

溪黄草常压回流提取物与减压回流提取物 抗氧化性的比较

温玲蓉, 林恋竹, 赵谋明

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文对比了常压回流提取法与减压提取法得到的溪黄草不同溶剂提取物总酚, 黄酮, 单宁提取率及抗氧化性强弱。实验结果表明: 溪黄草提取物抗氧化性及总酚、黄酮、单宁提取率均受提取溶剂极性影响。在相同溶剂提取条件下, 溪黄草提取物抗氧化性及总酚、黄酮、单宁提取率均受不同提取方法影响。常压回流提取物的抗氧化性高于减压回流提取物的抗氧化性。溪黄草中除总酚、黄酮、单宁外, 还有其他物质会对抗氧化性有贡献。料液比的恒定及提取溶剂的选择是溪黄草有效成分提取的关键所在。高温不仅不会破坏溪黄草有效成分, 还能增强有效成分的溶出。

关键词: 溪黄草; 常压回流提取; 减压回流提取; 抗氧化性

文章编号: 1673-9078(2010)1-71-5

Compassion of Antioxidant Capacity of Extracts from *Rabdosia Lophanthoides* (Buch.Ham ex D.Don) Hara by Reflux Extraction and Decompression Reflux Extraction

WEN Ling-rong, LIN Lian-zhu, ZHAO Mou-ming

(College of Light Industry and Food, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The study compared the extraction rates of total phenols, flavonoids, tannins and antioxidant capacity of extracts from *rabdosia lophanthoides* (Buch.Ham ex D.Don) Hara by decompression reflux extraction and reflux extraction. The results showed that the extraction rates of total phenols, flavonoids, tannins and antioxidant capacities of extracts were influenced by solvent polarity. Using the same extraction agents, the extraction rates of total phenols, flavonoids, tannins and antioxidant capacity of extracts were influenced by different extraction methods. The antioxidant capacity of extracts by reflux extraction was higher than that by decompression reflux extraction. Several compounds including the total phenols, flavonoids, tannins, might contribute to antioxidant capacity of *rabdosia lophanthoides* (Buch.Ham ex D.Don) Hara. Constant material-solvent ratio and suitable extraction agents were the key factors influencing the extraction of active ingredients from *Rabdosia lophanthoides*(Buch.Ham ex D. Don)Hara. High temperature could improve the extraction efficiency of the effective compounds in *Rabdosia lophanthoides*(Buch.Ham ex D. Don)Hara.

Key words: *rabdosia lophanthoides*(Buch. Ham ex D. Don)Hara; reflux extraction; decompression reflux extraction; antioxidant capacity

溪黄草属于唇形科香茶属植物, 是一种多年生草本植物。据中华大辞典记载, 溪黄草具有清热祛湿、凉血散瘀之功效, 对急性肝炎、肠炎、痢疾等有较好效果^[1]。溪黄草含萜类、黄酮类、酚类、氨基酸等多种化学成分^[2,3]。酚类化合物具有较强的抗氧化性, 研究表明其抗氧化性能减缓冠状动脉硬化、癌症和年龄相关的大脑退行性疾病, 另还具有抗菌、抗炎和舒张

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD27B03, 2006BAD27B04)

作者简介: 温玲蓉(1986-), 女, 本科

通讯作者: 赵谋明(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品生物技术。

血管的作用^[4]。鉴于多种慢性病及退行性疾病与体内的氧自由基过剩有关, 因此从溪黄草中提取酚类化合物, 并评价其抗氧化性强弱就显得非常有必要。

常压回流提取法能高效快速从天然产物中提取有效成分, 因此天然产物有效成分提取普遍采用常压回流提取法。回流提取法常采用水、乙醇或水-乙醇作为提取剂, 而水、乙醇的沸点又较高, 高温对于天然产物中热敏性物质是一种威胁。减压回流提取法通过改变体系真空度有效降低提取溶剂的沸点, 热敏性物质不会被高温破坏, 且提取过程在真空条件下进行, 提取物不会被氧气所氧化。另外, 真空条件下, 溶剂能

在低温下保持沸腾和回流,有利于物料与溶剂的混合及有效成分的溶出^[5]。

本文对比了常压回流提取法与减压提取法得到的溪黄草不同溶剂提取物总酚,黄酮,单宁提取率,并用DPPH·清除能力及铁氰化钾还原力作指标评价了抗氧化性强弱。

1 材料与方法

1.1 材料

溪黄草,购于广州万怡药房五山店,广东产。

DPPH·(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl): Sigma公司;磷酸二氢钠,磷酸氢二钠,无水乙醇,丁醇,乙酸乙酯,铁氰化钾,三氯乙酸,氯化铁,无水碳酸钠,钨酸钠,钼酸钠,磷酸,浓盐酸,硫酸锂,溴水,没食子酸,芦丁,均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 样液制备

1.2.1.1 减压回流法

水提取物:称取5.0g溪黄草(粉碎过80目筛),按料液比1:20(g:mL)添加100mL水,调节真空度0.095MPa,55℃减压回流2h,55℃浓缩至干,用60%乙醇定容至50mL,制成水提取物贮备液;

乙酸乙酯提取物:称取5.0g溪黄草(粉碎过80目筛),按料液比1:20(g:mL)添加100mL乙酸乙酯,调节真空度0.095MPa,30℃减压提取(微沸状态)2h,35~40℃浓缩至干,用60%乙醇定容至50mL,制成乙酸乙酯提取物贮备液;

60%乙醇提取物:称取5.0g溪黄草(粉碎过80目筛),按料液比1:20(g:mL)添加100mL60%乙醇,调节真空度0.095MPa,33℃减压回流2h,40~45℃浓缩至干,用60%乙醇定容至50mL,制成60%乙醇提取物贮备液;

丁醇提取物:称取5.0g溪黄草(粉碎过80目筛),按料液比1:20(g:mL)添加100mL丁醇,调节真空度0.095MPa,66℃减压回流2h,65~75℃浓缩至干,用60%乙醇定容至50mL,制成丁醇提取物贮备液。

1.2.1.2 常压回流法

水提取物:称取5.0g溪黄草(粉碎过80目筛),按料液比1:20(g:mL)添加100mL水,100℃回流2h,55℃浓缩至干,用60%乙醇定容至50mL,制成水提取物贮备液;

乙酸乙酯提取物:称取5.0g溪黄草(粉碎过80目筛),按料液比1:20(g:mL)添加100mL乙酸乙酯,80℃回流2h,35~40℃浓缩至干,用60%乙醇定容至

50mL,制成乙酸乙酯提取物贮备液;60%乙醇提取物:称取5.0g溪黄草(粉碎过80目筛),按料液比1:20(g:mL)添加100mL60%乙醇,80℃回流2h,40~45℃浓缩至干,用60%乙醇定容至50mL,60%乙醇提取物贮备液;

丁醇提取物:称取5.0g溪黄草(粉碎过80目筛),按料液比1:20(g:mL)添加100mL丁醇,114℃回流2h,65~75℃浓缩至干,用60%乙醇定容至50mL,制成丁醇提取物贮备液。

1.2.2 抗氧化性的评价

1.2.2.1 DPPH·清除能力测定

参考Wei Luo等人^[6]的方法,并作适当修改。吸取样品待测液将不同提取方法不同溶剂制备的提取物贮备液做适当稀释,每个样品至少做5个稀释度,便于计算各提取物贮备液EC50值)2.0mL,加入0.2mmol/L DPPH·溶液2.0mL,摇匀,放置30min。以无水乙醇调零,测定517nm处的吸光度A样品。测定样品待测液2.0mL与无水乙醇2.0mL混合液在517nm处的吸光度A对照,再测定2.0mL DPPH·溶液与2.0mL无水乙醇在517nm处的吸光度A空白。DPPH清除率按以下公式计算。EC50值为自由基清除率达到50%时的样品浓度。

$$\text{清除率}/\% = (1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}}) \times 100$$

1.2.2.2 铁氰化钾还原法

参考Dina Atmani等人^[7]的方法,并作适当修改。取1mL样品待测液(将不同提取方法不同溶剂制备的提取物贮备液做适当稀释,每个样品至少做5个稀释度,便于计算各提取物贮备液EC50值),加入pH6.6的磷酸缓冲液2.5mL和1%(质量百分数)铁氰化钾溶液2.5mL,混合后在50℃放置20min,加入10%(质量百分数)三氯乙酸溶液2.5mL,4800r/min离心10min,取上清液2.5mL,加入2.5mL蒸馏水和0.1%(质量百分数)氯化铁2.5mL,混匀,静置10min,在700nm处测定吸光度。还原力的EC50值为还原力达到0.5时的样品浓度。

1.2.3 总酚、黄酮、单宁提取率测定

1.2.3.1 总酚提取率测定

标准曲线的绘制:参考H.J.D.Dorman等人^[8]的方法,并作适当修改。称取120℃干燥恒重没食子酸9.4mg,蒸馏水定容至100mL。分别精密量取没食子酸溶液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8mL置10mL容量瓶中,加水至约6mL,摇匀,各加Folin-Ciocalteu试剂0.5mL,摇匀,在1~8min内加

20% (质量百分数) 碳酸钠溶液 1.5 mL, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 在 40 °C 水浴上保温 2 h, 迅速冷却, 立即在 760 nm 处测定吸光度。

提取物总酚提取率测定: 按照标准曲线绘制方法测定。总酚提取率以每 100 g 原料中提取出的总酚含量表示。实验均重复 3 次。

1.2.3.2 黄酮提取率测定

标准曲线的绘制: 参考 Robert Socha 等人^[9]的方法, 并作适当修改。称取 120 °C 干燥恒重芦丁 5.1 mg, 用 60% 微热乙醇定容至 50 mL, 准确吸取标准应用液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 6 只 10 mL 容量瓶中, 加 30% 乙醇使成 5 mL, 加 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 1 mol/L NaOH 溶液 4 mL, 加水 0.4 mL, 摇匀, 放置 15 min, 于 510 nm 波长处测定吸光度。

提取物黄酮提取率测定: 按照标准曲线绘制方法测定。黄酮提取率以每 100 g 原料中提取出的黄酮含量表示。实验均重复 3 次。

1.2.3.3 单宁提取率测定

采用张婷等人^[10]的方法, 并作适当修改。用干酪素振摇吸附单宁后, 用 Folin-Ciocalteu 法测定单宁含量。分别吸取 0.1 mL 待测样品加水定容至 10 mL 后倾入 100 mL 三角瓶中, 加入精密称取的 100 mg 干酪素, 混匀, 放入摇床中振摇后 (150 r/min, 45 min), 取出过滤, 得滤液。测定滤液中未被吸附的总酚含量, 用总酚含量减去干酪素吸附单宁后测得总酚含量可得单宁含量。

提取物单宁提取率计算: 提取率以每 100 g 原料中提取出的单宁含量表示。实验均重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 抗氧化性比较

2.1.1 DPPH·清除能力比较

2.1.1.1 减压回流提取法不同溶剂提取物

由表 1 可看出, EC₅₀ 值按从小到大排列顺序是: 60%乙醇提取物<丁醇提取物<乙酸乙酯提取物<水提取物, 说明 DPPH·清除能力: 60%乙醇提取物>丁醇提取物>乙酸乙酯提取物>水提取物。

2.1.1.2 常压回流提取法不同溶剂提取物

由表 1 可看出, EC₅₀ 值按从小到大排列顺序是: 60%乙醇提取物~丁醇提取物<乙酸乙酯提取物<水提取物, 说明 DPPH·清除能力: 60%乙醇提取物~丁醇提取物>乙酸乙酯提取物>水提取物。

2.1.1.3 两种提取法不同溶剂提取物 DPPH·清除能力比较

由表 1 可看出, 两种提取法不同溶剂提取物 DPPH·清除能力受提取溶剂极性影响。两种提取法均表明: 溪黄草提取物中, DPPH·清除能力: 60%乙醇提取物>(≈) 丁醇提取物>乙酸乙酯提取物>水提取物。

另外, 相同溶剂做提取剂条件下: 常压回流提取物的 EC₅₀ 均小于减压回流提取物, 说明相同溶剂做提取剂条件下, 常压回流提取物的 DPPH·清除能力强于减压回流提取物。

表 1 提取物 DPPH·清除能力比较

Table 1 DPPH· scavenging capacity of the extracts from *Rabdosia lophanthoides*(Buch.Ham ex D. Don)Hara

提取方法	试样	R ²	线性关系	回归系数		EC ₅₀ 置信区间(μL)
				常数项/显著性	一次项/显著性	
减压回流提取	水提取物	0.995	显著	0.193/不显著	0.0504/显著	(2.369, 3.062)
	乙酸乙酯提取物	0.998	显著	-0.14/不显著	0.0381/显著	(1.627, 1.904)
	60%乙醇提取物	0.998	显著	-0.127/显著	0.01157/显著	(0.415, 0.488)
	丁醇提取物	0.999	显著	-0.0629/显著	0.0138/显著	(0.595, 0.655)
常压回流提取	水提取物	0.997	显著	0.0457/不显著	0.0242/显著	(1.166, 1.343)
	乙酸乙酯提取物	0.992	显著	-0.201/显著	0.0164/显著	(0.503, 0.732)
	60%乙醇提取物	0.997	显著	-0.117/显著	0.0106/显著	(0.370, 0.454)
	丁醇提取物	0.993	显著	-0.236/显著	0.0132/显著	(0.333, 0.511)

注: (1) 置信水平为 95%; (2) 显著性概率<0.05, 显著; 显著性概率>0.05, 不显著; (3) 线性关系: DPPH·清除率与试样浓度 (用提取物贮备液体积数表示) 线性关系

2.1.2 铁氰化钾还原能力比较

2.1.2.1 减压回流提取法不同溶剂提取物

由表 2 可看出, EC₅₀ 值按从小到大排列顺序是:

60%乙醇提取物<丁醇提取物<乙酸乙酯提取物<水提取物, 说明铁氰化钾还原能力: 60%乙醇提取物>丁醇提取物>乙酸乙酯提取物>水提取物。

2.1.2.2 常压回流提取法不同溶剂提取物

由表 2 可看出, EC50 值按从小到大排列顺序是: 60%乙醇提取物≈丁醇提取物<乙酸乙酯提取物≈水提取物, 说明铁氰化钾还原能力: 60%乙醇提取物≈丁醇提取物>乙酸乙酯提取物≈水提取物。

2.1.2.3 两种提取法不同溶剂提取物铁氰化钾还原能力比较

由表 2 可看出, 两种提取法不同溶剂提取物铁氰

化钾还原能力受提取溶剂极性影响。两种提取法均表明: 溪黄草提取物中, 铁氰化钾还原能力: 60%乙醇提取物>(≈) 丁醇提取物>乙酸乙酯提取物>(≈) 水提取物。

另外, 相同溶剂做提取剂条件下: 常压回流提取物的 EC50 均小于减压回流提取物, 说明相同溶剂做提取剂条件下, 常压回流提取物的铁氰化钾还原能力强于减压回流提取物。

表 2 铁氰化钾还原力

Table 2 Potassium ferricyanide reducing powers of the extracts from *Rabdosia lophanthoides*(Buch.Ham ex D. Don)Hara

提取方法	试样	R ²	线性关系	回归系数		EC50 置信区间(μl)
				常数项/显著性	一次项/显著性	
减压回流提取	水提取物	0.998	显著	-2.210/显著	22.017/显著	(8.003, 9.593)
	乙酸乙酯提取物	0.999	显著	-1.341/显著	16.745/显著	(6.633, 7.432)
	60%乙醇提取物	0.999	显著	-0.517/显著	5.270/显著	(2.012, 2.223)
	丁醇提取物	0.997	显著	-0.814/显著	7.513/显著	(2.599, 3.286)
常压回流提取	水提取物	0.999	显著	-0.664/显著	8.498/显著	(3.374, 3.797)
	乙酸乙酯提取物	0.999	显著	-0.823/显著	8.529/显著	(3.253, 3.630)
	60%乙醇提取物	0.998	显著	-0.556/显著	5.839/显著	(2.166, 2.560)
	丁醇提取物	0.999	显著	-0.605/显著	5.893/显著	(2.185, 2.498)

注: (1) 置信水平为 95%; (2) 显著性概率<0.05, 显著; 显著性概率>0.05, 不显著; (3) 线性关系: 铁氰化钾还原力与试样浓度(用提取物贮备液体积数表示)线性关系

综上所述, 以 DPPH-清除能力, 铁氰化钾还原能力作抗氧化指标, 实验结果均表明: 以 60%乙醇作提取剂, 溪黄草提取物的抗氧化性最高, 其次是丁醇, 然后是乙酸乙酯, 最后是水。在相同溶剂提取条件下, 常压回流提取物的抗氧化性高于减压回流提取物。

2.2 总酚、黄酮、单宁提取率测定

2.2.1 减压回流提取法不同溶剂提取物

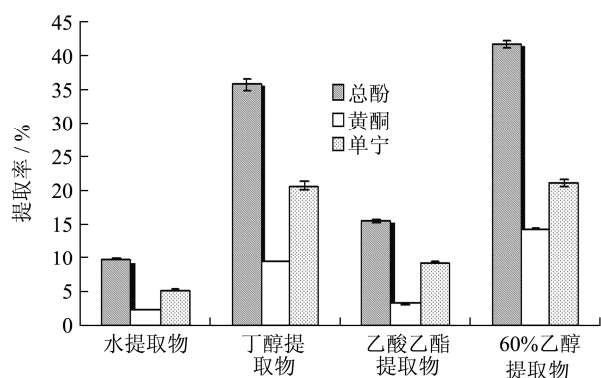


图 1 减压回流提取法不同溶剂提取物总酚、黄酮、单宁提取率

Fig.1 Extraction rates of total phenols, flavonoids and tannins of extracts by decompression reflux extraction using different solvent

由图 1 可知, 总酚提取率按高低排列: 60%乙醇提取物>丁醇提取物>乙酸乙酯提取物>水提取物。黄酮

提取率按高低排列: 60%乙醇提取物>丁醇提取物>乙酸乙酯提取物>水提取物。单宁提取率按高低排列: 60%乙醇提取物≈丁醇提取物>乙酸乙酯提取物>水提取物。

2.2.2 常压回流提取法不同溶剂提取物

由图 2 可知, 总酚提取率按高低排列: 60%乙醇提取物>丁醇提取物>乙酸乙酯提取物>水提取物。黄酮提取率按高低排列: 60%乙醇提取物>丁醇提取物>乙酸乙酯提取物≈水提取物。单宁提取率按高低排列: 60%乙醇提取物>丁醇提取物>乙酸乙酯提取物>水提取物。

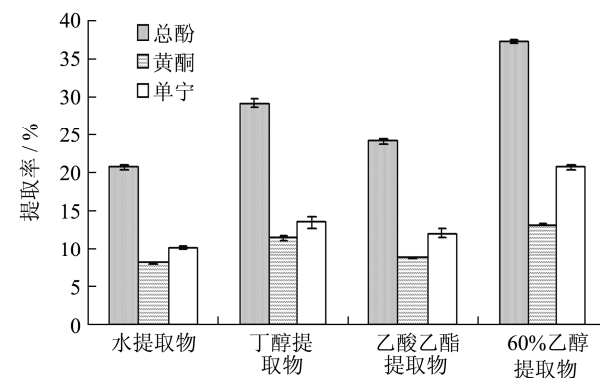


图 2 常压回流提取法不同溶剂提取物总酚、黄酮、单宁提取率

Fig.2 Extraction rates of total phenols, flavonoids and tannins of extracts by reflux extraction using different solvent

综上所述,不同溶剂作提取剂,对溪黄草总酚、黄酮、单宁的提取率存在影响。总的说来,用60%乙醇作提取剂,溪黄草总酚、黄酮、单宁的提取率是最高的,其次是丁醇,然后是乙酸乙酯,最后是水。

用60%乙醇作提取剂时,减压回流法总酚提取率高于常压回流提取法总酚提取率,两种提取方法对黄酮、单宁提取率影响不大;用丁醇作提取剂时,减压回流提取法总酚、单宁提取率高于常压回流提取法总酚、单宁提取率,但减压回流提取法黄酮提取率稍低于常压回流提取法黄酮提取率;对于以乙酸乙酯、水作提取剂,常压回流提取法总酚、黄酮、单宁的提取率均高于减压回流提取法总酚、黄酮、单宁的提取率。

2.3 讨论

实验结果表明:溪黄草提取物抗氧化性及总酚、黄酮、单宁提取率均受提取溶剂极性影响。另外,在相同溶剂提取条件下,溪黄草提取物抗氧化性及总酚、黄酮、单宁提取率均受不同提取方法影响。

常压回流提取物的抗氧化性高于减压回流提取物的抗氧化性。对于总酚、黄酮、单宁提取率,在以60%乙醇或丁醇作提取剂时,减压回流提取法优于常压回流提取法;在以乙酸乙酯或水作提取剂时,常压回流提取法优于减压回流提取法。

因此,溪黄草总酚、黄酮、单宁提取率高低不一定与抗氧化性强弱有直接相关性,特别是选择不同体外抗氧化评价指标时。虽然,鉴于总酚、黄酮、单宁具有良好抗氧化性,也不排除溪黄草中其他化合物对抗氧化性所作的贡献。即是说:溪黄草中除总酚、黄酮、单宁外,还有其他物质会对抗氧化性有贡献。

若将抗氧化性作为两种提取方法提取效率的评判指标,则常压回流提取法优于减压回流提取法。减压回流提取物抗氧化性弱于常压回流提取物的原因可能在于:为了追求在尽可能低的温度下保证提取溶剂的沸腾,回流状态,采取了较高的真空度,提取溶剂可能来不及被冷凝,回流,就被真空泵抽走,导致料液比下降,影响有效成分溶出。虽然常压回流提取法温度高于减压回流提取法,但溶剂能有效回流,保持恒定的料液比,更有利于有效成分的溶出。

料液比的恒定及提取溶剂的选择是溪黄草有效成分提取的关键所在。另外,高温不仅不会破坏溪黄草有效成分,还能增强有效成分的溶出。

3 结论

(1)溪黄草提取物抗氧化性及总酚、黄酮、单宁提取率均受提取溶剂极性影响。另外,在相同溶剂提取条件下,溪黄草提取物抗氧化性及总酚、黄酮、单宁提取率均受不同提取方法影响。

(2)常压回流提取物的抗氧化性高于减压回流提取物的抗氧化性。溪黄草中除总酚、黄酮、单宁外,还有其他物质会对抗氧化性有贡献。

(3)料液比的恒定及提取溶剂的选择是溪黄草有效成分提取的关键所在。另外,高温不仅不会破坏溪黄草有效成分,还能增强有效成分的溶出。

参考文献

- [1] 丁利君,周燕芳,林楠.溪黄草中黄酮类物质提取及对羟自由基清除作用[J].食品与机械,2004,20(3):13-14.
- [2] 吴剑峰.溪黄草的研究综述[J].时珍国医国药,2003,14(8):498-500.
- [3] 邓韵,蔡妙颜,田野,胡松青,李琳.溪黄草不同溶剂提取物中总二萜含量的测定[J].现代食品科技,2005,(2):153-154,157
- [4] Bin-Gui Wang,Wei-Wei Zhang,Xiao-Juan Duan, et al. In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae) [J]. Food Chemistry,2009,113:1101-1105.
- [5] Jun-Xia Wang, Xiao-Hua Xiao, Gong-Ke Li. Study of vacuum microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds and pigment from Chinese herbs[J]. Journal of Chromatography A, 2008,1198-1199:45-53.
- [6] Wei Luo,Mou ming Zhao,Bao Yang,et al. Identification of bioactive compounds in *Phyllanthus emblica* L. fruit and their free radical scavenging activities[J]. Food Chemistry, 2009,114:499-504.
- [7] Dina Atmani, Nassima Chahe, Meriem Berboucha,et al. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants[J]. Food Chemistry, 2009,112:303-309.
- [8] H.J.D.Dorman,A.Peltoketo,R.Hiltunen,et al.Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs[J]. Food Chemistry,2003,83:255-262.
- [9] Robert Socha, Lesław Juszcak, Sławomir Pietrzyk,et al. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. Food Chemistry, 2009,113:568-574.
- [10] 张婷,糜漫天,唐勇,等人.光皮木瓜多酚类的提取和清除DPPH的抗氧化活性[J].营养学报,2007,29(5):485-489.