

桑叶总黄酮提取工艺优化及体外抗氧化研究

胡玥婵 袁娅利 郭丽彬 柳娜 田国政*

(湖北民族大学生物科学与技术学院 湖北 恩施 445000)

摘要:研究超声波处理时间、乙醇浓度、液料比、水浴温度、水浴时间 5 个因素对桑叶总黄酮提取率的影响。用响应面优化提取工艺,并研究桑叶总黄酮的抗氧化能力。结果表明,提取桑叶总黄酮最佳工艺,为乙醇浓度 80.69%、水浴时间 86.13min、水浴温度 88.10℃时,提取率最高可达 37.58mg/g。该优选提取工艺稳定可行,桑叶总黄酮具有较强的抗氧化活性,为桑叶的开发应用提供了依据,在清除羟自由基时更是达到了 86.14%的清除率。

关键词:桑叶;总黄酮;超声波辅助提取;抗氧化性

DOI:10.14051/j.cnki.xddy.2019.12.001

桑树(*Morus alba* L.)属于种子植物门双子叶植物纲蔷薇目桑科桑属,为落叶乔木,桑叶是桑科植物桑的叶,约占桑树地上部产量的 64%^[1],每年可摘 3~6 次。黄酮类化合物是自然界中广泛存在的一大类化合物,其具有广泛的生理药理活性^[2-4]。黄酮类化合物具有 2-苯基色原酮结构,多为结晶性固体,少数为无定型粉末。在桑叶中,黄酮类化合物是其重要的活性成分。本研究利用超声波辅助提取黄酮,以破坏植物细胞壁,加速有效物质的溶解,以提高黄酮提取量^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料:桑叶采摘于湖北民族学院综合实验楼旁,105℃烘 30min,再将温度调至 80℃烘干,粉碎过 80 目筛,备用。

试验仪器:GZX-9140MBE 电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司上海),UV-2550 紫外可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司上海),TDL80-2B 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),CR21 高速冷冻离心机(日本日立公司),DFY-500 粉碎机(江阴市新友机械制造有限公司),DL-720J 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

试验试剂:芦丁(标准品),乙醇,NaNO₃,Al(NO₃)₃,NaOH,聚酰胺树脂,FeSO₄·7H₂O,H₂O₂,核黄素,甲硫氨酸,氮蓝四唑,DPPH 均为 AR。

1.2 方法

1.2.1 桑叶总黄酮反应液的吸收光谱。取标准溶液 10mL,置于 25mL 容量瓶中,加 30%酒精 2.5mL,加入 5% NaNO₃1mL,混匀,放置 6min,加入 10% Al(NO₃)₃1mL,混匀,放置 6min,加入 1mol/L NaOH 10mL,以 30%乙醇定容至 25mL,放置 15min。以不加标准溶液的相应溶液为空白对照,使用紫外可见分光光度计在 200~800nm 波长范围进行连续波长扫描。确定最大吸收峰波长为 505nm。

1.2.2 芦丁标准曲线的绘制及桑叶总黄酮的测定。量取 0.0,1.0,2.0,……,10.0mL 芦丁标准品溶液,分别置于 25mL 容量瓶中,加 30%乙醇溶液至 12.5mL,加入 5% NaNO₃1mL,混匀,放置 6min,加入 10% Al(NO₃)₃1mL,混匀,放置 6min,加

入 1mol/LNaOH 10mL,以 30%乙醇定容至 25mL,摇匀后放置 15min。在 505nm 波长下测定吸光度值,芦丁标准曲线为: $y=11.05x-0.0107$ ($R^2=0.9976$)。桑叶总黄酮含量的测定与标准曲线的方法一致。

1.2.3 超声波处理对桑叶总黄酮的提取率的试验设计。取 5g 的桑叶粉末于圆底烧瓶中,按液料比 1:20 的规格向烧瓶中加入 70%乙醇溶液,摇晃混匀,超声波分别处理 5、10、15、20、25min,于 80℃水浴锅中冷凝回流提取 120min,提取物 4000r/min 离心 15min,上清备用。取上清测定计算提取总黄酮提取率。

1.2.4 不同单因素处理对桑叶总黄酮的提取率的试验设计。设置不同乙醇体积分数(50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%)、液料比(1:20、1:30、1:40、1:50、1:60)、水浴时间(60min、90min、120min、150min、180min)、水浴温度(50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃)对桑叶进行回流处理,定容后提取液 4000r/min 离心 15min,测定提取液中总黄酮含量,计算桑叶中总黄酮的提取率。

1.2.5 响应面法实验设计方法。在单因素试验的基础上,选择对桑叶黄酮提取率影响最大的 3 个因素作为响应面优化设计的考察因素。响应面法选用 Box-Behnken 试验设计,试验的水平与因素设计见表 1。

表 1 试验水平与因素设计表

A:乙醇体积分数/%	B:水浴时间/min	C:水浴温度/℃
-1(75)	-1(60)	-1(80)
0(80)	0(90)	0(90)
+1(85)	+1(120)	+1(100)

1.2.6 桑叶总黄酮的纯化方法。首先用 90%乙醇多次煮沸聚酰胺,后用去离子水浸泡清洗至澄清。将桑叶黄酮过滤提取液与聚酰胺混合震荡 10h,桑叶总黄酮被聚酰胺吸附,用去离子水洗聚酰胺,至滤液无色。再用 80.69%乙醇多次洗脱,合并洗脱液,即为纯化后的桑叶总黄酮,并回收处理聚酰胺。

1.2.7 桑叶总黄酮体外抗氧化活性研究方法。(1)羟自由基清除能力测定。取 0.2mL、0.4mL、0.6mL、0.8mL、1.0mL 浓度为

基金项目:湖北民族大学大学生创新项目,项目编号 2017CX168

作者简介:胡玥婵(1997-),女,湖北武汉人,本科,学号:0715410007;袁娅利:071541004;郭丽彬,大学学号:071541010;柳娜,大学学号:071541012;通信作者:田国政(1964-),湖北鹤峰人,高级实验师,从事天然产物开发与利用。

0.02mg/mL 桑叶黄酮无水乙醇溶液于带塞试管中,并补加无水乙醇至 1.0mL。分别加入浓度为 0.2 mol/L 的 pH 值 7.4 磷酸盐缓冲液 2.0 mL,充分混匀后加入 1.0 mL 浓度为 1.865 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液,再次混匀后加入 1.0 mL 0.03% H₂O₂,于 37℃ 恒温水浴 60 min 后,在 536 nm 处分别测量加入桑叶黄酮样品的吸光度。以 Vc 代替样品作为阳性对照,计算羟自由基清除效率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_1 - A}{A} \times 100$$

式中: A₁ 为测量加入桑叶黄酮样品的吸光度, A 为未加入桑叶黄酮样品的吸光度。

(2) 超氧离子自由基清除能力测定。将 3 × 10⁻⁶ mol/L 的核黄素溶液和 0.01 mol/L 甲硫氨酸溶液在 25℃ 下 20w 光照培养箱光照 20 min,核黄素因光化反应产生超氧离子自由基^[6],再加入氮蓝四唑,使浓度为 1 × 10⁻⁴ mol/L,于 560nm 处测量吸光度值 A,可表示为超氧离子自由基的浓度。取上述反应体系 1mL 于带塞试管,滴 0.2mL、0.4mL、0.6mL、0.8mL、1.0mL 浓度为 0.02mg/mL 桑叶黄酮无水乙醇溶液于带塞试管中,并补加无水乙醇至总溶液 2.0mL。于 560nm 处分别测量各组混合溶液的吸光度 A₁, A - A₁ 即为超氧离子自由基减少的量。以抗坏血酸代替样品作为阳性对照,计算超氧离子自由基清除效率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A - A_1}{A} \times 100$$

(3) DPPH 自由基清除能力测定。取 0.2mL、0.4mL、0.6mL、0.8mL、1.0mL 浓度为 0.02mg/mL 桑叶黄酮无水乙醇溶液于带塞试管中,并补加无水乙醇至 1.0mL。加入 3.0mL 0.0004% 甲醇 DPPH 溶液,混匀,在 30℃ 下放置 30min,在 517nm 处测定吸光值,以未加样品的 DPPH 溶液为对照测定吸光度 A,以样品与 DPPH 反应后溶液测得吸光度 A₁,以 1mL 样品加上 3.0mL 0.0004% 的甲醇溶液测得吸光度为 B。抗坏血酸代替样品作为阳性对照,计算 DPPH 自由基清除能力^[7]。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - B}{A}\right) \times 100$$

2 结果与分析

2.1 超声波处理时间与桑叶总黄酮提取率的影响

由图 1 看出,超声波处理时间在 5~20min 间对桑叶黄酮得率变化较小,但远远高于未进行超声处理的桑叶黄酮得率。处理 20min 后,桑叶黄酮得率上升,说明超声波处理需要一定的时间。

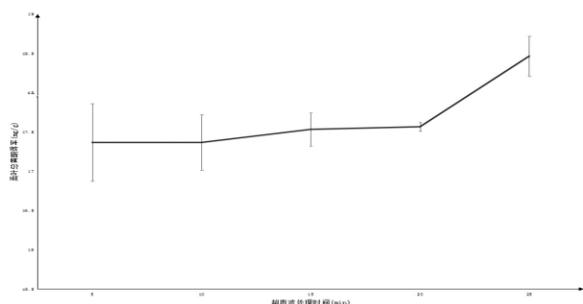


图 1 超声波处理时间与桑叶总黄酮得率的关系

2.2 乙醇体积分数对桑叶总黄酮提取率的影响

由图 2 看出,随着乙醇浓度的上升黄酮得率慢慢升高,乙醇浓度为 65% 时黄酮得率达到最高,以后变化不大。

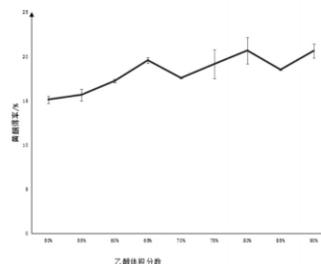


图 2 乙醇浓度对桑叶总黄酮提取率的影响

2.3 液料比对桑叶总黄酮提取率的影响

由图 3 看出,桑叶总黄酮提取率随着液料比的升高而慢慢上升,并在液料比超过 1:30 后上升渐渐变得平缓。

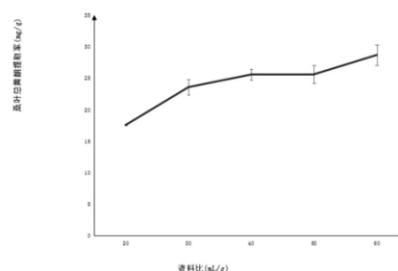


图 3 液料比对桑叶总黄酮提取率的影响

2.4 水浴时间对桑叶总黄酮提取率的影响

由图 4 看出,当水浴时间在 90min 时桑叶黄酮的提取率达到最高,之后有缓缓下降的趋势。

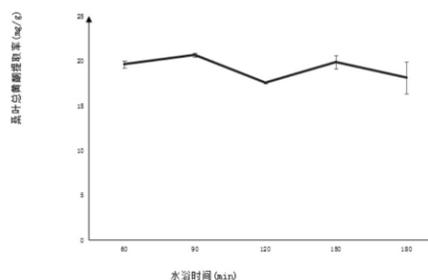


图 4 水浴时间对桑叶总黄酮提取率的影响

2.5 水浴温度对桑叶总黄酮提取率的影响

由图 5 看出,桑叶黄酮的提取率随水浴温度上升,在 90℃ 达到最高,在 100℃ 略有回降。

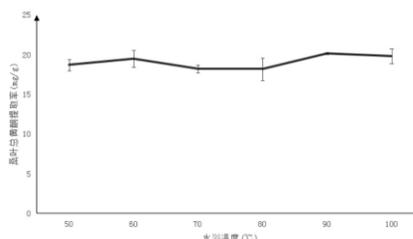


图 5 水浴温度对桑叶总黄酮提取率的影响

2.6 响应面优化

在单因素的基础上选择乙醇体积分数、水浴时间、温度

进行响应面试验,试验结果见表2。

从表3方差分析,模型 $F=135.74$ 和 $(Prob > F) < 0.0001$, 表明该模型是极显著的。模型的 F 值仅有 0.01% 的可能由于噪音出现较大的误差。模型失拟项 $Prob > F > 0.05$, 模型失拟项不显著,拟合程度良好,结果有效。其方程为 提取率(mg/g) = $3728 + 1.68 * A - 0.90 * B - 1.20 * C - 0.075 * A * B - 0.28 * A * C + 1.13 * B * C - 6.33 * A^2 - 4.38 * B^2 - 3.63 * C^2$

表2 实验方案及其提取率

试验号	乙醇体积分数(%)	水浴时间(min)	水浴温度(°C)	提取率(mg/g)
1	0	0	0	36.7
2	-1	-1	0	25.4
3	-1	0	+1	25.3
4	+1	0	+1	27.7
5	+1	+1	0	27.6
6	0	+1	+1	27.8
7	0	0	0	37.4
8	+1	-1	0	29.3
9	0	-1	-1	33.0
10	0	-1	+1	27.6
11	+1	0	-1	29.9
12	-1	+1	0	24.0
13	0	+1	-1	28.7
14	-1	0	-1	26.4
15	0	0	0	37.2
16	0	0	0	37.8
17	0	0	0	37.3

响应面分析模型认为在乙醇体积分数为 80.69%、水浴时间 86.13min、水浴温度 88.10°C 时,提取率最高可达 37.6mg/g。根据优化条件进行 3 次平行验证,测得平均值为 34.1mg/g,与预测值相差 3.5mg/g。

表3 回归模型的方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob > F
模型	383.60	9	42.62	135.74	< 0.0001
A- 乙醇浓度	22.45	1	22.45	71.48	< 0.0001
B- 水浴时间	6.48	1	6.48	20.64	0.0027
C- 水浴温度	11.52	1	11.52	36.69	0.0005
AB	0.023	1	0.023	0.072	0.7967
AC	0.30	1	0.30	0.96	0.3590
BC	5.06	1	5.06	16.12	0.0051
A ²	168.58	1	168.58	536.87	< 0.0001
B ²	80.68	1	80.68	256.96	< 0.0001
C ²	55.41	1	55.41	176.45	< 0.0001
残差	2.20	7	0.31		
失拟项	1.57	3	0.52	3.33	0.1376
纯误差	0.63	4	0.16		
总和	385.80	16			

采用 Design Expert 8.05 软件作图,如图 6 所示,乙醇体积分数分别与水浴时间、水浴温度对桑叶总黄酮的提取率的影响随着乙醇体积分数的升高,呈现提取率先升高后降低的趋

势,两者相互作用的等高线近为椭圆形,表明乙醇体积分数分别与水浴时间、水浴温度之间的交互作用显著,水浴时间与水浴温度两者相互作用的等高线近似圆形,两者的交互作用影响不显著。

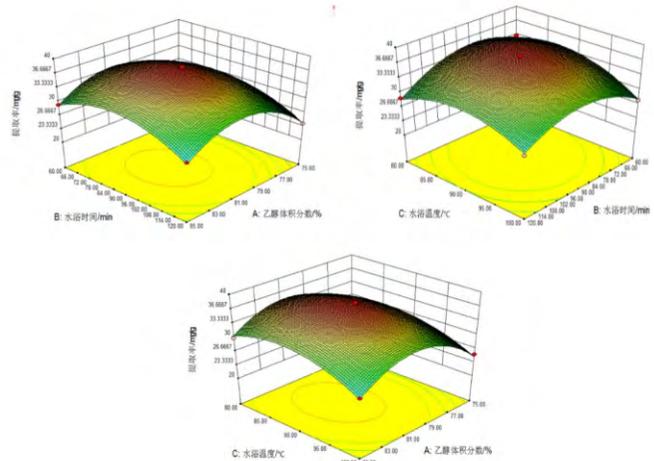


图6 两因素交互作用对桑叶总黄酮提取率的响应面图

2.7 桑叶总黄酮的体外抗氧化性

2.7.1 羟自由基清除能力。由图 7 看出,桑叶黄酮在浓度为 2.4 μg/mL 时能清除羟自由基能力最强,清除率为 86.14%。高于抗坏血酸浓度为 1.6 μg/mL 时取得的最高清除率。

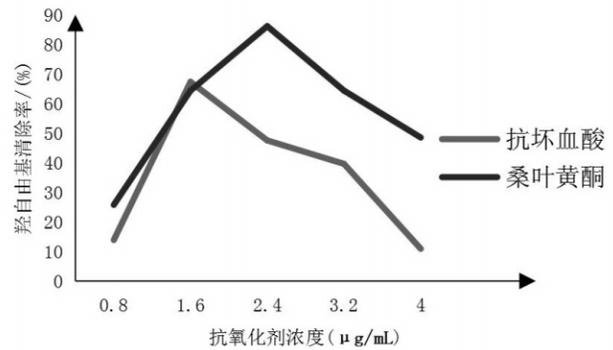


图7 桑叶黄酮清除羟自由基能力

2.7.2 超氧离子自由基清除能力。由图 8 看出,桑叶黄酮在浓度为 4 μg/mL 时能清除超氧离子自由基能力最强,清除率为 70.00%。高于抗坏血酸浓度为 6 μg/mL 时取得的最高清除率。

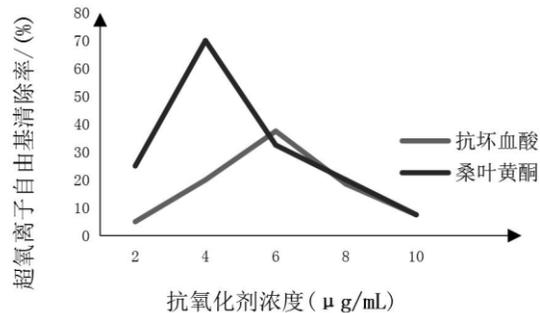


图8 桑叶黄酮清除超氧离子自由基能力

2.7.3 DPPH 自由基清除能力。由图 9 看出,桑叶黄酮在浓度

竹子组织培养研究进展

张春玲

(国家知识产权局专利局专利审查协作江苏中心 江苏 苏州 215163)

摘要:通过竹子组织培养研究相关资料的查阅,简要概述了胚培养、以芽繁芽以及愈伤组织培养等方法的研究进展。并据此分析了竹子组织培养研究的特点以及注意事项,以为竹子组织培养研究提供借鉴和参考。

关键词:竹子;组织培养;研究进展

竹子是森林资源的重要组成部分,其适应性强、生长快、产量高、用途广,并具有良好的经济、社会和生态效益。但由于竹类植物开花间隔期长,且开花期无法预测,种子获取十分困难,而埋鞭、埋秆、埋节等传统繁殖方法具有消耗种竹多、种苗运输不便、劳动强度大、繁殖系数低等缺点。植物组织培养技术不仅能适用于大规模的苗木繁殖,还是遗传研究的重要组成部分。

1 竹子组织培育研究进展

1.1 胚培养

胚培养是竹子组织培养应用中取得成功的代表。1968年,首次出现成熟种胚离体培养为植株的有关报道;时隔2年,Nadgauda以印度刺竹、勃氏甜龙竹以及牡竹3个品种的竹子幼芽在组培环境下进行培养,使得竹子成功开花结实;1995年,张桂和利用麻竹胚芽,实现离体培养及快速繁殖;1998年,谭宏超等利用植物激素诱导竹子胚胎,成功培育出无菌苗;2000年,谢庆华等发现竹子胚胎在不同生长环境下所表现出的差异,消毒方式对种子萌芽带来的影响;2006年,耿树香将巨龙竹小穗种进行培养基增殖培育与诱导培育对比试验,发现培养基中抗褐变的最优组合;2008年,岳晋军发现以毛竹种胚为外植体的最佳消毒处理方式;同年,陈懿涵初步建立毛竹种胚组织培养体系;2009年,夏登云对慈竹种

胚到愈伤组织及丛生芽进行研究,获得最佳消毒方式与最佳培养基;2012年,曹雄丽等通过32种经济竹种的研究发现,以选用种子作为外植体组培效果最好;2015年,赵康研究了诱导佛肚毛竹种胚愈伤组织的最佳激素组合,并筛选出有效防治褐化的方法;2018年,郑祥乾等获得云南甜龙竹和黄竹种子表面消毒的最佳组合。

1.2 以芽繁芽

以芽繁芽在竹子品种筛选以及母性植株保持方面优势较为明显,能实现无性系植株的繁殖和利用。1987年,Banik在液体培养基和固体培养基中培育出不同胚芽的丛芽;2002年,王光萍通过观赏竹嫩芽的培育发现了多种再生植株;次年,张关楚等发现了KT对竹子生长的作用;2004年,苏海等用带腋芽的茎段作为外植体在马来甜龙竹的组织培养和快繁研究方面获得较大成功;张铁等以勃甜龙竹嫩枝诱导丛生芽获得再生植株;2005年,王光萍等分别对菲白竹等11种观赏竹种进行诱导丛生芽及再生植株,指出不同竹种丛生芽生根难易差别较大,丛生竹生根率高,而散生竹则较难生根;2006年,李在留等对巨龙竹幼年竹和成年竹材料进行了系统研究,筛选出各阶段的最佳培养基;张春霞等研究了菲白竹的组织培养微繁技术,获得其增殖和生根的最佳培养基;顾小平等对小佛肚竹、凤尾竹和孝顺竹幼竹的茎尖和带节茎段

为 $4\mu\text{g/mL}$ 时能清除超氧离子自由基能力最强,清除率为64.56%。高于抗坏血酸浓度为 $2\mu\text{g/mL}$ 时取得的最高清除率。

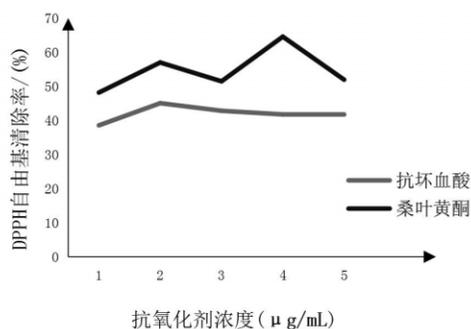


图9 桑叶黄酮清除 DPPH 自由基能力

3 结论

通过单因素和多因素分析,乙醇体积分数为80%、水浴时间86min、水浴温度 88°C 时,在此条件下提取率最高可达 37.6mg/g 。桑叶中的黄酮类活性成分对DPPH自由基、羟基自

由基和超氧自由基有明显清除作用,具有强抗氧化能力,在浓度为 $2\sim 4\mu\text{g/mL}$ 抗氧化能力最强。

参考文献

- [1] 赵丽君,齐凤兰,瞿晓华,等.桑叶的营养保健作用及综合利用[J].中国食物与营养,2004(2)
- [2] 陈玲玲,刘炜,陈建国,等.桑叶黄酮对糖尿病小鼠调节血糖的作用机制研究[J].中国临床药理学杂志,2010(2)
- [3] 江正菊,宁林玲,胡霞敏,等.桑叶总黄酮对高脂诱导大鼠高血脂及高血糖的影响[J].中药材,2011(1)
- [4] 周军,张福华.桑叶黄酮对四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2013(19)
- [5] 王育慷.超声波原理与现代应用探讨[J].贵州大学学报(自然科学版),2005(3)
- [6] 贾之慎,唐孟成,朱祥瑞.桑树黄酮类化合物清除超氧离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的研究[J].浙江农业大学学报,1996(5)
- [7] 俞坚.桑叶黄酮化合物提取、分离鉴定及其抗氧化活性研究[D].浙江:浙江工商大学硕士研究生学位论文,2007

(责任编辑 王蔓)