

# 番石榴叶中黄酮类物质提取及其抗氧化性研究

林燕如<sup>1</sup>, 丁利君<sup>2</sup>

(1. 韩山师范学院化学系, 广东 潮州 521041) (2. 广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006)

**摘要:** 研究了番石榴叶中黄酮类物质的提取工艺, 并用正交实验确定了最佳的提取条件。实验结果表明: 番石榴叶中总黄酮类物质的最佳提取条件为原材料经过微波处理 3 min, 再用 40% 的乙醇回流 3 h, 此条件下黄酮得率为 9.91%。抗氧化实验表明, 番石榴叶黄酮提取物能有效抑制猪油的氧化, 对羟自由基和超氧自由基有良好的清除作用。

**关键词:** 番石榴叶; 黄酮; 抗氧化作用

**中图分类号:** S567.1<sup>+</sup>9; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)10-0058-04

## Extraction of Flavonoid from the Leaves of Guava and its Antioxidation Activity

LIN Yan-ru<sup>1</sup>, DING Li-jun<sup>2</sup>

(1. Department of Chemistry, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China)

(2. School of Light Industry & Chemical Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** The extraction conditions of the flavonoid from the leaves of guava was studied and optimized through the orthogonal experiment. The results showed that the optimal microwave treatment time and dipping time in 40% alcohol were 3 min and 3 h, respectively. Under the optimized conditions, the total flavonoids content, which was measured by spectrophotometric method with rutin as the standard sample, reached 9.91%. The extracts could efficiently decrease the POV value of the lard and scavenge the radicals of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and ·OH.

**Key words:** leaves of guava; flavonoid; antioxidative activity

番石榴 (*Psidium guajava* Linn) 属于桃金娘科, 原产于美洲, 现在广东省各地都有栽培, 其果实味道鲜美, 营养丰富。番石榴叶中含有丰富的黄酮类物质, 具有很好的药用和保健作用。根据有关医学书籍<sup>[1]</sup>记载, 番石榴的鲜叶和干叶, 也可以药用, 具有收敛止泻, 消炎止血, 治急性胃肠炎的作用。

本文对番石榴叶中黄酮类物质的提取以及其抗氧化性进行了研究, 给番石榴叶的保健功能和开发利用提供科学的理论基础。

## 1 实验材料及仪器

### 1.1 实验材料

番石榴叶: 采于潮州市郊某果园, 品种是珍珠番石榴。将叶洗净、烘干、粉碎, 备用。

猪油: 市售板油洗净后文火中熬炼而成, 装入容器中低温保存。芦丁: 生化试剂, 上海试剂二厂。

试剂: 亚硝酸钠, 硝酸铝, 氢氧化钠, 95%乙醇,

收稿日期: 2007-05-28

作者简介: 林燕如(1982-), 女, 助理实验师, 研究方向: 食品分析方面的研究

三氯甲烷, 冰乙酸, 碘化钾, 硫代硫酸钠, 二丁基羟基甲苯(BHT), 邻苯三酚, pH=8.34的磷酸缓冲溶液PBS(简称, 由KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>配制), 过氧化氢, 硫酸亚铁, 水杨酸, 均为分析纯。

### 1.2 实验仪器

Uv-9200型紫外可见分光光度计, 微波炉, FA2004电子分析天平, 电热恒温干燥箱, 回流装置, 恒温水浴装置等。

## 2 实验方法

### 2.1 番石榴叶中黄酮类物质的提取方法<sup>[2]</sup>

#### 2.1.1 温水浸提法提取工艺

番石榴叶→干燥→粉碎→称重→温水浸泡→抽滤→离心→定容→测吸光度

取约 5 g 番石榴叶的干粉, 分别在 50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 和 90 °C 温度下分两次进行恒温水浴, 蒸馏水浸泡。第 1 次用 10 倍水浸泡 1 h, 第 2 次用 8 倍的水浸泡 0.5 h, 合并两次滤液并浓缩, 于 100 mL 的容量瓶中定容。

#### 2.1.2 微波提取工艺

番石榴叶→干燥→粉碎→称重→加入适量的蒸馏水→微波处理→加入 95%的乙醇配制成所需的浓度→回流→抽滤→离心→定容→测吸光度

取约 5 g 番石榴叶的干粉于容器中, 加适量的水, 盖上保鲜膜, 在 800 W 的微波炉用火力为 20% 下处理 5 min, 加入乙醇, 分别使乙醇的浓度为 40%、60%、70%、80%、95%, 料液比为 1:18, 回流 1 h, 冷却后抽滤, 离心, 于 100 mL 容量瓶中定容。

## 2.2 正交试验方案设计

微波回流提取番石榴叶中的黄酮类物质的影响因素较多, 为了综合考虑各种影响因素的主次顺序, 在经过对各个因素的粗测后, 确定了对测量结果影响最大的三个因素: 微波时间, 乙醇浓度以及回流时间。所以各取约 5 g 的番石榴叶的干料进行微波时间、乙醇浓度、回流时间的三因素三水平的正交试验(表 4)。

## 2.3 总黄酮含量的测定

### 2.3.1 工作曲线回归方程的建立<sup>[8]</sup>

配置一系列不同浓度的芦丁标准溶液于波长  $\lambda=500$  nm 处测定吸光度。以吸光度 A 为纵坐标, 黄酮浓度 C 为横坐标, 绘制标准曲线。用最小二乘法进行线性拟合, 得出黄酮浓度 C 与吸光度 A 的线性回归方程:  $C=0.2071A+0.002706$ , 相关系数  $R=0.9978$ 。

### 2.3.2 样品中总黄酮含量测定的方法

取以上定容后的番石榴叶黄酮提取液 1 mL 于 50 mL 容量瓶, 加入 24 mL 30% 的乙醇, 加入 1.4 mL 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液, 摇匀, 放置 5 min 后加入 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  1.4 mL, 摇匀, 放置 6 min 后再加入 5 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液, 混匀, 用 30% 乙醇稀释到刻度, 放置 10 min 后于波长 500 nm 处测定吸光度值, 以芦丁标准液作对照定量检测各提取方法所得的黄酮含量。

总黄酮含量/%= $C \times 50 \times 100 \times 100 / (5 \times 1000)$

其中: C 是根据测定的 A 从 A-C 曲线上查得的对应浓度。

## 2.4 抗氧化性实验

### 2.4.1 提取液对猪油的抗氧化作用<sup>[9-10]</sup>

往 30.0 g 温热猪油中分别加入 0.20%、0.40% 粗黄酮提取物和 0.02% BHT, 搅匀, 以猪油空白为对照样, 在  $(60 \pm 1)$  °C 烘箱中强化保存, 定时搅拌, 于一定时间后取样测定猪油中的过氧化值 (POV 值), 并以此来衡量番石榴叶黄酮类化合物的抗氧化活性。

过氧化值的测定按 GB5009.37-1985 方法进行。精密称取 2~3 g 猪油样品, 置于 250 mL 碘量瓶中, 加入 30 mL 三氯甲烷-冰乙酸混合液, 使样品完全溶解。加入 1.00 mL 饱和 KI 溶液, 紧密塞好瓶盖, 并轻轻摇匀 0.5 min, 然后放在暗处 3 min, 取出加 100 mL 水, 摇

匀。立即用 0.002 mol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  标准溶液滴定, 至淡黄色时, 加 1 mL 淀粉指示剂, 继续滴定至蓝色消失为终点, 取相同量三氯甲烷-冰乙酸混合液、KI 溶液、水, 按同一方法, 作试剂空白试验。

样品的过氧化值 (POV) 为:

$$\text{POV} = \frac{(V_1 - V_2) \times M}{m} \times 1000$$

式中: POV - 样品的过氧化值, mmol/kg;  $V_1$  - 试样消耗  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  标准溶液体积, mL;  $V_2$  - 空白试验消耗  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  标准溶液体积, mL; M -  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  标准溶液的摩尔浓度, mol/L; m - 样品质量, g。

### 2.4.2 提取液对自由基的清除作用<sup>[11-12]</sup>

#### 2.4.2.1 对超氧自由基 $\text{O}_2^-$ 的清除率的测定

利用  $\text{O}_2^-$  清除剂能使邻苯三酚自氧化产物在  $\lambda=322$  nm 处的吸收峰受到抑制这一特点, 进行光化学方法监测, 间接测得提取液对  $\text{O}_2^-$  的清除率。

取 0.1~0.5 mL 的黄酮提取液, 5 mL pH 8.34 的 PBS 50 mmol/L, 25 °C 水浴中保温 20 min, 加入 0.3 mL 邻苯三酚 0.2 mmol/L, 加水到 10 mL, 测定反应启动后第 20 s 时的  $A_{322}$  值(用同浓度同一黄酮提取液作为参比, 以消除试样本身在 322 nm 处的吸收)。另取试剂同上, 不加黄酮提取液以作对照, 测反应启动后第 20 s 时的  $A_{322}$  值(用 pH=8.34 的 PBS 作为参比)。

$\text{O}_2^-$  清除率/%= $(A_x - A_0) \div A_x \times 100 \%$

式中  $A_x$  为反应体系原来的吸光度,  $A_0$  为加入提取液后的吸光度。

#### 2.4.2.2 羟自由基 $\cdot\text{OH}$ 的生成及清除率的测定

参照 Fenton 反应的方法建立反应体系模型, 利用  $\text{H}_2\text{O}_2$  与二价铁离子混合后产生  $\cdot\text{OH}$ , 但  $\cdot\text{OH}$  具有很强的反应活性, 存活时间短, 若在反应体系中加入水杨酸, 能有效地捕捉  $\cdot\text{OH}$  并产生有色产物。该产物在 510 nm 处有强吸收, 若加入具有清除  $\cdot\text{OH}$  功能的被测物, 便会与水杨酸竞争  $\cdot\text{OH}$ , 从而使有色产物的生成量减少, 采用固定反应时间法, 在 510 nm 处测量含被测物反应液的吸光度, 并与空白液比较, 便能测定被测物对  $\cdot\text{OH}$  的清除作用。

$\cdot\text{OH}$  清除率/%= $(A_x - A_0) \div A_x \times 100 \%$

式中:  $A_x$  为反应体系原来的吸光度,  $A_0$  为加入提取液后的吸光度。

取 2 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  1 mL 于 10 mL 试管中, 加入 6 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mL, 摇匀, 再加入 6 mmol/L 水杨酸 1 mL, 摇匀, 于 37 °C 水浴中恒温 15 min 后, 测定其吸光度  $A_x$ 。测定后将一定浓度的黄酮提取液 0.1~1 mL 加入试管中, 加水至 10 mL, 摇匀, 放置 10

min, 再测定其吸光度  $A_0$ , 使用公式进行计算即可得清除率。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 不同水浴温度对温浸法提取效果的影响

表1 温度对黄酮提取效果的影响

Table 1 The influence of temperature to flavonoid extracting

温度/℃	50	60	70	80	90
吸光度	0.163	0.233	0.277	0.312	0.245
黄酮含量%	3.38	5.10	6.01	6.73	5.35

表1 结果表明: 在一定温度范围内, 随着水浴温度的升高, 提取液中的总黄酮类物质含量也增加, 80 ℃时效果最好, 主要是由于黄酮类物质易溶于水。但 90 ℃时含量反而降低, 可能是因为温度太高, 把一些黄酮类物质破坏了。

#### 3.2 乙醇浓度对提取效果的影响

表2 乙醇浓度对提取效果的影响

Table 2 The influence of alcohol density

乙醇浓度/%	40	60	70	80	95
吸光度	0.283	0.305	0.372	0.361	0.310
黄酮含量%	6.13	6.59	7.97	7.75	6.69

表2 结果表明, 乙醇含量为 70%时黄酮类物质的提取效果最好(料液比为 1:18, 回流时间为 1 h)。

#### 3.3 不同回流提取时间对提取效果的影响

表3 不同回流提取时间对提取效果的影响

Table 3 The influence of backwating time to flavonoid extracting

回流时间/h	1	2	3	4	5
吸光度	0.287	0.310	0.304	0.279	0.265
黄酮含量%	6.21	6.69	6.57	6.05	5.76

表3 结果表明, 物料回流 2 h 的提取效果最好(料液比为 1:18, 乙醇浓度为 40%)。往后随着时间增加, 吸光度反而降低, 这可能是回流时间太长, 有部分乙醇被挥发, 而导致沸点逐渐增大, 从而破坏某些黄酮类化合物。

#### 3.4 微波法 $L_9(3^3)$ 正交试验结果及分析

由表4 可知, 对番石榴叶进行三因素三水平微波提取时, 提取黄酮的最佳条件是:  $A_1B_1C_3$ , 即用原材料经过微波处理 3 min, 再用浓度为 40%的乙醇回流 3 h。此条件下提取液黄酮物质含量为 9.91%。

表4 正交试验结果

Table 4 The results of experiment

实验序号	A(乙醇浓度 /%)	B(微波时间 /min)	C(回流时间 /h)	吸光度	黄酮含量 /%
1	40(1)	3(1)	3(3)	0.465	9.91
2	60(2)	3(1)	1(1)	0.364	7.81
3	80(3)	3(1)	2(2)	0.402	8.60
4	40(1)	5(2)	2(2)	0.285	6.17
5	60(2)	5(2)	3(3)	0.39	8.34
6	80(3)	5(2)	1(1)	0.381	8.16
7	40(1)	7(3)	1(1)	0.355	7.62
8	60(2)	7(3)	2(2)	0.288	6.24
9	80(3)	7(3)	3(3)	0.368	7.90
$k_1$	10.02	8.77	7.86		
$k_2$	7.46	7.56	7.00		
$k_3$	8.22	7.25	8.72		
R	1.8	1.52	1.74		A>C>B

#### 3.5 番石榴叶黄酮提取物对猪油的抗氧化作用

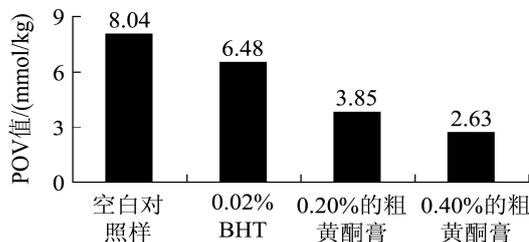


图1 烘箱强制氧化 72 h 后猪油的 POV 值

由图1 可知, 番石榴叶黄酮提取物对猪油具有明显的抗氧化作用。

#### 3.6 番石榴叶黄酮提取液对自由基 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 的清除作用

用不同浓度的番石榴叶黄酮提取液对自由基  $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$  进行清除。结果见图 2~3。

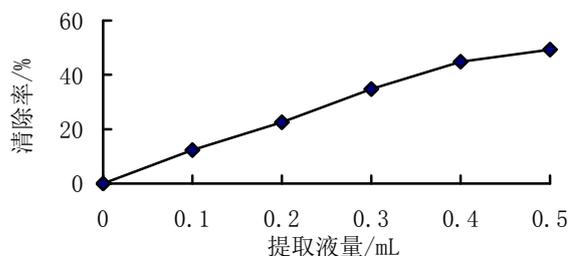


图2 黄酮提取液对超氧自由基清除作用

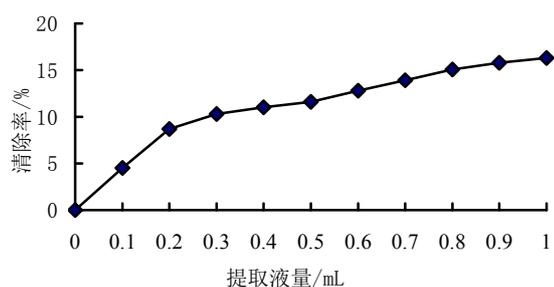


图3 黄酮提取液对羟自由基的清除作用

由图2、图3可知,当加入黄酮提取液后,吸光度  $A_{322}$  值有显著变化,即番石榴叶黄酮提取液对  $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$  有明显的清除作用,且清除效果随着黄酮提取液浓度的增加而显著增大。

## 4 结论

4.1 经微波处理后再回流的方法从番石榴叶中提取黄酮类化合物的最佳工艺条件为用原材料经过微波处理 3 min,再用浓度为 40%的乙醇回流 3 h,此时提取到的黄酮类物质最多,含量为 9.91%。

4.2 番石榴叶黄酮提取液能明显降低猪油的过氧化值。

4.3 番石榴叶黄酮提取液对超氧自由基、羟自由基有明显的清除作用。

番石榴叶中黄酮类物质用微波法提取,工艺简单,提取时间短,条件容易控制,提取率高,提取剂乙醇易除净,所以可将此工艺应用于工业化生产,所生产的提取液可浓缩成膏状物、粉状物,所制取的番石榴叶黄酮粗粉中黄酮含量可达 46.3%。此黄酮粗粉可直

接将其添加到保健饮料、糖果、饼干或口服液中,可成为保健食品和功能食品的原料,应用前景良好。

## 参考文献

- [1] 吴修仁.广东药用植物简编[M].广东高等教育出版社,1989
- [2] 胡敏,甘璐,姜发堂,等.银杏叶中黄酮类化合物最佳提取工艺研究[J].食品工业科技,1997(5):49-51
- [3] 丁利君,冼建毅.黄芪中黄酮类化合物提取及其对羟自由基清除作用[J].食品与机械,2002(3):20-21
- [4] 房方,张广强,谢新年.用分光光度法进行黄酮类化合物含量测定的研究[J].河南中医药学刊,1997,12(2):17-19
- [5] 李石生,刘欣.鄂西产三种野生葛总黄酮含量的紫外分光光度法测定[J].植物资源与环境,1997,6(3):61-63
- [6] 徐雅琴,李淑芹,付红.黄树莓叶片中黄酮类物质的提取及抗氧化性[J].化学研究与应用,2002,14(6):39-41
- [7] 盛清,任玉翠,周彦钢.鱼腥草制剂中总黄酮含量的测定[J].食品工业科技.1999,20(1):63-65
- [8] 丁利君,吴振辉,蔡创海.槐花中黄酮类物质提取工艺的研究[J].农业工程学报,2002,8(1):85-88
- [9] 杨继生,倪永全.降低油脂中过氧化值方法的研究[J].化学世界,2000,10:526
- [10] 石锦芹,黄绍华,谌乐礼等.柿叶乙醇提取物在猪油中的抗氧化性研究[J].食品工业科技,1999,20(5):22-23
- [11] 曾小玲,马齿苋水提物对氧自由基清除作用的研究[J].湖南医科大学学报.1999,24(2):133-135
- [12] 李贵荣,杨胜圆.党参多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J].化学世界.2001(8):421-422

(上接第 52 页)

- [6] Manat Chaijan, Soottawat Benjaku, Wonnop Visessanguan, Cameron Faustman. Characteristics and gel properties of muscles from sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) caught in Thailand[J]. Food Research International, 37(2004):1021-1030
- [7] H.H.CHEN. Decoloration and Gel-forming Ability of Horse Mackerel Mince by Air-flotation Washing[J]. Food Engineering and Physical Properties, 2002, 67(8):2970-2975
- [8] Ng, C. S. Measurement of free and expressible drips. In H.Hasegawa (Ed.), Laboratory manual on analytical methods and procedure for fish and fish products [C](pp.1-2). Singapore: Southeast Asian Fisheries Development Center, 1978
- [9] Hordur G. Kristinsson, Bergros Ingadottir. Recovery and Properties of Muscle Proteins Extracted from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Light Muscle by pH Shift Processing [J]. Journal of Food Science, 2006, 71(3):132-141
- [10] 赵梅荣,刘良忠.谷氨酰胺转氨酶对草鱼鱼糜品质的影响[J].食品科学,2006,27(12):170-174
- [11] Shimizu Y., Toyohara H. & Lanier, T. C. Surimi production from fatty and dark-fleshed fish species. In T. C. Lanier & C. M. Lee (Eds.), Surimi technology [C] (pp.181-207). New York: Marcel Dekker, 1992