(11):2037-2045.
[8] 邹建国,刘飞,刘燕燕,等. 响应面法优化微波辅助提取枳壳中总黄酮工艺[J]. 食品科学,2012,33(2):24-28.
[9] 栾云峰,王菲,刘长江,等. 软枣猕猴桃总黄酮含量测定的方法研究[J]. 食品科学,2011,32(4):155-158.
[10] 段志涛,高英,霍文杰,等. 桑白皮中总黄酮含量测定方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(7):133-135.
[11] 俞燕,厉飞,张副兴,等. 山核桃叶中总黄酮含量测定[J]. 中华中医药学刊,2012,30(7):1622-1625.
[12] 王占一,戴博,王玉海,等. 石榴皮总多酚脂质体制备工艺参数的统计学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):33-37.
[13] 陈先晖,袁博,鞠秀云,等. 响应曲面法优化超声波提取红缘拟层孔菌总三萜工艺[J]. 食品科学,2010,31(20):6-10.
[14] 卢圣楼,刘红,臧文霞,等. 响应面法优化神秘果叶总三萜的超声波提取工艺[J]. 林产化学与工业,2013,33(6):95-100.
[15] 王占一,金美花,王玉海,等. Plackett-Burman 和 Central Composite design 试验设计法优化石榴皮中熊果酸的 SFE-CO₂ 萃取工艺[J]. 中药材,2015,38(3):610-614.
[16] 黎云龙,于震宇,郜海燕,等. 骏枣多糖提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品科学,2015,36(4):45-49.
[17] 薛治浦,李欣,朱文学. 响应面法优化丹参叶总酚酸超声波辅助提取工艺[J]. 食品科学,2011,32(12):34-38.

[责任编辑 刘德文]