

# 人参花蕾提取液清除羟基自由基作用研究

马 勇, 邵立新

(渤海大学生物与食品科学学院, 辽宁 锦州 121000)

**摘 要:** 以人参花蕾为原料, 以 50% 的乙醇水溶液为提取剂, 得到人参花蕾提取液, 其中人参皂苷提取率为 8.17%。向 Fenton 反应体系中加入人参花蕾提取液, 可以有效地清除体系中的羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )。清除  $\cdot\text{OH}$  的效果随着提取液加入量的增加而增大, 加入 5.00% 提取液(人参皂苷含量  $12.30\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )时, 清除效果最佳。

**关键词:** 人参花蕾; 提取液; 人参皂苷; 清除自由基

## Study on Hydroxy Free Radical Scavenging Effect of Ginseng Flowers Extract

MA Yong, SHAO Li-xin

(College of Biotech and Food Science, Bohai University, Jinzhou 121000, China)

**Abstract:** Ginseng flowers were extracted by using 50% ethanol aqueous solution to prepared ginsenoside extract. The yield of ginsenoside is 8.17%. The ginsenoside extract added into Fenton reaction system can scavenge hydroxyl free radical ( $\cdot\text{OH}$ ) efficiently. The scavenging effect increases with the addition amount of the ginsenoside extract rising, and is up to the highest at the addition amount of 5% (content of ginsenoside  $12.30\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

**Key words:** ginseng flower; extract; ginsenosid; scavenging free radical

中图分类号: TS252

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)10-0101-04

人参花为完全花, 由花萼、花冠、雄花、雌花组成。开花前的人参花蕾为绿色, 其中含有 20 种皂苷活性物质、17 种氨基酸、11 种微量元素<sup>[1]</sup>。人参花蕾中皂苷总量是人参根的 4.06 倍, 其中可提升人体免疫力并抑制癌细胞成长的人参皂苷 Rd 含量(高达 2.77%)是人参根的 13.85 倍; 能保护细胞膜、防止细胞老化、扩张血管、降低血压和血糖, 提高肝细胞蛋白质和 NAD 的合成, 显著抑制宫颈癌细胞生长的人参皂苷 Re 含量是人参根的 14.7 倍<sup>[2]</sup>。由此可见人参花蕾的药用和保健价值并不低于人参根。

本实验以人参花蕾为原料, 以 50% 的乙醇水溶液为提取剂, 通过离心、减压、萃取、减压、溶解、再次离心、定容, 得到人参皂苷提取液<sup>[3]</sup>。通过向产生羟基自由基的化学反应体系中加入人参花蕾提取液, 清除反应中产生的自由基<sup>[4-5]</sup>, 从而阐明人参花蕾中人参皂苷清除自由基的作用和抗衰老的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

人参花蕾(绿色干燥花蕾) 吉林省长春市售; 人参皂苷 Re 大连医海生物科技有限公司; 甲醇、乙醇、

正丁醇、硫酸亚铁、水杨酸等均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

RE.52-86A 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-D(III)循环水真空泵 上海申光仪器仪表有限公司; 800 型离心沉淀器 上海手术器械厂; 722- 光栅分光光度计 上海精密科学仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 人参花蕾的预处理——脱脂

将人参花蕾于  $60^{\circ}\text{C}$  干燥 1h, 碾碎, 过 60 目筛。称取 10g, 按 1:15 的固液比加入乙醚, 用磁力搅拌器搅拌脱脂两次, 每次 1.5h, 弃去溶剂, 得到淡绿色残渣。待其乙醚气味消失, 再于  $60^{\circ}\text{C}$  干燥 1h, 即为脱脂人参花蕾的样品。这样可以避免一些脂类物质溶解于乙醇中, 提高人参皂苷的提取率。

#### 1.3.2 人参花蕾中人参皂苷的提取(乙醇回流法)<sup>[3]</sup>

精密称取脱脂人参花蕾 6.00g, 置于蒸馏瓶中, 按照 1:20 的固液比加入 120ml 50% 乙醇, 回流提取人参花蕾中人参皂苷, 离心去除残渣; 减压蒸馏回收乙醇, 得到人参皂苷浸膏粗品; 用水饱和正丁醇萃取人参皂苷浸膏, 收集正丁醇溶液, 减压蒸馏回收正丁醇, 得到人参皂苷浸膏; 用甲醇溶解人参皂苷浸膏, 定容到 40ml

收稿日期: 2008-07-21

作者简介: 马勇(1960-), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品检验与食品开发。E-mail: mayong0416@163.com

(脱脂人参花蕾质量与溶剂甲醇体积之比约为 1:6), 摇匀, 即为人参皂苷提取液, 称之为提取液  $Y_1$  (黄绿色)。

### 1.3.3 人参皂苷的测定<sup>[4]</sup>

以人参皂苷  $Re$  为标准物, 通过标准曲线法定量。精密称取人参皂苷  $Re$  标准物 5.00mg 溶于 2.50ml 甲醇中, 摇匀, 配制成 2.00  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的溶液。分别吸取此溶液 50 (100  $\mu\text{g}$ )、75 (150  $\mu\text{g}$ )、100 (200  $\mu\text{g}$ )、125 (250  $\mu\text{g}$ )、150 (300  $\mu\text{g}$ )  $\mu\text{l}$ , 置于 25ml 的比色管内, 用热风吹干溶剂后, 分别加入 5% 的香草醛冰醋酸 0.20ml、高氯酸 0.80ml, 混匀, 盖塞。将比色管置于 60℃ 水浴中加热 15min, 取出冷却到室温, 分别加入冰醋酸 10ml, 摇匀。静置 15min 后, 于波长 550nm 处测定其吸光度。以人参皂苷  $Re$  标准物质量为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算线性回归方程式。

$$y=ax+b, a=\frac{n\sum xy-\sum x\sum y}{n\sum x^2-(\sum x)^2}, b=\frac{\sum x^2y-\sum x\sum yx}{n\sum x^2-(\sum x)^2}$$

式中,  $y$  为一定体积的  $Re$  标准物样液中总皂苷的质量 ( $\mu\text{g}$ ),  $x$  为吸光度。

精确量取三份 20  $\mu\text{l}$  提取液  $Y_1$ , 分别置于 25ml 的比色管中, 测定、计算提取液  $Y_1$  中人参皂苷浓度及人参花蕾中人参皂苷的提取率。

$$T(\%)=\frac{C\times V_1}{M\times\frac{V_1}{V_2}}$$

式中,  $C$  为提取液  $Y_1$  浓度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ );  $V_1$  为加入提取液体积 ( $\mu\text{l}$ );  $M$  为制备提取液  $Y_1$  人参花蕾质量 ( $\text{g}$ );  $V_2$  为提取液  $Y_1$  总体积 ( $\text{ml}$ );  $T$  为人参花蕾中人参皂苷提取率 (%)。

### 1.3.4 人参皂苷提取回收率测定

精密称取脱脂人参花蕾粉末 1.0034g 两份, 其中一份加入 0.0023g 的人参皂苷  $Re$  标准物, 按照 1.3.2 和 1.3.3 的操作要点, 提取、测定人参花蕾中人参皂苷, 计算回收率。以只有人参花蕾的提取液为  $Y_2$ , 人参花蕾加人参皂苷  $Re$  标准物的提取液为  $Y_3$ 。根据脱脂人参花蕾质量与溶剂甲醇体积之比约为 1:6, 将  $Y_2$ 、 $Y_3$  均定容为 5.5ml。

$$P(\%)=\frac{Y_3\text{中人参皂苷质量平均值}-Y_2\text{中人参皂苷质量平均值}}{Y_3\text{中人参皂苷}Re\text{标准物质量}}\times 100=\frac{(C_2-C_1)\times V_1\times V}{M\times V_1}\times 100$$

式中,  $P$  为  $Re$  对照样品的回收率 (%);  $C_1$  为  $Y_2$  的平均浓度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ );  $C_2$  为  $Y_3$  的平均浓度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ );  $M$  为  $Y_3$  中加入  $Re$  对照样的质量 ( $\text{g}$ );  $V_1$  为加入提取液体积 ( $\mu\text{l}$ );  $V$  为提取液定容后的总体积 ( $\text{ml}$ )。

### 1.3.5 人参花蕾提取物(人参皂苷)活性研究——体外清

除羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ )

采用 Fenton 反应产生羟基自由基, 加入人参花蕾提取液(人参皂苷)清除羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ), 以水杨酸 - 乙醇为显色剂, 与  $\text{Fe}^{3+}$  在酸性条件下生成有色络合物, 通过分光光度法测定  $\text{Fe}^{3+}$  浓度, 从而测定人参花蕾提取物(人参皂苷)对羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 的清除率<sup>[4]</sup>。

但是, 由于  $\text{Fe}^{2+}$  也可以与显色剂形成络合物, 人参花蕾提取液  $Y_1$  也有一定的颜色, 都具有一定的吸光度。因此, 在实验中以硫酸亚铁、水杨酸 - 乙醇、不同体积的人参花蕾提取液  $Y_1$  的混合溶液为本底吸收, 在计算中予以扣除。

$$\text{羟基自由基清除率}(\%)=\frac{A_0-(A_x-A_{x0})}{A_0}\times 100$$

式中,  $A_0$  为空白对照液吸光度, 即只加入硫酸亚铁、水杨酸 - 乙醇、过氧化氢, 不加入人参花蕾提取液  $Y_1$  的吸光度;  $A_x$  为加入硫酸亚铁、水杨酸 - 乙醇、过氧化氢、人参花蕾提取液  $Y_1$  后的吸光度;  $A_{x0}$ : 加入硫酸亚铁、水杨酸 - 乙醇、人参花蕾提取液  $Y_1$ , 不加过氧化氢引发反应的吸光度, 即本底吸光度。

操作要点为: 首先在比色管  $A_0$ 、 $A_x$ 、 $A_{x0}$  中分别加入 9mmol/L 的硫酸亚铁 2ml、9mmol/L 的水杨酸 - 乙醇 2ml, 摇匀; 在  $A_0$  试管中加入 8.8mmol/L 的过氧化氢 2ml 摇匀; 在  $A_x$ 、 $A_{x0}$  管中分别加入人参花蕾提取液  $Y_1$  (0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.50ml); 在  $A_x$  管中分别加入 8.8mmol/L 的过氧化氢 2ml, 摇匀; 最后在  $A_0$ 、 $A_x$ 、 $A_{x0}$  管中分别加入 8ml pH3.8 的醋酸 - 醋酸钠缓冲溶液, 用蒸馏水定容到 25ml。于 37℃ 水浴加热 30min, 取出后冷却到室温, 静置 10min。以蒸馏水为参比, 于波长 510nm 处分别测定吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 人参皂苷提取结果与分析

#### 2.1.1 标准曲线与线性回归方程

表 1  $Re$  标准曲线测定数据  
Table 1 Data for  $Re$  standard curve

项目	人参皂苷 $Re$ 标准物溶液 (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )				
	1	2	3	4	5
$Re$ 标准物体积 ( $\mu\text{l}$ )	50	75	100	125	150
$Re$ 标准物质量 ( $\mu\text{g}$ )	100	150	200	250	300
5% 香草醛冰醋酸 (ml)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
高氯酸 (ml)	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
冰醋酸 (ml)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
$A_{550nm}$	0.196	0.281	0.391	0.441	0.610

由表 1 可求得,  $a=0.002$ ,  $b=-0.0114$ , 可得线性回归方程为  $y=0.002x-0.0114$ 。标准曲线见图 1。

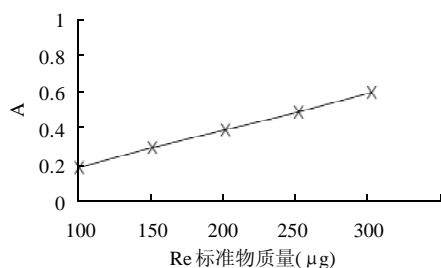


图1 Re 标准物质标准曲线

Fig.1 Re standard curve

### 2.1.2 人参皂苷提取

表2 提取液 Y<sub>1</sub> 浓度Table 2 Concentrations of extraction solution Y<sub>1</sub>

测定编号	1	2	3
加入提取液体积(μl)	20	20	20
5% 香草醛冰醋酸(ml)	0.20	0.20	0.20
高氯酸(ml)	0.80	0.80	0.80
冰醋酸(ml)	10.00	10.00	10.00
A <sub>550nm</sub>	0.471	0.482	0.489
皂苷质量(μg)	241.2	246.7	250.2
皂苷浓度(μg/μl)	12.06	12.34	12.51
Y <sub>1</sub> 平均浓度(μg/μl)		12.30	
人参花蕾中人参皂苷提取率 T(%)		8.17	

注：制备 Y<sub>1</sub> 人参花蕾总质量 6.00g；Y<sub>1</sub> 定容后总体积 40.00ml。

人身皂苷的测定结果见表 2。用 50% 的乙醇回流、80℃水浴的方法<sup>[1]</sup>从人参根中提取人参皂苷得率为 4.29%。本实验用相同方法从人参花蕾中提取人参皂苷的提取率为 8.17%，说明人参花蕾中的总皂苷含量大于人参根。

### 2.1.3 回收率测定

由表 3 可见，用 50% 的乙醇提取人参花蕾中人参皂苷的回收率比较高。因此，本实验从人参花蕾中提取人参皂苷的方法可靠、实用。

### 2.2 人参花蕾提取液体外清除羟基自由基的能力测定

表3 回收率相关数据  
Table 3 Recovery rate data

项目	提取液 Y <sub>2</sub>			提取液 Y <sub>3</sub>		
	1	2	3	1	2	3
人参花蕾质量(g)		1.0034			1.0034	
Re 标准物质量(g)		0			0.0023	
总质量(g)		1.0034			1.0057	
定容后总体积(ml)		5.50			5.50	
提取液体积 V <sub>i</sub> (μl)		20			20	
5% 香草醛冰醋酸(ml)		0.20			0.20	
高氯酸(ml)		0.80			0.80	
冰醋酸(ml)		10.00			10.00	
A <sub>550nm</sub>	0.581	0.582	0.578	0.591	0.611	0.586
皂苷质量(μg)	296.2	296.7	294.7	301.2	311.2	298.7
质量平均值(μg)		295.9			303.7	
平均浓度(μg/μl)		14.80			15.19	
回收率(%)		93.6			93.6	

取不同体积的人参花蕾提取液 Y<sub>1</sub>，分别测定 A<sub>x</sub>、A<sub>x0</sub>，计算不同体积提取液 Y<sub>1</sub> 清除羟基自由基的能力，结果见表 4。

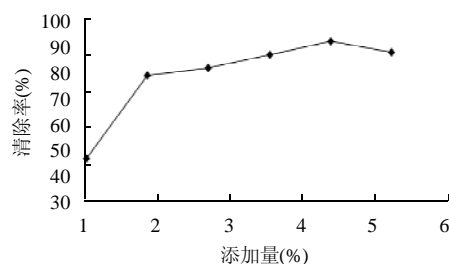


图2 人参花蕾提取物添加量与清除羟基自由基能力的关系

Fig.2 Relationship of scavenging effect with addition amount of ginseng flowers extract

由表 4、图 2 可见，人参花蕾提取液清除羟基自由基的效果随着添加量的增加而增大。即人参花蕾提取液添加量增加，A<sub>x</sub> - A<sub>x0</sub> 的差值越小，[A<sub>0</sub> - (A<sub>x</sub> - A<sub>x0</sub>)]/A<sub>0</sub> 值越大，清除羟基自由基的能力越强。提取液加入量

表4 不同体积提取液 Y<sub>1</sub> 清除羟基自由基的能力Table 4 Abilities for scavenging hydroxy free radical of extraction Y<sub>1</sub> with variable volume

不同体积提取液	清除 ·OH 能力						
硫酸亚铁体积(ml)			2.00				
水杨酸-乙醇体积(ml)			2.00				
过氧化氢体积(ml)			2.00(A <sub>x0</sub> =0)				
pH3.8 的缓冲液体积(ml)			8.00				
蒸馏水定容体积(ml)			25.00				
提取液 Y <sub>1</sub> 浓度体积(μg/μl)			12.30				
A <sub>x</sub> 、A <sub>x0</sub> 中分别加入提取液 Y <sub>1</sub> 体积(ml)	0	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50
A <sub>x</sub> 、A <sub>x0</sub> 中提取液 Y <sub>1</sub> 百分含量(%)	0	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00
A <sub>0</sub> (510nm)	0.373	—	—	—	—	—	—
A <sub>x</sub> (510nm)	—	0.547	0.646	0.730	0.812	0.850	0.915
A <sub>x0</sub> (510nm)	—	0.346	0.564	0.658	0.760	0.816	0.866
[A <sub>0</sub> - (A <sub>x</sub> - A <sub>x0</sub> )]/A <sub>0</sub> × 100	—	46.11	78.02	80.70	86.06	90.88	86.86

在 0.25~0.50ml 即 1.00%~2.00% 之间, 羟基自由基的清除率增加的比较明显; 提取液加入量在 0.50~1.25ml 即 2.00%~5.00% 之间, 羟基自由基清除率虽呈递增趋势, 但幅度不大; 提取液加入量在 1.25~1.50ml 即 5.00%~6.00% 之间, 羟基自由基清除率有所下降。其原因是  $\text{Fe}^{2+}$  也可以与显色剂形成络合物, 具有一定的颜色和吸光度, 增大了  $A_x$  值, 而本底值  $A_{x0}$  的影响减弱,  $[A_0 - (A_x - A_{x0})]/A_0$  值相应变小。

因此, 人参花蕾提取液清除羟基自由基添加量的有效范围为 1.00%~5.00%, 添加量 5.00% 左右清除羟基自由基能力最强。

### 3 结 论

3.1 人参花蕾中人参皂苷提取率为 8.17%, 高于人参根 (4.29%)。

3.2 乙醇回流法可以有效的从人参花蕾中提取人参皂苷, 方法稳定、可靠。提取条件为 50% 乙醇、固液

比 1:20、回流提取温度 83℃、回流 4 次、每次 2.5h。加入标准人参皂苷 Re, 回收率为 93.26%。

3.3 人参花蕾提取物具有较强的清除羟基自由基能力。随着提取液加入量的增加, 对羟基自由基的清除率增大。常温常压下加入 5.00% 人参花蕾提取液 ( $12.30 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 清除羟基自由基能力最强。

### 参考文献:

- [1] 陈长武, 张利财. 人参花可乐保健饮料的研制[J]. 饮料工业, 2007, 10(6): 39-41.
- [2] 王健梅. 欧科学家发现人参花蕾的药用价值远超过人参[J]. 中国农业信息, 2005(3): 17.
- [3] 张晶, 陈全成, 马晓杰, 等. 不同提取方法对人参皂苷提取率的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(1): 71-73.
- [4] 马利华, 贺菊萍, 秦卫东, 等. 槐花提取物抗氧化性能研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 75-77.
- [5] 崔巍, 赵洪艳, 王燕嬉. 人参皂甙抗衰老的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(11): 1578-1580.
- [6] 李治国, 董里, 史惠祥, 等. Fenton 试剂处理 2,4-D 废水研究[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2004, 31(4): 442-443.