

葫芦茶的总黄酮的提取工艺优化及抗氧化活性

【摘要】目的：考察葫芦茶中总黄酮的含量，对其提取工艺进行优化，并对其抗氧化作用进行初步探讨。**方法：**利用超声波辅助乙醇法，对葫芦茶总黄酮进行提取，通过单因素实验与响应面优化得到最优提取工艺条件。此外，还对葫芦茶乙醇提取液的体外抗氧化活性进行研究。**结果：**本次实验，对葫芦茶总黄酮提取率的影响的因素依次是：料液比>提取时间>乙醇体积分数。用软件分析提取最优工艺条件：提取时间为 52.36 min，料液比为 1:57.74，乙醇浓度为 64.97%，预测提取率值为 14.49%。根据实际情况调整为：乙醇浓度为 65%，料液比为 1:60，提取时间为 52 min，测出实际提取率为 14.347%，与预测值的相对误差为-0.997%。在体外抗氧化活性测试中，葫芦茶的乙醇提取物对三种自由基的清除率分别为 62.07%、92.63%与 100%。**结论：**得出提取最佳优化条件，从葫芦茶醇提物中提取出的有效成分有很强的抗氧化性，可以作为一种较好的天然抗氧化剂。

【关键词】葫芦茶；黄酮；超声波辅助法；响应面优化；体外抗氧化活性

Optimization of Extraction Process and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from *Cucurbita moschata*

[Abstract] Objective: The purpose of this article is to study the content of total flavonoids in cucurbit tea and optimize the extraction process of total flavonoids in *Cucurbita moschata*. It also is to study the antioxidant effect of total flavonoids in *Cucurbita moschata*. **Method:** Ultrasonic-assisted ethanol extraction method was used to extract total flavonoids from *Cucurbita moschata*. The optimum extraction conditions were obtained by single factor experiment combined with response surface optimization experiment, and the antioxidant activity of its ethanol extract from *Cucurbita moschata* was studied in vitro. **Result:** From this study, it can be seen that the factors affecting the extraction rate of total flavonoids in *Cucurbita moschata* are: material liquid ratio>extraction time>ethanol volume fraction. It uses the software analysis to extract the optimal process conditions: extraction time is 52.36 minutes, solid-liquid ratio is 1:57.74, ethanol concentration is 64.97%, and the predicted extraction rate value is 14.49%. According to the actual situation, the ethanol concentration is 65%, the material liquid ratio is 1:60, the extraction time is 52 minutes, and the actual extraction rate is 14.347% with a relative error of -0.997% compared to the predicted value. In the in vitro antioxidant activity test, the ethanol extract of gourd tea had a scavenging rate of 92.63%, 100%, and 62.07% for the three free radicals. **Conclusion:** The optimal extraction conditions were obtained. The effective components extracted from the alcohol extract of *Cucurbita moschata* have strong antioxidant activity and can be used as a good natural antioxidant.

[Keywords] *Cucurbit tea* Flavone Ultrasonic-assisted method Response surface optimization Antioxidant activity in vitro

目 录

1 前言	1
2 材料与方法	2
2.1 材料与仪器	2
2.2 葫芦茶预处理	3
2.4 葫芦茶总黄酮的提取及含量测定	4
2.5 单因素试验	4
2.6 响应面设计试验	5
2.7 验证响应面实验的优化条件	6
2.8 葫芦茶样品的抗氧化活性测定	6
2.8.1 样品对 DPPH 自由基清除能力的测定	6
2.8.2 样品对 ABTS 自由基清除能力的测定	6
2.8.3 样品对羟自由基清除能力的测定	7
2.9 数据处理	8
3 结果与分析	9
3.1 芦丁标准曲线的结果	9
3.2 单因素试验的结果与分析	10
3.3 响应面优化实验的结果与分析	13
3.4 各个因素间交互作用分析	15
3.5 验证性实验结果与分析	16
3.6 葫芦茶样品的抗氧化活性测定结果	17
3.6.1 样品对 DPPH 自由基清除能力的测定	17

3.6.2 样品对 ABTS 自由基清除能力的测定.....	18
3.6.3 样品对羟自由基清除能力的测定.....	19
3.7 结论	20
4 讨论.....	21
参考文献	22
致谢	24

1 前言

葫芦茶为豆科葫芦茶属植物葫芦茶 (*Tadehagi triquetrum*(L.) Ohashi) 的全草, 别名牛虫草、百劳舌、咸鱼草等, 主要分布于广东、广西、海南等地区, 目前从该植物中分离出 30 余种化合物, 其中黄酮类、酚类为其特征性成分, 特别是其所含有的苯丙素苷类成分葫芦茶苷为其特有成分, 所得黄酮类成分多为黄酮苷类化合物, 母核多为槲皮素^[1]。葫芦茶具有清热解毒、利湿退黄、杀虫防腐的功效, 在抗炎抗过敏、抗菌、保肝、降糖降脂、促进伤口愈合、预防感染、缓解疼痛、辅助其他疗法等方面的作用^[2-7]。在内服和外治方面均取得了显著疗效, 应用范围广泛, 不良作用少, 药用价值较高, 并且葫芦茶在我国南方地区分布广泛, 药源丰富, 经济便宜, 适于进行临床推广, 综合葫芦茶的功效及笔者临床运用中药外治的经验, 葫芦茶在中医外治方面具有较高的研究价值和广阔的应用前景^[8]。

如今, 随着科学技术的发展和中医药行业的迅速崛起, 传统民族医药以独特的临床疗效日益受到国家重视, 这些天然的植物有许多丰富的生物活性化合物, 在查阅相关文献时发现其含有黄酮物质, 而且黄酮物质具有抗炎等的功效, 所以本人决定选择进行葫芦茶总黄酮物质的提取工艺优化及抗氧化活性的测定的实验。

目前, 从植物中提取出黄酮的方法包括了超声波辅助提取法、溶剂提取法、酶提取法和微波辅助提取法等, 其中的超声波辅助提取法的操作较为简便、提取时间的要求较短、效率高等特点^[9-11]。本次的研究的目的在于研究超声波辅助法的不同工艺条件对葫芦茶总黄酮提取率的影响, 测定葫芦茶乙醇提取物的体外抗氧化性能, 以期优化葫芦茶总黄酮提取的工艺提供参考。

响应面与正交实验是有所区别的, 正交是一种线性设计方法, 可以找出多个因素水平的最佳组合。但正交只能分析离散型数据, 精度不高, 预测性不佳。而响应面采用非线性模型, 能求得高精度的回归方程, 进行合理预测来找出最优工艺条件。在牟会荣等人^[12]对于桑叶黄酮提取工艺优化的两种方法对比结果中得知, 响应面得到的提取量较高以及建立的优化模型能够较好地预测。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

此次所用葫芦茶的原材料是采自广东省潮州市某山上的某一路边。

此次实验所用的材料与试剂如表 1 所示。

表 1 材料与试剂

材料/试剂	纯度	厂家/来源
芦丁标准品	分析纯	源叶生物
无水乙醇	分析纯	广州化学试剂厂
95%乙醇	分析纯	广州化学试剂厂
水杨酸	分析纯	广州化学试剂厂
硝酸铝	分析纯	天津市光复精细化工研究所
过硫酸钾 (K ₂ S ₂ O ₈)	分析纯	天津市福晨化学试剂
亚硝酸钠	分析纯	天津市福晨化学试剂
氢氧化钠	分析纯	天津市福晨化学试剂
硫酸亚铁 (FeSO ₄)	分析纯	天津市永大化学试剂有限公司
抗坏血酸	分析纯	天津市天新精细化工有限公司
2,2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑林 -6-磺酸 (ABTS)	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
30%过氧化氢 (H ₂ O ₂)	分析纯	天津市富宇精细化工有限公司
1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)	分析纯	合肥巴斯夫生物科技有限公司

此次实验所用的仪器与设备如表 2 所示。

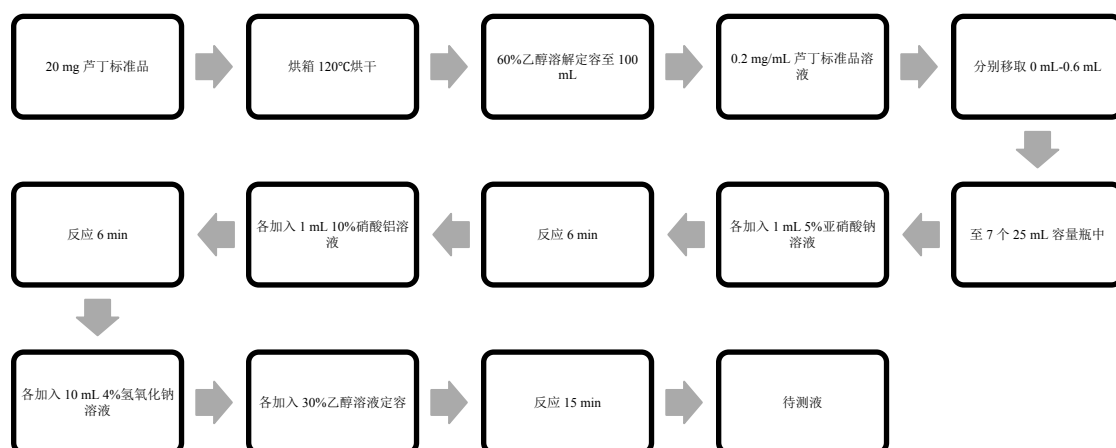
表 2 仪器与设备

仪器	型号	厂家
可见分光光度计	721N型	上海精密科学仪器有限公司
多功能粉碎机	1000Y型	永康市铂欧五金制品有限公司
电子天平	JA5003N型	上海佑科仪器仪表有限公司
循环水真空泵	SHZ-DIII型	巩义市子华仪器有限责任公司
数控超声波清洗器	KQ5200DB型	昆山市超声仪器有限公司
台式离心机	TDL80-2B型	上海安亭科学仪器厂
综合型超纯水机	FAMO-10FV型	南京权坤生物科技有限公司
电热鼓风干燥箱	GZX-9246MBE型	上海博迅医疗生物仪器股份有限公司

2.2 葫芦茶预处理

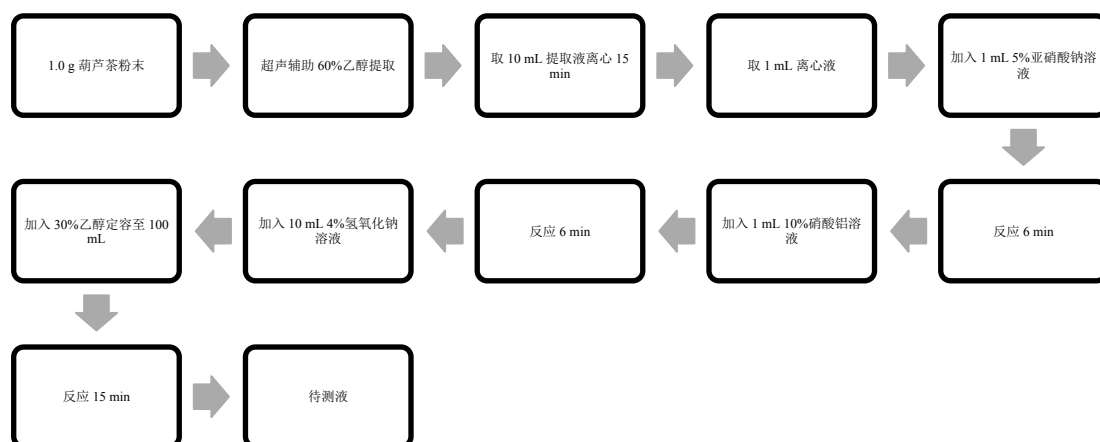
将供试葫芦茶置于粉碎机中进行粉碎，用 3 号筛过筛，过筛后装袋，备用。

2.3 芦丁标准曲线的绘制



同时，以不添加芦丁标准品水提液作为空白对照，在 510 nm波段进行吸收。最终绘制出以吸收值为纵坐标，以芦丁标准液（mg/mL）为横坐标的标准曲线。在 $R^2=0.9998$ 的情况下，计算出了 $y=10.831x+0.002$ 。

2.4 葫芦茶总黄酮的提取及含量测定



最后，将其放入 510 nm 波段测定其吸收，并由标准方程式推算出其含量。计算公式是：

$$W = \frac{cV_1V_3}{mV_2} \quad \text{公式 (1)}$$

W 是以每克葫芦茶中份量的芦丁的毫克数（mg/g）来表达的葫芦茶的总黄酮含量； c 是以 mg/mL为单位，由所测试的葫芦茶得到的浓度；以毫升计， V_1 为供试的葫芦茶的第 1 次定容；以毫升计， V_2 表示所吸收的葫芦茶浸提液的体积；以毫升计， V_3 为供试的葫芦茶的二次定容； m 是以 g表示的葫芦茶的重量。

2.5 单因素试验

使用 2.4 中葫芦茶总黄酮的提取方法，对乙醇浓度、提取时间、料液比对葫芦茶总黄酮提取量影响进行了研究^[13]，从中选出 3 个显著因子然后再进行响应面优化试验。

以乙醇浓度为单因素的实验方案如表 3 所示。

表 3 乙醇体积分数的实验方案

实验组别	1	2	3	4	5
乙醇浓度（%）	60	65	70	75	80
提取时间（min）	30	30	30	30	30
料液比（g/mL）	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50
温度（℃）	50	50	50	50	50
超声功率（W）	200	200	200	200	200

以提取时间为单因素的实验方案如表 4 所示。

表 4 提取时间的实验方案

实验组别	1	2	3	4	5
提取时间（min）	35	40	45	50	55
乙醇浓度（%）	65	65	65	65	65
料液比（g/mL）	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50
温度（℃）	50	50	50	50	50
超声功率（W）	200	200	200	200	200

以料液比为单因素的实验方案如表 5 所示。

表 5 料液比的实验方案

实验组别	1	2	3	4	5
料液比（g/mL）	1:30	1:40	1:50	1:60	1:70
乙醇浓度（%）	65	65	65	65	65
提取时间（min）	30	30	30	30	30
温度（℃）	50	50	50	50	50
超声功率（W）	200	200	200	200	200

2.6 响应面设计试验

表 6 试验因素与水平设计方案

水平	-1	0	1
A 乙醇浓度（%）	60	65	70
B 提取时间（min）	45	50	55
C 料液比（g/mL）	1:70	1:60	1:50

依据单因素试验的结果，借助响应面Box-Behnken法对试验进行优化，进一步考察 3 个显著要素对总黄酮提取量的影响。

然后会在电脑已经下载好的Design-Expert 13 软件中，以葫芦茶总黄酮提取量为响应值，对试验结果进行分析。方案如表 6 所示。

2.7 验证响应面实验的优化条件

按照响应面优化试验方案模型拟合获得的最佳提取工艺条件，用葫芦茶粉末以及给出的最佳提取工艺条件进行 3 次重复性实验，然后计算出此条件下得出的葫芦茶总黄酮物质的提取量，并将最终得出的实验结果取平均值后，与该模型给出的理论最佳数据进行对比，验证该模型的可靠性。

2.8 葫芦茶样品的抗氧化活性测定

2.8.1 样品对DPPH自由基清除能力的测定

实验按照李婉仪等^[14]的测定方法，根据实验的实际情况进行修改应用，实际实验方案如表 7 所示。

表 7 清除DPPH自由基能力测定的方法

组别	试剂和样液加量	吸光度
阴性对照组	2 mL DPPH溶液+2 mL无水乙醇	A ₀
样品组	2 mL DPPH溶液+2 mL黄酮溶液待测液	A ₁
空白组	2 mL无水乙醇+2 mL黄酮溶液待测液	A ₂

DPPH溶液的配制: 称取 DPPH底物 0.01 g，用无水乙醇溶解，移入 250 mL 容量瓶，进行定容，摇匀后保存。

分别配置不同浓度梯度的葫芦茶提取液和抗坏血酸溶液作为待测液，抗坏血酸溶液作为阳性对照。按照表加入反应液，然后在暗处反应 30 min后，在紫外波长 517 nm下以无水乙醇作为参照溶液测定吸光度（A）。之后会根据其原理来计算葫芦茶提取液和抗坏血酸溶液的清除率。

计算公式为：

$$R = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

公式（2）

2.8.2 样品对ABTS自由基清除能力的测定

实验按照扈芷怡等^[15]的测定方法，根据实验的实际情况进行修改应用，实际实验方案如表 8 所示。

表 8 清除ABTS自由基能力测定的方法

组别	试剂和样液加量	吸光度
阴性对照组	4 mL DPPH溶液+1 mL无水乙醇	A_0
样品组	4 mL DPPH溶液+1 mL黄酮溶液待测液	A_1
空白组	4 mL无水乙醇+1 mL黄酮溶液待测液	A_2

ABTS工作液的制备：准确称量 0.0 384 g ABTS底物溶于 5 mL蒸馏水中得到甲液（14 mmol/L ABTS液）；准确称量 0.0 066 g过硫酸钾溶于 5 mL蒸馏水中得到乙液（4.9 mmol/L $K_2S_2O_8$ 液）；将两者同体积混合，暗反应 18 小时后，再用无水乙醇稀释到 $A_{734}=0.68\pm0.02$ ，作为ABTS工作液备用，保存。

分别配置不同浓度梯度的葫芦茶提取液和抗坏血酸溶液作为待测液，抗坏血酸溶液作为阳性对照。按照表 8 加入反应液，暗处反应 30 min后，以无水乙醇作为参比溶液，在紫外波长 734 nm下测定吸光度（A），计算葫芦茶提取液和抗坏血酸溶液的清除率。计算公式见式（2）。

2. 8. 3 样品对羟自由基清除能力的测定

实验按照秦生华等^[16]的测定方法，根据实验的实际情况进行修改应用，实际实验方案如表 9 所示。

表 9 清除羟基自由基能力测定的方法

组别	试剂和样液加量	吸光度
阴性对照组	2 mL蒸馏水+2 mL $FeSO_4$ 溶液+	A_0
	2 mL水杨酸溶液+2 mL过氧化氢溶液	
样品组	2 mL黄酮待测液+2 mL $FeSO_4$ 溶液+	A_1
	2 mL水杨酸溶液+2 mL过氧化氢溶液	
空白组	2 mL黄酮待测液+2 mL $FeSO_4$ 溶液+	A_2
	2 mL蒸馏水+2 mL过氧化氢溶液	

制备 6 mmol/L硫酸亚铁溶液：称量出 $FeSO_4\cdot 7H_2O$ 0.1 668 g

放到烧杯中，加入少量蒸馏水溶解，再移入到 100 mL容量瓶中用蒸馏水定容，摇匀后获得 6 mmol/L硫酸亚铁。

制备 6 mmol/L 过氧化氢溶液：精确地吸取 0.68 mL 30% H_2O_2 溶液，置 100 mL的容量瓶中，加入蒸馏水定容至 100 mL, 后得到目标 H_2O_2 溶液，储存起来。

6 mmol/L 水杨酸溶液的制备：精确称量出 0.0 829 g，放入烧杯中，加入适当的 95%乙醇，搅拌至完全溶解，移入 100 mL的容量瓶中，用 95%乙醇定容, 摇匀后，获得 6 mmol/L的水杨酸溶液，存放起来。

分别配置不同浓度梯度的葫芦茶提取液和抗坏血酸溶液作为待测液，抗坏血酸溶液作为阳性对照。按照表加入反应液，暗处反应 30 min后，以蒸馏水作为参比溶液，在紫外波长 517 nm下测定吸光度（A），计算葫芦茶提取液和抗坏血酸溶液的清除率。计算公式见式（2）。

2.9 数据处理

本实验数据结果使用Origin 2022 作图；使用Design-Expert 13 软件中Box-Behnken法设计优化试验方案通过对试验数据的分析和处理，得出了最优的提取工艺参数和回归方程。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/455112140343011134>