

鳄嘴花总黄酮超声提取工艺优化及其体外抗氧化活性考察

张卫华, 马珍, 孙艳, 杨欢, 陈钧*
(江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

[摘要] 目的: 优选鳄嘴花总黄酮的超声提取工艺条件并考察其体外抗氧化活性。方法: 在单因素试验基础上, 利用 Box-Behnken 试验设计考察乙醇体积分数、超声温度、料液比 3 个变量对鳄嘴花总黄酮提取量的影响, 同时评价其体外抗氧化活性。结果: 最佳提取工艺为加 42 倍量 67% 乙醇于 53 ℃ 提取 30 min; 总黄酮提取量 $12.15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 与预测值 $12.38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的偏差 1.86%。鳄嘴花总黄酮还原力的 C (吸光度为 0.5 时样品质量浓度) $179.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 DPPH, ABTS 自由基的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 89.72, 51.92 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 H_2O_2 诱导的大鼠红细胞溶血的 IC_{50} 237.22 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论: 鳄嘴花总黄酮具有明显的抗氧化活性。

[关键词] 鳄嘴花; 总黄酮; 超声提取工艺; 抗氧化活性; 芦丁

[中图分类号] R283.6; R284.2; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0038-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190038

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction Process for Total Flavonoids from *Clinacanthus nutans* and Evaluation of Its *in vitro* Antioxidant Activity

ZHANG Wei-hua, MA Zhen, SUN Yan, YANG Huan, CHEN Jun*
(School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ultrasonic-assisted extraction process of total flavonoids from *Clinacanthus nutans* and evaluate its *in vitro* antioxidant activity. **Method:** Based on single-factor tests, Box-Behnken design model was applied to investigate effects of ethanol concentration, temperature and ratio of solid to liquid on extraction efficiency. Besides, *in vitro* antioxidant activities were evaluated simultaneously. **Result:** Optimum extraction process was as following: extracted 30 min with 42 times the amount of 67% ethanol at 53 ℃; yield of total flavonoids was as high as $12.15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ under these conditions, whose deviation was 1.86% by comparing with the predictive value of $12.38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Total flavonoids from *C. nutans* turn out to be equipped with strong reducing power with an C_{50} (the concentration when absorbance was 0.5) of $179.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, as well as significant scavenging activity to DPPH free radical and ABTS free radical with half inhibitive concentration (IC_{50}) of 89.72, 51.92 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Extract also demonstrated significant protective effect against H_2O_2 -induced hemolysis with an IC_{50} of 237.22 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** Total flavonoids from *C. nutans* have desired antioxidant activity.

[Key words] *Clinacanthus nutans*; total flavonoids; ultrasonic-assisted extraction; antioxidant activity; rutin

鳄嘴花别名柔刺草、扭序花、青箭等, 主要分布于中国、泰国、马来西亚等热带地区, 用于治疗

皮疹、蚊虫叮咬、毒蛇咬伤等。药理研究表明鳄嘴花提取物具有显著的抗肿瘤、抗氧化及免疫调节

[收稿日期] 20140224(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81303313)

[第一作者] 张卫华, 在读硕士, 从事中药化学成分及药理活性研究, Tel: 0511-88780196, E-mail: weihuazh2011@126.com

[通讯作者] * 陈钧, 教授, 博士生导师, 从事中药化学成分分析及药理活性研究, Tel: 0511-88780196, E-mail: shchen@ujs.edu.cn

功效等作用^[1-4]。化学分析发现该药材茎叶中含有甾醇、三萜、黄酮等化合物^[5-6],其中黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎、增强心血管功能等活性^[7],开发应用前景广阔。目前关于鳄嘴花中黄酮类化合物的提取和活性研究鲜有报道,本实验采用超声技术提取鳄嘴花中总黄酮并优选其提取工艺,考察其抗氧化活性,为鳄嘴花活性成分的开发利用提供参考。

1 材料

UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),Sartorius AG 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)。鳄嘴花采集于马来西亚,经江苏大学药学院陈钧教授鉴定为鳄嘴花属植物鳄嘴花 *Clinacanthus nutans* (Burm. f) Lindau 的干燥全草地上部分,粉碎过 40 目筛备用。芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100080-200707),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和 2,2-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)均购自美国 Sigma 公司,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制 精密称取 105 ℃ 干燥至恒重的芦丁对照品 12.7 mg,加 70% 乙醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中,得 254 mg·L⁻¹对照品溶液。精密吸取该溶液 0,1,2,3,4,5,6 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加 70% 乙醇补至 6 mL,加入 5% NaNO₂ 溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加入 4% NaOH 溶液 10 mL,用 70% 乙醇定容至刻度,于 510 nm 处测定吸光度(A),平行测定 3 次,以质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $A = 0.0011C - 0.0308$ ($R^2 = 0.9999$),线性范围 10.16 ~ 60.96 mg·L⁻¹。

2.2 总黄酮的含量测定 精密称取鳄嘴花粉末 1.0 g,置于 100 mL 锥形瓶中,加入 70% 乙醇溶液 20 mL,于 50 ℃ 超声 30 min,离心(3 000 r·min⁻¹,10 min,下同)取上清液,精密吸取 1 mL,按 2.1 项下方法测定 A,计算总黄酮含量^[8]。

2.3 响应面分析^[9] 在单因素试验基础上,根据中心组合试验设计原理,选择乙醇体积分数、超声温度、料液比为自变量,固定提取时间 30 min,总黄酮提取量为响应值,精密称取鳄嘴花粉末 1.0 g,共 17 份,按设定条件提取,参照 2.2 项下方法测定提取液中总黄酮含量,结果见表 1。

应用 Design-Expert 8.0.5.0 软件对表 2 中数据

表 1 鳄嘴花总黄酮超声提取工艺 Box-Behnken 试验安排

No.	A 乙醇体积 分数/%	B 超声温度 /℃	C 料液比 /g·mL ⁻¹	总黄酮提取量 /mg·g ⁻¹
1	80	50	1:45	9.91
2	70	50	1:35	11.84
3	70	50	1:35	11.65
4	70	40	1:45	9.39
5	60	50	1:45	11.71
6	70	60	1:25	9.37
7	70	60	1:45	11.46
8	80	60	1:35	9.68
9	80	50	1:25	8.02
10	70	50	1:35	11.85
11	60	40	1:35	9.01
12	60	60	1:35	10.22
13	80	40	1:35	7.19
14	70	50	1:35	11.72
15	70	50	1:35	11.94
16	70	40	1:25	7.81
17	60	50	1:25	9.01

进行多元回归拟合,得自变量与响应值的多元二次回归方程 $Y = 11.80 - 0.64A + 0.92B + 1.03C + 0.32AB - 0.20AC + 0.13BC - 1.31A^2 - 1.47B^2 - 0.83C^2$,为检验该方程的有效性,确定各自变量对响应值的影响程度,对回归模型进行方差分析,见表 2。结果显示整体模型 $P < 0.0001$,表明该二次方程模型达极显著水平,模型决定系数为 0.9955 且失拟项不显著,说明该方程拟合较好,试验误差小,可用于鳄嘴花总黄酮提取工艺的分析 and 预测。一次项中 A, B, C, 二次项 A², B², C² 和交互项 AB 对总黄酮提取量具有极显著影响,交互项 AC 影响显著,BC 不显著,表明各因素对总黄酮提取量的影响不是简单的线性关系。响应面分析见图 1,表明各因素对总黄酮提取量影响顺序为 C > B > A,其中因素 C 影响最显著,表现为曲面最陡峭,响应值变化较大。

利用 Design-Expert 8.0.5.0 软件得出鳄嘴花总黄酮超声提取最佳条件为乙醇体积分数 67.4%,超声温度 53.1 ℃,料液比 1:41.8;此条件下模型预测值 12.38 mg·g⁻¹。结合实际操作条件,确定最佳提取工艺为乙醇体积分数 67%,超声温度 53 ℃,料液比 1:42。称取鳄嘴花粉末 3 份,每份 5.0 g,按该条件

表 2 总黄酮提取量方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	40.44	9	4.49	172.70	<0.000 1
A	3.32	1	3.32	127.42	<0.000 1
B	6.72	1	6.72	258.13	<0.000 1
C	8.53	1	8.53	327.79	<0.000 1
AB	0.41	1	0.41	15.74	0.005 4
AC	0.16	1	0.16	6.30	0.040 3
BC	0.065	1	0.065	2.50	0.157 9
A ²	7.23	1	7.23	277.72	<0.000 1
B ²	9.04	1	9.04	347.33	<0.000 1
C ²	2.88	1	2.88	110.82	<0.000 1
残差	0.18	7	0.026		
失拟项	0.13	3	0.043	3.28	0.140 4
误差	0.053	4	0.013		
总离差	40.62	16			

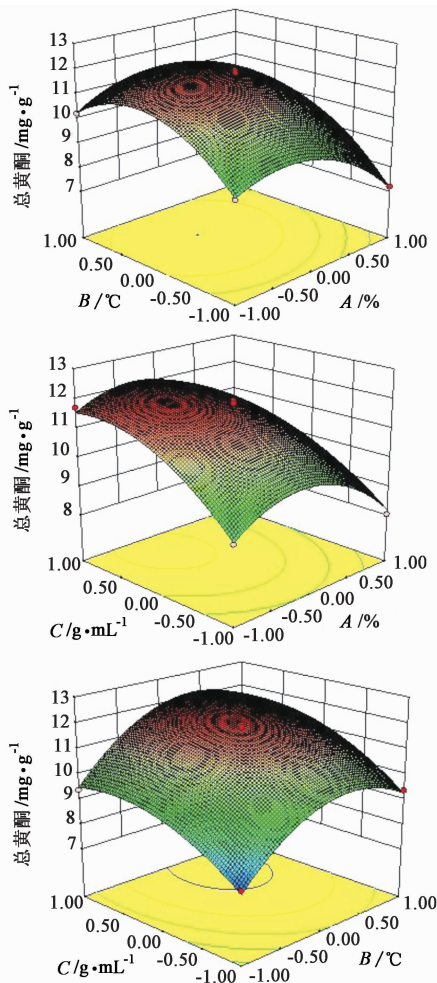


图 1 料液比、乙醇体积分数及超声温度对鳄嘴花总黄酮提取量的响应面分析

进行验证试验,结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)鳄嘴花中总黄酮提取量(12.15 ± 0.21) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,与模型预测值相近,表明该优选工艺可靠。

2.4 鳄嘴花总黄酮的纯化 取鳄嘴花总黄酮提取液 100 mL,反复用 D101 型大孔树脂进行纯化,采用不同体积分数乙醇梯度洗脱,收集 10% ~ 30% 乙醇洗脱液,合并,浓缩,冷冻干燥后得粉末状鳄嘴花总黄酮^[10],参照 2.2 项下方法测得冻干粉中总黄酮质量分数 64.1%。

2.5 抗氧化活性考察

2.5.1 还原力测定 用 60% 乙醇配制不同质量浓度(50,100,150,200,250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的鳄嘴花总黄酮溶液,移取各溶液 1 mL,以 60% 乙醇做空白对照,各加入 pH 6.6 磷酸缓冲液 2.5 mL 和 1% 铁氰化钾溶液 2.5 mL,混匀,置于 50 °C 水浴 20 min,加入 10% 三氯乙酸溶液 2.5 mL,离心,取上清液 2.5 mL,加入水和 0.1% 三氯化铁溶液各 2.5 mL,混匀,静置 10 min,于 700 nm 处测定吸光度(A, $n = 3$),结果 A 依次为 0.140,0.281,0.417,0.564,0.702,计算 $C_{0.5}$ (A 为 0.5 时样品质量浓度) = $179.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,A 越高表明还原力越强。

2.5.2 DPPH 自由基清除能力测定^[11] 移取不同质量浓度(20,40,60,80,100,200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的鳄嘴花总黄酮溶液各 1 mL,加入 60% 乙醇 2 mL,各加入 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 乙醇溶液 1 mL,摇匀,黑暗处放置 30 min,于 517 nm 处测定 A_1 ;空白组以 60% 乙醇代替样品溶液,测定 A_0 ;对照组以 60% 乙醇代替 DPPH 溶液,测定 A_2 ;按 $[A_0 - (A_1 - A_2)]/A_0$ 计算清除率分别为 19.1%,26.3%,38.6%,47.8%,52.6%,71.2%,半数抑制浓度(IC_{50})为 $89.72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,表明鳄嘴花总黄酮在 20 ~ 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 清除 DPPH 自由基的能力逐渐增强。

2.5.3 ABTS 清除能力测定^[12] 移取不同质量浓度(20,40,60,80,100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的鳄嘴花总黄酮溶液 1 mL,与 ABTS 工作液 3 mL 混合均匀,室温反应 5 min,于 734 nm 处测定 A_1 ;空白组以 60% 乙醇代替样品溶液,测定 A_0 ;对照组以无水乙醇代替 ABTS 工作液,测定 A_2 ;按 $[A_0 - (A_1 - A_2)]/A_0$ 计算分别为 24.3%,42.0%,58.1%,73.0%,82.3%, $\text{IC}_{50} = 51.92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,结果表明鳄嘴花总黄酮对 ABTS 自由基的清除能力随质量浓度的增加而显著增强。

2.5.4 红细胞溶血抑制作用 参照王敏等^[13]的研究方法配制 0.5% 红细胞悬液,移取不同质量浓度(200,400,600,800,1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的鳄嘴花总黄酮

溶液各 1 mL,分别加入 0.5% 红细胞悬液 1 mL 和 100 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 溶液 0.1 mL,混匀后于 37 ℃ 水浴 60 min,加水稀释 5 倍,于 2 000 r min⁻¹ 离心 10 min。取上清液于 415 nm 处测定 A₁;空白组以 pH 7.4 等渗磷酸盐缓冲液代替样品溶液,测定 A₀;对照组以 pH 7.4 等渗磷酸盐缓冲液代替 0.5% 红细胞悬液,测定 A₂,按 $[A_0 - (A_1 - A_2)]/A_0$ 计算抑制率分别为 35.7%, 79.2%, 90.7%, 91.5%, 94.1%, IC₅₀ = 237.22 mg·L⁻¹。

3 讨论

本文将超声提取技术与 Box-Behnken 中心组合设计相结合,设计响应面试验,建立数学模型,较好地拟合了试验参数,确定了鳄嘴花总黄酮超声提取工艺,该工艺操作方便、能耗低、省时,是较为理想的提取鳄嘴花总黄酮的方法。相关研究证明还原力与物质的抗氧化活性密切相关,是抗氧化剂提供电子的重要指标;DPPH, ABTS 自由基清除能力评价方法快速、准确度高,适用于植物提取物的抗氧化活性评价;对过氧化氢诱导的红细胞氧化溶血的抑制能力可间接反映脂质过氧化的抑制作用。综合体外抗氧化试验结果可证明该植物中总黄酮具有较强的抗氧化活性,可能是其抗肿瘤等生理活性的主要成分之一,为鳄嘴花资源的综合开发和利用提供参考。

[参考文献]

- [1] Pannangpetch P, Laupattarakasem P, Kukongviriyapan V, et al. Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of *Clinacanthus nutans* (Burm. f) Lindau[J]. Songklanakarin J Sci Technol, 2007, 29(1): 1.
- [2] Sakdarat S, Shuyprom A, Pientong C, et al. Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau[J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17(5): 1857.
- [3] Wanikiat P, Panthong A, Sujayanon P, et al. The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil

responsiveness by *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans* extracts [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 116(2): 234.

- [4] Yong Y K, Tan J J, Teh S S, et al. *Clinacanthus nutans* extracts are antioxidant with anti-proliferative effect on cultured human cancer cell lines[J]. Evid-Based Compl Alt, 2013, DOI:10.1155/2013/462751.
- [5] Teshima K I, Kaneko T, Ohtani K, et al. C-glycosyl flavones from *Clinacanthus nutans*[J]. Nat Med, 1997, 51(6): 557.
- [6] Dampawan P, Huntrakul C, Reutrakul V, et al. Constituents of *Clinacanthus nutans* and the crystal structure of lup-20(29)-ene-3-one [J]. J Sci Soc Thailand, 1997(3): 14.
- [7] 王慧. 黄酮类化合物生物活性的研究进展[J]. 食品与药品, 2010, 12(9): 347.
- [8] 欧阳艳, 刘伟, 赵晓南. 响应面法优化新疆黑果小檗鲜果中总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 46.
- [9] 徐伟, 凌伟坚, 褚克丹, 等. 响应面法优化车前子油的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(23): 3253.
- [10] 李盈蕾, 陈建华, 宋晓凯, 等. 大米草总黄酮微波提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 中成药, 2010, 32(11): 1983.
- [11] Li H Y, Deng Z Y, Zhu H H, et al. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities [J]. Food Res Int, 2012, 46(1): 250.
- [12] Ercan B, Ilhami G. Polyphenol contents and *in vitro* antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) [J]. Food Res Int, 2011, 44(5): 1482.
- [13] 王敏, 魏益民, 高锦明. 苦荞黄酮的抗脂质过氧化和红细胞保护作用研究[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 278.

[责任编辑 刘德文]