

# 桑树皮黄酮的超声波提取 及体外抗氧化作用研究

王 晶, 任发政\*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 教育部功能乳品重点实验室, 北京 100083)

**摘 要:** 采用超声波提取法对桑树皮中总黄酮进行提取, 通过单因素及正交试验确定了桑树皮黄酮超声波提取法的最佳工艺条件: 物料粒度大于 60 目, 使用 80% 乙醇, 功率为 325W, 料液比 1:10 条件下提取 30min, 黄酮的得率为 7.841%。利用清除 DPPH 自由基的能力和还原力作为指标测定了桑树皮黄酮的抗氧化活性。结果表明, 桑树皮黄酮有较强的抗氧化能力。超声波提取法与常规热回流提取法的效果及黄酮提取物的抗氧化作用相当。

**关键词:** 桑树皮; 黄酮; 超声波; 抗氧化

Study on Ultrasonic Wave Extraction and Antioxidant Activities of Flavonoids in *Mori* Barks

WANG Jing, REN Fa-zhang\*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Key Laboratory of Functional Dairy, Ministry of Education, Beijing 100083, China)

**Abstract:** This investigation adopted ultrasound extract to extract flavonoids in *Mori* barks. According to the orthogonal test, the optimum extraction conditions are: 60 mesh granularity, 80% ethanol, 325 W ultrasound power, solid/liquid ratio 1:10 and 30 min processing time with flavonoid yield 7.841%. The antioxidant activities of flavonoid extracts were evaluated by two antioxidant assays, for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals scavenging and reducing power. In comparison with the heat reflux extraction, the results showed that the flavonoid contents and antioxidant activities of extracts obtained by two different extractions are comparable.

**Key words** *Mori* bark; flavonoids; ultrasound extraction; antioxidant activity

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0206-04

桑树皮是桑科桑属植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根茎外皮, 可用于中药材。桑树皮性平味苦, 人肝、脾、肺、肾经<sup>[1]</sup>, 有祛风湿、利关节、行水气之功效。近年来, 药理研究表明桑树的根、茎、叶以及桑椹具有美白、抗衰老、降压、降糖、抗癌、抗病毒、软化血管等作用<sup>[2-4]</sup>。其中, 主要的活性成分是黄酮类化合物, 包括桑素(mulberrin)、桑色烯(mulberrochromene)、环桑素(cyclomulberrin)、环桑色烯(cyclomulberrochromene)和桑酮(kuwanon)等<sup>[5-7]</sup>。

传统植物中黄酮类化合物的提取方法多以热回流为主, 操作虽简单, 但提取时间长, 温度高, 费时且会使黄酮类物质遭到不同程度的破坏。超声波提取法是近年来兴起的新方法, 很多研究表明, 利用超声波技术可加速植物材料中的有效成分进入溶剂, 增加有效成分的提取率, 缩短提取时间, 并可避免高温对提取成

分的影响<sup>[8-12]</sup>。据知, 超声技术应用于提取桑树皮黄酮类物质的研究尚未见报道。

中国是种桑养蚕的大国, 每年都有大量的桑树皮产生, 然而除少量入药外, 大部分都被视为废物焚烧处理, 不仅浪费资源, 而且还污染环境。本研究的目的就是利用超声波这种在较低温度下省时、高效的提取方法对桑树皮中黄酮类物质进行提取。同时, 对桑树皮黄酮提取物的抗氧化活性进行研究, 为桑树皮的有效利用提供了一些理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

桑树皮 产于广西。

芦丁、DPPH 分析纯, Sigma 化学公司; 亚硝

收稿日期: 2007-05-21

作者简介: 王晶(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能乳品。E-mail: xmwd020329@126.com

\* 通讯作者: 任发政(1962-), 男, 教授, 博士, 研究方向为乳品及肉品科学。E-mail: renfazheng@263.net

酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、无水乙醇、铁氰化钾、三氯乙酸(TCA)、氯化铁、BHT、抗坏血酸(VC)、生育酚(VE) 均为分析纯,市售。

AS7240AT(H)型超声波清洗机;UV-2102 PC型紫外可见分光光度计;循环水式多用真空泵SHB-ⅢA;真空冷冻干燥机。

## 1.2 方法

### 1.2.1 标准曲线的绘制<sup>[13]</sup>

精确称取芦丁0.0152g,加适量乙醇及蒸馏水,加热溶解,冷却后用蒸馏水定容至50ml,摇匀备用。用移液管分别量取芦丁标准液、2、5、8ml置于25ml容量瓶中,用30%乙醇补充至12.5ml,加入0.7ml NaNO<sub>2</sub>溶液摇匀,放置5min后加入0.7ml Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>溶液,6min后再加入5ml NaOH溶液,用30%乙醇溶液定容,10min后于波长510nm处进行比色测定,以试剂空白参比。最后以吸收度(A)为纵坐标,芦丁浓度C(mg/ml)为横坐标,绘制标准曲线。得回归曲线:  $A=10.515C + 0.0142$ ,  $R^2=0.9998$ 。

### 1.2.2 提取方法及桑皮总黄酮的测定

#### 1.2.2.1 原料处理

将干燥的桑树皮粉碎过筛,加石油醚(1:10)在40℃热浸提1h脱脂,烘干备用。

#### 1.2.2.2 桑皮总黄酮的测定

准确称取5.00g脱脂桑树皮粉于100ml三角烧瓶中。按要求加入一定量的乙醇,在30℃温度下超声波辅助提取一定时间,抽滤,加30%乙醇定容于100ml容量瓶中作为待测液。按1.2.1的方法测出吸光度,据标准曲线计算出桑皮黄酮的含量。

### 1.2.3 提取工艺的优化<sup>[14-15]</sup>

选择乙醇为提取溶剂,在预实验中发现,物料浸泡时间对浸出率几乎无影响。因此,本实验主要讨论物料粒度、超声波功率、超声波提取时间、乙醇浓度和料液比对黄酮得率的影响,通过单因素和正交试验,选取最佳的黄酮提取工艺。

### 1.2.4 黄酮提取物体外抗氧化作用的测定

本实验选用了清除DPPH自由基的能力以及还原力作为测定桑树皮黄酮提取物的抗氧化能力的指标。同时以BHT、VC以及VE作为对照。

#### 1.2.4.1 对DPPH自由基的清除能力<sup>[16]</sup>

将1.5ml的样品(0.2~2mg/ml)与等量的DPPH ( $2 \times 10^{-4}$ mol/L,乙醇溶解)溶液均匀的混合,室温下避光静置30min在517nm下测定其吸光值A<sub>i</sub>。同时用同法测定1.5ml DPPH ( $2 \times 10^{-4}$ mol/L)溶液与等量的无水乙醇混合后的吸光值A<sub>e</sub>,以及1.5ml样品与等量无水乙醇混合后的

吸光值A<sub>j</sub>。样品对DPPH的清除率= $[1 - (A_i - A_j) / A_e] \times 100\%$ 。式中,以BHT、VC、VE作对照。

#### 1.2.4.2 还原力<sup>[17]</sup>

1ml的样品(1~5mg/ml)与2.5ml的磷酸缓冲液(0.2mol/L, pH6.6)及2.5ml的铁氰化钾(1%)混合,于50℃下保温20min。之后,将2.5ml 10%的TCA加入到上述混合液中,离心。取2.5ml上清液,加入2.5ml的蒸馏水以及0.5ml的FeCl<sub>3</sub>(0.1%)混匀后于700nm下读取吸光度。吸光度越大,还原力越强。其中,以BHT、VC、VE作对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 正交试验设计

根据单因素试验结果,可将物料粒度固定为60目,超声波功率设为325W,选择对实验影响较大的3个因素:乙醇浓度、料液比及提取时间,各设置3水平,采用L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交试验表,以确定桑皮总黄酮物质的最佳提取条件。

表1 超声波提取桑树皮黄酮的正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test of ultrasonic wave extraction

A 乙醇浓度(%)	B 料液比	C 提取时间(min)
60	1:10	20
70	1:15	30
80	1:20	40

表2 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)超声波提取桑树皮黄酮的正交试验结果表

Table 2 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) Results of orthogonal test of ultrasonic wave extraction

序列	A 乙醇浓度	B 料液比	C 提取时间	吸光度	黄酮得率(%)
1	1	1	1	0.268	6.034
2	1	2	2	0.295	6.676
3	1	3	3	0.274	6.177
4	2	1	2	0.318	7.223
5	2	2	3	0.299	6.771
6	2	3	1	0.305	6.914
7	3	1	3	0.332	7.556
8	3	2	1	0.320	7.271
9	3	3	2	0.346	7.889
k <sub>1</sub>	6.296	6.938	6.740		
k <sub>2</sub>	6.969	6.906	7.049		
k <sub>3</sub>	7.572	6.993	6.890		
R	1.276	0.087	0.523		

注:本试验数据均为三次试验结果的平均值。

通过对乙醇浓度、料液比、提取时间的综合评价,由分析结果可以看出,对黄酮得率影响的主次顺序为A > C > B,即乙醇浓度对桑皮黄酮的提取结果影响最大,其次是超声提取的时间,料液比的影响最小。根据方差分析,乙醇浓度对黄酮的得率影响极显

表3  $L_9(3^3)$  超声波提取桑树皮黄酮的正交试验的方差分析  
Table 3 Variance analysis of orthogonal test of ultrasonic wave extraction

因素	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
乙醇浓度	2.446	2	50.958	**
料液比	0.012	2	0.250	
提取时间	0.466	2	9.708	*
误差	0.05	2		

注: \*\* 极显著影响( $p < 0.01$ ), \* 显著影响( $p < 0.05$ )。

著( $p < 0.01$ ), 提取时间也有显著的影响( $p < 0.05$ ), 料液比的影响很小。从正交试验结果得到最佳的提取工艺为  $A_3B_3C_2$ , 但由于料液比的影响很小, 从节省能源的角度考虑, 可选取工艺条件为以 80% 的乙醇, 料液比为 1:10, 超声波处理 30min。

## 2.2 超声波法与常规回流法的黄酮得率的比较

称取过 60 目筛的脱脂桑皮粉 5.00g, 用 80% 的乙醇按 1:10 的物料比 80℃ 条件下提取 1h, 与之前确定的超声波提取工艺进行比较, 实验结果见表 4。可见, 超声波提取法与传统的热回流相比, 可在较低的温度和较少的时间下得到更高的总黄酮得率。

## 2.3 体外抗氧化作用结果

桑树皮黄酮具有较强的清除 DPPH 自由基的能力和

表4 超声波法与热回流法提取桑树皮黄酮的得率比较  
Table 4 Compare of flavonoid yields obtained by ultrasonic wave extraction and heat reflux extraction respectively

提取方法	超声波提取	热回流提取
总黄酮得率(%)	7.841	7.838

较高的还原力, 且超声波得到的黄酮粗提物(UE)与热回流得到的黄酮粗提物(HRE)的抗氧化能力相似。

### 2.3.1 DPPH 自由基的清除能力

不同浓度的样品及对照对 DPPH 的清除能力见图 1, 无论是超声波提取还是热回流提取, 得到的黄酮提取物在 2mg/ml 时, 对 DPPH 的清除率都大于 90%。虽然 BHT 和 VC 在 0.2mg/ml 时的清除率已经很高, 但是 VE 在 2mg/ml 时的清除率才 6.8%。

### 2.3.2 还原力

从图 2 可见, 在低浓度时, 黄酮提取物的还原能力要比对照品 BHT、VC、VE 都要低, 但当浓度大于 3mg/ml 时, VE 的还原能力趋于平缓, 而黄酮提取物的还原力却在不断增加, 并逐渐大于 VE 的还原力。

## 3 结 论

确定的超声波法提取条件为: 桑皮粉过 60 目筛, 使用 80% 乙醇, 以 1:10 的物料比在功率为 325W 下提

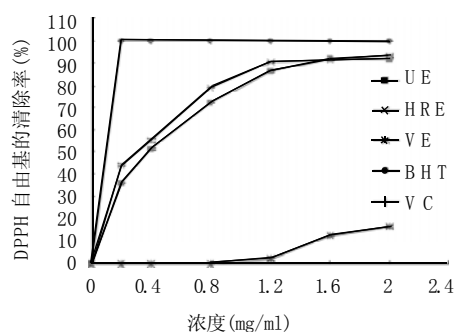


图1 不同浓度的桑树皮黄酮提取物、VE、BHT、VC 对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.1 Free radical scavenging activities of different amount of flavonoid extracts from Mori barks, BHT, ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol on DPPH

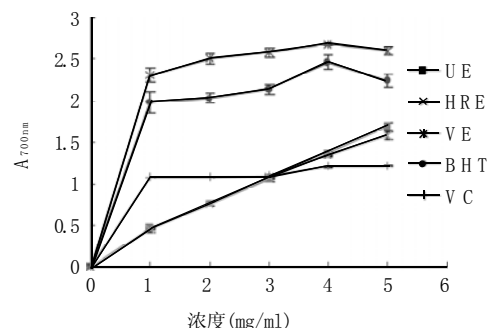


图2 不同浓度的桑树皮黄酮提取物、VE、BHT、VC 的还原力  
Fig.2 Reducing power of different amounts of flavonoid extracts from Mori barks, for BHT, ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol

取 30min, 黄酮的总得率可达 7.841%。本法的黄酮得率较高, 且节省了大量的时间和能源, 降低了生产成本, 为今后桑皮黄酮的提取和利用提供了很好的参考。

通过对黄酮提取物抗氧化活性的研究可得桑树皮的黄酮提取物有一定的抗氧化能力, 虽然与 BHT、VC 相比有一定差距, 但比 VE 的抗氧化性要强, 且成本低廉, 没有毒害。因此, 将桑树皮黄酮提取后可考虑用作食品的抗氧化剂, 或者作为功能因子添加到饲料及肥料中, 从而增加桑树的附加值。

## 参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000:244.
- [2] 邹宇晓, 廖森泰, 刘学铭, 等. 桑树资源治疗糖尿病研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(3): 265-268.
- [3] 顾寅钰, 石瑞常, 张凤林. 蚕桑副产物的综合利用及其药用价值[J]. 北方蚕业, 2002, 23(93): 22-23.
- [4] 黎琼红, 张国刚, 董淑华. 桑属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(5): 386-390.
- [5] 何雪梅, 廖森泰, 刘吉平. 桑树的营养功能性成分及药理作用研究进展[J]. 蚕业科学, 2004, 30(4):390-393.
- [6] 肖培根. 新编中药志:第三卷 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002:655-

- 663.
- [7] 高学敏. 中药学: 下册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 1274-1276.
- [8] 蔡健, 华景清, 王微, 等. 黄酮提取工艺研究进展[J]. 淮阴工学院学报, 2003(5): 82-85.
- [9] 卢艳花. 中药有效成分提取分离技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 71-72.
- [10] VINATORU M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2001(8): 303-313.
- [11] ENTEZARI M H, NAZARY S H, KHODAPARAST M H. The direct effect of ultrasound on the extraction of date syrup and its micro-organisms[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2004(11): 379-384.
- [12] HENERA M C, LUQUE D E, CASTRO M D. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection[J]. Journal of Chromatography, 2005, 1100: 1-7.
- [13] 陈发奎. 常用中草药有效成分含量测定[M]. 北京: 人民教育出版社, 1997, 288-291.
- [14] 高中松, 彭密军, 高亮, 等. 桑叶黄酮的提取分离纯化研究[J]. 安徽农学通报, 2005, 11(6): 48-50.
- [15] 王延峰, 李延清, 郝永红, 等. 超声法提取银杏叶黄酮的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 166-167.
- [16] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. Lebensmittel Technology, 1995, 28: 25-30.
- [17] OYAIZU M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44: 307-315.