

# 冷水花总黄酮的提取工艺优选及抗氧化活性考察

甘秀海<sup>1</sup>, 梁志远<sup>1</sup>, 赵超<sup>2\*</sup>

(1. 贵州师范学院 化学与生命科学学院, 贵阳 550018;  
2. 贵州师范大学 天然药物质量控制研究中心, 贵阳 550001)

**[摘要]** 目的:测定不同产地冷水花中总黄酮的含量并评价其抗氧化活性。方法:在单因素试验基础上,以总黄酮提取量为指标,选择料液比、提取温度、提取时间为考察因素,采用响应面法优化冷水花总黄酮的提取工艺,测定不同产地冷水花样品中总黄酮的含量并考察其抗氧化活性。结果:最佳提取工艺为料液比 1:19,提取温度 71 ℃,提取时间 126 min。冷水花总黄酮提取量 7.08 mg·g<sup>-1</sup>;不同产地样品中总黄酮质量分数 4.35~7.10 mg·g<sup>-1</sup>,具有明显的地域差异性。冷水花总黄酮对 1,1-二苯基苦基苯肼和 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基的清除能力与维生素 C 相当。结论:不同产地冷水花中总黄酮具有较好的抗氧化能力,且该能力与总黄酮含量具有明显量效关系。

**[关键词]** 冷水花; 总黄酮; 响应面法; 抗氧化活性

**[中图分类号]** R283.6;R284.1;R284.2;R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0010-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.2015160010

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150702.1014.008.html>

**[网络出版时间]** 2015-07-02 10:14

## Investigation of Extraction Process and Antioxidation of Total Flavonoids from *Pilea aquarum*

GAN Xiu-hai<sup>1</sup>, LIANG Zhi-yuan<sup>1</sup>, ZHAO Chao<sup>2\*</sup> (1. School of Chemistry and Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550018, China; 2. Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine the content of total flavonoids from *Pilea aquarum* and evaluate its antioxidative activity. **Method:** With the content of total flavonoids as an indicator, based on single factor experiments, response surface methodology was adopted to optimize extraction process by taking liquid-solid ratio, extraction temperature and time as factors. The content of total flavonoids in *P. aquarum* from different places were determined, then antioxidation of total flavonoids were evaluated against DPPH and ABTS free radical. **Result:** Optimum conditions were as follows: liquid-solid ratio of 1:19, extraction temperature at 71 ℃ and extraction time of 126 min. Yield of total flavonoids was as high as 7.08 mg·g<sup>-1</sup> under these conditions. The content of total flavonoids in *P. aquarum* from different places was from 4.35 to 7.10 mg·g<sup>-1</sup> with obvious regional differences. Scavenging capacity of total flavonoids were as same as vitamin C against DPPH and ABTS free radical. **Conclusion:** There is obvious difference of total flavonoids content in *P. aquarum* from different places, and total flavonoids has good antioxidative activity in a dose-dependent manner.

**[Key words]** *Pilea aquarum*; total flavonoids; response surface methodology; antioxidation

冷水花具有清热、利湿、退黄等功效,是贵州常见苗族药品种,可用于治疗黄疸、肺结核等疾病<sup>[1-3]</sup>。前期通过系统化学成分研究发现,冷水花中含有多种黄酮类化合物,并具有一定抗菌活

性<sup>[4-5]</sup>;另外,本课题组还采用了高效液相色谱法(HPLC)测定不同种冷水花中木犀草苷和大波斯菊苷的含量,结果发现湿生冷水花中这2种黄酮类成分的含量较高<sup>[6]</sup>。为进一步开发冷水花的药材资

**[收稿日期]** 20150405(001)

**[基金项目]** 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2010]2213号);贵州省应用化学特色重点学科(黔教科研发[2012]442号)

**[第一作者]** 甘秀海,副教授,从事中药化学成分及质量控制研究,Tel:0851-86700494,E-mail:gxh200719@163.com

**[通讯作者]** \*赵超,副研究员,从事中药化学及中药质量控制研究,Tel:0851-86700494,E-mail:chaozhao@126.com

源,在单因素试验基础上,本实验采用响应面法优化冷水花总黄酮的提取工艺,利用紫外分光光度法 (ultraviolet spectrophotometry, UV) 测定不同产地冷水花中总黄酮的含量,比较不同产地冷水花总黄酮的抗氧化活性,为该药材资源的综合开发与利用提供参考。

### 1 材料

Cary-100 型紫外-可见分光光度计(美国瓦里安公司),XFB-200 型中药粉碎机(长沙市中南制药机械厂),AL204 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。湿生冷水花样品于 2012 年 9~10 月采自贵州省境内,经贵州师范学院朱富寿教授鉴定为荨麻科植物湿生冷水花 *Pilea aquarum* 的全草;芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111521-200303),1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)和 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)均购于美国 Sigma 公司,维生素 C(北京市金诺欣成化工有限公司),试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备** 取冷水花全草,粉碎,过 60 目筛,精密称取 1.0 g,用石油醚脱脂后,按一定料液比加入 70% 乙醇,于一定温度下加热提取,趁热过滤,取滤液,加 70% 乙醇定容至 50 mL,即得。

**2.2 标准曲线绘制** 精确称取芦丁对照品 10 mg,加 70% 乙醇溶解并定容至 50 mL,得  $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  对照品溶液。参考文献[7]方法,准确吸取芦丁对照品溶液 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,用 70% 乙醇补至 8.0 mL,加入 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,静置 5 min;加入 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,静置 5 min;加入 4% 氢氧化钠溶液 10 mL,用 70% 乙醇定容至刻度,摇匀,以试剂为空白参比液,于 510 nm 处测定吸光度  $A$ ,平行测定 3 次,以  $A$  为纵坐标,质量浓度 ( $C$ ) 为横坐标,得回归方程  $A = 11.318C + 0.012 (R^2 = 0.9996)$ ,结果表明芦丁质量浓度在  $0.002 \sim 0.064 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  与  $A$  呈良好线性关系。

**2.3 提取工艺优选**<sup>[8]</sup> 在单因素试验基础上,确定以 70% 乙醇为提取溶剂,选择料液比、提取温度及时间为自变量,以总黄酮提取量 ( $Y$ ) 为因变量,利用 Design-Expert 8.0.6 软件中的 Box-Behnken 优化冷水花总黄酮的提取条件。取冷水花全草,粉碎,过 60 目筛,精密称取 1.0 g,共 17 份,试验安排及结果见表 1。对表 1 中数据进行多元回归分析,得因变量对各自变量的二次多项回归方程  $Y = 6.99 -$

$0.055A + 0.016B + 0.049C - 0.038AB - 0.12AC + 0.02BC - 0.29A^2 - 0.28B^2 - 0.35C^2$ ,该回归模型的方差分析见表 2。

表 1 冷水花总黄酮提取工艺响应面试验分析

Table 1 Response surface analysis for extraction process of total flavonoids from *Pilea aquarum*

No.	A 料液比 /g·mL <sup>-1</sup>	B 提取温度 /°C	C 提取时间 /min	总黄酮 /mg·g <sup>-1</sup>
1	1:30	70	60	6.34
2	1:10	80	120	6.51
3	1:30	70	180	6.22
4	1:20	60	180	6.36
5	1:10	70	60	6.25
6	1:30	80	120	6.35
7	1:20	70	120	6.98
8	1:30	60	120	6.41
9	1:20	60	60	6.31
10	1:10	70	180	6.59
11	1:20	70	120	7.01
12	1:20	70	120	6.99
13	1:10	60	120	6.42
14	1:20	70	120	6.99
15	1:20	80	60	6.32
16	1:20	80	180	6.45
17	1:20	70	120	6.98

表 2 回归模型方差分析

Table 2 Variance analysis of regression model

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	1.440	9	0.160	434.97	<0.000 1
A	0.024	1	0.024	65.79	<0.000 1
B	$2.113 \times 10^{-3}$	1	$2.113 \times 10^{-3}$	5.74	0.047 7
C	0.019	1	0.019	51.68	0.000 2
AB	$5.625 \times 10^{-3}$	1	$5.625 \times 10^{-3}$	15.29	0.005 8
AC	0.055	1	0.055	150.13	<0.000 1
BC	$1.600 \times 10^{-3}$	1	$1.600 \times 10^{-3}$	4.35	0.075 5
A <sup>2</sup>	0.350	1	0.350	946.09	<0.000 1
B <sup>2</sup>	0.330	1	0.330	897.37	<0.000 1
C <sup>2</sup>	0.520	1	0.520	1402.15	<0.000 1
残差	$2.575 \times 10^{-3}$	7	$3.679 \times 10^{-4}$		
失拟项	$1.975 \times 10^{-3}$	3	$6.583 \times 10^{-4}$	4.39	0.093 5
绝对误差	$6.000 \times 10^{-4}$	4	$1.500 \times 10^{-4}$		
总差离	1.440	16			

由表 2 可知,模型的  $P < 0.000 1$ ,表明该回归模

型达到了极显著水平,说明建立的模型可靠。回归方程复相关系数( $R^2$ )0.998 2,说明该模型拟合程度较好。模型的修正复相关系数( $R_{adj}^2$ )0.995 9,表明该方程较好地反映了各自变量与因变量的关系,提示该模型对冷水花总黄酮提取工艺的分析 and 预测良好。由回归模型的方差分析可知,一次项  $A, C$  和二次项  $A^2, B^2, C^2$  均对总黄酮提取工艺影响极显著,因素  $B$  影响显著,交互项  $AC, AB$  对总黄酮提取工艺的影响高度显著。在所选试验范围内,由  $F$  可判断 3 个因素对提取工艺的影响顺序为  $A > C > B$ 。各自变量交互作用对总黄酮提取量的影响分析见图 1。结果发现各自变量对提取工艺的影响均表现出先上升后下降的趋势,同时交互因子对总黄酮提取量影响均能够达到响应值的极大值,其中因素  $A$  影响最显著,表现为曲面最陡峭,响应值变化较大。

通过响应面软件分析,得冷水花总黄酮的最佳提取工艺为料液比 1:18.8,提取温度 70.4 °C,提取时间 125.4 min,此条件下总黄酮理论提取量 7.10  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。考虑实际操作,将提取条件修正为料液比 1:19,提取温度 71 °C,提取时间 126 min。取冷水花全草,粉碎,过 60 目筛,精密称取 1.0 g,共 3 份,测得总黄酮平均提取量 7.08  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (RSD 1.3%),与理论提取量的相对误差 1.1%,说明优选的提取工艺稳定可行。

**2.4 重复性试验** 精密称取同一批冷水花样品 6 份,依据最佳提取工艺条件,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下方法测定,计算总黄酮含量的 RSD 1.1%,表明该方法重复性良好。

**2.5 精密度试验** 精密吸取对照品溶液 2 mL,按 2.2 项下方法重复测定 6 次,计算总黄酮含量的 RSD 0.9%,表明仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液 2 mL,共 6 份,按 2.2 项下方法每隔 30 min 测定 1 次吸光度,结果 3 h 内 RSD 1.0%,表明供试品溶液在 0~3 h 内稳定性良好。

**2.7 加样回收率试验**<sup>[9]</sup> 精密称定已知总黄酮质量分数为 6.85  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  的冷水花样品约 0.4, 0.5, 0.6 g,各 3 份,分别精密加入芦丁对照品 4.0, 3.0, 2.0 mg,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下方法测定总黄酮含量,计算回收率,结果见表 3。

**2.8 样品的含量测定** 精密称取冷水花粉末样品 1.0 g,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项

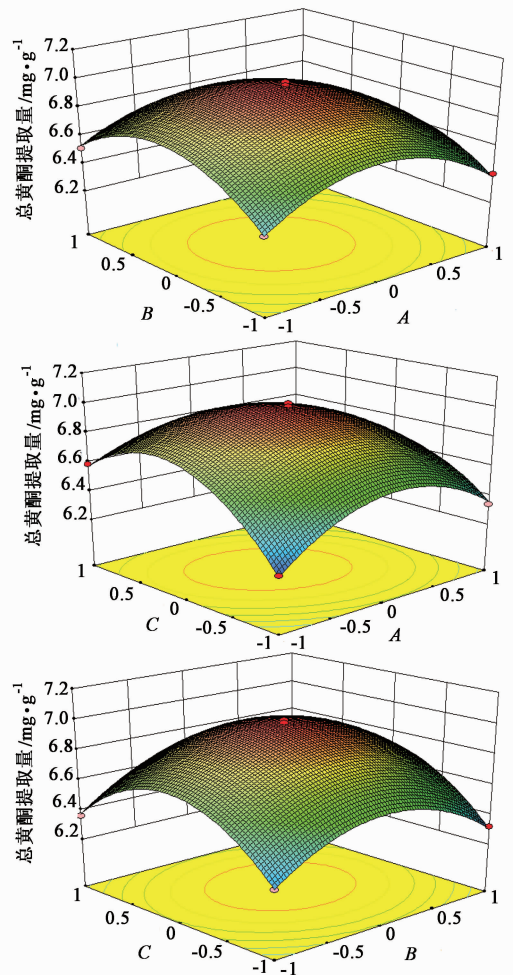


图 1 料液比、提取温度和提取时间交互作用对冷水花总黄酮提取量的响应面  
Fig. 1 Response surface plots showing interaction of liquid-solid ratio, extraction temperature and time on yield of total flavonoids from *Pilea aquarum*

表 3 冷水花总黄酮含量测定的加样回收率试验  
Table 3 Recovery test of determination of total flavonoids from *Pilea aquarum*

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.410 2	2.809 9	4.011 2	6.714 5	97.34		
0.405 1	2.774 9	3.998 5	6.712 8	98.48		
0.399 5	2.736 6	4.103 5	6.815 0	99.39		
0.503 4	3.448 3	3.102 6	6.558 1	100.23		
0.510 1	3.494 2	3.002 1	6.436 2	98.00	98.70	1.6
0.499 7	3.422 9	3.018 5	6.382 7	98.06		
0.598 8	4.101 8	1.997 8	6.081 2	99.08		
0.604 0	4.137 4	2.056 3	6.115 9	96.22		
0.610 5	4.181 9	2.101 5	6.314 8	101.49		

下方法测定总黄酮含量,结果见表 4。结果显示不同产地冷水花样品中总黄酮的含量具有明显差异,

其中贵州玉屏冷水花中总黄酮的含量最高,而贵州贵阳冷水花中总黄酮的含量最低;贵州贵阳的冷水花采自黔灵公园较潮湿的背阳处,其余均采自向阳处,说明样品中总黄酮含量与土壤、阳光、水分等气候的差异密切相关。

表 4 不同产地冷水花中总黄酮含量及抗氧化活性

Table 4 Content and antioxidant activity of total flavonoids in *Pilea aquarum* from different places

样品	产地	采集时间	总黄酮 /mg·g <sup>-1</sup>	IC <sub>50</sub> /mg·L <sup>-1</sup>	
				DPPH	ABTS
S1	贵州纳雍	2012-09	6.52	5.32	10.87
S2	贵州贵阳	2012-10	4.35	8.18	13.15
S3	贵州凯里	2012-09	6.78	5.22	10.19
S4	贵州天柱	2012-09	7.05	5.01	9.87
S5	贵州正安	2012-09	7.09	4.98	9.62
S6	贵州息烽	2012-09	6.85	6.11	10.35
S7	贵州惠水	2012-10	5.46	7.92	12.18
S8	贵州遵义	2012-10	6.12	5.18	10.65
S9	贵州盘县	2012-09	6.98	5.02	10.11
S10	贵州玉屏	2012-10	7.10	4.88	9.11

**2.9 抗氧化活性测定**<sup>[7,10]</sup> 将样品溶液及阳性对照溶液用 70% 乙醇配成系列质量浓度,测定各溶液对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力( $n=3$ ),计算清除率,利用 Origin 软件处理数据,得各样品消除 DPPH 和 ABTS 自由基的半数抑制率(half inhibition concentration, IC<sub>50</sub>),见表 4。结果显示冷水花总黄酮样品对 DPPH 和 ABTS 自由基具有较好的消除能力,多数产地样品对自由基的清除能力优于维生素 C(对 DPPH 和 ABTS 自由基的 IC<sub>50</sub> 分别为 7.17, 11.54 mg·L<sup>-1</sup>),其中贵州玉屏产冷水花样品对 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力最强,总黄酮的含量也最高;而贵州贵阳冷水花样品总黄酮对自由基的清除能力最弱,总黄酮含量也最低,说明冷水花样品对自由基的清除能力与总黄酮含量成量效关系。

### 3 讨论

冷水花是一种广泛分布于贵州的苗族习用药材之一,前期研究发现其木犀草苷和大波斯菊苷含量较高,但要得到纯的单体化合物较困难,这阻碍了冷水花药用资源的利用。本文在单因素试验基础上,采用响应面试验优化了总黄酮的提取工艺<sup>[11]</sup>。总黄酮的含量测定常采用 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaOH 法,多羟基黄酮类化合物(如芦丁、金丝桃苷、异槲

皮苷、槲皮苷)在 510 nm 处有最大吸收,其余均无最大吸收<sup>[12]</sup>,故选择芦丁为指标成分测定总黄酮含量。结果表明不同产地冷水花样品中总黄酮的含量具有明显差异,这可能与不同地区的土壤特性及光照、水分等气候有关。

采用 DPPH 和 ABTS 自由基评价法测定了冷水花样品对自由基的清除能力,这是 2 种被广泛认可的抗氧化活性测定方法,具有快速、准确等优点。结果显示冷水花总黄酮具有较好的抗氧化活性能力,但不同产地样品的清除能力差异性较大,总黄酮含量高的样品清除自由基的能力强,反之清除自由基的能力弱,说明冷水花清除自由基的能力与总黄酮含量间呈较好的量效关系,为该药材的药理活性物质基础研究提供实验依据。

### [参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2005:311-312.

[2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:202.

[3] 汪毅. 中草药彩色图集[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2001:96.

[4] 甘秀海,梁志远,杨小生,等. 冷水花化学成分研究[J]. 中成药,2012,34(4):689-691.

[5] 甘秀海,梁志远,姜金仲,等. 冷水花抗菌活性成分研究[J]. 中国药理学杂志,2014,49(23):2069-2072.

[6] 甘秀海,梁志远,赵超,等. RP-HPLC 同时测定冷水花属 3 种植物中 2 种黄酮苷的含量[J]. 云南大学学报:自然科学版,2015,37(1):129-133.

[7] 张卫华,马珍,孙艳,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(19):38-41.

[8] 帕丽达·阿布力孜,丛媛媛,米仁沙·牙库甫,等. 响应面法优化牛舌草总黄酮的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(3):48-51.

[9] 吕鹏,贾秀梅,张振凌,等. 怀山药及非药用部位总黄酮含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):65-68.

[10] 李园园,王俊霞,曹乃峰,等. 河南产景天三七抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2011,23(2):337-340.

[11] 周向军,高义霞,张霞. 响应面法优化黄花菜总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):29-32.

[12] 池玉梅,居羚,邓海山,等. 分光光度测定总黄酮法的适用性[J]. 分析化学,2010,38(6):893-896.

[责任编辑 刘德文]