

湘西节节草总黄酮的超声波提取及抗氧化研究

张俊生, 陈莉华*, 张文龙
(吉首大学化学化工学院, 湖南 吉首 416000)

摘 要: 以湘西蕨类植物节节草为原料, 采用超声波辅助法提取总黄酮。通过单因素及正交试验优化提取工艺条件, 考察总黄酮对羟自由基的清除效果及在不同时间、温度下对油脂的抗氧化性能。结果表明, 当在乙醇体积分数 45%、料液比 1:30 (g/mL)、超声提取时间 30min、超声温度 60℃最佳条件下, 节节草中总黄酮得率为 1.16%。该黄酮提取物对羟自由基清除效果随浓度的增大而升高, 对茶籽油的抗氧化效果较动物油脂好。

关键词: 节节草; 黄酮; 提取; 油脂; 抗氧化性

Ultrasonic-assisted Ethanol Extraction and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from *Equisetum ramosissimum* Desf. Grown in West Hunan

ZHANG Jun-sheng, CHEN Li-hua*, ZHANG Wen-long
(College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstracts : One-factor-at-a-time and orthogonal array design methods were used to optimize the conditions for ultrasonic-assisted ethanol extraction of total flavonoids from the dried shoot of *Equisetum ramosissimum* Desf. grown in west Hunan province, China. The extraction yield of total flavonoids was 1.16% under the optimal extraction conditions: 45% ethanol aqueous solution as the extraction solvent, material-to-liquid ratio 1:30 (g/mL), ultrasonic treatment time 30 min, and extraction temperature 60 °C. The total flavonoids could scavenge hydroxyl free radicals in a concentration-dependent fashion and had stronger inhibitory effect against lipid peroxidation in tea seed oil than in lard.

Key words: *Equisetum ramosissimum* Desf.; total flavonoids; extraction; fat and oil; antioxidation

中图分类号: O623.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)16-0071-05

节节草又称锉草、笔头草、笔筒草、节骨草, 是木贼科植物 *Equisetum hiemale* L. 之木贼亚属的干燥地上部分, 在《中华人民共和国药典(一部)》中学名叫木贼^[1], 在湘西地区分布广泛, 药用历史悠久, 有散风热、退目翳之功效, 用于治疗风热目赤、迎风流泪、目生云翳、肝炎、咳嗽、支气管炎、泌尿系统感染等。全草含有有机酸类、黄酮类、生物碱及有机硅酸盐等化学成分^[2]。

黄酮类化合物具有多种生物活性, 能降压、镇痛、抗菌、清热解毒、抑制脂肪氧化酶、抗癌等^[3-4], 对治疗冠心病、延缓动脉粥样硬化和消除自由基等方面有显著效果。

食用油脂氧化变质会产生有害物质, 部分酸败产物还具有致癌作用。食品工业中常添加抗氧化剂以预防或抑制油脂和含油食品氧化变质, 目前常用的抗氧化剂均

为人工合成, 但研究发现均对人体有一定毒副作用^[5-6], 过量时存在致癌可能性^[7], 因此, 安全、保健的天然食品抗氧化剂取代人工合成抗氧化剂是食品添加剂的发展趋势。天然产物中黄酮类化合物在食品抗氧化剂方面的显著效果, 使其成为广大科研工作者的关注热点。

目前节节草的研究主要集中在化学成分和药理研究等方面^[8-9], 但对节节草中黄酮类化合物的提取工艺以及作为油脂抗氧化剂的研究尚未见报道。本实验以湘西特色植物节节草为研究对象, 重点研究总黄酮的超声波辅助提取工艺及其对油脂抗氧化能力的影响, 旨在为进一步利用节节草资源提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2010-12-03

基金项目: 科技部科技型中小企业技术创新基金资助项目(10C26214302421; 11C26414305373);

吉首大学校级科研计划项目(11JDY051)

作者简介: 张俊生(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为光谱分析。E-mail: zhangjunshenggirl@163.com

* 通信作者: 陈莉华(1961—), 女, 教授, 博士, 研究方向为天然产物提取及应用。E-mail: chenlihua99@163.com

节节草采于吉首本地,选择长势良好、健康无病虫害的植株,干燥后取地上部分剪成碎末并装进样品袋,存放于干燥箱中备用;新鲜猪板油 市售;茶籽油 吉首本地。

芦丁标准品、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、水杨酸、过氧化氢、硫酸亚铁、无水乙醇、没食子酸、VC、碘化钾、冰醋酸、三氯甲烷、淀粉、碘等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

KQ250-E 型超声波清洗器、SHB-III 循环水式多用真空泵、K-201B- II 型旋转蒸发器 郑州长城科工贸有限公司;GZX-9070MBE 型数显鼓风干燥箱;723 可见分光光度计;恒温水浴锅;FA2104N 型电分析天平 上海思龙科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 总黄酮的定量测定

1.3.1.1 芦丁标准曲线的绘制

采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 分光光度法绘制芦丁标准曲线。精密称取 120°C 干燥至质量恒定的芦丁对照品 23.0mg ,置于 100mL 容量瓶中,加 95% 乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,备用。精密吸取对照品溶液 0.0 、 1.0 、 2.0 、 3.0 、 4.0 、 5.0 、 6.0mL ,分别置于 25mL 容量瓶中,再分别加水 6.0 、 5.0 、 4.0 、 3.0 、 2.0 、 1.0 、 0.0mL 。加入 5% NaNO_2 溶液 1.0mL ,摇匀,放置 6min ,加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1.0mL ,摇匀,放置 6min ;再加入 4% NaOH 溶液 10.0mL ,加水至刻度,摇匀,放置 15min 。在波长 510nm 处测定吸光度,以质量浓度(C)对吸光度(A)进行线性回归,得回归方程: $C=0.0939A$, $R^2=0.9998$,芦丁质量浓度在 $0\sim 0.05\text{mg/mL}$ 之间有良好的线性关系。

1.3.1.2 总黄酮提取方法及定量测定

称取 1.00g 节节草粉末于具塞锥形瓶中,加入一定体积分数的乙醇溶液,置于超声波清洗器中超声一定时间,过滤,滤液经石油醚萃取脱色后,定容至 50mL ,精密移取 2.0mL 于 25mL 容量瓶中,采用 1.3.1 节方法进行总黄酮含量测定,以空白管为参比于 510nm 处测定吸光度,通过标准曲线计算得到总黄酮含量与总黄酮得率^[10]。

通过改变溶剂类型、乙醇体积分数、料液比、超声处理时间及超声温度等因素探讨超声波辅助乙醇提取技术对节节草总黄酮提取效果的影响。

1.3.2 总黄酮的定性分析

将节节草总黄酮提取液分别进行三氯化铁、氢氧化钠水溶液、三氯化铝、硼酸显色反应,对提取物进行验证。

1.3.3 总黄酮抗氧化性分析

1.3.3.1 提取液清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)实验

参照 Fenton 反应的方法建立反应体系模型^[11]。分别取 2mmol/L FeSO_4 溶液 3mL ,加 1mmol/L H_2O_2 溶液 3mL 摇匀后,加 6mmol/L 水杨酸溶液 3mL ,立即摇匀,于 37°C 水浴中加热 15min 后取出,测其吸光度 A_0 ,然后分别加入一定质量浓度的总黄酮提取液 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 1.0mL ,最后加入蒸馏水补充体积至 10mL 。继续水浴加热 15min ,在波长 510nm 处以空白液为参比测其吸光度 A_x 。采用以上方法实验,取 1.0mL 蒸馏水代替总黄酮提取液, 37°C 恒温 15min 后测其吸光度 A_0 。均重复 3 次。

$$P/\% = \frac{A_0 - A_x - A_{00}}{A_0} \times 100$$

式中: P 为羟自由基的清除率; A_0 为空白液的吸光度; A_x 为加入黄酮后溶液的吸光度; A_{00} 为加入蒸馏水后的溶液吸光度。

1.3.3.2 提取液脂质自氧化实验

1)标准曲线绘制:按照文献[12]方法,在 25mL 具塞比色管中,依次加 2.00mL 氯仿-冰醋酸、 1.00mL 质量分数 1% 的淀粉溶液,分别取已标定过的 KI-I_2 标准溶液(含碘 $0.00\sim 0.83\mu\text{mol}$) 0.0 、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 1.0 、 1.2mL ,加水定容至 25mL ,摇匀,取上层清液,以蒸馏水为参比,在波长 585nm 处测定吸光度,碘量(M , μmol) 在 $0\sim 0.96\mu\text{mol}$ 间与吸光度(A)存在良好的线性关系,回归方程为 $M=4.0153A+0.0039$, $R^2=0.9986$ 。

2)油脂过氧化值(peroxide value, POV)的测定:采用国际通用的烘箱储藏法^[13]使之发生氧化酸败变质并进行测定。称取 20g 油脂及 2mL 提取物,搅拌均匀后,放入烘箱中强化保存,间隔 1h 交换它们在烘箱中的位置并取待测样品 1mL ,加入 2.00mL 氯仿-冰醋酸溶解,再加入 1.00mL 10% KI 溶液,加盖摇匀 30s ,并置于暗处反应 3min 。取出后立即用水稀释并加入 1.00mL 1% 淀粉溶液,以后操作同标准曲线。根据吸光度和标准曲线计算出碘生成量,按下式计算油脂过氧化值(POV)及总黄酮对油脂的保护率:

$$\text{POV}/(\text{mmol/kg}) = \frac{\text{碘生成量}}{W}$$

式中: W 表示油脂质量/ kg 。

$$\eta/\% = \left(1 - \frac{\text{POV}_{\text{未1}} - \text{POV}_{\text{初}}}{\text{POV}_{\text{未2}} - \text{POV}_{\text{初}}}\right) \times 100$$

式中: η 为总黄酮对油脂的保护率/ $\%$; $\text{POV}_{\text{初}}$ 为未对油脂进行强化氧化时的过氧化值/ (mmol/kg) ; $\text{POV}_{\text{未1}}$ 为添加总黄酮的油脂强化氧化后的过氧化值/ (mmol/kg) ; $\text{POV}_{\text{未2}}$ 为未添加总黄酮的油脂强化氧化后的过氧化值/ (mmol/kg) 。

2 结果与分析

2.1 总黄酮的定性检测

节节草地上部分总黄酮提取液的颜色反应结果见表1, 可知其中主要含黄酮类和黄酮醇类物质。

表1 总黄酮提取液显色结果

Table 1 Coloration results of total flavonoid extract from the dried shoot of *Equisetum ramosissimum* Desf.

FeCl ₃	氢氧化钠溶液	AlCl ₃	H ₃ BO ₃
棕褐色沉淀	黄色	黄色	亮黄色

2.2 超声提取工艺单因素试验

2.2.1 料液比对提取效果的影响

本实验选择乙醇作为提取溶剂, 其料液比将影响总黄酮的得率。称取节节草粉末1.00g, 按1:10、1:15、1:20、1:25、1:30的料液比, 分别加入45%的乙醇, 在60℃条件下超声提取30min, 测定滤液的吸光度, 考察不同料液比对总黄酮得率的影响, 结果如图1所示。

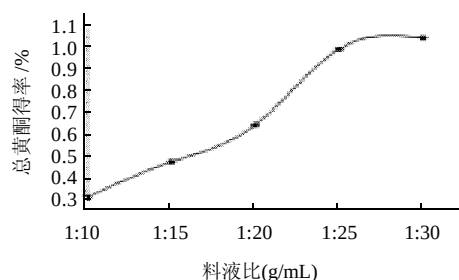


图1 料液比对提取效果的影响

Fig.1 Effect of solid-to-liquid ratio on total flavonoid extraction yield

由图1可知, 在1:10~1:25范围内, 随提取溶剂用量增大总黄酮提取率逐渐上升, 当达到1:25后, 总黄酮得率增加缓慢。通常情况下, 增加溶剂的量可以降低样品周围的浓度, 使细胞壁内外的浓度差增大, 有利于有效成分的溶出。当料液比超过1:25后, 总黄酮得率增加缓慢, 趋于稳定, 这是由于传质效率已趋于最大。从浸提效果、减少溶剂用量和降低浓缩负荷等方面综合考虑, 后续试验选1:25的料液比进行提取。

2.2.2 乙醇体积分数对提取效果的影响

以1:25的料液比, 考察不同乙醇体积分数对总黄酮得率的影响, 结果表明, 当乙醇体积分数为45%时, 黄酮得率达到最大, 这是由于黄酮的极性较小, 易溶于中等或中等偏下极性溶剂。当乙醇体积分数由45%增大到55%时, 黄酮得率反而下降, 可能由于乙醇分子间以及与水分子间存在氢键, 从而使水的极性降低, 导

致黄酮的溶解度下降。当乙醇体积分数超过75%后, 黄酮得率再次降低, 这可能是随着乙醇体积分数升高, 溶液极性相对偏高, 从而导致黄酮类化合物溶解度减小。根据“相似相溶原理”, 黄酮类化合物的溶出度与溶剂的极性有关, 极性相近可达到最大溶出度, 综合考虑, 选用45%乙醇溶液作为提取溶剂。

2.2.3 超声处理时间对提取效果的影响

称取节节草粉末1.00g, 按1:25的料液比, 加入45%的乙醇, 在60℃条件超声处理不同时间, 过滤后测定滤液的吸光度, 计算黄酮得率, 结果如图2所示。

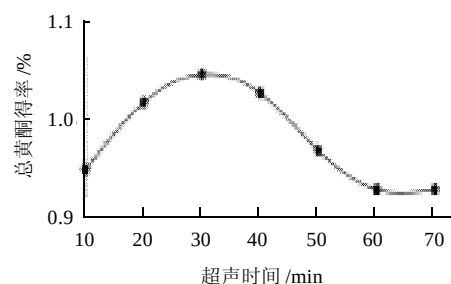


图2 超声时间对总黄酮提取效果的影响

Fig.2 Effect of sonication time on total flavonoid extraction yield

由图2可知, 总黄酮得率随超声波处理时间呈先增大后减小趋势。可能由于黄酮类物质本身易被氧化破坏, 过长时间暴露在外, 尤其是高温提取时, 最终总黄酮得率将减小, 此外, 考虑降低能耗及成本节约、提取效率以及提取周期等因素的影响, 最终选取为30min为最佳提取时间。

2.2.4 超声温度对提取效果的影响

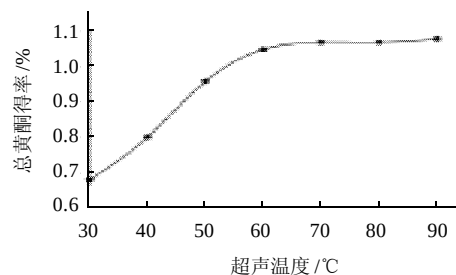


图3 超声温度对总黄酮提取效果的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on total flavonoid extraction yield

以45%乙醇为提取剂, 考察了不同超声温度对总黄酮得率的影响, 由图3可知, 总黄酮的得率随超声温度的升高而不断增大。原因可能是随温度升高, 分子的运动速度加快, 有效成分渗透和溶解速度加快, 从而使黄酮溶出度加大。当温度超过60℃后总黄酮得率无明显提高, 考虑温度过高可能造成黄酮化学结构变化、杂

质溶出量增加、后续操作不便以及溶剂损失等不利因素,最终选择超声温度 60℃ 为最佳提取温度。

2.3 正交试验确定最佳条件

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,因素水平如表 2 所示,结果如表 3 所示。

表 2 正交试验因素水平表

Table 2 Factors and their levels in orthogonal array design

试验号	A 料液比(g/mL)	B 乙醇体积分数/%	C 超声温度/℃	D 超声时间/min
1	1:20	25	40	20
2	1:25	35	50	30
3	1:30	45	60	40

表 3 节节草总黄酮提取工艺正交试验设计与结果

Table 3 Orthogonal array design and corresponding experimental results

试验号	A	B	C	D	总黄酮得率/%
1	1	1	1	1	0.505
2	1	2	2	2	0.945
3	1	3	3	3	1.056
4	2	1	2	3	0.933
5	2	2	3	1	1.133
6	2	3	1	2	1.116
7	3	1	3	2	1.162
8	3	2	1	3	1.114
9	3	3	2	1	1.039
均值 1	0.835	0.867	0.922	0.892	
均值 2	1.061	1.074	0.972	1.074	
均值 3	1.115	1.070	1.117	1.044	
极差 R	0.280	0.207	0.195	0.182	

以总黄酮得率为指标,由表 3 中极差分析结果可知,超声波技术提取各因素对节节草中总黄酮的提取率影响的主次顺序为: $A > B > C > D$,即料液比>乙醇体积分数>超声温度>超声时间,其中料液比的影响最大。由此得出超声辅助法提取湘西节节草中总黄酮的最佳工艺方案为 $A_3B_2C_2D_2$,即料液比 1:30、乙醇体积分数 45%、超声温度 60℃、时间 30min。

2.4 最佳工艺条件验证

采用正交试验中的最佳工艺条件验证实验:称取节节草粉末 1.00g,分别加入 30mL 45% 乙醇,超声波协同处理 30min,过滤,取上清液测定总黄酮质量及得率,平行提取 3 次,得率分别为 1.163%、1.164%、1.161%。

2.5 节节草总黄酮抗氧化性研究

2.5.1 提取液清除羟自由基($\cdot OH$)实验

自由基具有很高的反应活性,可导致细胞和组织器官损伤、诱发各种疾病、加速机体衰老。实验以没食子酸和 VC 做对比,考察 37℃ 总黄酮对自由基的清除

率。由图 4 可知,节节草总黄酮在 10~60 $\mu g/mL$ 范围内时,对 $\cdot OH$ 清除作用非常明显,随着总黄酮溶液质量浓度增高,对 $\cdot OH$ 的清除能力也相应增强。相同质量浓度下,清除 $\cdot OH$ 的能力大小为没食子酸>节节草总黄酮>VC。

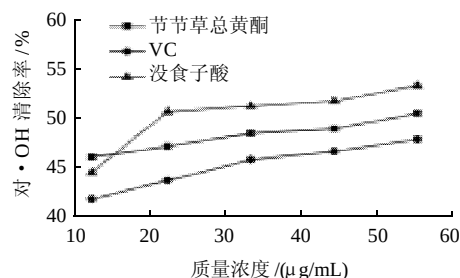


图 4 VC、节节草黄酮、没食子酸对 $\cdot OH$ 清除能力比较

Fig.4 Comparison of hydroxyl free radical scavenging capacities among total flavonoids from the dried shoot of *Equisetum ramosissimum* Desf., VC and gallic acid

2.5.2 总黄酮对油脂的抗氧化性

食用油脂含有不饱和脂肪酸,光、热、氧气等因素可引发脂肪酸脱去氢原子形成游离基,从而与氧结合,形成过氧化游离基,引发油脂自氧化反应。总黄酮作为抗氧化剂可捕获自由基,有效抑制油脂的自氧化反应。

实验考察了 30℃ 节节草中总黄酮做为抗氧化剂对茶籽油和猪油的抗氧化作用。表 4 结果表明,添加总黄酮后,茶籽油和猪油的过氧化值均比未添加总黄酮之前降低,这表明总黄酮能增加油脂的抗氧化能力。相同条件下,总黄酮对茶籽油的抗氧化性强于对猪油的抗氧化性,在相同时间内,两者的过氧化值相差值不大。

表 4 总黄酮对油脂的抗氧化性(过氧化值 POV)比较

Table 4 Inhibitory effect of total flavonoids from the dried shoot of *Equisetum ramosissimum* Desf. against lipid peroxidation in tea seed oil and lard

时间/h	1	2	3	4	5	6	7
茶籽油	0.94	1.52	1.99	2.28	3.75	4.11	4.42
茶籽油 + 节节草总黄酮	0.54	1.30	1.48	2.16	3.19	3.42	3.71
猪油	0.78	1.36	2.05	2.45	3.66	4.67	4.87
猪油 + 节节草总黄酮	0.51	1.05	1.59	1.97	2.30	3.48	3.95

2.5.2.1 温度对总黄酮抗茶籽油氧化效果的影响

油脂过氧化值测定过程中,温度的高低对测定结果的影响很大。由图 5 可看出,在 30、40℃ 条件总黄酮对茶籽油样的保护率随时间的延长而增大,温度升至 50℃,总黄酮对油样的保护率随时间的延长反而下

降。这可能由于总黄酮热稳定性的降低, 导致其对植物油样品的保护率降低。

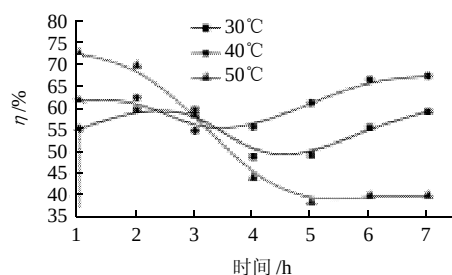


图5 总黄酮对茶籽油的保护率随温度变化的影响

Fig.5 Effect of temperature on anti-lipid peroxidation activity of total flavonoids from the dried shoot of *Equisetum ramosissimum* Desf. in tea seed oil

2.5.2.2 温度对总黄酮抗猪油氧化效果的影响

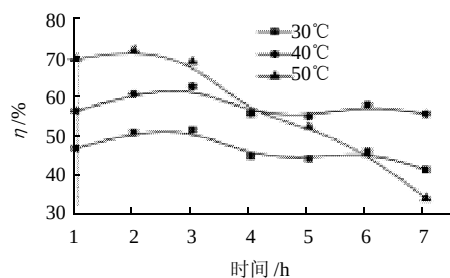


图6 总黄酮对猪油的保护率随温度变化的影响

Fig.6 Effect of temperature on anti-lipid peroxidation activity of total flavonoids from the dried shoot of *Equisetum ramosissimum* Desf. in lard

如图6所示, 节节草总黄酮在30℃和40℃对猪油脂的保护情况与相同条件下对茶籽油的保护效果相似。但比较两图可明显看出: 在后期反应中, 节节草总黄酮对茶籽油的保护率随时间的延长上升明显, 而其对猪油的保护效果则无明显变化。据此可得出: 在相同条件下, 节节草总黄酮对茶籽油的保护效果大于对猪油的保护效果。

3 结论

节节草总黄酮最佳提取工艺流程及提取条件为乙醇体积分数45%、料液比(g/mL)1:30、超声提取时间30min、超声温度60℃。此条件下, 总黄酮得率为1.16%。将该提取物进行自由基清除实验, 结果表明节节草总黄酮对羟自由基有一定的清除能力。抗油脂氧化实验表明, 节节草总黄酮对茶籽油的抗氧化性效果较猪油好, 但受温度、时间的影响变化较大。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典: 2000年版: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 42-43.
- [2] 王小雄, 贾忠建. 节节草化学成分的研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(12): 2524-2528.
- [3] STEINBERG F M, GUTHRIE N L, VILLABLANCA A C, et al. Soy protein with isoflavones has favorable effects on endothelial function that are independent of lipid and antioxidant effects in healthy postmenopausal women [J]. Am J Clin Nutr, 2003, 78(1): 123-130.
- [4] XU Hongxi, LEE S F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria [J]. Phytother Res, 2001, 15(1): 39-43.
- [5] 朱振宝, 田宾, 易建华. 金银花不同提取物的油脂抗氧化效果研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(2): 69-72.
- [6] 朱宇旌, 李新华, 张勇, 等. 苜蓿黄酮抗氧化性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(4): 615-618.
- [7] 邓鹏, 程永强, 薛文通. 油脂氧化及其氧化稳定性测定方法[J]. 食品科学, 2005, 26(增刊1): 196-199.
- [8] 李淑惠, 靳丹虹, 李德坤, 等. 木贼科植物研究概况 I. 化学成分研究[J]. 中草药, 2000, 31(7): 12-14.
- [9] 李德坤, 李静, 李平亚, 等. 木贼科植物研究概况 II. 药理活性[J]. 中草药, 2000, 31(8): 7-9.
- [10] 朱慧, 马瑞君, 吴双桃, 等. 薇甘菊总黄酮的提取及清除羟自由基活性的测定[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 71-73.
- [11] 丁利君, 周圳辉, 林燕如. 芒其中黄酮物质的提取及其抗氧化研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 77-82.
- [12] 赵新淮, 张娜, 王琳. 油脂过氧化值的碘量测定法比较研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(4): 60-62.
- [13] 崔永明, 余龙江, 敖明章. 甘草总黄酮对油脂抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 119-121.