

# 超声波协同提取鱼腥草黄酮及其抗氧化性

张剑, 曾虹燕\*, 黄炎

(湘潭大学 化工学院 生物技术研究所, 湖南 湘潭 411105)

**摘要:** 研究了超声波协同乙醇提取不同部位鱼腥草黄酮的最佳工艺条件, 并测定黄酮提取物对 DPPH·、羟基自由基和超氧自由基的抑制效果。结果表明: 鱼腥草叶中黄酮含量最高, 在固液比 1:30, 85%乙醇浓度, 65℃下提取 40 min, 黄酮提取率为 2.36%。鱼腥草黄酮对 DPPH· 自由基活性、·OH 自由基和超氧 O<sub>2</sub><sup>-</sup>· 自由基的清除率可达 72.8%、70.8% 和 69.8%, 表明鱼腥草黄酮是一种天然有效的自由基清除剂。

**关键词:** 鱼腥草; 黄酮; DPPH; 抗氧化活性

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)01-0141-04

## Extraction of flavonoid from *Hououynia cordate* by ultrasound and its anti-oxidation

ZHANG Jian, ZENG Hong-Yan\*, HUANG Yan

(College of Chemical Engineering, Biotechnology Institute, Xiangtan University, Xiangtan 411105, China)

**Abstract:** The optimal process conditions of ethanol extraction for flavonoid in different parts of *Hououynia cordate* assisted by ultrasound was researched, inhibition effects of flavonoid extraction on DPPH, hydroxyl radical, superoxide radical were also studied. The results showed that the flavonoid content in the leaves was the highest, and under the optimal conditions (the ratio of solid to liquid is 1:30, alcohol 85% at 65℃ for 40 min), the yield of flavonoid was 2.36%. *H. cordate* flavonoid possessed strong scavenging activity on DPPH, hydroxyl radical, superoxide radical with corresponding maximum scavenging rate 72.8%, 70.8% and 69.8%, suggesting that it would be an effective natural free radical scavenger.

**Key words:** *Hououynia cordate*; flavonoid; DPPH; anti-oxidation

黄酮类化合物广泛存在于植物中, 具抗炎、抗菌、抗衰老、降血脂、增加机体免疫力等功效。鱼腥草为三白草科蕺菜属植物蕺菜 (*Hououynia cordate*) 全草, 是药食两用植物。其性味辛、寒, 具有清热解毒、消肿排脓、利尿通淋的功效 (曹纬国等, 2003)。鱼腥草含有槲皮素、槲皮甙、金丝桃甙、芦丁等黄酮类化合物。其黄酮提取主要有溶剂萃取法和微波协同提取法。溶剂萃取法中以乙醇提取法效率最高, 但产品成分复杂, 耗时 (廖德胜等, 2002); 微波法节能、时间大为缩短, 但泄露的微波更可能造成环

境污染 (肖谷清等, 2007; 陈根洪等, 2005)。超声波协助溶剂提取可大大缩短提取时间、提高提取效率 (谭胜兵, 2007)。李胜华等 (2006) 用超声波协同乙醇提取鱼腥草叶中总黄酮, 提取率为 3.24%, 前人对鱼腥草总黄酮提取 (李胜华等, 2007) 和鱼腥草叶黄酮 (叶春等, 2007) 的研究较多。但用超声波协同乙醇提取鱼腥草不同部位 (根、茎、叶) 总黄酮和其抗氧化能力的研究目前国内尚未见报道。用超声波协同乙醇提取新技术可克服常规浸提法的不足, 对样品进行快速、高效的提取, 同时还不破坏提取产物的

收稿日期: 2008-03-28 修回日期: 2009-07-04

基金项目: 湘潭市科技支撑重点项目 (S2008NC10220161) [Supported by the Key Science and Technology Supporting Item (S2008NC10220161)]

作者简介: 张剑 (1969-), 湖南涟源人, 讲师, 主要从事食品工程研究, (E-mail) zjalice12@yahoo.com.cn.

\* 通讯作者 (Author for correspondence)

分子结构。本研究用此法对鱼腥草黄酮提取及其抗氧化能力进行了深入研究,发现鱼腥草黄酮对 DP-PH·、羟基自由基和超氧自由基有较强的抑制效果,是一种天然有效的自由基清除剂。本文可为综合利用鱼腥草资源提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

鱼腥草(采自湘潭大学校园),洗净阴干,37℃干燥,分别取不同部位(根、茎、叶)制成鱼腥草粉(60目)。试剂与仪器:芦丁(上海化学试剂公司);UV9100分光光度计(日立公司);KQ400DB型数控超声波反应器。

### 1.2 方法

(1)浸提法:分别准确称量不同部位鱼腥草粉3.0 g(根、茎、叶),50 mL 乙醚浸提30 min 脱脂和叶绿素等,过滤,放入含300 mL的80%乙醇液的索氏提取器中提取,定容,测黄酮含量。(2)超声波法:按乙醇浸提法所述将3.0 g不同部位鱼腥草粉脱脂,过滤,脱脂鱼腥草粉按表1工艺条件进行超声波协同乙醇提取,过滤,浓缩滤液,37℃干燥,得鱼腥草黄酮粗提物,测黄酮含量。

表1 提取工艺参数

Table 1 Factors of extraction

水平 Level	乙醇浓度(%) Concentration of ethanol	固液比(g/mL) Rate of solid to liquid	温度 Temperature (°C)	时间 Time (min)
	A	B	C	D
1	85	1:10	55	20
2	88	1:20	60	30
3	90	1:30	65	40
4	95	1:40	70	50

### 1.3 分析方法

(1)黄酮含量参照曾虹燕等(2002)测定:以芦丁为对照品测定鱼腥草不同部位总黄酮含量,加入铝离子试剂,使黄酮化合物与铝盐形成配合物在可见光区能获得稳定的特征吸收峰。(2)DPPH 自由基清除率参照吴春等(2005)测定:一定量的样品液及DPPH·的 $2 \times 10^{-4}$  mol/L 无水乙醇溶液加入到同一具塞试管中,摇匀。30 min 后于520 nm 最大吸收波长处测定其吸光度计算清除率。(3)·OH 自由基清除率参照丁利君等(2005)测定:依次加入2 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  3 mL, 1 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  3 mL, 6

mmol/L 水杨酸 3 mL, 摇匀,于37℃水浴15 min 后测其吸光度。然后分别加入不同浓度的鱼腥草黄酮液,蒸馏水定溶至10 mL,摇匀,加热15 min,测吸光度,计算清除率。(4)( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )自由基清除率参照丁利君等(2005)测定:将鱼腥草黄酮与2 mol/L 邻苯三酚的PBS溶液(pH8.34)配制成不同浓度的黄酮液,在326 nm 最大吸收波长处测定其吸光度,计算清除率。

## 2 结果与amp;讨论

### 2.1 超声协同乙醇提取鱼腥草黄酮

2.1.1 超声波协同提取叶中黄酮 通过正交试验,考察超声波协同下,各因素对乙醇提取叶中黄酮的影响。由表2可知,各因素对提取叶中黄酮结果顺序为:提取时间>固液比>温度>乙醇浓度,提取时间影响最大;乙醇浓度85%、固液比1:20、65℃、超声波协同提取40 min,黄酮粗提物得率为2.36%。李胜华等(2006)超声波协同乙醇提取鱼腥草叶,总黄酮提取率达3.24%,可能由于其鱼腥草来源于规范栽培基地,原料本身总黄酮含量较高的缘故。在最佳条件下做了3次追加验证实验,提取率分别为2.41%、2.28%和2.39%,均值为2.36%。

表2 正交试验结果(叶)

Table 2 Results of orthogonal design (leaves)

No.	A	B	C	D	Yield (%)
1	1	1	1	1	1.13
2	2	2	2	2	1.24
3	3	3	3	3	0.64
4	4	4	4	4	0.92
5	1	2	3	4	1.13
6	2	1	4	3	1.78
7	3	4	1	2	1.42
8	4	3	2	1	1.80
9	1	3	4	2	1.02
10	2	4	3	1	1.14
11	3	1	2	4	0.75
12	4	2	1	3	1.02
13	1	4	2	3	0.94
14	2	3	1	4	0.51
15	3	2	4	1	2.13
16	4	1	3	2	2.16
K1	4.22	5.82	4.08	6.20	
K2	4.66	5.52	4.73	5.84	
K3	4.94	3.96	5.06	4.38	
K4	5.9	4.42	5.85	3.30	
R	0.420	0.465	0.443	0.724	

2.1.2 超声波协同提取茎中黄酮 在超声波协同乙醇提取茎中黄酮的实验中(表 3),各因素对提取茎中黄酮效果顺序为:固液比>温度>提取时间>乙醇浓度,固液比的影响最大。最佳条件为:乙醇浓度 90%、1:40 固液比、60 °C 超声波协同提取 40 min,得率为 0.85%。在最佳条件下做了 3 次追加验证实验,提取率分别为 0.91%、0.78%和 0.84%,均值为 0.84%。

表 3 正交试验结果(茎)

Table 3 Results of orthogonal design (stems)

No.	A	B	C	D	Yield (%)
1	1	1	1	1	0.50
2	2	2	2	2	0.39
3	3	3	3	3	0.23
4	4	4	4	4	0.37
5	1	2	3	4	0.44
6	2	1	4	3	0.62
7	3	4	1	2	0.42
8	4	3	2	1	0.39
9	1	3	4	2	0.57
10	2	4	3	1	0.64
11	3	1	2	4	0.56
12	4	2	1	3	0.46
13	1	4	2	3	0.52
14	2	3	1	4	0.13
15	3	2	4	1	0.84
16	4	1	3	2	0.72
K1	2.04	2.40	1.52	2.38	
K2	1.79	2.14	1.87	2.11	
K3	2.06	1.34	2.04	1.84	
K4	1.95	1.96	2.41	1.51	
R	0.069	0.266	0.224	0.218	

2.1.3 超声波协同提取根中黄酮 超声波协同下,考察各因素对乙醇提取根中黄酮的影响,结果见表 4。提取时间对鱼腥草(根)黄酮提取效果的影响最

显著(表 3),其它三因素对提取效果的影响几无差异。在乙醇浓度 90%,1:30 固液比,60 °C 超声波协同提取 40 min,得率为 0.49%。在最佳条件下做了 3 次追加验证实验,提取率分别为 0.51%,0.48%和 0.54%,均值为 0.51%。

## 2.2 鱼腥草不同部位总黄酮含量

对比超声波协同法和乙醇浸提法的提取效果(表 5),鱼腥草叶的黄酮含量最高,其次为茎,根的含量最低。超声波协同法在外观性状上优于乙醇浸提法的,两种方法的提取效率几无差异,但超声波协同提取时间远低于乙醇浸提法的。

表 4 正交试验结果(根)

Table 4 Results of orthogonal design (roots)

No.	A	B	C	D	Yield (%)
1	1	1	1	1	0.25
2	2	2	2	2	0.22
3	3	3	3	3	0.20
4	4	4	4	4	0.21
5	1	2	3	4	0.34
6	2	1	4	3	0.42
7	3	4	1	2	0.44
8	4	3	2	1	0.45
9	1	3	4	2	0.40
10	2	4	3	1	0.40
11	3	1	2	4	0.32
12	4	2	1	3	0.40
13	1	4	2	3	0.30
14	2	3	1	4	0.25
15	3	2	4	1	0.44
16	4	1	3	2	0.40
K1	1.29	1.39	1.34	1.39	
K2	1.29	1.40	1.29	1.46	
K3	1.40	1.30	1.34	1.32	
K4	1.46	1.35	1.47	1.12	
R	0.042	0.025	0.044	0.105	

表 5 提取方法对不同部位的总黄酮萃取的影响(n=3)

Table 5 Effect of methods on extraction of flavonoid from different parts

	乙醇浸提 Soxhlets			超声波 Ultrasound		
	叶 Leaf	茎 Stem	根 Root	叶 Leaf	茎 Stem	根 Root
外观 Appearance		黄褐色			黄色	
时间 Time		9 h			30 min	
得率 Yield (%)	2.02	0.78	0.43	2.36	0.85	0.49

## 2.3 黄酮提取物清除 DPPH·自由基活性

由图 1 可看出,当黄酮液浓度小于 0.2 mg/mL 时,DPPH·自由基的清除活性随黄酮液浓度的增大而急剧增大;继续加大黄酮液的浓度,DPPH·自由基的清除活性渐渐趋向于饱和。叶中黄酮液对 DPPH·自由基的清除率最高,叶中黄酮液浓度 1.0

mg/mL 时,对 DPPH·清除率为 72.8%;根的最底。可能叶中总黄酮含量最高,根的黄酮含量最低的缘故,黄酮含量高,其抗氧化活性就高。

## 2.4 鱼腥草黄酮·OH 自由基清除活性

羟自由基是最活泼的,其反应速率极快,它是机体危害最大的自由基。图 2 结果表明,叶中黄酮液

浓度 1.0 mg/mL 时,叶中黄酮对 ·OH 自由基的清除率为 70.8%。叶中黄酮液对 ·OH 的清除活性最高,根的最低;这些与其对 DPPH 自由基的清除活性一致(图 1)。当黄酮液浓度小于 0.3 mg/mL 时,黄酮对 ·OH 清除效果随黄酮液浓度的增大而急剧增大;继续加大黄酮液浓度,其对 ·OH 自由基清除活性逐渐趋于饱和(图 2)。

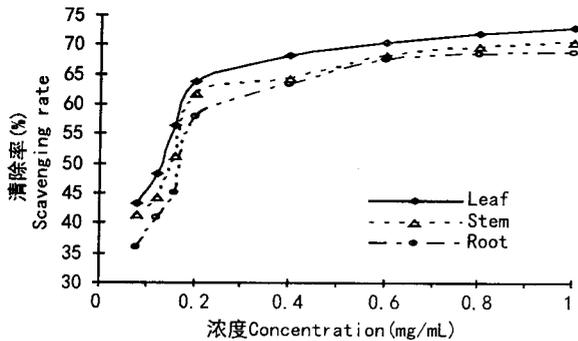


图 1 黄酮清除 DPPH· 自由基活性  
Fig.1 DPPH· scavenging activity of the flavonoid

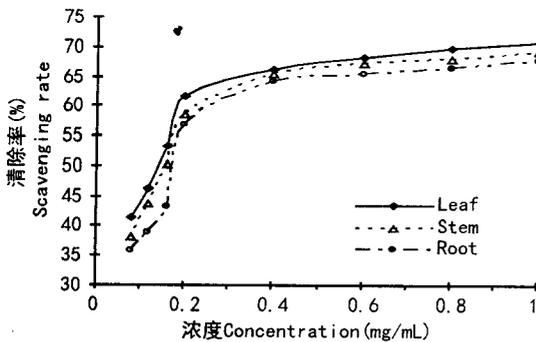


图 2 黄酮对 ·OH 自由基的清除活性  
Fig.2 Hydroxyl radical scavenging activity of the flavonoid

### 2.5 鱼腥草黄酮对超氧(O<sub>2</sub><sup>-</sup>·)自由基的抑制效果

图 3 结果可知,叶中黄酮液的(O<sub>2</sub><sup>-</sup>· 自由基的清除率最高,根的最低。当黄酮液浓度小于 0.3 mg/mL 时,黄酮对超氧(O<sub>2</sub><sup>-</sup>·)自由基清除能力随黄酮液浓度的增大而急剧增大;继续加大黄酮液浓度,其(O<sub>2</sub><sup>-</sup>· 自由基清除活性逐渐趋于饱和。叶中黄酮液浓度 1.0mg/mL 时,叶中黄酮对 O<sub>2</sub><sup>-</sup>· 自由基的清除率为 69.8%。这些与其 DPPH 自由基的清除和 O<sub>2</sub><sup>-</sup>· 自由基的清除活性的结果一致(图 1,2)。

## 3 结论

(1)通过正交试验,确定了鱼腥草不同部位中黄

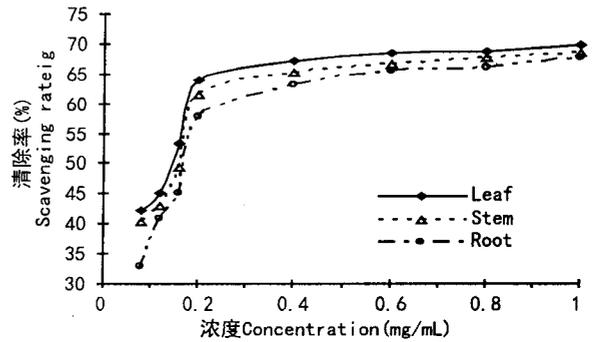


图 3 黄酮对 O<sub>2</sub><sup>-</sup>· 自由基的清除活性  
Fig.3 Superoxide radical scavenging activity of the flavonoid

酮化合物的最佳提取条件,其中鱼腥草叶黄酮得率最高,这与齐迎春等(2001)报道结果符合。其最佳工艺条件是:乙醇浓度 85%、固液比 1:20、65℃ 下,超声波辅助提取 40 min,黄酮粗提物得率为 2.36%。超声辅助法优于浸提法,可能由于超声产生的空化作用加速植物细胞壁破裂,促进总黄酮化合物的释放,从而提高提取效率。(2)鱼腥草黄酮对 DPPH· 自由基活性、·OH 自由基和超氧 O<sub>2</sub><sup>-</sup>· 自由基均有清除效应,是一种较好的天然抗氧化剂。

### 参考文献:

Cao WG(曹伟国),Liu ZQ(刘志勤),Shao Y(邵云), et al. 2003. A progress in pharmacological research of flavonoids(黄酮类化合物药理作用研究进展)[J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin* (西北植物学报),23(12):2 241-2 247

Chen GH(陈根洪),Chen C(程超). 2005. Study on the microwave assisted complex extracton technology of flavonoid and polysaccharide from *Houttuynia cordata*(微波法复合提取鱼腥草黄酮和多糖工艺的研究)[J]. *J Hubei Institute for Nationalities* (湖北民族学院学报),9(3):296-298

Ding LJ(丁利君),Zhou XH(周圳辉),Lin YR(林燕如). 2005. Study on extraction and anti-oxidation of the flavonoid from *dier-anopterispedata*(芒其中黄酮物质的提取及其抗氧化研究)[J]. *Food Sci*(食品科学),26(8):77-81

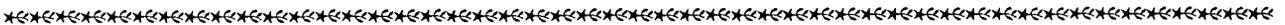
Liao DS(廖德胜),Wang JM(王敬勉). 2002. Study on the extraction of flavonoid and application from *Houttuynia cordata*(鱼腥草黄酮的制备及其应用研究)[J]. *China Food Additives*(中国食品添加剂),2:81-83

Xiao GQ(肖谷清),Li WY(李旺英),Dai D(戴典). 2007. Total flavones in *Houttuynia cordata* by microwave-assisted extraction (鱼腥草中总黄酮的微波辅助萃取研究)[J]. *Chin J Spect Lab*(光谱实验室),9(5):825-828

Tang SB(谭胜兵). 2007. Study on the extraction of natrual product with supersonic(超声波技术在天然产物提取中的应用)[J]. *J Zaozhuang Univ*(枣庄学院学报),24(2):84-86

(下转第 121 页 Continue on page 121)

1998. The positive correlations between the activities of antioxidant enzymes and somatic embryogenesis during the period of tissue culture in *Lycium barbarum* (枸杞组织培养中抗氧化酶活性与体细胞胚发生相关性的研究)[J]. *J Lanzhou Univ: Nat Sci*(兰州大学学报:自然科学版), **34**(3):93-99
- Foyer CH, Noctor G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signaling[J]. *New Phytol*, **146**:359-388
- Gutteridge JMC, Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems[J]. *Trends Biochem Sci*, **15**(4):129-135
- Hall MB, Jennings JP, Lewis BA, et al. 2001. Evaluation of starch analysis methods for feed samples[J]. *J Sci Food Agric*, **81**:17-21
- Kuehnle AR, Chen FC, et al. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* [J]. *Plant Cell Reports*, **11**(9):438-442
- Larkindale J, Huang B. 2004. Thermo-tolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene[J]. *Plant Physiol*, **161**:405-413
- Laws N, Galinsky B. 1996. Anthurium world market survey[J]. *Floracult Inter*, (6):21
- Li DM(李冬梅), Lai ZX(赖钟雄). 2005. Changes of the contents of starches in the process of somatic embryomaturaton in longan (*Dinocarpus longan*) (龙眼体胚成熟过程中淀粉含量的变化)[J]. *J Fujian Agric Fore Univ: Nat Sci*(福建农林大学学报:自然科学版), **34**(2):220-223
- Li HY(李华云), Zhuang JP(庄军平), Huang SQ(黄胜琴), et al. 2007. Effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration on growth and carbon fixation of phalaenopsis 'sogo Benz sogo' (高浓度 CO<sub>2</sub> 对蝴蝶兰 CO<sub>2</sub> 吸收速率和生长的影响)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **34**(3):705-710
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. *Trends Plant Sci*, **7**:405-410
- Pierik RLM, Steegmans HHM, vanDerMeys JAJ. 1974. Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* [J]. *Sci Hort*, **2**(2):193-198
- Xin WJ(辛伟杰), Xu B(徐彬), Wang GD(王广东), et al. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Anthurium andraeanum* (花烛体细胞胚胎发生及植株再生研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **33**(6):1281-1286
- Yang JL(杨金玲). 1998. Studies on cytohistology and starch accumulation during somatic embryogenesis of *Picea meyeri* (白木千体细胞胚胎发生的细胞组织学和淀粉积累动态的研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), **18**(3):335-338
- Zhan YF(詹园凤), Wu Z(吴震), Jin XX(金潇潇), et al. 2006. Anti-oxidative enzymes and some physiological features in somatic embryogenesis of garlic (大蒜体细胞胚胎发生过程中抗氧化酶活性变化及某些生理特征)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), **26**(9):1799-1802
- Zhang JY(张建瑛), Yang L(杨玲), Shen HL(沈海龙). 2007. Changes of antioxidative enzyme activity in somatic embryogenesis of *Sorbus pohuashanensis* (花楸体细胞胚发生过程中抗氧化酶活性的变化)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **43**(2):264-268



(上接第 144 页 Continue from page 144)

- Li SH(李胜华), Wu XJ(伍贤进), Yu JP(郁建平). 2006. Study on extraction process of flavonoids from *Houttuymia cordata* leaves with supersonic extraction (超声波提取鱼腥草叶总黄酮优化工艺研究)[J]. *Food Sci*(食品科学), **27**(12):270-273
- Li SH(李胜华), Wu XJ(伍贤进). 2007. Study on extraction process of flavonoids extracting methods in different parts of *Houttuymia cordata* (鱼腥草总黄酮的提取及其方法对比)[J]. *J Jishou Univ: Nat Sci*(吉首大学学报:自然科学版), **28**(3):117-118
- Qi YC(齐迎春), Hu C(胡城), et al. 2001. Comparative analysis of nutrients in stems and leaves from *Houttuymia cordata* (鱼腥草茎、叶的营养成分对比分析)[J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research* (特产研究), **4**:45-46
- Ye C(叶春), Kan JQ(阚健全), Tan SM(谭书明). 2007. Study on extraction of flavonoids from *Houttuymia cordata* leaves (鱼腥草叶中总黄酮提取工艺研究)[J]. *Food Sci*(食品科学), **28**(11):192-195
- Wang H(王辉), Yan BZ(严宝珍). 2006. Study on extraction of total flavones from *Ginkgo biloba* by ultrasonic wave method (银杏叶中总黄酮超声提取法)[J]. *Nat Prod Res Develop* (天然产物研究与开发), **18**:135-138
- Zeng HY(曾虹燕), Zhou PH(周朴华), et al. 2002. Total flavones contents in cultural materials of *Hypericum sampsonii* (元宝草培养物的总黄酮量)[J]. *J Plant Res Environ* (植物资源与环境学报), **11**(1):59-60