

黄芩多酚提取工艺优化及其抗氧化活性研究

【摘要】目的：优化黄芩多酚超声提取工艺条件，研究黄芩的体外抗氧化活性。**方法：**以乙醇体积分数、超声提取时间、超声提取温度和料液比为主要影响因素，以黄芩多酚提取率作为考察指标，进行单因素实验，在此基础上采用正交试验优化黄芩多酚的提取工艺。考察黄芩提取物对 2,2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸（ABTS）、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）及羟基自由基的清除能力，选用维生素 C 作为阳性对照，研究其在体外的抗氧化活性。**结果：**各因素对黄芩多酚提取率影响的大小依次为料液比、乙醇体积分数、提取温度、提取时间。黄芩多酚的最佳超声提取工艺参数是使用体积分数为 40% 的乙醇，在 50℃ 条件下超声 60 min，料液比为 1:25，最佳工艺条件下黄芩多酚的提取率为 8.15%。黄芩提取物在 0.0019 mg/mL ~ 0.058 mg/mL 范围内对 ABTS、DPPH 及羟基自由基的最高清除率分别为 100%、93.63%、53.19%。**结论：**优选出了超声辅助提取黄芩多酚的最佳工艺，采用单因素分析与正交试验结合的方法可行。黄芩提取物具有一定的体外抗氧化活性。

【关键词】黄芩；多酚；提取；抗氧化活性

Optimization of Extraction Process of Polyphenols from *Scutellaria Baicalensis* Georgi and Antioxidant Activity of *Scutellaria Baicalensis* Georgi

[Abstract] Objective: The purpose is to optimize the extraction technology of polyphenols from *Scutellaria baicalensis* Georgi and study antioxidant activity of *Scutellaria baicalensis* Georgi in vitro. **Methods:** By using the extraction efficiency of polyphenols from *Scutellaria baicalensis* Georgi as the index, ethanol volume fraction, solid-liquid ratio, extraction time and extraction temperature as response factors, orthogonal design was used to optimize the extraction technology of polyphenols from *Scutellaria baicalensis* Georgi based on single factor test. Scavenging on 2,2'-azino-bis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) free activities, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) free radicals and hydroxyl free radicals of extractive from *Scutellaria baicalensis* Georgi were investigated. By using vitamin C as positive control, its antioxidant activity in vitro was investigated. **Results :** The effects of all factors on the extraction rate of *Scutellaria baicalensis* polyphenol were liquid-solid ratio, ethanol volume fraction, extraction temperature and extraction time. The optimized extraction conditions for polyphenols from *Scutellaria baicalensis* Georgi was as follows: ethanol volume fraction of 40% with extraction time 60 min, extraction temperature 50°C and liquid-solid ratio 1:25. The extraction efficiency of polyphenols from *Scutellaria baicalensis* Georgi was 8.15% in the verification test. In the range of 0.0019 mg/mL to 0.058 mg/mL, the highest scavenging rates of extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi on ABTS free radicals, DPPH free radicals and hydroxyl free radicals were 100%, 93.63% and 53.19%, respectively. **Conclusion:** Through single factor analysis and orthogonal test, the optimal extraction method of polyphenol of *Scutellaria baicalensis* assisted by ultrasound was proved to be feasible. The extractive from *Scutellaria baicalensis* Georgi shows certain antioxidant activity in vitro.

[Keywords] *Scutellaria baicalensis* Georgi Polyphenols Extraction

Antioxidant activity

目 录

1 前言	1
2 材料与方法	2
2.1 材料及仪器	2
2.2 黄芩多酚的提取	3
2.2.1 黄芩片前处理.....	3
2.2.2 样品溶液制备.....	3
2.3 黄芩多酚提取率的测定	4
2.3.1 没食子酸标准曲线的绘制.....	4
2.3.2 黄芩多酚提取与测定.....	4
2.4 单因素实验	5
2.4.1 料液比对黄芩多酚提取率的影响.....	5
2.4.2 乙醇体积分数对黄芩多酚提取率的影响.....	5
2.4.3 提取时间对黄芩多酚提取率的影响.....	6
2.4.4 提取温度对黄芩多酚提取率的影响.....	6
2.5 正交试验设计	6
2.5.1 试验设计.....	6
2.5.2 结果分析.....	7
2.6 验证试验	8

2.7 黄芩多酚提取物体外抗氧化实验	9
2.7.1 样品溶液的制备.....	9
2.7.2 样品对 ABTS 自由基的清除能力.....	9
2.7.3 样品对 DPPH 自由基的清除能力.....	10
3.6.4 样品对羟基自由基的清除能力.....	10
3 结果与分析	12
3.1 没食子酸标准曲线	12
3.2 单因素实验	12
3.2.1 料液比对黄芩多酚提取率的影响.....	12
3.2.2 乙醇体积分数对黄芩多酚提取率的影响.....	13
3.2.3 提取时间对黄芩多酚提取率的影响.....	14
3.2.4 提取温度对黄芩多酚提取率的影响.....	15
3.3 正交试验	16
3.4 验证试验	17
3.5 黄芩多酚提取物体外抗氧化实验	18
3.5.1 样品对 ABTS 自由基的清除能力.....	18
3.5.2 样品对 DPPH 自由基的清除能.....	19
3.5.3 样品对羟基自由基清除能力.....	20
3.6 结论	21
4 讨论	22

参考文献	24
------------	----

致谢	27
----------	----

1 前言

黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 为唇形科黄芩的干燥根，性苦、寒，具有清热燥湿、泻火、解毒、止血、安胎等功效 Error! Reference source not found.。在植物资源中，黄芩的经济价值很高，是一种常见的药用植物。黄芩是一种以黄酮类物质为主的中药，其化学成分非常丰富，酚类、挥发油等也是黄芩的化学成分之一 Error! Reference source not found.。黄芩总黄酮类、黄芩苷、黄芩素在体外抑菌研究中被证明对多种致病菌的药理活性具有不同的抑制作用 Error! Reference source not found.。其不同溶剂提取出来的提取物对多种病菌有着不同程度的抑制效果 Error! Reference source not found.。黄芩还具有抗肿瘤 Error! Reference source not found.、抗氧化 Error! Reference source not found.、抗病毒 Error! Reference source not found. 及护肝 Error! Reference source not found. 等药理作用，其应用在中国用药历史中已有上千年岁月，广泛应用于抗病毒、消炎抑菌、解毒阵痛、抗肿瘤、抗氧化等疾病的治疗与预防 Error! Reference source not found.。

目前，大众对黄芩的研究主要是围绕着黄酮类物质开展的 Error! Reference source not found.。黄芩在酚类方面的研究较少 Error! Reference source not found.，酚类化合物具有抗氧化、抗炎抑菌等作用 Error! Reference source not found.。酚类化合物的结构比一般化合物复杂得多，以多酚的结构性质为基础，可将其分为两种类型，一种是黄酮类物质，另一种是非黄酮类物质，酚酸、木酚素和芪类均属于非黄酮类物质 Error! Reference source not found.。本次研究对于黄芩中多酚的提取工艺进行了优化，采用超声波辅助溶剂提取，结合单因素分析，辅以正交试验，改进了黄芩多酚的提取。此外，微波提取法、酶辅助提取法和超临界流体提取法均是提取多酚的工艺之一 Error! Reference source not found.。考察黄芩提取物的体外抗氧化活性，阳性对照品是维生素 C，在相同的条件下比较维生素 C 和黄芩提取物对于 ABTS 自由基、DPPH 自由基和羟基自由基三种自由基的清除率。本次研究对于整合黄芩的提取方法提供了一定的理论数据，可扩大黄芩的资源利用，并为天然抗氧化物质的研究提供了一定的基础，而如何将产品进行优化、提纯，使得其在工业生产方面能方便快捷有效，这些技术是科研工作者今后的努力方向之一。

2 材料与方法

2.1 材料及仪器

本实验所用药材为黄芩，饮片来源于安徽康和中药科技有限公司，批号为220307。

所需材料和试剂见表 2-1。

表 2-1 材料及试剂

材料/试剂	纯度/批号	厂家
95%乙醇	分析纯（批号 20200501）	广州化学试剂厂
无水乙醇	分析纯	广州化学试剂厂
无水碳酸钠	分析纯（批号 20160710）	广州化学试剂厂
没食子酸	分析纯	天津科密欧化学试剂有限公司
福林酚试剂	分析纯（批号 20210406）	国药集团化学试剂有限公司
抗坏血酸（Vc）	分析纯（批号 20130104）	天津市天新精细化工有限公司
1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 （DPPH）	分析纯 （批号 6HOGA-ID）	梯希爱（上海）化成工业发展 有限公司
2,2'-联氨-双-3-乙基苯并 噻唑啉-6-磺酸（ABTS）	分析纯 （批号 20210125）	国药集团化学试剂有限公司
过硫酸钾	分析纯	天津市福晨化学试剂厂

硫酸亚铁	分析纯（批号 20150527）	天津市永大化学试剂有限公司
30%过氧化氢	分析纯	天津市富宇精细化工有限公司
水杨酸	分析纯（批号 20200301）	广州化学试剂厂

所需实验仪器见表 2-2。

表 2-2 实验仪器

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

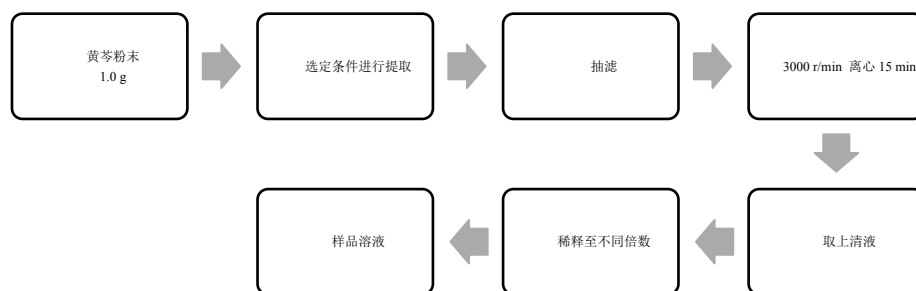
2.2 黄芩多酚的提取

2.2.1 黄芩片前处理

黄芩饮片洁净后，热水下锅隔水蒸 30 min，取出烘干，用粉碎机进行粉碎，过筛，得到黄芩粉备用。粉末置于干燥瓶中，防止受潮。

2.2.2 样品溶液制备

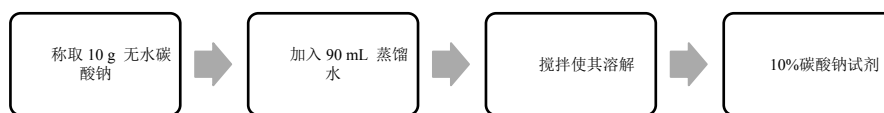
根据实际情况以及实际应用方面，提取黄芩多酚会有很多种影响因素，考虑到黄芩多酚可能会在高温下会被氧化，部分多酚会分解而影响到黄芩多酚的稳定性 **Error! Reference source not found.**，同时考虑到多酚类化合物的极性大多属于中等极性物质 **Error! Reference source not found.**，尽可能最大程度地从黄芩中提取黄芩多酚，可以利用相似相溶原理，所以选择乙醇作为提取溶剂，且乙醇的体积分数不宜过大，否则极性过大同样会影响多酚的提取率。酚类化合物结构不稳定，超声提取时间过长易改变或分解酚类化合物的结构 **Error! Reference source not found.**，所以超声时间不宜过长。溶剂使用过多会影响到回收的难度，而溶剂量过少会使得到的样品液量过少从而操作困难。所以单因素实验中，除去需要进行实验研究的变量，其他条件均选定料液比为 1:20，使用乙醇体积分数为 50%的溶剂，40℃条件下超声提取 30 min。黄芩样品液制备具体方法见下方流程图。



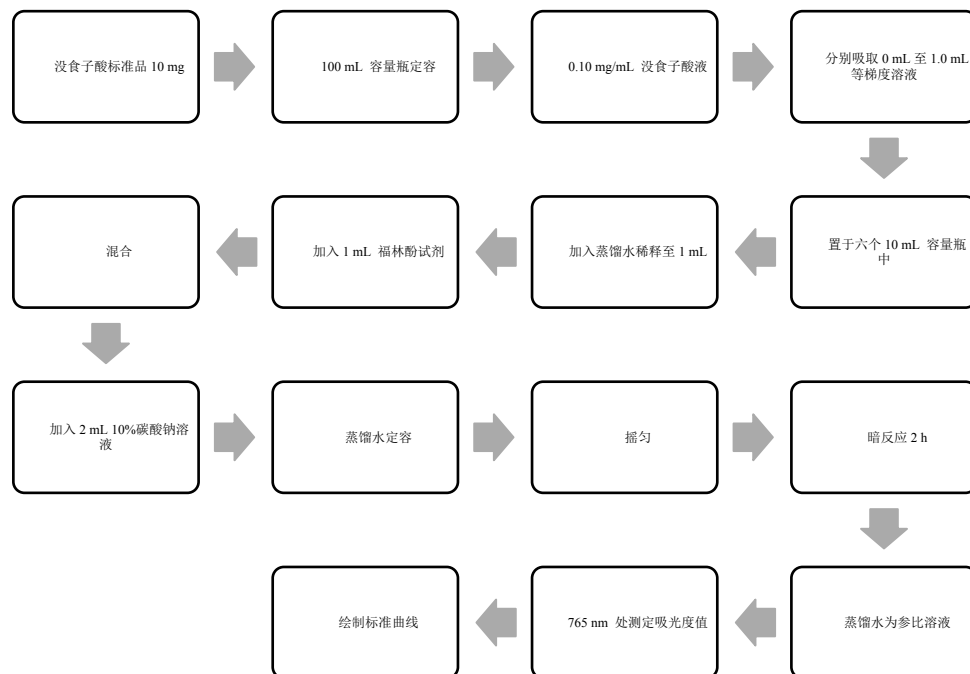
2.3 黄芩多酚提取率的测定

2.3.1 没食子酸标准曲线的绘制

采用福林酚法 Error! Reference source not found.，根据实验实际情况进行适当的改进。



10%碳酸钠试剂保存备用，没食子酸溶液保存备用，由流程图可得标准曲线。

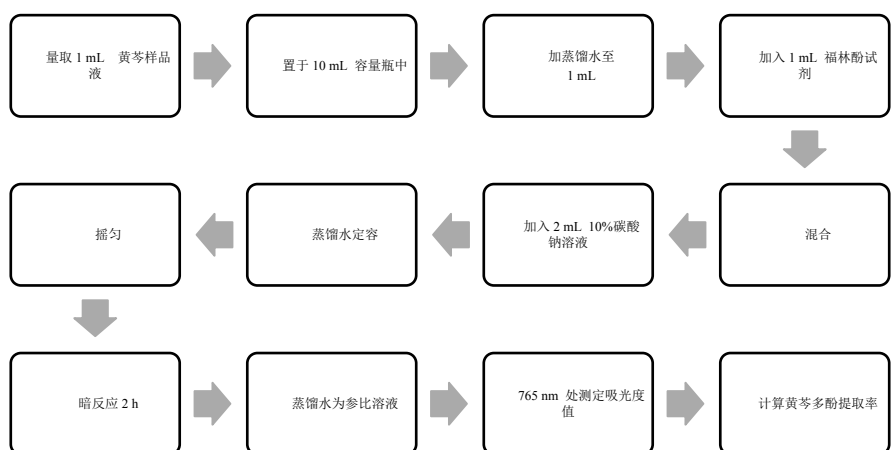


2.3.2 黄芩多酚提取与测定

黄芩多酚的提取方法见流程图，黄芩多酚的提取率由公式（1）计算。

$$\text{黄芩多酚提取率 (\%)} = \frac{C \times V \times N}{10M} \quad \text{公式 (1)}$$

公式（1）中：C 为提取液中经过线性回归方程求得的多酚含量（mg/mL）；V 为提取液体积（mL）；N 为稀释倍数；M 为称取的黄芩质量（g）。



2.4 单因素实验

2.4.1 料液比对黄芩多酚提取率的影响

分别称取 1.0 g 黄芩粉五份，置于 50 mL 干燥瓶中，按照表 2-3 所列条件进行实验，根据公式（1）计算黄芩多酚的提取率。

表 2-3 料液比对黄芩多酚提取率的影响

编号	1	2	3	4	5
提取温度（℃）	40	40	40	40	40
提取时间（min）	30	30	30	30	30
乙醇体积分数（%）	50	50	50	50	50
料液比（g/mL）	1:15	1:20	1:25	1:30	1:35

2.4.2 乙醇体积分数对黄芩多酚提取率的影响

表 2-4 乙醇体积分数对黄芩多酚提取率的影响

编号	1	2	3	4	5
提取温度（℃）	40	40	40	40	40

提取时间 (min)	30	30	30	30	30
乙醇体积分数 (%)	30	40	50	60	70
料液比 (g/mL)	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20

分别称取 1.0 g 黄芩粉五份，置于 50 mL 干燥瓶中，按照表 2-4 所列条件进行实验，根据公式（1）计算黄芩多酚的提取率。

2.4.3 提取时间对黄芩多酚提取率的影响

分别称取 1.0 g 黄芩粉五份，置于 50 mL 干燥瓶中，按照表 2-5 所列条件进行实验，根据公式（1）计算黄芩多酚的提取率。

表 2-5 提取时间对黄芩多酚提取率的影响

编号	1	2	3	4	5	6
提取温度 (°C)	40	40	40	40	40	40
提取时间 (min)	20	30	40	50	60	70
乙醇体积分数 (%)	50	50	50	50	50	50
料液比 (g/mL)	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20

2.4.4 提取温度对黄芩多酚提取率的影响

分别称取 1.0 g 黄芩粉五份，置于 50 mL 干燥瓶中，按照表 2-6 所列条件进行实验，根据公式（1）计算黄芩多酚的提取率。

表 2-6 提取温度对黄芩多酚提取率的影响

编号	1	2	3	4	5
提取温度 (°C)	30	40	50	60	70
提取时间 (min)	30	30	30	30	30

乙醇体积分数 (%)	50	50	50	50	50
料液比 (g/mL)	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20

2.5 正交试验设计

2.5.1 试验设计

正交设计因素与水平如表 2-7 所示, 根据单因素实验结果, 将四个因素分别设为 A、B、C、D, 在 4 个单因素实验中选取黄芩多酚提取率最高值及相邻的两个值分别设为 1、2、3, 作为三个单因素水平, 正交试验设计见表 2-8。

表 2-7 正交实验设计因素与水平

水平	因素			
	提取温度 (°C)	乙醇体积分数 (%)	料液比 (g/mL)	提取时间 (min)
1	A1	B1	C1	D1
2	A2	B2	C2	D2
3	A3	B3	C3	D3

表 2-8 正交试验实验表

编号	A	B	C	D	黄芩多酚提取率 (%)
1	1	1	1	1	a
2	1	2	2	2	b
3	1	3	3	3	c

4	2	1	2	3	d
5	2	2	3	1	e
6	2	3	1	2	f
7	3	1	3	2	g
8	3	2	1	3	h
9	3	3	2	1	i

正交表是通过 $L_p(n^k)$ 表达的, 其中 p 为实验次数, n 为水平个数, k 为因素个数。因为因素个数 $k=4$, 水平个数 $m=3$, 所以 $p=k \times (n-1) + 1=9$, 本次试验次数采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 平行测试三次取平均值, 通过拟合得出黄芩多酚提取的最佳条件。

2.5.2 结果分析

使用极差分析法分析结果。

各因素 K 值计算见表 2-9, 比较同一因素下不同水平的 K 值, 可以判断该因素下的优水平, 由此可以得到该实验条件下的最优水平组合 **Error! Reference source not found.**。各因素, R 值计算方式见公式 (2)、公式 (3)、公式 (4)、公式 (5), 若该因素对试验指标有更大的影响, 则 R 值越大, 所以, 可以根据 R 值大小, 来确定它们对实验结果影响的主次顺序 **Error! Reference source not found.**。

表 2-9 各因素 K 值计算表

K 值	A	B	C	D
K1	$(a+b+c) / 3$	$(a+d+g) / 3$	$(a+f+h) / 3$	$(a+e+i) / 3$
K2	$(d+e+f) / 3$	$(b+e+h) / 3$	$(b+d+i) / 3$	$(b+f+g) / 3$
K3	$(g+h+i) / 3$	$(c+f+i) / 3$	$(c+e+g) / 3$	$(c+d+h) / 3$

A 因素极差计算方式如下公式（2）所示：

$$R_A = K_{A_{\max}} - K_{A_{\min}} \quad \text{公式（2）}$$

公式（2）中： $K_{A_{\max}}$ 表示 A 因素下的最大 K 值， $K_{A_{\min}}$ 表示 A 因素下的最小 K 值，通过计算，可得 A 因素的极差 R_A 。

B 因素极差计算方式如下公式（3）所示：

$$R_B = K_{B_{\max}} - K_{B_{\min}} \quad \text{公式（3）}$$

公式（3）中： $K_{B_{\max}}$ 表示 B 因素下的最大 K 值， $K_{B_{\min}}$ 表示 B 因素下的最小 K 值，通过计算，可得 B 因素的极差 R_B 。

C 因素极差计算方式如下公式（4）所示：

$$R_C = K_{C_{\max}} - K_{C_{\min}} \quad \text{公式（4）}$$

公式（4）中： $K_{C_{\max}}$ 表示 C 因素下的最大 K 值， $K_{C_{\min}}$ 表示 C 因素下的最小 K 值，通过计算，可得 C 因素的极差 R_C 。

D 因素极差计算方式如下公式（5）所示：

$$R_D = K_{D_{\max}} - K_{D_{\min}} \quad \text{公式（5）}$$

公式（5）中： $K_{D_{\max}}$ 表示 D 因素下的最大 K 值， $K_{D_{\min}}$ 表示 D 因素下的最小 K 值，通过计算，可得 D 因素的极差 R_D 。

2.6 验证试验

将正交试验所得的最优组合 $A_{\max} B_{\max} C_{\max} D_{\max}$ 与各单因素所得的黄芩多酚提取率最优组合 $A_2 B_2 C_2 D_2$ 进行验证试验，比较其他条件相同的情况下黄芩多酚的提取率，平行测定三次，得出经超声辅助提取结合正交试验优化后的最佳提取工艺，并计算 RSD 值。

2.7 黄芩多酚提取物体外抗氧化实验

2.7.1 样品溶液的制备

待测液制备：用电子天平称取黄芩粉末 1.0 g，放入 50 mL 干燥瓶中，选择任一条件经超声辅助提取，减压抽滤，离心后取上清液，按照黄芩多酚含量测定方法测得黄芩多酚的含量，再根据原液浓度将溶液稀释成一定梯度的稀释液，稀释后的样品液浓度应大概在 0.01 mg/mL 到 0.06 mg/mL 之间，保存备用。

维生素 C 溶液的制备：配置浓度为 1 mg/mL 的维生素 C 液，先称取 0.1 g 抗坏血酸，将其溶解于少量蒸馏水中，并转移至 100 mL 容量瓶中，用蒸馏水定容，摇匀即得。再从上述维生素 C 液中分别移取 1 mL 至 6 mL 六份等梯度的溶液到六个 100 mL 容量瓶中，分别定容，分别配置成 0.01 mg/mL、0.02 mg/mL、0.03 mg/mL、0.04 mg/mL、0.05 mg/mL、0.06 mg/mL 六份等浓度梯度的溶液，保存备用。

2.7.2 样品对 ABTS 自由基的清除能力

实验按照崔巧玉等 [Error! Reference source not found.](#)的方法，根据实际情况进行修改。

ABTS 工作液的制备：准确称量 0.0384 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 0.0066 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）；将二者同等体积混合，暗反应 18 h 后，再用无水乙醇将溶液稀释到 $A_{734}=0.68\pm0.02$ ，作为 ABTS 工作液，保存备用。

以维生素 C 液作为阳性对照，分别配置不同浓度的维生素 C 液和黄芩提取液作为待测液。按照表 2-10 加入各类反应液，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），并用公式（6）计算维生素 C 液和黄芩提取液对 ABTS 自由基的清除率。

维生素 C 液和黄芩提取液 ABTS 自由基清除率计算公式：

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/475112200343011134>