

小蓟提取物的制备及其抗氧化活性研究

马蓉蓉,张修正,翟珍妮,邹旖旎,刘海梅,赵 芹

(鲁东大学 食品工程学院,山东 烟台 264039)

摘要:小蓟(*Cirsium setosum*)是近年来新兴的一种食药兼用的野菜,富含多种生物活性成分。本研究采用超声联合乙醇提取的方法,提取小蓟中的黄酮类活性物质,并以黄酮类物质的含量为参照,通过单因素实验、正交试验确定小蓟提取液制备的最优工艺。以最优工艺制备小蓟提取液,测定其羟自由基清除能力、DPPH 自由基清除能力、铁离子螯合能力和还原力,评价其体外抗氧化活性。结果表明,小蓟中黄酮类物质的最优提取工艺为:乙醇 60%,料液比为 1:20($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),超声时间为 30 min。小蓟提取液的羟自由基的清除率为 34.52%,DPPH 自由基的清除率为 44.78%,铁离子螯合率为 60.61%,并且具有较高的还原力。本研究提示小蓟中黄酮类化合物具有显著的抗氧化活性,通过超声联合乙醇提取可以显著提升小蓟中黄酮类化合物的提取率。

关键词:小蓟;黄酮;超声提取;抗氧化活性

中图分类号:Q946.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-8020(2020)04-0361-05

小蓟(*Cirsium setosum*),别名青青菜、刺刺菜、野红花等,为菊科蓟属植物,在我国分布广泛,俄罗斯东部、日本、朝鲜、中欧等地亦有分布。小蓟具有凉血止血、祛瘀消肿的功能,可用于治疗衄血、吐血、尿血、便血、崩漏下血、外伤出血、痈肿疮毒等^[1],为历代中医临床的常用药之一,也是国家卫生计生委公布药食同源品种之一。目前关于小蓟的药理活性和功能的研究主要集中在对血液系统的作用,如杨星昊等^[2]研究发现小蓟的乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物等均具有不同程度的止血、凝血和抗炎作用。周文序等^[3]发现小蓟中的止血有效成分主要为柳穿鱼苷和芦丁。聂倩等^[4]研究发现小蓟中的有机酸类物质如原儿茶酸、咖啡酸、绿原酸等同样具有止血效果,可以显著缩短凝血时间。此外,小蓟还具有抗癌^[5]、降低血压^[6]、抗菌消炎^[7-9]等生理功能,其中,黄酮和酚酸类成分是影响其药理学活性的主要因素^[10-11]。

黄酮类化合物是广泛存在于植物中的具有抗氧化作用的次生代谢产物。小蓟中的黄酮类物质含量较高,具有显著的药理学作用^[12]。黄酮类化合物的生理活性主要有抗氧化和清除自由基,在

抗肿瘤、抗癌、抗炎、抗菌、抗病毒方面作用显著,还可以作为天然抗氧化剂和功能食品添加剂使用^[13-14]。因此,本研究以小蓟中的黄酮类物质为切入点,利用乙醇联合超声提取的方法,确定其提取的最优工艺,并评价其体外抗氧化活性,为小蓟中的活性成分研究提供有益补充,也为其精深加工和高值化利用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

小蓟(*C. setosum*),干品,购于烟台中医世家药品超市,经高速万能粉碎机粉碎后过 60 目筛备用。

1.2 实验设备与实验试剂

T6 型紫外可见分光光度计,购自北京普析通用仪器有限公司;PS-40A 型超声机,购自龙口市先科仪器公司;81-2 型恒温磁力搅拌器,购自上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司。

乙醇、三氯化铝、铁氰化钾、三氯乙酸等化学

收稿日期:2020-06-30;修回日期:2020-08-13

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划项目(201710451115,201710451116);山东省重点研发计划(医用食品)(2018YYSP009);校企合作项目(28000101)

第一作者简介:马蓉蓉(1996—),女,山东烟台人,研究方向为生物活性物质。E-mail:769182346@qq.com

通信作者简介:赵芹(1983—),女,山东青岛人,副教授,博士,研究方向为生物活性物质。E-mail:candyffff@163.com

试剂均为国产分析纯。

1.3 小蓟提取物的制备

取 1 g 小蓟粉末加入试管,加入乙醇溶液,放入温度为 30 ℃,功率为 300 W 的超声波清洗机中进行超声处理,提取不同时间后于转速 5000 r·min⁻¹ 条件下离心 5 min,收集上清液即为小蓟提取液。

1.4 总黄酮的含量测定方法

以芦丁为标准品,分别配成 250、125、62.5、31.25、15.63、7.81 和 3.91 mg·L⁻¹ 的芦丁溶液,采用 AlCl₃ 显色法来测定芦丁含量^[15],绘制标准曲线(图 1),建立回归方程: $Y = 0.003\,4X + 0.001\,8$, 相关系数 $R^2 = 0.999\,9$ 。在 415 nm 下测定小蓟提取液的吸光度,计算总黄酮的含量。

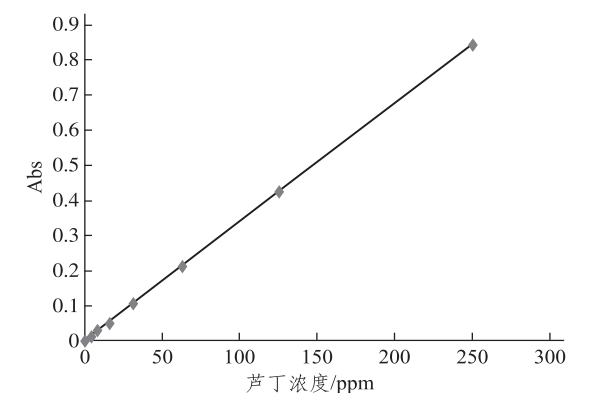


图 1 芦丁标准曲线
Fig. 1 Standard curve of Rutin

1.5 单因素实验

1.5.1 料液比对小蓟中总黄酮提取的影响

设定乙醇浓度为 60%,超声温度为 30 ℃,超声时间 30 min,料液比分别为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30,测定小蓟提取液中总黄酮含量,确定最佳料液比。

1.5.2 乙醇浓度对小蓟中总黄酮提取的影响

设定料液比为 1:20,超声温度 30 ℃,超声时间 30 min,乙醇浓度分别为 30%、45%、60%、75%、90%,测定小蓟提取液中总黄酮含量,确定最佳乙醇浓度。

1.5.3 超声时间对小蓟中总黄酮提取的影响

设定乙醇浓度为 60%,料液比为 1:20,超声温度 30 ℃,超声时间分别为 10、20、30、40、50 min,测定小蓟提取液中总黄酮含量,确定最佳超声时间。

1.6 正交试验

基于单因素试验结果,选取乙醇浓度、料液比、超声时间作为影响因素,选用 L₉(3³) 因素水平进行正交试验。

1.7 小蓟提取液抗氧化活性的研究

以最优工艺制备小蓟提取液,测定其黄酮类化合物的含量。采用水杨酸法^[16]和 2,2-二苯基-1-苦肟基自由基(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)法^[17]来测定小蓟提取液对羟自由基的清除能力和对 DPPH 自由基的清除能力;参照欧阳音乐等人的方法^[18]分别测定小蓟提取液还原能力和铁离子螯合能力,其中阳性对照组为 0.01% 抗坏血酸。

1.8 统计学分析

采用 Excel, SAS8.1 统计软件对数据进行分析处理及图表的制作,方差分析的显著性水平为 $P < 0.05$,极显著性水平为 $P < 0.01$ 。

2 实验结果

2.1 单因素实验

2.1.1 料液比对小蓟总黄酮提取的影响

料液比对总黄酮提取率的影响见图 2。由图 2 可以看出,小蓟黄酮得率随料液比增加呈现上升趋势,当料液比为 1:20(g·mL⁻¹)时,提取液中黄酮得率最高。当料液比大于 1:20(g·mL⁻¹)后,小蓟黄酮得率增加不明显,表明其达到最大溶解度。基于经济的角度,选择料液比为 1:20(g·mL⁻¹)为正交实验的中值。

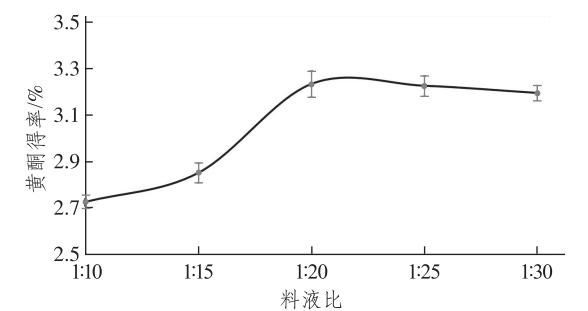


图 2 料液比对小蓟总黄酮提取率的影响
Fig. 2 Effect of material-liquid ratio on the extraction rate of total flavonoids

2.1.2 乙醇浓度对小蓟总黄酮提取得影响

由图3可知,小蓟提取液中总黄酮的得率随乙醇浓度的增加呈先增加后降低的趋势。当乙醇浓度为60%时,小蓟总黄酮得率达到 $3.168\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。当乙醇浓度再增加时,小蓟总黄酮的得率呈现下降趋势,这是因为黄酮类化合物是一大类极性范围很广的物质,60%乙醇的加入使醇溶性和水溶性的总黄酮都能最大程度的溶出,当溶液的极性过高和过低时,都会降低黄酮类化合物的溶出,本结果与杨振俊^[19]提取小蓟黄酮结果相同。故本实验选择乙醇浓度60%作为正交实验的中值。

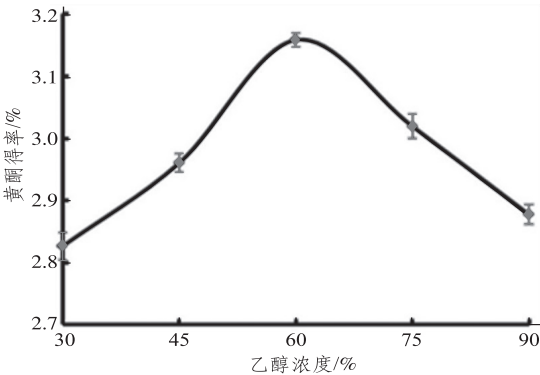


图3 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

Fig.3 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of total flavonoids

2.1.3 超声时间对小蓟总黄酮提取的影响

超声提取可以破坏细胞壁,有助于黄酮类化合物的释放与溶出,可有效地提高黄酮的提取效率,在中药有效成分的提取中已被大量应用。王飞^[20]等采用超声法提取制备了青杆针叶总黄酮并评价了抗氧化活性。王丽岩^[21]等采用超声法辅助提取玫瑰茄中黄酮成分,并评价其抗氧化活性。本实验在乙醇提取的基础上联合超声的方法提取小蓟中的黄酮类物质。超声时间对总黄酮提取率的影响见图4。

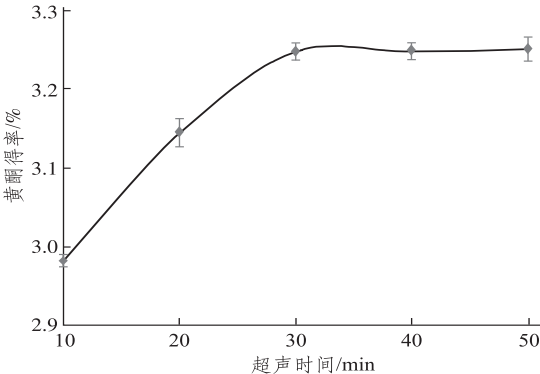


图4 超声时间对总黄酮提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasound time on the extraction rate of total flavonoids

由图4可知,小蓟总黄酮的得率随超声时间的延长而增大,超声时间为30 min时,小蓟总黄酮的得率达到最大值,30 min后基本达到平衡。从节约能源的角度,选择30 min为正交实验超声时间的中值。

2.2 正交实验

由单因素实验结果,按照表1设计正交实验。

表1 正交优化因素水平表
Tab.1 The levels of orthogonal optimization factors

因素水平	料液比/(g·mL ⁻¹)	乙醇浓度/%	超声时间/min
1	1:15	45	20
2	1:20	60	30
3	1:25	75	40

通过计算正交试验中各因素水平的不同实验结果发现,影响小蓟中黄酮提取的因素中乙醇浓度>超声时间>料液比,在乙醇60%,料液比1:20,超声时间30 min的条件下,总黄酮的提取率明显高于正交试验中其他条件下的提取率,表明此条件为小蓟中总黄酮提取的最优条件,总黄酮的得率为 $3.572\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (见表2)。杨振俊^[19]通过正交试验优化得到小蓟总黄酮提取最佳工艺为60%乙醇,加醇量为20倍量,提取2次,每次1 h,黄酮类化合物的提取率为 $0.92\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。由此可见超声辅助大大提高了提取效率。

表2 正交实验结果
Tab.2 Results of orthogonal experiment

序号	A 料液比	B 乙醇浓度/%	C 超声时间	提取率
1	1	1	1	2.842
2	1	2	2	3.120
3	1	3	3	2.751
4	2	1	2	2.452
5	2	3	3	2.936
6	2	2	2	3.572
7	3	1	3	2.928
8	3	2	1	2.678
9	3	3	2	2.756
K1	2.904	3.031	3.031	
K2	2.987	3.123	2.776	
K3	2.787	2.814	2.872	
R	0.2	0.309	0.255	

注:K1,K2,K3 分别代表每个因素各水平下提取率的平均值,R代表极差。

2.3 小蓟提取液的抗氧化能力

采用最佳工艺制备得小蓟提取液,其中黄酮

类化合物的含量为 $180\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。表 3 列出了小蓟黄酮提取液与抗坏血酸之间的抗氧化活性比较结果,由表 3 可以看出,小蓟黄酮提取液的羟自由基清除能力优于 0.01% 抗坏血酸,表明其抗氧化活性与清除羟自由基的能力密切相关。小蓟提取液的 DPPH 自由基的清除能力和还原力低于抗坏血酸对照组,原因可能是因为抗坏血酸都是纯物质,而小蓟提取液未经提纯,可能含有其他影响抗氧化活性的成分;小蓟提取液的 Fe^{2+} 螯合能力比抗坏血酸高,表明提取液中部分成分具有显著的金属离子螯合能力,具体的成分需要进一步分离纯化鉴定。

表 3 小蓟黄酮提取液与抗坏血酸之间抗氧化活性的比较
Tab.3 Comparison of antioxidant activity between
C. setosum extract and ascorbic acid

	小蓟提取液	0.01% 抗坏血酸
羟自由基清除能力/%	42.52±2.82	33.43±1.45
DPPH 自由基清除能力/%	33.78±5.56	96.37±4.26
铁离子螯合能力/%	60.61±1.81	27.05±0.82
还原力/ $A_{700\text{nm}}$	0.17±0.02	0.68±0.04

3 结论

小蓟作为传统中药材,目前主要是对其药剂组方和炮制的研究,对其所含有的活性成分的药理作用和生理功能并未进行深入分析。本实验以小蓟中的黄酮类化合物为研究对象,优化了小蓟黄酮类化合物的提取工艺,并对提取液的生理功能进行了初步的分析,发现超声辅助提取可以显著提升黄酮类化合物的提取率,制备的提取液具有显著的抗氧化活性。提取液中具体发挥抗氧化功能的单体成分需要进一步分离纯化,其体内抗氧化的作用,及其在细胞水平、分子水平的抗氧化机制仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 中国药典编写委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
[2] 杨星昊,崔敬浩,刘 海,等. 小蓟炮制作用的研究[J]. 陕西中医,2006,27(2):232-234.
[3] 周文序,田珍. 中药大,小蓟中柳穿鱼苷和芦丁的薄层扫描法定量分析[J]. 药物分析杂志,1994,14(6):39-40.
[4] 聂倩,张直峰,吕建平,等. 大孔吸附树脂分离纯化

小蓟多糖的工艺研究[J]. 湖北农业科学,2014,53(19):4661-4665.
[5] 王振飞. 大蓟、小蓟、地榆提取液对四种癌细胞抑制作用的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2007.
[6] 叶莉,梁军,张志宁,等. 宁夏小蓟三种提取物降压活性成分的筛选[J]. 时珍国医国药,2012,23(3):620-621.
[7] 吴亚军,苏洁,黄浦俊,等. 蒙花苷对 TNF- α 诱导的血管内皮细胞炎症损伤及 TLR4/I κ B α /NF- κ B 信号通路的影响. 中国现代应用药学,2017,34(5):637-643.
[8] 卫强,周莉莉. 小蓟中挥发油成分的分析及其抑菌与止血作用的研究[J]. 华西药学杂志,2016,31(6):604-610.
[9] 姜海. 小蓟抗炎、止血有效部位的化学成分研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2008.
[10] LUAN N,WEI W D,WANG A,et al. Four new taraxastane-type triterpenoic acids from *Cirsium setosum* [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2016,18(11):1015-1023.
[11] SUN Q,CHANG L,RENY,et al. Simultaneous analysis of 11 main active components in *Cirsium setosum* based on HPLC-ESI-MS/MS and combined with statistical methods[J]. Journal of Separation Science, 2012,35(21):2897-2907.
[12] 刘学. 小蓟化学成分研究[D]. 长春:长春中医药大学,2007.
[13] 彭子瑶,蒋鑫炜,孙建霞,等. 黄酮类物质对皮肤光损伤保护的研究进展[J]. 食品科学,2019,40(11):246-253.
[14] 肖咏梅,李明,毛璞,等. 黄酮类化合物生物改性及活性的研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2019,40(2):123-131+139.
[15] 赵振,刘霞,黄昭,等. 苎麻籽总黄酮含量测定方法比较研究[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(18):6195-6200.
[16] 伍艳霞,谭翠容,姜悦,等. 卵磷脂的抗氧化性研究[J]. 广州化工,2019,47(1):46-48.
[17] 聂少平,谢明勇,罗珍. 用清除有机自由基 DPPH 法评价茶叶多糖的抗氧化活性[J]. 食品科学,2006,27(3):34-36.
[18] 欧阳吾乐,雷福红,杨亚晋,等. 4 种竹叶营养成分分析及其黄酮提取物体外抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(10):1669-1674.
[19] 杨振俊,赵焕君,王一淞,等. 小蓟总黄酮提取工艺优选研究[J]. 中国医学工程,2012,20(12):147+151.
[20] 王飞,樊金栓,冯慧英,等. 青扞针叶总黄酮超声提

取及抗氧化活性[J]. 西北林学院学报,2016,31(1):243-249.

助提取及其抗氧化活性[J]. 吉林农业大学学报,2016,38(1):117-121.

[21] 王丽岩,荆哲华,王晶晶,等. 玫瑰茄黄酮超声波辅

Extraction and Antioxidant Activities of *Cirsium setosum*

MA Rongrong, ZHANG Xiuzheng, ZHAI Zhenni, ZOU Yini, LIU Haimei, ZHAO Qin

(School of Food Engineering, Ludong University, Yantai 264039, China)

Abstract: *Cirsium setosum*, a kind of new edible and medical potherb appeared in recent years, contains rich biological active components and exhibits diverse bioactivities. In this experiment, the ultrasonic and ethanol extraction method was used to extract the flavonoid active substances in *C. setosum*. And with the content of flavonoids as the reference, the optimal process for preparing *C. setosum* extract was determined by single factor experiment and orthogonal test. DPPH radical scavenging activity, ferrousion chelating ability, reducing power and hydroxyl radical scavenging ability experiments were carried out to detect the antioxidant activity. The results showed the optimum parameters of extraction process were: 60% ethanol concentration, 1:20 g·mL⁻¹ of solid-to-liquid ratio and 30 min of ultrasonic processing time. The hydroxyl radical scavenging rate was 34.52%, DPPH free radical scavenging rate was 44.78%, and iron chelating rate was 60.61%. The ethanol extract of *C. setosum* have good antioxidant activity. This study indicated that the flavonoids in *C. setosum* had significant antioxidant activity, and the extraction rate could be significantly improved by ultrasonic extraction combined with ethanol extraction.

Keywords: *Cirsium setosum*; flavonoid; ultrasonic extraction; antionxidant activity

(责任编辑 李维卫)

版权声明

根据《中华人民共和国著作权法》《信息网络传播权保护条例》等法律法规的规定,本刊作如下声明:

1. 作者向本刊投稿,即意味着将作品的发表权、删改权、信息网络传播权、数字化汇编权、数字化复制权、数字化制品形式(包括光盘、互联网出版物)出版发行权等权利授予本刊,并视同许可本刊官方新媒体免费转载以及与有关数据库的合作(本刊不再另行支付费用)。如不同意以上授权,请在投稿时说明。
2. 本刊载刊的全部编辑内容归《鲁东大学学报(自然科学版)》编辑部所有,非经书面同意,任何单位和个人不得转载、摘编、刊印或以其他方式使用在本刊发表的文章等。如有违反,本刊保留一切法律追究的权利。
3. 本刊版面、栏目等受著作权保护,对复制、仿制、假冒者将追究法律责任。
4. 已在本刊发表的作品,本刊有免费结集出版精华本、合订本,以及相关电子产品的权利,有特别声明者除外。

《鲁东大学学报(自然科学版)》编辑部