

山楂中黄酮类物质的水提取工艺及理化性质研究

郭艳华, 李 娇, 黄 刚, 吴旺喜, 白建勋, 张彩虹, 熊加严

(江汉大学 化学与环境工程学院, 湖北 武汉 430056)

摘 要:探讨水提取山楂中黄酮的工艺条件,考察浸提时间、温度、料液比、酸度等条件对提取山楂中总黄酮含量的影响;用化学显色反应和紫外光谱初步确定提取产物的黄酮类型;研究山楂黄酮的理化性质。结果表明:水提取山楂黄酮的适宜工艺条件为:提取时间2 h,温度50 ℃,山楂与蒸馏水的料液比为1:30,酸度 $\text{pH}=8$,黄酮得率为4.96%。经显色反应和紫外光谱初步确定山楂黄酮的类型为黄酮醇类和简单黄酮类。食品添加剂和金属离子对山楂黄酮含量及抗氧化活性均有一定的影响。

关键词:山楂;水提取工艺;黄酮含量;紫外光谱;理化性质;抗氧化活性

中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-0143(2020)01-0029-08

DOI:10.16389/j.cnki.cn42-1737/n.2020.01.004

Study on Water Extraction Process and Physicochemical Properties of Flavonoids in Hawthorn

GUO Yanhua, LI Jiao, HUANG Gang, WU Wangxi, BAI Jianxun,
ZHANG Caihong, XIONG Jiayan

(School of Chemical and Environmental Engineering, Jianghan University, Wuhan 430056, Hubei, China)

Abstract: The process conditions of flavonoids extracted from hawthorn with water were discussed. The effects of extraction time, temperature, solid-liquid ratio and acidity on flavonoids extracted from hawthorn were investigated; the extracted flavonoids type was determined by chemical color reaction and UV spectroscopy; the physical and chemical properties were investigated. The results showed that the suitable process conditions of water extraction of hawthorn flavone were as follows: the extracting time of 2 h, the temperature of 50 ℃, the solid-liquid ratio of hawthorn with distilled water of 1:30, the acidity of $\text{pH}=8$, the yield of flavonoids was 4.96% under these conditions. The types of flavonoids from hawthorn which determined by color reaction and UV spectrum were flavonols and simple flavonoids. Food additives and metal ions had certain influence on the flavonoids content and the antioxidant activity of flavonoids.

Key words: hawthorn; water extraction process; flavonoid content; ultraviolet spectrum; physicochemical properties; antioxidant activity

收稿日期: 2019-08-23

基金项目: 湖北省教育厅科技项目(B2014073)

作者简介: 郭艳华(1960—),女,教授,研究方向:天然产物化学及功能材料。

山楂(*Crataegus* L.)又称山里红、红果、胭脂果,是一种蔷薇科植物,属于药食同源的传统中药材,具有很高的营养价值和药用价值^[1-5]。山楂具有活血化瘀、消食化积的作用,能降血脂和防治心血管疾病,同时,山楂中所含的黄酮类化合物具有抗衰老的作用,能增强机体的免疫力,有防癌的作用^[6-9]。对天然产物中黄酮类化合物及山楂中活性成分的提取已有一些文献报道^[10-17],但是用水作为溶剂系统研究山楂中黄酮的提取工艺条件及理化性质未见报道。用蒸馏水提取山楂中黄酮成分,其浸出率高,能较为彻底地将黄酮提取出来,且具有食用安全性高、易回收等优点。笔者探讨了山楂中黄酮成分的水溶剂提取条件及提取液理化性质,为降低山楂黄酮的提取成本提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

山楂:购于德仁堂大药房(将购买的山楂烘干除去水分,磨碎过60目筛,放置备用);芦丁(AR):国药集团化学试剂有限公司;硫酸锌(AR);氯化钙(AR);氯化镁(AR);氯化钾(AR);硝酸锰(AR);氯化钴(AR);氯化铝(AR);氯化钠(AR);硫酸铁(AR);硫酸(AR);氢氧化钠(AR);维生素C(AR);蔗糖(AR);枸橼酸(AR);水杨酸(AR);过氧化氢(AR)。

1.2 仪器与设备

UV-2401紫外-可见分光光度计:日本岛津公司;721分光光度计:上海精密科学仪器有限公司;85-1恒温水浴锅:国华电器有限公司;HH-2数显恒温水浴锅:国华电器有限公司;ST-02A多功能粉碎机:永鑫市帅通工具有限公司;RE-S2旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 芦丁标准曲线的绘制 准确称取芦丁20 mg,用30%乙醇溶解并定容至100 mL,得浓度为0.249 mg/mL的芦丁标准溶液,再按绘制芦丁标准曲线的方法^[11-13]测定吸光度,以吸光度为横坐标,芦丁标准溶液浓度为纵坐标,绘制标准曲线,得到芦丁标准曲线的回归方程为 $y = 11.8542x + 0.00868$, $R^2 = 0.9990$ 。

1.3.2 样品中黄酮含量的测定方法 取山楂各提取液代替芦丁标准溶液,按1.3.1同样的方法在510 nm处测定吸光度,根据标准曲线计算山楂各提取液中黄酮含量。

1.3.3 山楂黄酮水提取工艺条件的探讨 本课题首先从浸提剂的选择进行了探讨:在其他条件相同时,研究了蒸馏水、甲醇、70%甲醇、无水乙醇、70%的乙醇、醋酸、丙酮、乙酸乙酯等不同溶剂对提取山楂中黄酮含量的影响。研究结果发现:在相同的实验条件下,8组溶剂中提取的黄酮含量依次为:70%乙醇 \approx 蒸馏水 $>$ 70%甲醇 $>$ 乙醇 $>$ 甲醇 $>$ 丙酮 $>$ 醋酸 $>$ 乙酸乙酯,70%乙醇和蒸馏水两种溶剂的提取效果相近,70%乙醇略大于蒸馏水。从提取成本和实际生产角度出发,选择蒸馏水提取更有优势。

天然产物黄酮提取工艺条件一般还需要时间、温度、料液比及酸度的适宜条件,需要对每一种影响因素设计不同条件进行探讨;本研究对每一种影响因素设计4~5种不同的条件,分别探讨浸提时间的影响、浸提温度的影响、料液比的影响、pH值的影响,通过实验结果得到每一种影响因素下的适宜条件,从而确定水提取山楂中黄酮的适宜工艺条件。

首先探讨浸提时间对提取山楂中黄酮含量的影响,经重复性实验得到适宜时间为2 h,以下条件的探讨,均在2 h下进行。

(1) 浸提温度的影响

称取1.00 g山楂粉末,分别在不同温度(20、30、40、50、60℃)下浸提,测定黄酮含量,探讨浸提温度对提取山楂中黄酮含量的影响。

(2) 料液比的影响

称取 1.00 g 山楂粉末,分别加入不同体积的提取剂蒸馏水(设计料液比为 1:20、1:30、1:40、1:50),在 40 ℃的水浴中浸提 2 h后,测定黄酮含量,探讨料液比对提取山楂中黄酮含量的影响。

(3) 浸提液 pH 值的影响

称取 1.00 g 山楂粉末,分别加入提取剂蒸馏水 30 mL,浸提 2 h后,测定黄酮含量,探讨浸提液 pH 值(设计 pH 值为 2、4、6、8、10)对提取山楂中黄酮含量的影响。

1.3.4 提取物中黄酮类物质的初步鉴定 (1) 显色反应

将山楂膏状提取物用甲醇溶解,取少量分别放入 6 支比色管中进行显色反应。具体操作为:① 分别放在紫外光和自然光下观察,记为 CK;② 滴加几滴 5 mol/L 氨水,分别放在自然光和紫外光下观察;③ 滴加 1% AlCl₃ 溶液,分别放在自然光和紫外光下观察;④ 滴加 Na₂CO₃ 溶液于紫外光下观察;⑤ 滴加浓 H₂SO₄,于紫外光下观察现象;⑥ 加少许 Mg 和 2 滴浓 HCl,于紫外光下观察。

(2) 紫外—可见光谱的测定

紫外—可见光谱法通常用于鉴定黄酮的类型或结构,不同类型黄酮的峰型、峰位和强度有所不同,可以用于判断黄酮类型,将蒸馏水提取液进行紫外—可见光谱的测定。

1.3.5 山楂提取液理化性质的探究 (1) 抗氧化活性的测定

检测·OH 常用的方法参考文献[6,20]中的 Fenton 体系。Fenton 体系的反应如下:H₂O₂ + Fe²⁺ = ·OH + OH⁻ + Fe³⁺。·OH 具有很高的反应活性,能被水杨酸捕捉生成有色物质,若有抗氧化剂或自由基清除剂存在,会与水杨酸竞争,使有色物质生成量减少,通过测定吸光度即可检测。在试管中依次加入 3 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液 1 mL、3 mmol/L 的水杨酸溶液 1 mL、待测样品溶液 1 mL、3 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液 1 mL,摇匀,37 ℃水浴 30 min,冷却静置后,在 510 nm 处测吸光度。数据计算公式为

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100\%$$

式中,A₀为空白管吸光度,以 1 mL 蒸馏水代替样品溶液;A_i为样品溶液管吸光度;A_j为对照管吸光度,以 1 mL 蒸馏水代替水杨酸溶液。

(2) 常见食品添加剂与山楂黄酮作用的测定

先将山楂提取物进行黄酮含量的测定和抗氧化活性的测定。再取等量山楂提取物溶液,分别加入等量相同浓度的不同食品添加剂溶液,间隔一定时间观察现象,放置一段时间后,进行黄酮含量的测定和抗氧化活性的测定。

(3) 常见金属离子与山楂黄酮作用的测定

配制 0.10 mol/L 的硫酸锌、氯化钙、氯化镁、氯化钾、硝酸锰、氯化钴、氯化铝、氯化钠、硫酸铁的溶液,各取 10 mL 的山楂溶液,加入 1 mL 的金属离子溶液,在 pH = 7 的条件下静置不同时间后,观察现象,放置 1 h 后进行黄酮含量的测定和抗氧化活性的测定。

2 结果与分析

2.1 提取条件的确定

2.1.1 浸提温度的影响 按 1.3.3 中(1)的方法测定浸提温度对提取山楂黄酮的影响,结果见图 1。

由图 1 可知,用蒸馏水提取山楂中黄酮时,若温度太低,提取的速度较慢,含量也较低;但温度超过 50 ℃时,黄酮稳定性降低,含量减少,故适宜温度选择为 50 ℃。

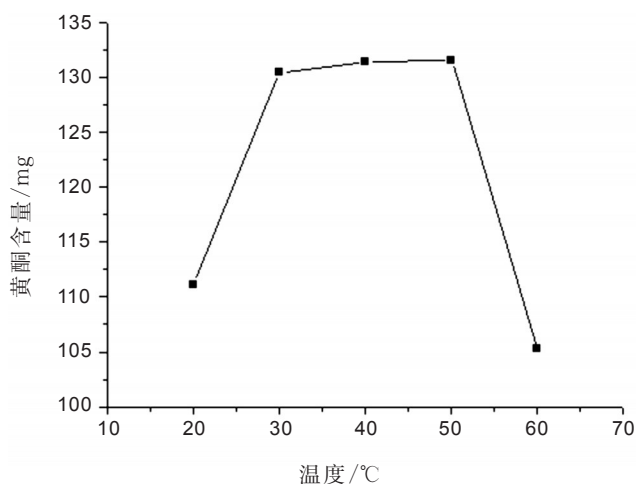


图 1 浸提温度对黄酮含量的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on content of flavonoids extracted with distilled water

2.1.2 料液比的影响 按 1.3.3 中(2)的方法测定料液比对提取山楂黄酮的影响,结果见图 2。

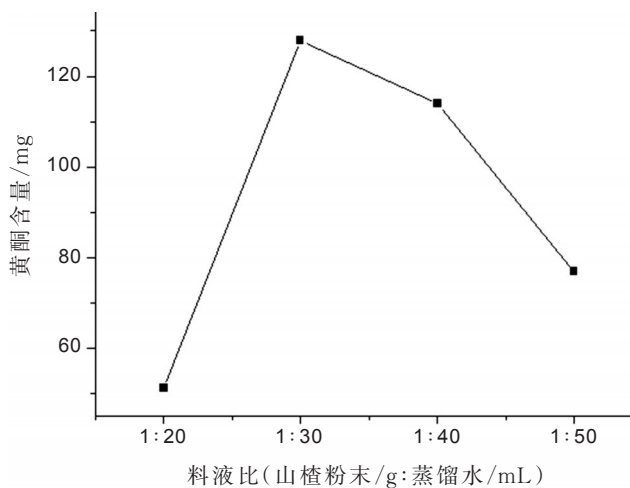


图 2 料液比对黄酮含量的影响

Fig. 2 Effect of extraction solid-liquid ratio on content of flavonoids extracted with distilled water

由图 2 可知,蒸馏水为提取剂提取山楂中的黄酮时,适宜料液比为 1:30。

2.1.3 浸提酸度的影响 按 1.3.3 中(3)的方法测定 pH 值对提取山楂黄酮的影响,结果见图 3。

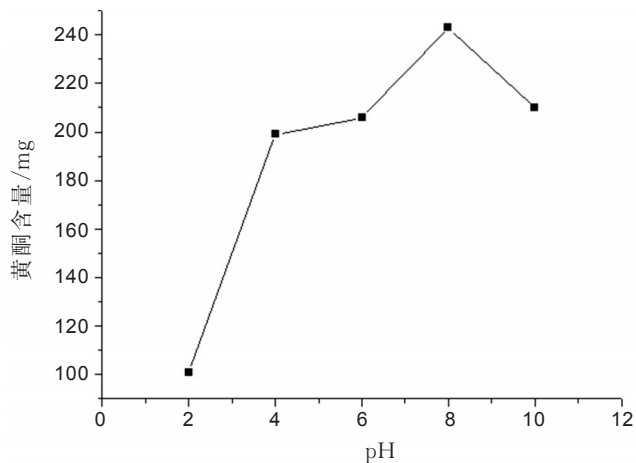


图 3 浸提酸度对黄酮含量的影响

Fig. 3 Effect of extraction acidity on content of flavonoids extracted with distilled water

由图3可知,蒸馏水作提取剂提取山楂中的黄酮适宜酸度为 $\text{pH} = 8$ 。

2.2 提取物中黄酮类物质的初步鉴定

2.2.1 显色反应结果 将蒸馏水溶剂提取液和乙醇溶剂提取液用旋转蒸发仪蒸发浓缩成膏状,然后用甲醇溶解,根据1.3.4中(1)的操作方法,加入各种显色剂的显色反应实验结果见表1。

表1 显色反应结果

Tab. 1 Results of color reaction

显色剂	蒸馏水提取液		乙醇提取液	
	可见光显色	紫外光显色	可见光显色	紫外光显色
CK	灰黄	黄绿	灰黄	黄绿
氨水	黄	黄绿	黄	亮黄
AlCl_3 溶液	灰黄	黄绿荧光	黄	黄绿荧光
Na_2CO_3 溶液	灰黄	亮黄	灰黄	黄棕
浓 H_2SO_4	灰黄	深黄橙	灰黄	深黄橙
$\text{HCl} + \text{Mg}$	灰黄	红	灰黄	紫红

由显色反应实验结果可知,提取液显色反应现象与黄酮化合物和黄酮醇相似,与文献[18-19]报道一致。黄酮醇和黄酮化合物可经盐酸镁粉还原生成花色素而显色。能与铝盐反应生成有颜色的配合物,是因为黄酮醇和黄酮化合物分子中有邻二酚羟基,能与酸和碱反应,与分子内酚羟基及 γ -吡喃酮环有关。

2.2.2 紫外-可见光谱的测定结果 按1.3.4中(2)的操作方法,测定了山楂提取物的紫外-可见光谱,结果见图4。

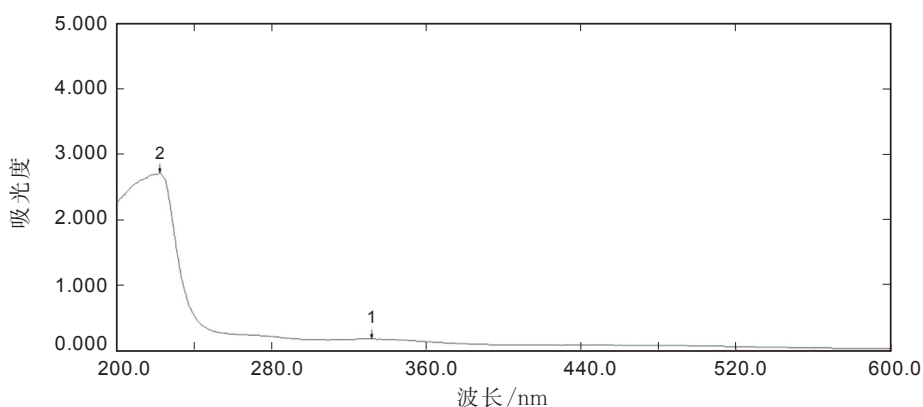


图4 蒸馏水的山楂提取液的吸收光谱

Fig. 4 Absorption spectra of extraction solution of hawthorn extracted with distilled water

由图4可见:蒸馏水提取液的紫外-可见吸收峰出现在222.50、330.00 nm处,这进一步说明山楂提取液的主要成分为简单黄酮类和黄酮醇类。

2.3 山楂黄酮的理化性质

2.3.1 食品添加剂与山楂黄酮的作用 按1.3.5中(1)和(2)的操作步骤得到的实验结果见图5和图6。

由图5和图6可知:常见食品添加剂对山楂黄酮含量有一定影响,蒸馏水为溶剂提取的山楂黄酮含量为248.12 mg,当加入枸橼酸后黄酮含量降低到20.69 mg,说明食品添加剂与山楂黄酮有一定的化学作用。常见的食品添加剂对山楂黄酮抗氧化活性也有一定的影响,其中枸橼酸影响较小,蔗糖和维生素C影响较大。

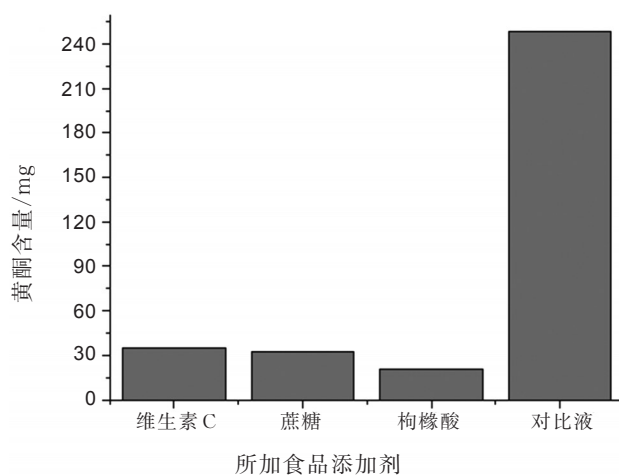


图 5 食品添加剂对山楂提取液黄酮含量的影响

Fig. 5 Effect of food additives on content of flavonoids from hawthorn extraction solution

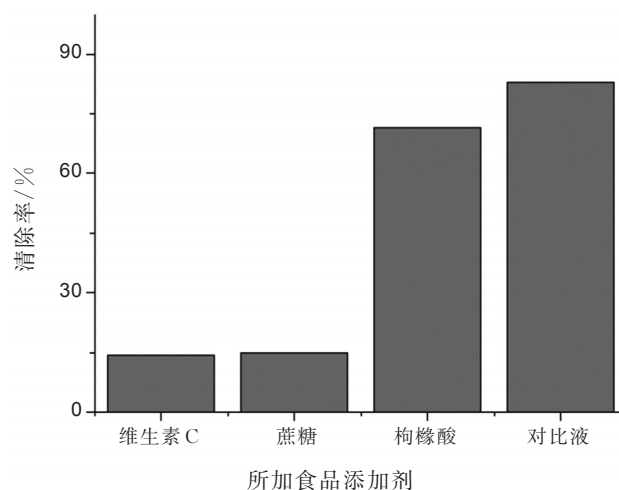


图 6 食品添加剂对山楂提取液黄酮抗氧化活性的影响

Fig. 6 Effect of food additives on antioxidant activity of hawthorn extraction solution

2.3.2 常见金属离子与山楂黄酮的作用 按 1.3.5 中(1)和(3)的实验步骤,得到常见金属离子对山楂提取液黄酮含量的影响,结果见图 7 和图 8。

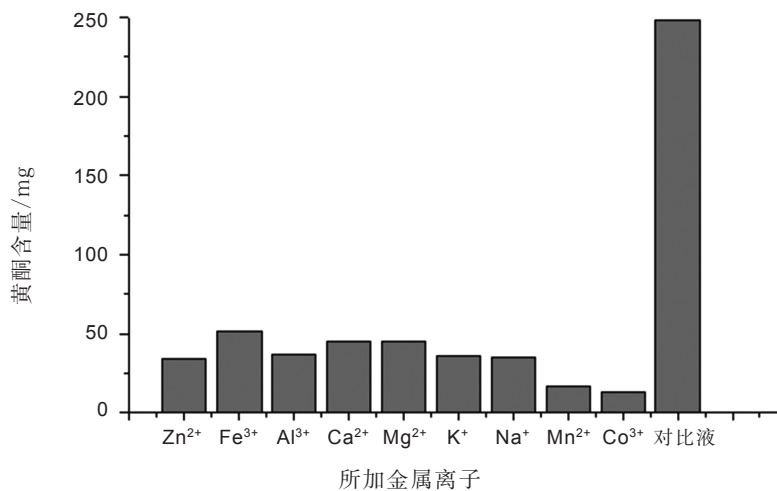


图 7 金属离子对山楂提取液黄酮含量的影响

Fig. 7 Effect of metal-ion on content of flavonoids from hawthorn extraction solution

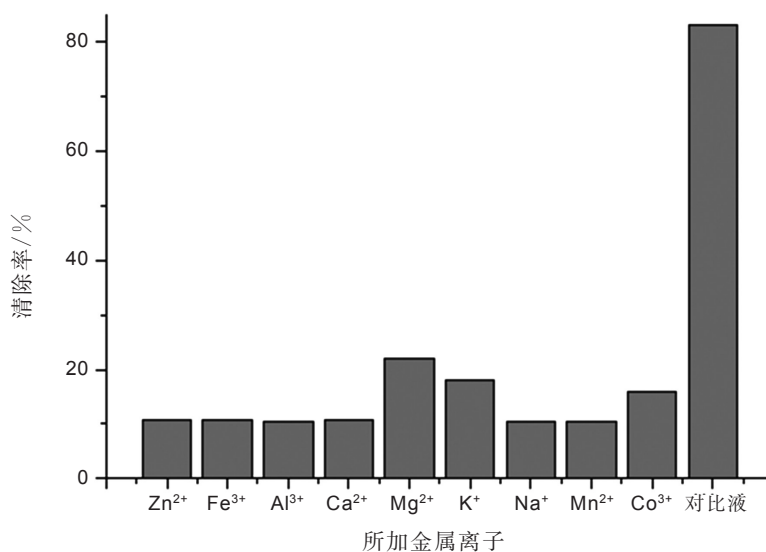


图8 金属离子对山楂提取液黄酮抗氧化活性的影响

Fig. 8 Effect of metal-ion on antioxidant activity of hawthorn extraction solution

由图7和图8可知:所加金属离子对蒸馏水作为溶剂提取的山楂黄酮含量有一定影响,蒸馏水为溶剂提取的山楂黄酮含量为248.12 mg,当加入Co³⁺离子后影响最大,降低到13.28 mg,这可能是由于Co³⁺的电子结构为3d⁶,与山楂黄酮中的配位原子结合为金属配合物时,稳定化能最大,使得Co³⁺与山楂黄酮作用力最强,所以黄酮含量降低最多。所加金属离子对山楂黄酮抗氧化活性也有一定的影响^[20],抗氧化活性均有一定的降低,其中加入Mg²⁺和K⁺离子影响相对较小。

3 结语

本研究结果表明:用廉价溶剂水提取山楂中黄酮的效果良好,提取工艺条件为:提取时间2 h,温度50℃,山楂与蒸馏水的料液比为1:30,酸度pH=8,提取的山楂黄酮含量为248.12 mg,黄酮得率4.96%,说明用水提取山楂黄酮的效果较好。初步鉴定山楂黄酮为黄酮醇类和简单黄酮类。常见食品添加剂对山楂黄酮含量及抗氧化活性有一定影响;所加金属离子对山楂黄酮含量有一定影响,Co³⁺离子影响最大,所加金属离子对山楂黄酮抗氧化活性也有一定的影响,其中加入Mg²⁺和K⁺离子影响相对较小。

参考文献 (References)

- [1] AI QURRAAN A F, SAWWAN J S, AI ABDALLAT A M. Analysis of phenylalanine ammoniolyase gene expression in callus cells of hawthorn (*Crataegus aronia* L.) [J]. Journal of Food Agriculture and Environment, 2012, 10: 572-576.
- [2] 吴士杰,李美,杨晓芮,等. 山楂化学成分及药理作用的研究[J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 316-319.
- [3] CHANG Q, ZUO Z, CHOW M S S, et al. Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. *major*) fruits and a hawthorn drink [J]. Food Chemistry, 2006, 98: 426-430.
- [4] WANG X T, CHEN L L, QI J, et al. Quality and antioxidant activity detection of crataegus leaves using on-line high-performance liquid chromatography with diode array detector coupled to chemiluminescence detection [J]. Food Chemistry, 2012, 120: 929-933.
- [5] MANUELA B, MANILA C, AUGUSTO A, et al. Raw millefiori honey is packed full of antioxidants [J]. Food Chemistry, 2006, 97: 217-222.

- [6] ZORAN M, DORDE M, NADA K, et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts[J]. *Bioresourse Technology*, 2005, 96:873-877.
- [7] 杨海玲,吴丽丹,张益,等. 广山楂质量控制研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2016, 12(17):48-49.
- [8] 朱彦陈,胡慧明,邵峰,等. 南山楂化学成分与药理作用研究进展[J]. *江西中医药*, 2014, 45(12):67-69.
- [9] 尹利华,辛秀兰. 山楂功能性成分提取及分析方法的研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(12):297-300.
- [10] 巩育军,牛盛童,黄学峰,等. 离子液体双水相萃取山楂黄酮和多糖的研究[J]. *化学与生物工程*, 2014, 31(7):27-33.
- [11] 张恩平,段瑜,张淑红,等. 番茄总黄酮两种提取工艺优化及比较研究[J]. *北方园艺*, 2015(9):105-108.
- [12] 高文秀,赵文卓,李平平. 果胶酶酶解法辅助超声波法提取山楂中总黄酮的初步工艺优化[J]. *吉林化工学院学报*, 2013, 30(7):29-32.
- [13] 石太渊,毛红燕,马涛,等. 响应面法优化提取辽五味子黄酮工艺参数研究[J]. *中国酿造*, 2011(2):96-99.
- [14] 霍文兰,范小芹,赵天聪. 超声法提取山楂果中熊果酸和齐墩果酸的工艺研究[J]. *应用化工*, 2013, 42(10):1833-1835.
- [15] 荆雪冰,孙晓萌. 不同的山楂提取物其降血脂作用的对比[J]. *当代医药论丛*, 2015, 13(22):151-152.
- [16] 邵峰,谷丽菲,刘荣华,等. 不同产地山里红野山楂中总黄酮总有机酸含量比较[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(1):11-13.
- [17] 孙协军,李秀霞,刘雪飞,等. 山楂黄酮超声波辅助提取工艺参数优化研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(9):2013-2017.
- [18] 陈业高. 植物化学成分[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [19] 徐任生. 天然产物化学[M]. 北京:科学出版社,2004.
- [20] 化学化工学科组. 化学化工创新性实验[M]. 南京:南京大学出版社,2010.

(责任编辑:陈 旷)