

超声波辅助大米草总黄酮提取及抗氧化活性研究

罗彩林^{1*}, 温扬敏¹, 高如承², 谢永华¹, 陈淑增¹

¹泉州医学高等专科学校, 泉州 362000; ²福建师范大学生命科学学院, 福州 350108

摘要:应用超声波技术,以大米草为原料提取黄酮类化合物,设计正交实验,研究乙醇浓度、料液比、超声处理温度和提取时间对总黄酮提取效果的影响,分析得出最佳提取工艺条件。并测定大米草黄酮体外抗氧化活性。结果表明:大米草总黄酮提取的最佳工艺条件为:乙醇浓度 80%,提取时间 20 min,料液比 1:30 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),提取温度 45 °C。影响大米草黄酮提取率的主次因素是:料液比 > 乙醇浓度 > 提取温度 > 提取时间。大米草黄酮总抗氧化活性和抗超氧阴离子活力随着浓度的增加逐渐增加,呈明显的量效关系,并且能有效清除氧化脂质(MDA)。

关键词:大米草;黄酮;超声波;抗氧化

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

Ultrasonic Assisted Technology for Extracting Flavonoids from *Spartina* and Their Antioxidant Activity

LUO Cai-lin¹, WEN Yang-min¹, GAO Ru-cheng², XIE Yong-hua¹, CHEN Shu-zeng¹

¹Quanzhou medical college, Fujian Quanzhou 362000, China; ²College of life sciences, Fujian normal university, Fuzhou 350108, China

Abstract: The ultrasonic extraction technology was used to extract total flavonoids from *Spartina*. The influences of ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction time and temperature on the extraction percent of the flavonoids were analyzed through an orthogonal experiment. The optimum conditions were obtained as follows: 45 °C, 20 min, solid-liquid ratio of 1:30 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), ethanol concentration of 80%. The influential degree of each impact factor decreased in the order of solid-liquid ratio > ethanol concentration > extraction temperature > extraction time. Both the total antioxidant activity and scavenging activities for superoxide anion radicals were obviously related to the concentrations. The total flavonoids extracts from *Spartina* could significantly clear up MDA.

Key words: *Spartina*; flavonoids; ultrasonic; antioxidant

大米草 (*Spartina, anglica* C. E. Hubbard) 系禾本科 (Gramineae) 大米草属 (*Spartina* Schreber) 植物^[1], 是我国 1963 年从欧洲引种的一种多年生沿海滩涂生物。大米草能够防风护堤、促淤造陆, 但由于其繁殖力强, 疯长蔓延而超出人们控制的范围。对我国沿海生态和海水养殖造成了很大的破坏, 因而被称为“害人草”^[2,3]。针对大米草入侵所带来的一系列后果, 国内外采取了很多方法来控制, 但效果都不尽人意, 对其有效防控成了一个世界性的难题。

黄酮类化合物具有广泛的生物活性, 包括抗氧化, 抗衰老, 抗菌, 抗肿瘤, 抗病毒等^[4,5], 也是一类具有广阔开发前景的天然抗氧化剂。大米草含有丰

富的黄酮类化合物, 徐年军等对大米草提取物及其初级分离样品进行了抗氧化、抗菌、抗肿瘤活性的筛选, 找到了一些具有重要生物活性物质, 成分主要是多糖和黄酮^[6]。利用大米草丰富的资源, 从中分离纯化活性物质, 变害为宝, 对其资源进行开发利用是大米草生态防控的理想方法。研究超声波提取大米草总黄酮的工艺条件及总黄酮的抗氧化活性, 为进一步开发利用大米草资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料:

大米草, 采自福建泉州湾沿海滩涂, 经福建师范大学生命科学学院庄惠如教授鉴定为大米草 (*Spartina, anglica* C. E. Hubbard), 标本保存于泉州医学高等专科学校实验室。洗净后于干燥箱中 60 °C 烘

收稿日期: 2013-05-15 接受日期: 2013-09-12

基金项目: 国家海洋局海洋公益性行业科研专项资助项目 (20120521-4); 校级自然科学研究项目 (2009XJ07)

* 通讯作者 Tel: 86-015859775823; E-mail: cailin002@163.com

干,取出粉碎,过 100 目筛备用;芦丁标准品(上海原叶生物公司);维生素 C(阿特维斯(佛山)制药有限公司,批准文号 H44021227);丙二醛(MDA)试剂盒、总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒、抗超氧阴离子自由基试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.1.2 实验仪器:

多功能粉碎机(上海高翔食品机械厂 GX-02);电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司 DK-S11);721 型紫外可见分光光度计(上海光谱);冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司 FD-1C-50);超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司 KQ-500DE)。

1.2 实验方法

1.2.1 芦丁标准曲线的绘制

黄酮化合物的测定以芦丁为标样,采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法。准确吸取芦丁标准液 0.00, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 mL, 相当于芦丁 0.00, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 mg, 分别置于 10 mL 刻度试管中,各加 30% 乙醇溶液至 5 mL,加 5% 亚硝酸钠 0.30 mL,混匀,放置 5 min 后加入 10% 硝酸铝

0.30 mL,摇匀放置 6 min 后加入 4% 氢氧化钠 2.00 mL,再用 30% 乙醇溶液稀释至刻度,摇匀,放置 10 min 后于 510 nm 处比色测定,以吸光度 A 为横坐标,以芦丁浓度 C(mg/mL)为纵坐标,用最小二乘法做线性回归,得回归方程: $Y=0.1217X-0.1214$, $R^2=0.9998$

1.2.2 大米草黄酮的提取及测定方法

准确称取 5.0 g 大米草粉末,按正交设计条件提取,残渣用 30% 乙醇溶液洗涤 3 次,合并滤液,放置 2 h 后,离心沉淀 20 min,取上层清液 5 mL 按亚硝酸钠-硝酸铝分光光度法测定吸光度,经标准曲线回归方程换算后,得出提取液总黄酮浓度。然后按下式计算总黄酮提取率: $E\% = m/M \times 100\%$,其中:E%:提取率;m:提取液中总黄酮质量(g);M:大米草粉末质量(g)。其余上层清液冷冻干燥,得到大米草粗黄酮的干燥品。

1.2.3 大米草黄酮提取工艺条件的优化

在预实验的基础上,选取乙醇浓度、料液比、超声处理温度、提取时间 4 个因素为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计安排试验,其因素水平见表 1。

表 1 提取黄酮的实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of extraction of flavonoids

水平 Level	A	B	C	D
	乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	提取时间 Time (min)	料液比 Solid-liquid ratio($g \cdot mL^{-1}$)	提取温度 Temperature($^{\circ}C$)
1	60	20	1:10	30
2	70	40	1:20	45
3	80	60	1:30	60

1.2.4 大米草黄酮总抗氧化能力(T-AOC)测定

准确称取大米草粗黄酮的干燥品 50 mg,溶解于 50 mL 30% 乙醇溶液中,再分别稀释,得到 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/mL 的大米草黄酮溶液,另设计相同浓度 V_c 为对照组,按照南京建成生物工程研究所试剂盒测定说明书进行总抗氧化能力(T-AOC)测定。T-AOC 单位定义:在 37 $^{\circ}C$ 时,每 mL 黄酮溶液每分钟使反应体系的吸光度(OD)值,每增加 0.01 时,为一个总抗氧化能力单位(U)。

1.2.5 大米草黄酮抗超氧阴离子活力测定

准确称取大米草粗黄酮的干燥品 50 mg,溶解于 50 mL 30% 乙醇溶液中,再分别稀释,得到 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1 mg/mL 的大米草黄酮溶液,另设计相同浓度 V_c 为对照组,按照南京建成生物工程研

究所试剂盒测定说明书进行抗超氧阴离子活力测定。活力单位定义:在反应系统中,每升物质在 37 $^{\circ}C$ 反应 40 min 所抑制的超氧阴离子自由基相当于 1 mg 维生素 C 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位(U/L)。

1.2.6 大米草黄酮清除丙二醛活性测定

小鼠肝脏样品用预冷的生理盐水清洗,滤纸吸干,称取 0.5 g 于玻璃匀浆器,加 5 mL 预冷的生理盐水,冰上匀浆,即为 10% 组织匀浆液。将不同浓度的大米草黄酮溶液分别加入小鼠肝脏匀浆,37 $^{\circ}C$ 保温 2 h 后离心,取上清液,严格按照南京建成生物工程研究所试剂盒测定说明书测定丙二醛(MDA)的量,另设计相同浓度 V_c 为对照组。

2 结果与分析

2.1 大米草黄酮最佳提取工艺确定

研究乙醇浓度、料液比、超声波处理温度、提取

时间 4 个因素对大米草黄酮提取的影响,通过 $L_9(3^4)$ 正交试验,确定最佳提取工艺条件,结果见表 2。

表 2 正交试验结果及分析

Table 2 Results and analysis of orthogonal experiment

编号 No.	因素 (Factor)				总黄酮提取率 Yield of total flavonoids (%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.93
2	1	2	2	2	1.25
3	1	3	3	3	1.89
4	2	1	2	3	1.67
5	2	2	3	1	1.90
6	2	3	1	2	0.84
7	3	1	3	2	2.06
8	3	2	1	3	1.33
9	3	3	2	1	1.77
K_1	1.357	1.553	1.033	1.533	
K_2	1.470	1.493	1.563	1.383	
K_3	1.720	1.500	1.950	1.630	
R	0.363	0.060	0.917	0.247	

结果得出影响大米草黄酮提取率的主次因素是:料液比 > 乙醇浓度 > 提取温度 > 提取时间。大米草黄酮类化合物提取的最佳工艺为: $A_3B_1C_3D_2$, 即乙醇浓度为 80%, 提取时间 20 min, 料液比为 1:30 ($g \cdot mL^{-1}$), 提取温度为 45 °C。在拟选定的最佳提取条件下进行验证试验, 所提取的大米草黄酮得

率可达 2.03%。根据方差分析(表 3), 料液比和乙醇浓度对大米草黄酮提取率影响显著 ($P < 0.05$), 而提取温度对大米草黄酮提取率有一定影响, 但影响不显著 ($0.10 > P > 0.05$)。提取时间对大米草黄酮提取率几乎没有影响。

表 3 大米草黄酮提取的正交实验方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal experiment of extracting flavonoids from *Spartina*

方差来源 Source of variance	偏差平方和 Sum of deviation	自由度 Degree of freedom	F 值 F value	P
乙醇浓度 (A)	0.0648	2		
料液比时间 (C)	0.0783	2	34.50	$P < 0.05^*$
提取温度 (D)	0.1497	2	211.83	$P < 0.01^*$
误差	0.01	2	2	15.5

2.2 大米草黄酮的总抗氧化活性

大米草黄酮的总抗氧化活性见图 1, 从图 1 可以看出, 大米草黄酮的总抗氧化活性随着浓度的增加逐渐增加, 具有良好的量效关系, 浓度越大总抗氧

化活性越强。当浓度较低时, 大米草黄酮的总抗氧化活性和 Vc 较为接近, 但浓度增加后, 大米草黄酮的总抗氧化活性比 Vc 更大, 且随着浓度增加, 差距有变大的趋势。

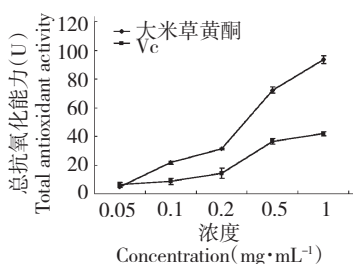


图1 大米草黄酮总抗氧化能力

Fig. 1 Total antioxidant activity of flavonoids

2.3 大米草黄酮清除丙二醛的活性

大米草黄酮清除丙二醛活性见图2。由图可知随着大米草黄酮浓度的增加,小鼠肝脏匀浆中丙二醛的含量逐渐降低,说明大米草黄酮能有效清除小鼠肝组织匀浆体外生成的氧化脂质(MDA),这与张晓玲等的研究结果一致^[7]。相同条件下,低浓度的大米草黄酮清除丙二醛活性比Vc还要高。

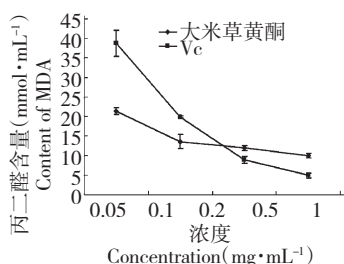


图2 大米草黄酮清除丙二醛的能力

Fig. 2 Flavonoids removal ability of MDA

2.4 大米草黄酮抗超氧阴离子活力

大米草黄酮抗超氧阴离子活力见图3。由图可知,随着浓度的增加,大米草黄酮和维生素C的抗超氧阴离子活力逐渐增大,相同条件下大米草黄酮的抗超氧阴离子活力比维生素C稍低。当浓度较高为1.0 mg/mL时,两者的抗超氧阴离子活力比较接近,差异不显著($P > 0.1$)。

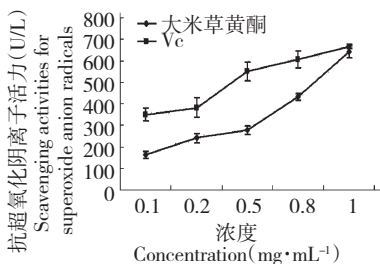


图3 大米草黄酮抗超氧阴离子活力

Fig. 3 Scavenging activities for superoxide anion radicals of flavonoids

3 讨论与结论

机体代谢过程中会不断产生自由基,其性质活泼,可通过连锁的氧化反应,产生多种有害物质,包括丙二醛、酮基等,以及新的氧自由基,后者可在机体各部位攻击核酸、蛋白质、糖类及生物膜系统中的多不饱和脂肪酸等,使这些生物大分子出现交联或断裂,导致细胞结构与功能受到不可逆转的氧化损伤,从而诱发多种病理损伤^[8]。黄酮类化合物可通过不同途径和机制抵制对机体有氧化损伤作用的自由基,从而发挥其抗氧化作用。清除自由基的最主要机制,是通过酚羟基与自由基反应生成较稳定的半醌式自由基,从而终止自由基链式反应^[9]。

大米草黄酮良好的天然抗氧化剂。应用超声波技术,设计正交实验,分析得出大米草黄酮最佳提取工艺条件为:乙醇浓度80%,提取时间20 min,料液比1:30 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),提取温度45℃。影响大米草黄酮提取率的主次因素是:料液比 > 乙醇浓度 > 提取温度 > 提取时间。大米草黄酮总抗氧化活性和抗超氧阴离子活力随着浓度的增加逐渐增加,呈明显的量效关系,并且能有效清除小鼠肝组织匀浆体外生成的氧化脂质(MDA)。与人工合成的抗氧化剂维生素C相比,大米草黄酮的抗氧化效果不比维生素C差,其中总抗氧化活力和低浓度条件下清除丙二醛的活力还比维生素C强。我国大米草资源丰富,从中提取有效成分,开发利用它们的药用价值,变废为宝,转害为利,对于防治大米草,保护原有生态环境,服务地方经济均有重要的现实意义。

参考文献

- 1 Thompson JD, McNeilly T, Gray AJ. Population variation in *Spartina anglica* C. E. Hubbard II. Reciprocal transplants among three successional populations. *New Phytologist*, 1991, 117: 129-139.
- 2 Tang TG (唐廷贵), Zhang WJ (张万钧). A discussion of ecological engineering benefits of *spartina spp* and its ecological invasion. *Engin Sci* (中国工程科学), 2003, 5(3): 15-20.
- 3 Lome KK, Paul H. Exotic species and estuaries: Managing *Spartina anglica* in Tasmania, Australia. *Ocean & Coastal Management*, 2000, 43: 573-584.
- 4 Chen H (陈颖), Li LJ (李丽娟), Li L (李良), et al. Research progress on extraction and pharmacology of flavonoid compounds in Chinese herbal medicines. *Yunnan Chem Tech*

- (云南化工), 2011, 38(4): 50-52.
- 5 Gong JY(龚金炎), Zhang Y(张英), Wu XQ(吴晓琴). Advances in studies on antiviral activities of flavonoids. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2008, 39: 623-627.
 - 6 Xu NJ(徐年军), Yan XJ(严小军), Xu JL(徐继林), *et al.* Screening of bioactive materials in *Spartina anglica*. *Marine Sci*(海洋科学), 2005, 29(3): 17-24.
 - 7 Zhang XL(张晓玲), Qu WJ(瞿伟菁), Sun B(孙斌), *et al.* The antioxidative activity of flavonoids from *Rosa roxburghii* trutt. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2005, 17: 396-400.
 - 8 Wu B(吴斌), Li XZ(李湘洲), Yang GE(杨国恩), *et al.* Research progress in antioxidant property and antioxidant mechanism of curcumin. *Acta Agric Jiangxi*(江西农业学报), 2009, 21: 121-123.
 - 9 Ou YP(欧阳平), Zhang GY(张高勇), Kang BA(康保安), The principle, application and prospect of new extraction techniques of flavonoids. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2003, 15: 563-566

(上接第 1232 页)

- 12 Guo LH(郭吕华), Yan L(杨岚), Du FL(杜发亮), *et al.* The mechanism of kidney-reinforcing chinese herbal mixture in the promoting osteoblast function *in vitro*. *J Pract Stomat*(实用口腔医学杂志), 2013, 29(1): 56-60.
- 13 Wang CT(王昌唐), Xu L(旭磊), Chen KM(陈克明), *et al.* Effect of puerarin on proliferation and differentiation of osteoblasts *in vitro*. *Chin J Tissue Engin Res*(中国组织工程研究), 2012, 16: 6102-6106.
- 14 Yan-Bin Wu, Cheng-Jian Zheng, Lu-Ping Qin, *et al.* Antios-teoporotic activity of anthraquinones from *Morinda officinalis* on osteoblasts and osteoclasts. *Molecules*, 2009, 14: 573-583.
- 15 Eun Mi Choi. Protective effect of quercitrin against hydrogen peroxide-induced dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Eep Toxicol Pathol*, 2012, 64: 211-216.
- 16 Zhu RQ(朱瑞清), Ge BF(葛宝丰), Yang BJ(杨斌金), *et al.* Study on estrogenic effect of genistein and apigenin *in vitro*. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2012, 37: 2317-2322.
- 17 Yang YR(杨韵若), Lu Y(陆阳). The chemical constituent and pharmacological activity of *Eclipta prostrata*. *World Phytomedicines*(国外医药·植物药分册), 2005, 20: 10-14.

(上接第 1247 页)

- 5 Ye L(叶林), Pu YF(蒲云峰), Yang FF(杨菲菲). Extraction process of *Sophora alopecuroides* gum assisted by ultrasonic. *Food Sci Tech*(食品科技), 2011, 36: 220-223.
- 6 Shan XJ(单晓菊), Di ML(邸明磊), Zhang Y(张岩), *et al.* Optimization of decolorization technology of *sophora alopecuroides* polysaccharide with activated carbon by response surface analysis. *Chin Pharm*(中国药房), 2011, 22: 4443-4446.
- 7 Dong Q(董群), Zheng LY(郑丽伊), Fang JN(方积年). Modified phenol-sulfuric acid method for determination of the content of oligo- and polysaccharides. *Chin Pharm J*(中国医学杂志), 1996, 9: 550-553.
- 8 Wu Y, Tang J, Cui SW, *et al.* Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds. *Carbohydr Polym*, 2007, 70: 437-443.
- 9 Li J, Fan L, Ding S. Isolation, purification and structure of a new water-soluble polysaccharide from *Zizyphus jujuba* cv. Jinsixiaozao. *Carbohydr Polym*, 2011, 83: 477-482.
- 10 Zhang WJ(张惟杰). Biochemical Research Techniques of Glycoconjugates, 2nd Edition(糖复合物生化研究技术, 第二版). Hangzhou: Zhejiang University Publishing House, 1999. 195-197.