

酸性氧化电解水辅助提取槐米总黄酮工艺

王紫倩, 高胜, 王铭, 衡娅萍, 吴祯祯*, 任占冬, 朱玉婵*

(武汉轻工大学化学与环境工程学院, 湖北武汉 430023)

摘要: 为探究酸性氧化电解水对植物总黄酮提取的预处理作用, 选取槐米为实验材料并采用酸性氧化电解水预处理-乙醇回流两步法进行提取。将单因素实验结果作为依据, 采取 Box-Behnken 法优化槐米总黄酮的提取工艺, 并且通过测定清除 DPPH 自由基和羟基自由基的能力评价其体外抗氧化活性。结果证实, 酸性氧化电解水预处理过程能明显提高总黄酮得率, 这是因为酸性氧化电解水中含有一定量氧化态的氯。当有效氯含量由 13.61 mg/L 提高到 322.22 mg/L 时, 其总黄酮得率由 7.16% 提高到 20.88%。槐米总黄酮的最佳提取工艺为: 酸性氧化电解水有效氯浓度 250 mg/L, 预处理时间 160.53 min, 乙醇体积分数 60.89%, 液料比 36.60:1 mL/g。此工艺下的槐米总黄酮得率达到 19.67%。体外抗氧化活性研究显示槐米总黄酮提取液对 DPPH 自由基和羟基自由基的最高清除率分别可达 96.38% 和 92.30%, 说明其具有较好的抗氧化活性, 可作为一种天然的抗氧化剂。该研究成果首次将酸性氧化电解水运用于植物提取的预处理过程中, 提出酸性氧化电解水预处理-乙醇回流两步法提取工艺, 为得到更高的得率提供实验支撑和理论分析。

关键词: 槐米; 总黄酮; 酸性氧化电解水; 有效氯; 预处理

文章编号: 1673-9078(2022)05-209-217

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.0935

Extraction of Total Flavonoids from *Sophora japonica* L. by Acidic Oxidized Electrolyzed Water

WANG Ziqian, GAO Sheng, WANG Ming, HENG Yaping, WU Zhenzhen*, REN Zhandong, ZHU Yuchan*

(School of Chemical and Environmental Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: In order to explore the pretreatment effect of acidic electrolyzed oxidizing water (AEOW) on the extraction of total flavonoids from plants, *Sophora japonica* was selected as experimental material and extracted by two-step method of AEOW pretreatment and ethanol reflux. Based on the results of single-factor experiment, the Box-Behnken method was used to optimize the extraction process of total flavonoids from *Sophora japonica*. The antioxidant activity *in vitro* was evaluated by measuring the ability of scavenging DPPH and hydroxyl free radicals. The results have confirmed that the pretreatment process of AEOW can obviously improve the yield of total flavonoids, because AEOW contains a certain amount of chlorine in oxidation state. When the available chlorine content (ACC) increased from 13.61 to 322.22 mg/L, the flavonoid yield increased from 7.16% to 20.88%. The optimum extraction process of total flavonoids from *Sophora japonica* was as follows: the ACC of AEOW was 250 mg/L, the pretreatment time was 160.53 min, the volume fraction of ethanol was 60.89%, and the ratio of liquid-to-solid was 36.60:1 mL/g. The yield of total flavonoids from *Sophora japonica* was 19.67%. The antioxidant activities *in vitro* showed that the highest scavenging rates of total flavonoids from *Sophora japonica* on DPPH and hydroxyl free radical can reach 96.38% and 92.30%, respectively, indicating that it has good antioxidant activity and can be used as a natural antioxidant. In this research, AEOW was applied to the pretreatment of plant extraction for the first time, and a two-step extraction process of AEOW pretreatment and ethanol reflux was proposed, which provided experimental support and theoretical analysis for the extraction of total flavonoids from plants.

引文格式:

王紫倩,高胜,王铭,等.酸性氧化电解水辅助提取槐米总黄酮工艺[J].现代食品科技,2022,38(5):209-217

WANG Ziqian, GAO Sheng, WANG Ming, et al. Extraction of total flavonoids from *Sophora japonica* L. by acidic oxidized electrolyzed water [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 209-217

收稿日期: 2021-08-22

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2020CFB777); 武汉轻工大学校立科研项目(2021Y21)

作者简介: 王紫倩(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 资源利用与植物保护, E-mail: sliense960415@163.com

通讯作者: 吴祯祯(1985-), 女, 实验师, 硕士, 研究方向: 资源利用与植物保护, E-mail: 252781541@qq.com; 共同通讯作者: 朱玉婵(1980-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 功能材料及应用, E-mail: 17367890@qq.com

Key words: *Sophora japonica*; flavonoids; acidic electrolyzed oxidizing water; available chlorine; pretreatment

槐米是豆科 (*Leguminosae* sp.) 植物槐 (*Sophora japonica* Linn) 的蓇葖采摘干燥后剔除枝梗及杂质所得的产物。槐米中不仅拥有种类丰富的黄酮类成分, 像芦丁、槐二醇、槲皮素等, 还有少量脂肪酸^[1], 使其在抗菌消炎、清热解毒、加快生命体新陈代谢^[2]等方面具有显著的药理作用。黄酮类化合物对自由基的清除机制与目前最为常见的如 BHA 这类合成抗氧化剂大致相同。主要是利用自由基与氢结合, 生成酚氧自由基。进一步再转变为半醌式自由基^[3,4], 并中断自由基链式反应, 达到抑制脂类氧化的功效。因此可以有效阻止自由基在体内的产生, 减少基体的氧化损伤, 是一种良好的天然非酶类抗氧化活性物质。在医药、食品和护肤品方面具有较好的运用价值^[4]。

目前, 植物中黄酮类物质的提取方法包括碱提酸沉法、乙醇回流法^[5,6]等常用传统的方法。黄酮类化合物在乙醇中具有较好的溶解度, 这使乙醇回流法不仅成本较低, 无环境污染, 操作简便, 且产品安全, 被广泛采用。在此基础上, 为了进一步提高提取效率, 更多的学者选择使用超声辅助, 微波辅助和加压溶剂法^[7,8]等方法进行辅助提取。但这些方法都是基于通过引入特殊仪器(超声、微波和加压)来提高提取效果。本文则从处理溶剂角度上进行考虑, 在常规乙醇回流法过程前面引入酸性氧化电解水(acidic electrolyzed oxidizing water, AEOW)预处理步骤, 希望能通过简单 AEOW 预处理过程起到破坏槐米植物细胞的作用, 从而为后续乙醇回流萃取提供辅助提高作用。因为 AEOW 具备三大特点: 低 pH 值、高氧化还原电位值、拥有一定的有效氯含量(available chlorine content, ACC)^[9,10]。这使其可通过氧化作用破坏生物细胞表面结构, 增加膜通透性^[11-13], 增加物质溶出效果。本文包括单因素实验和响应面法优化实验, 确定了提取槐米总黄酮的最佳工艺。同时通过测定清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine,

DPPH) 自由基和羟基自由基的效果, 评估槐米黄酮的抗氧化能力。综上所述, 本文旨在探究 AEOW 对槐米的预处理辅助提取作用, 考察其对总黄酮提取的增效作用, 为植物总黄酮提取方法提供一个新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

槐米, 本实验采购于武汉市药店。1,1-二苯-2-苦肼基(DPPH), 分析纯, Macklin; 芦丁(95%), 国药试剂; 乙醇、氯化钠、重铬酸钾、硫代硫酸钠、可溶性淀粉、硫酸、铬酸钾、氯化钾、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠、水杨酸、硫酸亚铁的纯度均为分析纯, 国药试剂。

1.2 仪器与设备

PS-3005D 直流稳压电源, 深圳兆信电子仪器设备厂; HJ-1 型磁力搅拌器, 荣华仪器制造有限公司; DF-101s(加深)集热式磁力搅拌器; SHZ-D 型真空泵, 上海力辰科技有限公司; BS210S 型电子天平, 德国赛多利斯集团; DHG-9147A 型恒温干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; 721 型可见分光光度计, 上海菁华仪器有限公司; RE-52C 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; FW100 型植物粉碎机, 郑州科丰仪器设备有限公司。

1.3 实验方法

整个实验流程如图 1 所示, 首先在自制电解槽中制备所需的酸性氧化电解水, 其次利用酸性氧化电解水对槐米进行预处理, 然后采用乙醇回流法提取黄酮类物质, 最后通过分光光度法测试其体外抗氧化活性。

1.3.1 酸性氧化电解水的制备与测定

1.3.1.1 酸性氧化电解水的制备

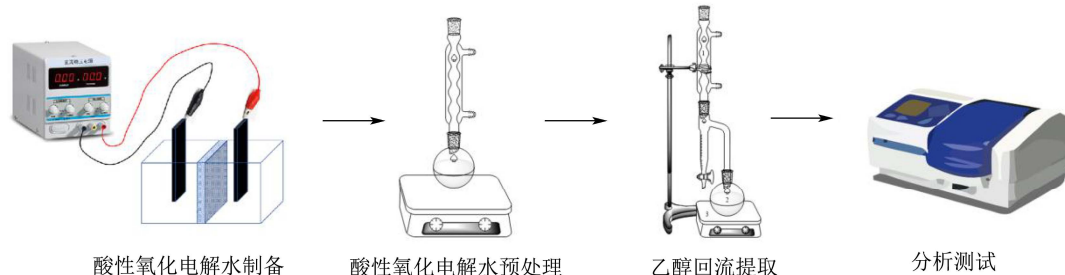


图 1 实验流程示意图

Fig.1 Schematic diagram of experiment procedure

参考文献^[13]的方法,在图1所示的自制电解槽中,用均相阳离子交换膜将电解槽分隔为阴极区和阳极区。阴阳极分别是纯钛板和自制钉铈氧化物电极。电解过程中,以0.1%~0.2%的NaCl溶液(400 mL)为电解质,电极间距2 cm,电极有效面积3.50 cm²,电流密度为60~70 mA/cm²,电解电压为20 V。当电解时间分别为10、30、60、75和90 min时,制得的电解水有效氯含量分别是13.61、52.94、114.33、166.10、205.47 mg/L。利用酸度计测定其pH=2.00±0.10,氧化电位值为1100±50 mV。

1.3.1.2 有效氯含量的测定

采用碘量法进行测定。先对阴凉避光静置两周后的Na₂S₂O₃溶液标定。取制得的酸性氧化电解水25 mL,加入KI固体0.50 g后移取2 mol/L的H₂SO₄溶液10 mL于碘量瓶中,暗处反应10 min。稀释标定后的Na₂S₂O₃溶液,用其滴定至溶液为浅黄色时加入1 mL的1%淀粉溶液,继续滴定至蓝色刚好消失,滴定终点以半分钟内颜色不变为指标。记录所用Na₂S₂O₃溶液体积V。有效氯含量计算公式:

$$w(\text{Cl}_2) = \frac{c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times \frac{M(\text{Cl}_2)}{2}}{V_{\text{电解水}}} \times 1000(\text{mg/L})$$

1.3.2 槐米总黄酮的提取

将实验所购买的槐米用去离子水冲洗洗净,放入60℃的恒温干燥箱中干燥。用植物粉碎机进行粉碎并用50目筛过滤,获得试验所需槐米粉末。称取2 g,在一定的有效氯浓度和预处理时间条件下进行浸泡预处理,随后改变乙醇体积分数和液料比进行回流提取。回流2 h后将所得的提取液抽滤离心,并取定量上层清液,用60%的乙醇定容至100 mL,贮存备用。

1.3.3 总黄酮的测定

1.3.3.1 总黄酮标准曲线的制定

用分析天平精准称取10.0 mg的芦丁黄酮标准品,溶于95%乙醇中,制备1 g/L的芦丁标准储备液。分别取0、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50和0.60 mL芦丁标准储备液,分别注入7个10 mL容量瓶中,依次标号0、1、2、3、4、5和6。加入5% NaNO₂溶液1 mL,摇匀,放置6 min;加入10% Al(NO₃)₃溶液1 mL,摇匀,放置6 min;随后加入4% NaOH溶液5 mL,95%乙醇定容。放置15 min后,以0号容量瓶为参比对照,吸光度测于510 nm处。然后样品测定吸光度3~5次取其平均值。数据结果以芦丁的浓度为横坐标,测定的吸光度为纵坐标,可以求得标准曲线的线性回归方程Y=0.0101X+0.0069, R²=0.9996。

1.3.3.2 槐米总黄酮的测定

参照米智等^[14]的方法。移取存贮液0.30 mL于50 mL容量瓶,纯水定容。根据“1.3.2.1”中所述操作。用标准曲线计算得出黄酮质量浓度和得率。

黄酮得率的计算公式:

$$\gamma = \frac{c \times 10^{-3} \times k \times v}{m}$$

式中:

γ ——得率, mg/g;

c ——计算出的黄酮质量浓度, mg/mL;

k ——黄酮类物质提取液的稀释倍数;

v ——总黄酮提取液的体积, mL;

m ——样品总质量, g。

1.3.4 单因素试验设计

在确定提取温度70℃,提取时间120 min的条件下,分别设置不同单因素实验水平:有效氯浓度13.61、52.94、114.33、166.10、205.47和322.22 mg/L;预处理时间0、2、4、6和8 h;乙醇体积分数50%、60%、70%、80%和90%;液料比10:1、20:1、30:1、40:1和50:1 mL/g。探究其对总黄酮得率的影响,依据结果,确定最终响应面实验因素的具体水平。

1.3.5 响应面试验设计

依据单因素试验结果,将总黄酮得率作为实验响应值。利用软件Design-Expert,设定有效氯含量(A)、预处理时间(B)、乙醇体积分数(C)和液料比(D)为自变量的4因素3水平的响应面分析实验。实验共29个试验点(含5个重复试验为零点)。试验因素与水平设计见表1。

表1 响应面分析试验因素与水平

Table 1 Factors and levels used in response surface analysis

水平	有效氯含量(A)/(mg/L)	预处理时间(B)/min	乙醇体积分数(C)/%	液料比(D)/(mL/g)
-1	150	30	60	20:1
0	200	120	70	30:1
1	250	210	80	40:1

1.3.6 槐米黄酮体外抗氧化活性试验

1.3.6.1 DPPH自由基的清除能力测定

参考文献^[15]的方法并加以修改。取最佳条件下获得的黄酮提取液,用60%乙醇定容成100 mL,然后从中分别移取0.00、2.00、4.00、6.00、8.00和10.00 mL液体到比色管中,分别用去离子水稀释成10.00 mL。然后分别取4.00 mL样品稀释液和4.00 mL DPPH溶液(0.2 mmol/L)于比色管中,室温避光反应15 min,520 nm下测定吸光度值。

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_1 - A_x}{A_0}) \times 100\%$$

式中:

A_1 —样品吸光度;

A_x —乙醇代替 DPPH 溶液吸光度;

A_0 —空白对照 (纯水替代样品)。

1.3.6.2 羟基自由基的清除能力测定

参考文献^[16]的方法并加以修改。配制不同浓度的提取液,依次加入 FeSO_4 溶液 (10.0 mmol/L)、 H_2O_2 溶液 (8.8 mmol/L)、样品溶液和水杨酸溶液 (10.0 mmol/L) 各 1.00 mL,用去离子水定容至 10 mL。37 °C 水浴反应 15 min 后,510 nm 处测定吸光度。

$$\text{羟基自由基清除率} / \% = (1 - \frac{A_1 - A_x}{A_0}) \times 100\%$$

式中:

A_1 —样品吸光度;

A_x —去离子水代替 H_2O_2 溶液吸光度;

A_0 —空白对照 (纯水替代样品)。

1.4 数据处理

多次平行实验,采用 Origin 2017 和 Design-Expert V8.0.6.1 软件对试验进行数据处理分析与因素相互关系的作图。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

2.1.1 有效氯浓度

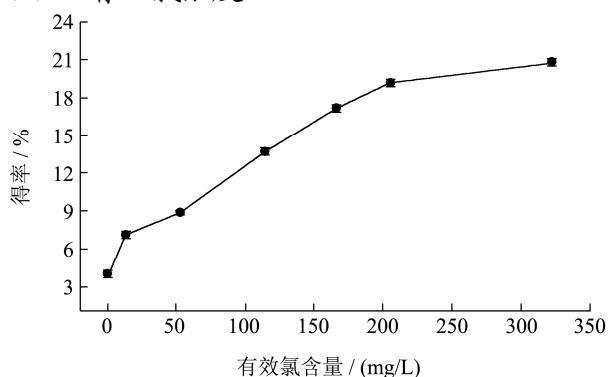


图2 酸性氧化电解水中有效氯含量对总黄酮得率的影响
Fig.2 Effect of ACC on the extraction yield of total flavonoids in AEW

由图 2 可知,经酸性氧化电解水处理 2 h 后,槐米总黄酮得率最高为 20.88%,其比纯水对照组(得率 4.01%)得到了明显的提高。以此数据为进一步探究基础,评估槐米黄酮得率受不同有效氯浓度的酸性氧化电解水的影响。当有效氯含量分别为 13.61、52.94、114.33、166.10、205.47 和 322.22 mg/L 时,其黄酮得率分别为 7.16%、8.92%、13.79%、17.20%、19.40%

和 20.88%。由数据可知,电解水中有效氯含量与总黄酮的得率成正相关关系。当有效氯从 52.94 mg/L 上升到 205.47 mg/L 时,总黄酮得率从 8.92% 增加到 19.40%,其增长率是 117.49%;而当有效氯浓度从 205.47 mg/L 增加到 322.22 mg/L 时,其增长率仅为 7.63%,即黄酮得率不再有明显的提高。这可能因为较高浓度的电解水具有一定的抑制性,同时会在一定程度上氧化破坏黄酮的结构^[13,17],致使得率不再增加。

2.1.2 预处理时间

由图 3 可知,槐米经酸性氧化电解水浸泡预处理后,其总黄酮得率随时间增长呈现出先升后降的走向,并在 2 h 时达到最大值。如图 2 所示,当预处理时间从 0 h 增加到 2 h 时,槐米总黄酮得率从 10.87% 增加到最大值 19.04%;但得率在预处理时间超过 2 h 后就开始下降。得率升高的原因是随着预处理时间的增加,酸性氧化电解水会加速生物细胞内物质的溶出,增大细胞膜的通透性^[18,19],有益加快黄酮类物质溶出效果,进而提高得率。但浸泡时间过长时,会损坏黄酮类物质的部分结构,致使得率降低。因此,将预处理时间定在 2 h 比较合适。

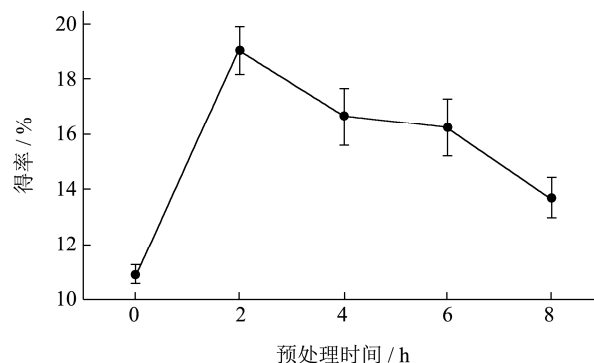


图3 预处理时间对总黄酮得率的影响
Fig.3 Effect of pretreatment time on the extraction yield of total flavonoids

2.1.3 乙醇体积分数

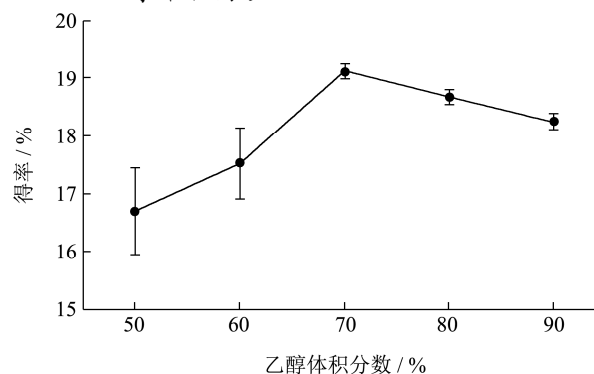


图4 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响
Fig.4 Effect of ethanol volume fraction on the extraction yield of total flavonoids

表 2 响应面试验设计及结果分析

Table 2 Design and analysis results of response surface experiments

试验号	A	B	C	D	Y 得率/%	试验号	A	B	C	D	Y 得率/%
1	-1	-1	0	0	17.07±0.04	16	0	1	1	0	17.89±0.10
2	1	-1	0	0	16.95±0.10	17	-1	0	-1	0	15.52±0.24
3	-1	1	0	0	16.76±0.07	18	1	0	-1	0	19.18±0.04
4	1	1	0	0	18.77±0.10	19	-1	0	1	0	17.89±0.27
5	0	0	-1	-1	16.42±0.07	20	1	0	1	0	16.34±0.13
6	0	0	1	-1	17.17±0.27	21	0	-1	0	-1	16.56±0.17
7	0	0	-1	1	17.58±0.13	22	0	1	0	-1	16.84±0.18
8	0	0	1	1	17.25±0.07	23	0	-1	0	1	16.15±0.08
9	-1	0	0	-1	17.14±0.08	24	0	1	0	1	17.75±0.12
10	1	0	0	-1	16.62±0.04	25	0	0	0	0	18.71±0.10
11	-1	0	0	1	15.46±0.10	26	0	0	0	0	19.04±0.14
12	1	0	0	1	18.74±0.12	27	0	0	0	0	18.82±0.12
13	0	-1	-1	0	17.72±0.17	28	0	0	0	0	18.93±0.27
14	0	1	-1	0	18.30±0.16	29	0	0	0	0	19.26±0.34
15	0	-1	1	0	15.57±0.14						

如图 4 所示,当乙醇体积分数不超过 70%时,得率处于一直增加的趋势,并在 70%时达到最大值。黄酮类物质是含有羟基的有机大分子,极性与乙醇较为接近^[20,21],同时乙醇会增加植物细胞的组织渗透性,使细胞中的黄酮类物质充分溶解在溶液中,增加了其溶解性,进而使得率提升。然而乙醇体积分数过高时,不仅会使黄酮成分溶解,还促进了与乙醇分子结合的色素、醇溶性杂质等成分的溶出,与黄酮物质形成竞争关系,使得率降低。因此后期呈现明显下降现象。

2.1.4 液料比

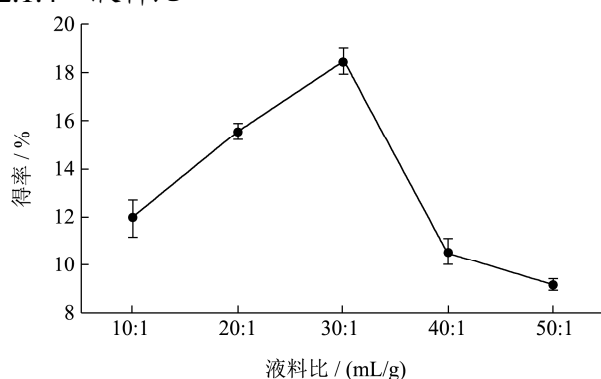


图 5 液料比对总黄酮得率的影响

Fig.5 Influence of solid-liquid ratio on the extraction yield of total flavonoids

如图 5 所示,当液料比 10:1 mL/g 变化到 30:1 mL/g 时,得率逐渐增大,且在液料比为 30:1 mL/g 时达到最大值 18.44%。持续增大配比中的溶剂量,得率反而下降。出现这种现象是因为随着提取溶剂量的逐渐增大,槐米细胞与溶剂中的黄酮浓度差也会随之增大,

同时增加了传质推动力^[22],所以溶出的总黄酮类含量就会增加。但是当液料比达到 30:1 mL/g 后,槐米中大部分黄酮都已经被提取溶出进入溶剂之中,基本达到饱和状态,溶剂量的继续增加,使原本溶解到溶液中的黄酮质量浓度被稀释^[21-23],得率下降。

2.2 响应面实验结果与分析

2.2.1 回归方程的建立

根据表 2 设计的因素和水平,以槐米总黄酮得率(Y)为响应值,自变量选择有效氯含量(A)、预处理时间(B)、乙醇体积分数(C)、液料比(D),采用 BBD 实验设计法进行响应面设计。实验结果如表 2 所示。对黄酮得率与有效氯浓度、预处理时间、乙醇体积分数和液料比之间的作用关系进行回归分析。得到回归方程: $Y=18.95+0.56A+0.50B-0.19C+0.18D+0.53AB-1.30AC+0.95AD+0.50BC+0.33BD-0.27CD-0.81A^2-0.86B^2-0.80C^2-1.16D^2$,其中 Y 为黄酮得率的预测值。

2.2.2 回归方程的验证

如表 3 所示,对上述回归方程进行了方差分析校验。由图可知,模型的 $p<0.0001$,并且决定系数 $R^2=0.9543$, $R^2_{adj}=0.9086$,说明该模型极显著。同时,失拟项不显著 ($p=0.1266>0.05$),在统计学上有意义。该回归模型与实际提取过程具有极高的拟合程度,可用于分析总黄酮得率随因素变化的趋势及产率预测。

四个因素对黄酮得率影响的主次关系可以通过 F 值的大小分别进行判定: A (有效氯含量) > B (预处理

理时间) > C (乙醇体积分数) > D (液料比)。其中因素 A、B, 交互作用项 AB、AC、AD 和二次项 A²、B²、C²、D² 对试验指标有极为显著的影响 (p<0.01), 交互

作用项 BC 对试验有显著的影响 (p<0.05), 其余项对试验指标的影响则不显著。

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值	显著性
模型	35.28	14	2.52	16.48	<0.0001	**
A	3.76	1	3.76	24.61	<0.0001	**
B	3.19	1	3.19	20.88	0.0002	**
C	0.53	1	0.53	3.43	0.0720	
D	0.43	1	0.43	2.83	0.0914	
AB	1.18	1	1.18	7.70	0.0083	**
AC	6.79	1	6.79	44.38	<0.0001	**
AD	3.61	1	3.61	23.61	<0.0001	**
BC	0.76	1	0.76	4.95	0.0118	*
BD	0.44	1	0.44	2.85	0.0781	
CD	0.35	1	0.35	2.28	0.1421	
A ²	4.26	1	4.26	27.84	<0.0001	**
B ²	4.40	1	4.40	28.80	<0.0001	**
C ²	4.01	1	4.01	26.24	<0.0001	**
D ²	9.03	1	9.03	59.08	<0.0001	**
残差	1.69	14	0.12			
失拟项	1.51	10	0.15	3.37	0.1266	
净误差	0.18	4	0.045			
总和	36.90	28				

R²=9543 R²_{adj}=0.9086

注: *表示差异显著, p<0.05; **表示差异极显著, p<0.01。

2.2.3 响应面分析

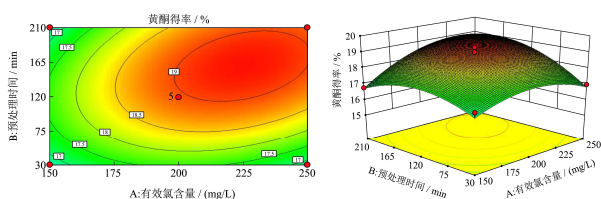


图 6 有效氯含量和预处理时间对总黄酮得率的影响

Fig.6 Effects of available chlorine concentration and pretreatment time on the extraction yield of total flavonoids

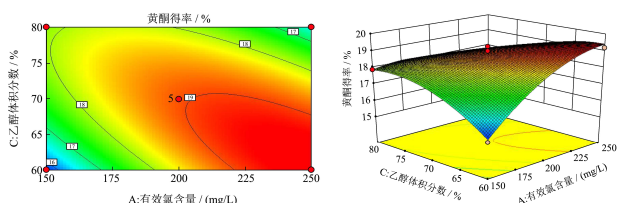


图 7 有效氯含量和乙醇体积分数对总黄酮得率的影响

Fig.7 Effects of available chlorine concentration and ethanol volume fraction on the extraction yield of total flavonoids

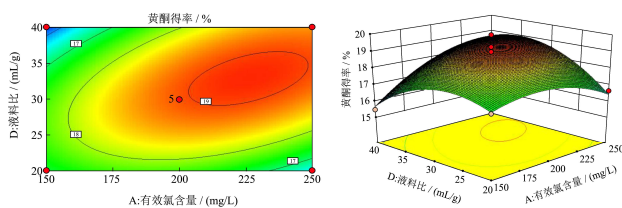


图 8 有效氯含量和液料比对总黄酮得率的影响

Fig.8 Effects of available chlorine concentration and liquid-solid ratio on the extraction yield of total flavonoids

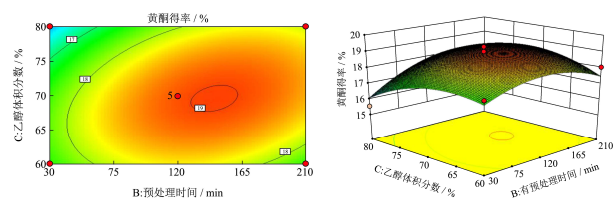


图 9 预处理时间和乙醇体积分数对总黄酮得率的影响

Fig.9 Effects of pretreatment time and volume fraction of ethanol on the extraction yield of total flavonoids

利用 Design-Expert 软件, 针对各因素之间的交互

作用关系进行分析,并作出响应曲面和等高线图。响应曲面中所示的陡峭程度和等高线椭圆率数值大小可以有效的判断出因素之间交互作用关系强弱的程度。曲面越陡峭,等高线椭圆率越大^[22,23],则可证明交互关系越显著。由图 6、图 7 和图 8 可看出,交互作用 AB、AC、AD 的响应曲面陡峭且图中的等高线较为扁平,椭圆率较大,因此证实了以上三种交互作用对总黄酮得率有较为显著的影响。其余图中响应曲面比较平滑,椭圆率较小,说明交互作用 BC、BD、CD 对响应值的影响较小。

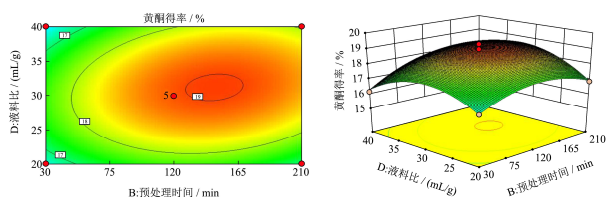


图 10 预处理时间和液料比对总黄酮得率的影响

Fig.10 Effects of pretreatment time and liquid-solid ratio on the extraction yield of total flavonoids

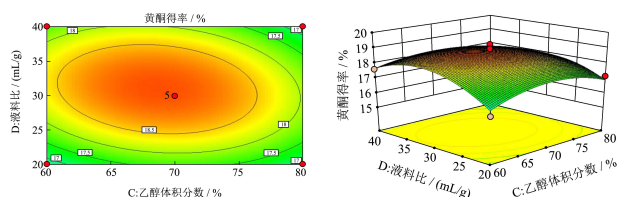


图 11 乙醇体积分数和液料比对总黄酮得率的影响

Fig.11 Effects of ethanol volume fraction and liquid-solid ratio on the extraction yield of total flavonoids

2.2.4 试验结果验证

依据响应面所示模型和结果分析,得到提取槐米总黄酮的最优工艺:有效氯浓度 250.00 mg/L,预处理时间 161.70 min,乙醇体积分数 60.93%,液料比 36.63:1 mL/g,在此条件下槐米总黄酮的得率最高,可达 20.00%。因此最佳工艺调整为:有效氯浓度 250.00 mg/L,预处理时间 162 min,乙醇体积分数 61%,液料比 37:1 mL/g,在此条件下重复进行 3 次试验。结果表明,在最优实验工艺条件下,黄酮平均得率为 19.67%,与估测值相差 0.33%,说明该模型可靠性较高,可以较好模拟槐米总黄酮的提取条件,且预测的黄酮得率准确。

目前,已报道的辅助提取技术有超声波、微波和加压等。其中,张堃等^[24]利用超声波辅助提取槐米黄

酮,得到乙醇浓度 70%,温度 25 °C,超声提取时间 35 min,料液比 1:40 g/mL 的最佳提取条件,此工艺下槐米黄酮得率为 15.47%。初丽媛^[25]采用加压溶剂提取法,得到最优工艺是温度 130 °C,料液比 1:40 g/mL,时间 20 min,乙醇体积分数 50%,压力 0.4 MPa,槐米黄酮得率为 19.40%。肖梦媛等^[6]通过正交实验设计法比较了醇提法、超声波提取和微波提取三种常见提取槐米总黄酮的工艺,其中最佳工艺下得率分别是 10.40%、2.49%和 8.18%。本文采用的酸性氧化电解水预处理-乙醇回流两步提取法,能大幅度地提高总黄酮得率,并优于常见的辅助提取方法。另外,该方法不需要使用超声波、微波等特殊仪器,预处理过程简单,可操作性强,其为植物中总黄酮的提取提供一个新思路。

2.3 槐米总黄酮抗氧化活性测定结果

2.3.1 DPPH 自由基清除能力分析

黄酮类物质可以提供质子与 DPPH 自由基结合而形成一种稳定的抗磁性分子,降低 DPPH 自由基的含量^[26]。由表 4 数据可知,提取液中总黄酮的浓度和对 DPPH 自由基的清除率成正相关关系。在提取液中总黄酮的浓度为 2.36 mg/mL 时,清除率达到最大值 96.38%±0.48%。即使浓度降低到 0.47 mg/mL,相应的清除率仍达到 91.86%±0.32%。Jun X 等^[3]探讨了在 PSE 条件下得到的槐米黄酮类物质对 DPPH 自由基清除效果,证实其浓度与清除率的显著相关性,当提取物浓度由 0.1 mg/mL 上升到 0.9 mg/mL 时,清除率从 29.56%±2.48% 增加到 90.5%±2.92%。与本文结果相近,说明槐米总黄酮在抗氧化方面有一定的应用价值。

2.3.2 羟基自由基清除能力分析

羟基自由基是一种易使蛋白质、脂类等物质发生氧化损伤的活跃自由基^[27]。清除羟基自由基在人体内的产生可以有效的提高机体抗氧化性能。表 4 数据表明,随着提取液中总黄酮浓度的增加,对羟基自由基清除率逐渐升高,呈现不断上升的趋势。当浓度达到 2.36 mg/mL 时,清除率高达 92.30%±0.24%,且当浓度大于 0.40 mg/mL 时,其对羟基自由基的清除率均在 85% 以上。王益莉等^[1]研究发现槐米提取液在 1 mg/mL 的浓度下对羟基自由基的清除率约为 89.00%,这说明槐米总黄酮具有较为良好的抗氧化效果。

表 4 槐米总黄酮的抗氧化性测定

Table 4 Determination of the antioxidant activity of total flavonoids in *Sophora japonica* L

总黄酮浓度/(mg/mL)	0.0	0.47	0.94	1.42	1.89	2.36
DPPH 自由基清除率/%	0	91.86±0.32	92.25±0.55	93.15±0.80	95.48±0.80	96.38±0.48
羟基自由基清除率/%	0	85.24±0.16	87.35±0.15	89.52±0.29	90.61±0.15	92.30±0.24

3 结论

试验采用自制酸性氧化电解水对槐米进行预处理后,采取乙醇回流法提取槐米中的黄酮类化合物,并探究其体外抗氧化活性。依据单因素实验所得出的结果,设计响应面实验,分析得出最佳提取槐米总黄酮的工艺参数:即有效氯浓度 250 mg/L,预处理时间 161.70 min,乙醇体积分数 60.93%,液料比 36.63:1 mL/g,在此工艺下得率为 19.67%,与模型预期值仅差 0.33%,证实了该工艺可行。实验利用酸性氧化电解水(有效氯含量 ACC=205.40 mg/L)对样品进行浸泡预处理,在相同条件下,比实验中对照组提高 4.84 倍,说明预处理效果显著。另外,槐米总黄酮清除 DPPH 自由基和羟基自由基的效果随其浓度的上升而增强。当黄酮浓度达到 2.36 mg/mL 时,清除 DPPH 自由基与羟基自由基效率最高可分别达 96.38% 和 92.30%,这表明槐米黄酮提取液具有良好的抗氧化活性。本研究结果将为植物黄酮类成分提取提供一个较为新颖的思路,为其得率的提高方法提供新依据。

参考文献

- [1] 王益莉,顾飞燕,李晨晨,等.槐米提取液的抗氧化性能及在乳液化妆品中的应用研究[J].日用化学工业,2017,47(3): 159-163
WANG Yili, GU Feiyan, LI Chenchen, et al. Antioxidation activity and application in cosmetics of extract from seed of *Sophora japonica* [J]. China Surfactant Detergent and Cosmetics, 2017, 47(3): 159-163
- [2] Aly S H, Elissawy A M, Eldahshan O A, et al. The pharmacology of the genus *Sophora* (Fabaceae): an updated review [J]. Phytomedicine, 2019, 64: 153070
- [3] Jun X, Yan L. Optimization of pressure-enhanced solid-liquid extraction of flavonoids from *Flos sophorae* and evaluation of their antioxidant activity [J]. Separation and Purification Technology, 2017, 175: 170-176
- [4] Liao J, Qu B, Da L, et al. New method to enhance the extraction yield of rutin from *Sophora japonica* using a novel ultrasonic extraction system by determining optimum ultrasonic frequency [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2015, 27: 110-116
- [5] 贺莹.响应曲面优化微波辅助提取槐花精油的工艺[J].食品工业,2020,41(6):28-31
HE Ying. Optimization of microwave-assisted extraction of essential oil from *Sophora japonica* by response surface [J]. The Food Industry, 2020, 41(6): 28-31
- [6] 肖梦媛,肖莲,文艳霞.正交法比较三种常见的槐米总黄酮提取工艺[J].广州化工,2019,47(9):108-111,123
XIAO Mengyuan, XIAO Lian, WEN Yanxia. Comparison of three common extraction techniques of total flavonoids from *Sophora japonica* by orthogonal method [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2019, 47(9): 108-111, 123
- [7] Gen W, Qi C, Lu J Y, et al. Negative pressure cavitation based ultrasound-assisted extraction of main flavonoids from *Flos Sophorae immaturus* and evaluation of its extraction kinetics [J]. Separation and Purification Technology, 2020, 244: 115805
- [8] 赵之怡,申盼盼,张运龙,等.微酸性氧化电解水对黄豆发芽的影响[J].食品与发酵工业,2020,46(20):135-140
ZHAO Zhiyi, SHEN Panpan, ZHANG Yunlong, et al. Effect of slightly acidic electrolyzed water on soybean germination [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(20): 135-140
- [9] Zheng Y, Shuang S L, Hai L Y, et al. Extraction and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides using electrolyzed oxidizing water [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019, 252(2): 022074
- [10] Ming R, Zhu Y, Deng L, et al. Effect of electrode material and electrolysis process on the preparation of electrolyzed oxidizing water [J]. New Journal of Chemistry, 2018, 42(14): 12143-12151
- [11] Rahman S, Khan I, Oh D. Electrolyzed water as a novel sanitizer in the food industry: current trends and future perspectives [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2016, 15(3): 471-490
- [12] Ren Z, Quan S, Gao J, et al. The electrocatalytic activity of IrO₂-Ta₂O₅ anode materials and electrolyzed oxidizing water preparation and sterilization effect [J]. RSC Advances, 2015, 5(12): 8778-8786
- [13] 王文清,陈红梅,张选明,等.酸性氧化电位水制备和杀菌机理的研究进展[J].现代化工,2008,11:24-28
WANG Wenqing, CHEN Hongmei, ZHANG Xuanming, et al. Progress in preparation and sterilizing mechanism of electrolyzed oxidizing water [J]. Modern Chemical Industry, 2008, 11: 24-28
- [14] 米智,刘荔贞,武晓红.响应面法优化沙棘果粉黄酮提取工艺的研究[J].中国调味品,2020,45(10):148-152
MI Zhi, LIU Lizhen, WU Xiaohong. Optimization of extraction process of flavonoids from *Hippophae rhamnoides* Linn. power by response surface methodology [J]. New Chemical Materials, 2020, 45(10): 148-152
- [15] 汪建红.脐橙皮中黄酮的提取新方法及其抗氧化性[J].内江

- 师范学院学报,2020,35(10):59-65
- WANG Jianhong. A new method of extracting flavonoids from navel orange peel and its antioxidant activity [J]. Journal of Neijiang Normal University, 2020, 35(10): 59-65
- [16] 郑晨曦,郝建雄,宋曙辉,等.微酸性氧化电解水对苦荞芽活性成分及抗氧化能力的影响[J].食品科学,2018,39(4):20-25
- ZHEN Chenxi, HAO Jianxiong, SONG Shuhui, et al. Effect of slightly acidic electrolyzed water on the bioactive compounds and antioxidant activity of Tartary buckwheat sprouts [J]. Food Science, 2018, 39(4): 20-25
- [17] 李楚楚,赵丹丹,韩雪,等.利用酸性氧化电解水提取柿子渣中果胶及其工艺优化[J].食品科技,2019,44(1):274-280
- LI Chuchu, ZHAO Dandan, HAN Xue, et al. Optimization on extraction of pectin from persimmon residue with acidic electrolyzed water [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(1): 274-280
- [18] Guo H, Wan X, Niu F, et al. Evaluation of antiviral effect and toxicity of total flavonoids extracted from *Robinia pseudoacacia cv. idaho* [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 118: 109335
- [19] 唐德智.黄酮类化合物的提取、分离、纯化研究进展[J].海峡药学,2009,21(12):101-104
- TANG Dezhi. Research progress on extraction, separation and purification of flavonoids [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2009, 21(12): 101-104
- [20] 王根.槐米中主要黄酮类成分的提取、富集及抗氧化活性研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2020
- WANG Gen. Study on extraction, enrichment and antioxidant activities of main flavonoids in *Flos Sophrae immaturus* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2020
- [21] He F, Wang W, Wu M, et al. Antioxidant and antibacterial activities of essential oil from *Atractylodes lancea* rhizomes [J]. Industrial Crops and Products, 2020, 153: 112552
- [22] Xue L, Lw A, Xiong W A, et al. Ultrasonic-assisted extraction for flavonoid compounds content and antioxidant activities of India *Moringa oleifera L.* leaves: simultaneous optimization, HPLC characterization and comparison with other methods [J]. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2020, 20: 100284
- [23] Jaimez-Ordaz J, Contreras-Lopez E, Hernandez-Sanchez T, et al. Comparative evaluation of four extraction methods of antioxidant compounds from *Decatropis bicolor* in aqueous medium applying response surface design [J]. Molecules, 2021, 26: 1042
- [24] 张堃,张双灵,张忍.超声波辅助提取荷叶和槐米黄酮的工艺研究[J].现代食品科技,2013,29(3):583-586,582
- ZHANG Kun, ZHANG Shuangling, ZHANG Ren. Ultrasonic assisted extraction of flavonoids from lotus leaf and *Sophora japonica* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(3): 583-586, 582
- [25] 初丽媛.槐米中黄酮成分的加压提取[J].科技风,2018,13: 150
- CHU Liyuan. Pressurized extraction of flavonoids from *Sophora japonica* [J]. Technology Wind, 2018, 13: 150
- [26] Cai L, Chen B, Yi F, et al. Optimization of extraction of polysaccharide from dandelion root by response surface methodology: structural characterization and antioxidant activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 907-919
- [27] Huang K, Liu R, Zhang Y, et al. Characteristics of two cedarwood essential oil emulsions and their antioxidant and antibacterial activities [J]. Food Chemistry, 2021, 346: 128970

(上接第 70 页)

- [30] Nilisha Rastogi, Singh Avinash, Singh Prashant-K, et al. Structure of iron saturated C-lobe of bovine lactoferrin at pH 6.8 indicates a weakening of iron coordination [J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2016, 84(5): 591-599
- [31] 闫序东,王彩云,云战友.乳铁蛋白热稳定性研究[J].中国乳品工业,2014,42(4):18-20
- YAN Xudong, WANG Caiyun, YUN Zhanyou. Studies on the thermal stability of lactoferrin [J]. China Dairy Industry, 2014, 42(4): 18-20
- [32] 倪娜,王振宇,陈立娟,等. pH对羊血浆蛋白热诱导凝胶特性的影响[J].现代食品科技,2015,31(7):160-166
- NI Na, WANG Zhenyu, CHEN Lijuan, et al. Effect of pH on the gel properties of lamb plasma protein during heat-induced gelation [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(7): 160-166