

超声波辅助乙醇提取垂盆草中总黄酮及其抗氧化活性

张俊生, 陈莉华, 侯孝璇, 段琛圭, 何 莉
(吉首大学化学化工学院, 湖南 吉首 416000)

摘 要: 用超声波辅助乙醇提取湘西垂盆草中的总黄酮。通过单因素和正交试验讨论料液比、乙醇体积分数、超声时间、温度等因素对提取效果的影响, 考察黄酮提取物对油脂的抗氧化性能及对羟自由基的清除效果, 并与一些天然抗氧化剂作比较。结果表明: 在 80℃ 条件下, 选择 40% 乙醇为提取剂、料液比 1:25(g/mL)、超声 40min, 提取率达到 1.968%。提取物对羟自由基的清除作用明显, 并能增加植物油和动物油的抗氧化能力, 在相同条件下该提取物对油脂的抗氧化效果强于柠檬酸而弱于 VC。

关键词: 垂盆草; 总黄酮; 油脂; 羟自由基; 抗氧化

Ultrasonic-Assisted Ethanol Extraction and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from *Sedum sarmentosum* Bunge

ZHANG Jun-sheng, CHEN Li-hua, HOU Xiao-xuan, DUAN Chen-gui, HE Li
(College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstracts Total flavonoids were extracted from *Sedum sarmentosum* Bunge using ethanol as extraction solvent with the aid of ultrasonic treatment. The effects of the extraction parameters material-to-liquid ratio (g/mL), ethanol concentration, ultrasonic treatment time and extraction temperature on extraction efficiency were explored by one-factor-at-a-time and orthogonal array design methods. The lipid peroxidation inhibitory activity and hydroxyl free radical scavenging activity of total flavonoids extract were evaluated and compared with those of several natural antioxidants. The extraction rate of total flavonoids was up to 1.968% after 40 min of ultrasonic treatment for extraction with 40% ethanol at 80 °C and a material-to-liquid ratio of 1:25. The resulting extract revealed obvious scavenging activity on hydroxyl free radicals and antioxidant effect on oil and fat. Under the same conditions, it was superior to citric acid but inferior to vitamin C in terms of antioxidant effect on oil and fat.

Key words: *Sedum sarmentosum* Bunge; total flavonoids; extraction; fat and oil; hydroxyl free radicals; antioxidation
中图分类号: O623.54 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2012)08-0018-06

垂盆草(*Sedum sarmentosum* Bunge)为景天科多年生肉质草本植物, 收载于《中国药典》2005 版一部^[1], 具有保肝护肝、抗病毒、抗肿瘤、调节免疫力等作用^[2-4]。垂盆草中含多种化学成分, 包括生物碱、三萜类、垂盆草苷及黄酮类成分等^[4-6]。近期研究认为垂盆草苷与黄酮类成分均为抗肝炎活性成分^[4], 垂盆草总黄酮是垂盆草中重要的保肝降酶活性部位之一, 并有明显的保护肝脏的作用^[7]。黄酮类化合物除具有通常的抗菌、清热解毒、抑制脂肪氧化酶等生物活性外, 在油

脂抗氧化方面也有显著效果, 从植物中提取安全、天然黄酮类物质以取代人工合成抗氧化剂是油脂或含油食品添加剂的发展趋势^[8-11]。

本实验提取垂盆草中总黄酮, 并研究提取物对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用及对油脂的抗氧化作用, 以期垂盆草的进一步开发利用提供一定参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与仪器

收稿日期: 2011-03-21

基金项目: 科技部科技型中小企业技术创新基金项目(10C26214302421)

作者简介: 张俊生(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然植物中生理活性成分提取分离及应用。

E-mail: zhangjunshenggirl@163.com

垂盆草、猪油、植物油 市购。

无水乙醇、鞣酸、柠檬酸、KI、冰醋酸、三氯甲烷、NaOH、HCl、NaNO₂、石油醚、Al(NO₃)₃、FeSO₄·H₂O₂、水杨酸等均为分析纯。

Gzx-9070MBE 数显鼓风干燥箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂；UV75TCRT 紫外分光光度计 日本岛津公司；K-201B- II 旋转蒸发器 郑州长城科工贸有限公司；KQ-250E 型超声波清洗机；电子天平；FM-1 植物粉碎机。

1.2 方法

1.2.1 总黄酮的提取及含量测定

将清除杂质后的垂盆草放于药盘内，放入 60℃ 温度下于数显鼓风干燥箱中烘干。用植物粉碎机粉碎，准确称取垂盆草粉末 1g，放于 250mL 锥形瓶中，加入不同体积分数的乙醇水溶液，在超声波的协同下提取，抽滤得到粗液，用石油醚萃取除去色素并分离，用旋转蒸发器除去乙醇并回收再利用，得到高浓度的醇提液。

1.2.2 总黄酮含量测定

以芦丁为对照品，按照 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 法^[12-13]绘制芦丁标准曲线，测定提取物中总黄酮含量。黄酮质量浓度(c)在 0~0.05mg/mL 范围内与吸光度(A)有良好的线性关系，回归方程为： $c = 0.0939A$ ， $R^2 = 0.9998$ 。

1.2.3 总黄酮清除羟自由基能力测定

参照 Fenton 反应^[14]建立羟自由基生成模型，在 15mL 比色管中依次加入 3mL 2mmol/L FeSO₄，3mL 6mmol/L H₂O₂，摇匀，接着加入 9mL 6mmol/L 水杨酸溶液。加入 1mL 蒸馏水，未加粗提取物比色管所测的吸光度为 A₀，其余比色管根据实验条件加入不同浓度的提取物 1mL，在 40℃ 水浴中放置 15min 后取出，以蒸馏水为参比，于波长 510nm 处测吸光度 A_x。

$$\text{羟自由基清除率} / \% = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100$$

式中：A_x 为加入提取液后的吸光度；A₀ 为空白对照的吸光度。

1.2.4 过氧化值的测定

在无水酸性条件下，油脂中的过氧化物使 I⁻ 定量氧化成 I₂，I₂ 与 I⁻ 结合生成易溶于水的 I₃⁻，利用 I₃⁻ 的吸光度与标准碘液吸光度进行比较定量。

按照文献^[15]方法，在 353nm 波长下，I₂ 含量 (W/μg) 对吸光度(A)的线性回归方程为： $A = 0.00435W - 0.24996$ ， $R^2 = 0.9875$ 。

黄酮提取物对油脂的抗氧化性：采用国际上通用的烘箱强化贮存法^[6-7]。用适量浓度的黄酮提取溶液加到温热动物油或植物油中，搅匀，在恒温箱中储存，以不

加任何抗氧化剂作对照组，不同时间取样测定动物油与植物油的过氧化值。另分别用 VC 和柠檬酸溶液按上述方法测定过氧化值，比较各种抗氧化剂的抗氧化能力。

在 100mL 三角瓶中加入 24mL 油 - 黄酮溶液(5:1, V/V)。在一定条件下反应，间隔 70min 取待测样品(大约 3 滴，不超过 0.12g)于干燥的 15mL 比色管中，加入氯仿 - 冰醋酸溶液 3mL，混匀，加入 KI 饱和碱液 0.12mL，轻摇 30s，置暗处 3min。然后加蒸馏水至刻度，加塞，颠倒混匀 2~3 次，静置约 5~10min，待水相澄清后，取上清液于 1cm 石英比色皿中，在 353nm 处以空白作参比，读取各管的吸光度 A 并计算出碘生成量，按下式计算过氧化值(peroxide value, POV)。

$$\text{POV} / \% = \frac{\text{样品中含 I}_2 \text{ 量} / \mu\text{g}}{\text{样品量} / \text{g} \times 10^6} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 单因素试验

以垂盆草总黄酮的提取率为指标，在 40W 超声功率、13kHz 超声频率及 250W 加热功率的条件下，考察不同的料液比、乙醇体积分数、超声时间、温度等单因素对其提取率的影响。

2.1.1 料液比对提取的影响

精密称取垂盆草粉末 1.000g，按不同的料液比(垂盆草粉质量 50% 乙醇溶液体积 g/mL)加入 50% 乙醇溶液，在温度 80℃ 条件下超声协同萃取 20min，过滤，收集滤液，用 50% 乙醇溶液定容至 50mL，测定总黄酮并计算提取率。考察了不同料液比对黄酮提取的影响，结果见图 1。

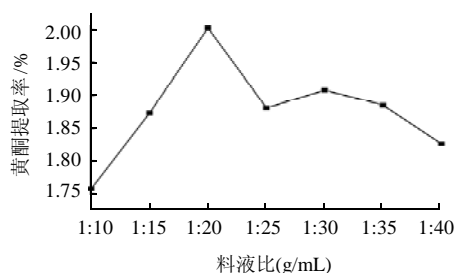


图 1 料液比对黄酮提取率的影响

Fig.1 Effect of material-to-liquid ratio on extraction rate of total flavonoids

随着料液比的增大，黄酮的提取率也逐渐上升，当上升到 1:20(g/mL)后，提取率开始下降。为提高生产成本以及不浪费溶剂，后续实验选用 1:20 的料液比进行提取。

2.1.2 乙醇体积分数对黄酮提取率的影响

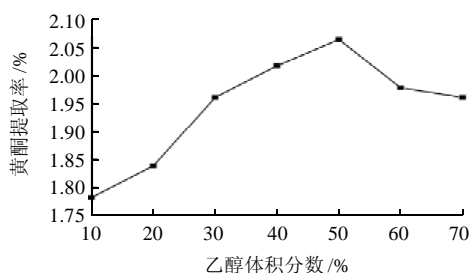


图2 乙醇体积分数对黄酮提取率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on extraction rate of total flavonoids

由图2可以看出,黄酮提取率随乙醇体积分数的增大而增大,在乙醇体积分数50%时达到最大,此后乙醇体积分数再增大提取率反而降低。所以选用50%乙醇溶液作为提取溶剂。

2.1.3 超声时间对黄酮提取率的影响

超声波独具的物理特性能促使植物细胞组织破壁或变形,短时间内即可获得最佳提取率,在40W超声功率、13kHz超声频率条件下超声时间对黄酮提取率的影响如图3所示。

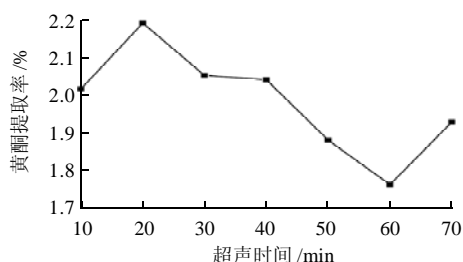


图3 超声时间对黄酮提取率的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic extraction time on extraction rate of total flavonoids

由图3可知,黄酮提取率随超声时间增大而增大,在20min时达到极值,此后在20~60min时间内,提取率随超声时间增大反而降低。原因可能为:有效成分浓度差是超声提取的主要动力,在提取初期,有效成分浓度差大,超声时间增大则提取率也增加明显;随着提取时间的延长,溶剂中有效成分浓度逐渐增大,与固相中的浓度差逐渐变小,所以提取率慢慢降低,且随着超声时间延长,超声过程不断产热,黄酮类物质本身易被氧化破坏使其活性成分造成损失,也使总黄酮提取率减小;但当超声时间太长(70min)时,超声波的作用促使或加速某些化学反应生成某些还原性物质(如染料的水溶液经超声处理后会变色或退色),使提取率又略有提高,选用超声时间20min。

2.1.4 超声温度对黄酮提取率的影响

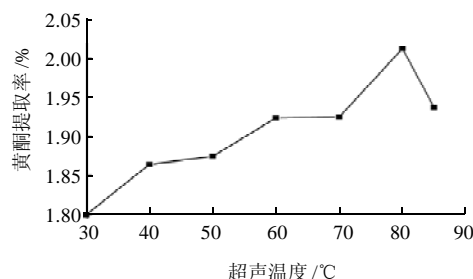


图4 超声温度对总黄酮提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic extraction temperature on extraction rate of total flavonoids

由图4可知,黄酮提取率随超声温度增大先缓慢增大,在70~80°C时急剧增大,并在80°C达到极值,此后温度再升高提取率反而急剧降低。由于80°C左右温度的变化导致提取率变化幅度较大,且温度过高容易导致活性物质失效,故选择70°C为宜。

2.2 垂盆草中黄酮提取正交试验及验证实验

2.2.1 正交试验设计

根据单因素试验结果,选用 $L_9(3^4)$ 正交表,选取料液比、乙醇体积分数、超声波处理温度、超声时间为考察因素,因素水平表如表1所示,结果见表2。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal tests

水平	A 乙醇体积分数 / %	B 超声时间 / min	C 温度 / °C	D 料液比 (g/mL)
1	30	20	60	1:20
2	40	30	70	1:25
3	50	40	80	1:30

表2 垂盆草黄酮提取工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果

Table 2 Results of orthogonal tests

试验号	A	B	C	D	提取率 / %
1	1	1	1	1	1.905
2	1	2	2	2	2.004
3	1	3	3	3	1.962
4	2	1	2	3	2.009
5	2	2	3	1	2.079
6	2	3	1	2	2.176
7	3	1	3	2	2.054
8	3	2	1	3	1.983
9	3	3	2	1	2.071
k_1	5.871	5.968	6.063	6.054	
k_2	6.263	6.066	6.084	6.234	
k_3	6.108	6.2089	6.094	5.953	
R	0.3927	0.2398	0.031	0.2803	

由表2可知,超声波技术提取垂盆草中黄酮各因素对提取率影响的主次顺序为: $A > D > B > C$,即乙醇体积分数>料液比>超声时间>提取温度,并由 k 值得出超声波辅助提取垂盆草中黄酮的最佳工艺方案为 $A_2B_3C_3D_2$ 。

2.2.2 验证实验

采用最佳工艺条件进行验证实验,平行提取3次,提取率分别为1.968%、1.963%、1.970%,结果表明该工艺条件稳定性好,重现度高。

2.3 黄酮对羟自由基的清除研究

2.3.1 质量浓度对羟自由基的清除效果的影响

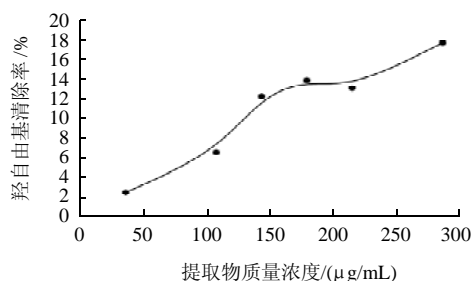


图5 提取物质质量浓度对羟自由基清除作用的影响

Fig.5 Hydroxyl free radical scavenging capacity of total flavonoids extract at various concentrations

由图5可知,垂盆草提取物有很强的清除羟自由基的作用,且黄酮提取物质量浓度越大,对羟自由基的清除能力越强,在35~285 $\mu\text{g/mL}$ 范围内清除率与质量浓度呈正相关。

2.3.2 温度对垂盆草黄酮清除羟自由基效果的影响

以质量浓度213.7 $\mu\text{g/mL}$ 的黄酮提取物研究温度对黄酮清除羟自由基效果的影响,结果见表3。

表3 温度对垂盆草黄酮清除羟自由基效果的影响(黄酮提取物213.7 $\mu\text{g/mL}$)

Table 3 Effect of temperature on hydroxyl free radical scavenging capacity (at 213.7 $\mu\text{g/mL}$)

温度/ $^{\circ}\text{C}$	30	40	50	60	70	80
清除率/%	26.42	11.73	6.39	-5.26	-22.35	-41.66

由表3可知,温度对清除率有较大影响。温度越高,垂盆草对黄酮羟自由基的清除率越小,在30 $^{\circ}\text{C}$ 时的清除率最大。原因可能是温度逐渐升高时黄酮本身氧化加剧,减弱了对羟自由基的清除能力,当高温(80 $^{\circ}\text{C}$)时,黄酮结构完全破坏,完全失去对羟自由基的清除能力并被羟自由基所影响,使清除率反而为负值。

2.4 黄酮对油脂的抗氧化性研究

2.4.1 烘箱强制保温时间对黄酮抗油脂氧化的影响

40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,将植物油及动物油在烘箱强制保温一定时间,在不同时间段取出测定过氧化值,试验黄酮提取物对油脂的抗氧化性,结果见表4、5。

表4 黄酮提取物对动物油的抗氧化活性

Table 4 Antioxidant activity of total flavonoids extract on fat

时间/min	220	290	360	430	510
POV/(动物油)	0.1088	0.08975	0.1529	0.1193	0.1674
POV/(动物油+黄酮)	0.09777	0.08768	0.1343	0.1153	0.1284
POV降低率/%	10.11	2.30	12.13	3.38	23.30

表4表明,在烘箱强化保存时间越长,动物油的过氧化值越高,说明油脂氧化程度越大;添加黄酮后,过氧化值均有不同程度的下降,说明黄酮提取物对油脂的氧化均有不同程度的抑制作用;同样浓度的黄酮提取物能使在烘箱放置时间长达510min、氧化程度很高的油脂其过氧化值降低23.30%,说明黄酮对氧化程度很深的动物油有较好的保护作用。

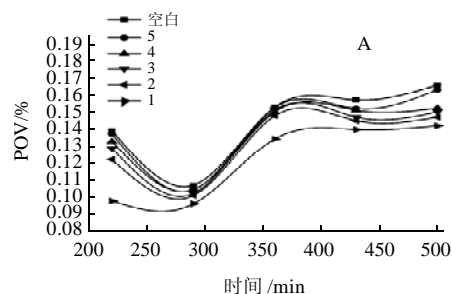
表5 黄酮提取物对植物油的抗氧化活性

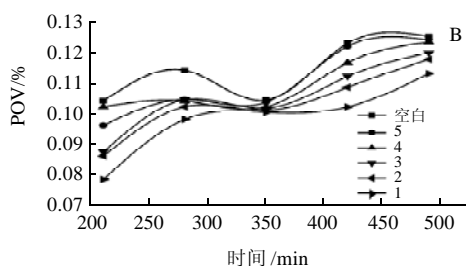
Table 5 Antioxidant activity of total flavonoids extract on oil

时间/min	210	280	350	420	490
POV/(植物油)	0.1201	0.1230	0.1350	0.1300	0.1371
POV/(植物油+黄酮)	0.1100	0.1190	0.1270	0.1250	0.1302
POV降低率/%	8.43	3.20	5.93	5.77	5.16

表5表明,在烘箱强化保存时间越长,植物油的过氧化值越高,说明油脂氧化程度越大;添加黄酮后,过氧化值均有不同程度的下降,说明黄酮提取物对油脂的氧化均有不同程度的抑制作用;同样浓度的黄酮提取物使植物油过氧化值降低最大只有8.43%,说明黄酮对植物油有较好的保护作用,但保护作用不像对动物油的保护作用那么大。

2.4.2 垂盆草黄酮质量浓度对油脂抗氧化性的影响





5~1 分别为垂盆草黄酮质量浓度 0.2048、0.3524、0.5000、0.6472、0.7952mg/mL; 空白为不加黄酮提取物的样品; 温度 40℃。

图 6 垂盆草黄酮质量浓度对动物油(A)和植物油(B)抗氧化性的影响

Fig.6 Effect of dose on POV of fat and oil in the presence of total flavonoids extract

由图 6 可知, 当烘箱强制放置时间相同时, 垂盆草黄酮质量浓度越大, 则油脂的 POV 值越小, 当放置时间为 220min 时, 0.3524mg/mL 黄酮使动物油的 POV 降低 4.60%, 0.7952mg/mL 的黄酮使动物油的 POV 降低 29.81%; 当放置时间 430min 时, 0.3524mg/mL 黄酮使动物油的 POV 降低 3.88%, 0.7952mg/mL 的黄酮使动物油的 POV 降低 11.02%。图 6 曲线变化趋势显示, 尽管有抗氧化剂存在, 但随着在烘箱强制放置时间越长, 油脂的氧化程度越来越大, 表明黄酮对油脂的抗氧化程度不但受黄酮浓度影响同时也受在烘箱强制放置时间长短的影响。

2.4.3 不同温度对黄酮抗油脂氧化的影响

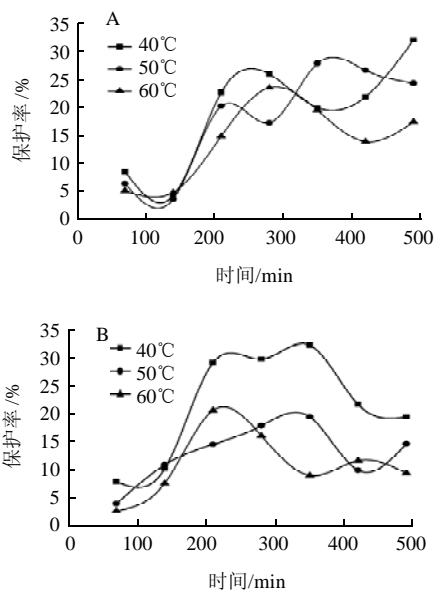


图 7 不同温度下黄酮对动物油(A)和植物油(B)的保护率

Fig.7 Protection rate of total flavonoids extract on fat and oil at different temperatures

图 7 表明, 黄酮能较好的保护动物油(图 7A), 当烘箱温度升高且放置时间延长时, 保护率呈总体上升趋势, 而温度升高黄酮对植物油(图 7B)的保护率下降, 且随在烘箱放置时间延长, 保护效果越来越弱。

2.5 黄酮提取物与其他抗氧化剂的比较

在烘箱温度 40℃ 条件下, 将添加了垂盆草黄酮、柠檬酸、VC 溶液的油样在烘箱强化保存了不同时间后, 检测了植物油(图 8A)及动物油(图 8B)的过氧化值。

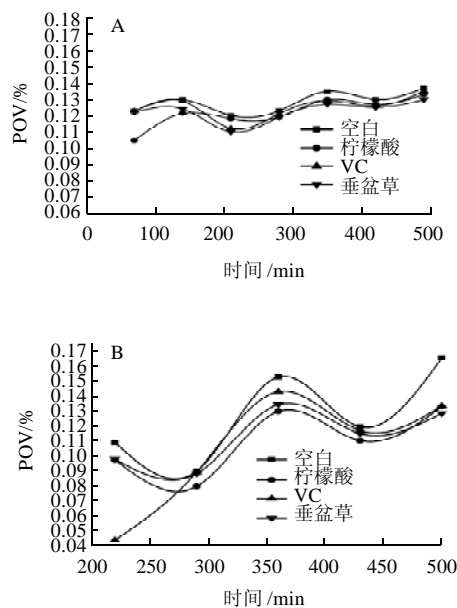


图 8 不同抗氧化剂对植物油(A)及动物油(B)抗氧化性的影响

Fig.8 Comparative antioxidant effects of total flavonoids extract and several natural antioxidants on oil and fat

图 8 表明, 不同的抗氧化剂对植物油的抗氧化能力不同, 在烘箱放置时间小于 100min 时, 柠檬酸的抗氧化能力强于垂盆草提取物, 其他时间段, 特别是放置时间超过 210min 后, 垂盆草黄酮与比常用的柠檬酸、VC 的抗氧化能力强, 使 POV 值降低更大, 在动物油中垂盆草黄酮抗氧化能力比柠檬酸强比 VC 弱。

3 结论

结果表明, 选择 40% 乙醇为提取剂、料液比 1:25 (g/mL)、40W 超声功率超声 40min, 垂盆草总黄酮提取率达到 1.968%。该提取物能很好地清除羟自由基和抑制油脂的氧化作用, 对动物油脂的抗氧化能力稍弱于 VC 强于柠檬酸, 对植物油的抗氧化能力则强于柠檬酸与 VC。垂盆草黄酮是天然抗氧化剂, 作为食品添加剂, 不仅可以延长食品的贮存时间, 而且具有保健功效, 符合当前的绿色低碳环保的生活理念。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 2005 版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 148.
- [2] 郭辉, 张玲. 垂盆草化学成分和药理作用的研究进展[J]. 食品与药品, 2006, 8(1): 19-22.
- [3] 黄丹丹, 张伟云. 垂盆草醇提物对人肝癌细胞 HepG2 的抑制作用及其机制初探[J]. 东南大学学报: 医学版, 2009, 28(4): 302-306.
- [4] 潘金火, 潘萍. 垂盆草总黄酮中 8 种单体成分对肝细胞的保护作用[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(19): 1621-1623.
- [5] HYUNCHEOL O H, KANG D G, KNOW J W, et al. Isolation of angiotensin conversioning enzyme (ACE) in hibitory flavonoids from Sedum sarmentosum[J]. Biol Pham Bull, 2004, 27(12): 2035-2040.
- [6] 张洪超, 兰天, 张晓辉. 垂盆草化学成分与药理作用的研究进展[J]. 中成药, 2005, 27(10): 1201-1203.
- [7] 潘金火, 潘萍. 垂盆草总黄酮的保肝降酶作用及其化学成分的鉴别研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 12(8): 1930-1934.
- [8] 张俊生, 陈莉华, 张文龙. 湘西节节草总黄酮的超声波提取及抗氧化研究[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 71-75.
- [9] 陈莉华, 左林艳, 唐玉坚. 微波辅助乙醇提取姜辣素及其对油脂的抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 69-73.
- [10] 万忠民, 鞠兴荣, 姚琦, 等. 中草药提取物对油脂抗氧化的比较研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 89-92.
- [11] 邓斌, 王存娣, 徐安武. 微波辅助提取花生壳黄酮类化合物及其抗氧化性研究[J]. 中国油脂, 2009, 34(3): 54-57.
- [12] 王川. 葡萄籽单宁的抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2009, 34(2): 184-187.
- [13] 莫开菊, 柳圣, 程超. 生姜黄酮的抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(9): 110-114.
- [14] 丁利君, 冼建毅. 黄芪中黄酮类化合物提取及其对羟自由基清除作用[J]. 食品与机械, 2002, 89(3): 20-21.
- [15] 张唯, 高斌富, 常新, 等. 紫外法与碘量法测定食用植物油中过氧化值的比较[J]. 中国油脂, 1993(5): 18-20.