

锦灯笼果实提取工艺优选及抗氧化活性考察

宗颖^{1,2}, 王志颖¹, 孙佳明^{2*}, 杜锐^{1*}

(1. 吉林农业大学, 长春 130118; 2. 长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] 目的: 优选锦灯笼果实的提取工艺并考察提取物的体外抗氧化活性。方法: 以总黄酮、总酚酸提取量为指标, 通过单因素试验和正交试验考察乙醇体积分数、提取时间及料液比对锦灯笼果实醇提工艺的影响, 考察提取物对 ABTS 自由基的清除能力。结果: 最佳提取工艺为加 20 倍量 85% 乙醇提取 2 次, 每次 0.5 h; 总黄酮和总酚酸平均提取量分别为 0.618、1.152 mg·g⁻¹, RSD 依次为 1.66%、1.19%。结论: 结合药效学试验筛选的提取工艺更加科学合理, 锦灯笼果实具有一定的体外抗氧化能力。

[关键词] 锦灯笼果实; 总黄酮, 总酚酸, 提取工艺, ABTS⁺·清除能力; 体外抗氧化活性

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0015-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070015

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000015.html>

[网络出版时间] 2014-01-21 9:13

Optimization of Extraction Technology for Physalis Calyx Seu Fructus Fruit and Investigation of its Antioxidant Activity

ZONG Ying^{1,2}, WANG Zhi-ying¹, SUN Jia-ming^{2*}, DU Rui^{1*}

[收稿日期] 20130724(015)

[基金项目] 吉林省教育厅科学技术研究项目(吉教科合字[2012]第50号)

[第一作者] 宗颖, 讲师, 从事中药有效成分的开发利用研究, Tel: 13756064817, E-mail: zongying7699@126.com

[通讯作者] * 孙佳明, 副研究员, 从事天然药物化学研究, Tel: 13604404585, E-mail: sun_jiaming2000@yahoo.com.cn;

* 杜锐, 教授, 博士, 从事中药物质基础研究, Tel: 13596408198, E-mail: durui71@126.com

酶解 pH 6.0, 酶用量 1 g (6.7 mg·g⁻¹), 酶解时间 30 min。按优选的提取工艺进行 3 次验证试验, 结果野黄芩苷平均质量浓度 4.68 g·L⁻¹ (RSD 0.53%), 较原注册标准提取方法中野黄芩苷 (1.34 g·L⁻¹) 含量提高了近 2.5 倍。

2.4 对比试验 在相同试验条件下, 运用煎煮法、单一超声波法、单一纤维素酶、纤维素酶协同超声波法分别对复方半边莲注射液中野黄芩苷进行 3 次提取, 结果野黄芩苷含量纤维素酶协同超声波法较原注册标准的煎煮法高 249.3%, 较单一超声波法高 21.9%, 较单一纤维素酶法高 107.1%, 说明纤维素酶协同超声波法可显著提高复方半边莲注射液中野黄芩苷提取率。

3 讨论

复方半边莲注射液原煎煮工艺存在提取周期长、有效成份损失大的缺点, 而纤维素酶协同超声波

法与原注册标准中煎煮法相比, 野黄芩苷含量高近 2.5 倍, 而且提取时间由原来 3 h 缩短至 1 h, 大大缩短了生产周期。本文是在实验室条件进行注射液制备, 除含量符合规定外, 性状、鉴别、可见异物、无菌等亦均符合规定, 但未对其热原进行检查。

[参考文献]

- [1] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: WS-10609(ZD-0609)-2002.
- [2] 王守英. 复方半边莲注射液定性定量标准研究[J]. 中外健康文摘: 医药月刊, 2007(11): 210.
- [3] 石磊, 姬志强, 康文艺. 复方半边莲注射液的临床应用[J]. 中国药房, 2011, 22(47): 4508.
- [4] 吕辉文, 许培玲. 复方半边莲注射液治疗小儿急性呼吸道感染疗效观察(附 98 例分析)[J]. 福建医药杂志, 2011, 33(5): 123.

[责任编辑 全燕]

(1. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
2. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] Objective: To optimize extraction process of Physalis Calyx Seu Fructus fruit and investigate antioxidant activity of its extract. **Method:** With extraction amounts of total flavonoids and total phenolic acids as index, orthogonal test and single factor tests were employed to optimize ethanol extraction process of Physalis Calyx Seu Fructus fruit by taking ethanol concentration, extraction time and solid-liquid ratio as factors, and antioxidant activity of extract was investigated by observing its ability of scavenging ABTS free radical. **Result:** Optimum extraction technology was as follows: extracted twice with 20 times the amount of 85% ethanol, 0.5 hour per time; Average extraction amounts of total flavonoids and total phenolic acids were 0.618, 1.152 mg·g⁻¹ with RSD of 1.66% and 1.19%, respectively. **Conclusion:** It was reasonable to optimize extraction technology by taking pharmacodynamics test as index, Physalis Calyx Seu Fructus fruit had a certain *in vitro* antioxidant activity.

[Key words] Physalis Calyx Seu Fructus fruit; total flavonoids; total phenolic acids; extraction process; ABTS free radical scavenging capacity; *in vitro* antioxidant activity

锦灯笼又名酸浆、红姑娘、挂金灯、山瑚柳、九古牛、泡泡草等,其果实年秋季采摘,呈圆球形,表面光滑,颜色橙红至朱红,微甜中稍微带点酸,以干净、整齐、个大、颜色鲜红的果实为上品^[1]。《本草纲目》中记载锦灯笼具有利湿除热、清肺止咳、利湿化痰、治疔等功效。研究表明锦灯笼果实中含有甾醇类、色素类、糖类、氨基酸类、黄酮类、有机酸类、无机元素类^[2]等成分;其中黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎、抗菌及泻下解痉等作用^[3-4];酚酸类化合物具有抗氧化、清除自由基、防紫外线的作用^[5-6]。目前锦灯笼果实提取工艺的报道主要以总黄酮为指标^[7]。本实验采用 UV 测定总黄酮和总酚酸含量,通过单因素试验和正交试验优选锦灯笼果实中总黄酮和总酚酸的提取工艺,考察提取物的体外抗氧化能力,为锦灯笼果实的开发利用提供参考。

1 材料

UV-2000 型紫外分光光度计(上海犹尼柯仪器有限公司),GB204 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。锦灯笼采于吉林省长春市奢岭山区,经长春中医药大学张辉教授鉴定为茄科植物酸浆 *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino 的新鲜果实;芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100080-200707),没食子酸对照品(天津市光复精细化工研究所,批号津 Q/HG NK 204-2000),2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS,加拿大 Bio Basic Inc 公司),维生素 C (Vc,中国医药集团上海化学试剂公司),水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 5 mg,加乙醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中,即得。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密量取芦丁对照品溶液 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,各加入 5% 亚硝酸钠 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加入 10% 硝酸铝 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加入 4% 氢氧化钠 4 mL, 用乙醇定容, 放置 10 min, 于 510 nm 处测定吸光度(A), 试剂空白参比, 以质量浓度(C)为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $A = 11.263C + 0.0004$ ($R^2 = 0.9993$), 线性范围 17.7 ~ 71.0 mg·L⁻¹。

2.2 总酚酸的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品 5 mg, 加水溶解并定容至 50 mL 量瓶中, 精密量取 12.5 mL 置 50 mL 量瓶中, 加水定容, 即得 0.025 g·L⁻¹ 对照品溶液, 备用。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密量取没食子酸对照品溶液 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 各加入水 1 mL, 加 Folin-Ciocalteu 显色剂 1 mL^[8], 加 10% 碳酸钠 2 mL, 用水定容至刻度, 在 30 °C 水浴中放置 30 min, 于 760 nm 处测定 A^[9], 试剂空白参比, 以 C 为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $A = 73.6C - 0.0193$ ($R^2 = 0.9994$), 线性范围 3.0 ~ 11.2 mg·L⁻¹。

2.3 单因素试验考察

2.3.1 乙醇体积分数 称取锦灯笼鲜果 5 份, 每份 5 g, 固定料液比 1:10, 提取数 2 次, 每次提取时间

1.5 h,分别用体积分数 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇溶液回流提取,过滤,合并滤液,备用。吸取样品提取液 30 mL 浓缩至 10 mL,精密吸取浓缩液 2 mL 置于 10 mL 量瓶中,按 2.1.2 项下方法测定测定 A,计算总黄酮提取量分别为 0.128, 0.149, 0.154, 0.37, 0.348 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。精密吸取样品提取液 0.5 mL 置于 10 mL 量瓶中,按 2.2.2 项下方法测定测定 A,计算总酚酸提取量分别为 0.514, 0.814, 1.068, 1.17, 1.132 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。表明锦灯笼果实中总黄酮和总酚酸提取量先随乙醇体积分数的增大而升高,于 80% 时达最大值,之后随乙醇体积分数的增高反而降低。

2.3.2 提取时间 称取锦灯笼鲜果 5 份,每份 5 g,分别加 10 倍量 80% 乙醇回流提取 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 h,各提取 2 次,过滤,合并 2 次滤液,备用。按 2.1.2 项下方法测定测定 A,计算总黄酮提取量分别为 0.225, 0.45, 0.432, 0.409, 0.375 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,表明总黄酮提取量随提取时间的延长呈先增加后降低的趋势,于提取 1 h 时达最大值;按 2.2.2 项下方法测定测定 A,计算总酚酸提取量分别为 1.268, 1.259, 1.192, 0.986, 1.018 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,表明总酚酸提取量随时间的延长而越低,但提取 0.5 和 1 h 时较接近,故确定提取 1 h。

2.3.3 料液比 称取锦灯笼鲜果 5 份,每份 5 g,分别加 10, 15, 20, 25, 30 倍量 80% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h,过滤,合并 2 次滤液,备用。按 2.1.2 项下方法测定测定 A,计算总黄酮提取量分别为 0.381, 0.423, 0.452, 0.436, 0.401 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,总黄酮提取量随料液比的增加而先增加后减小,当料液比为 1:20 时达最大值;按 2.2.2 项下方法测定测定 A,计算总酚酸提取量分别为 0.948, 1.157, 1.238, 1.224, 1.139 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,表明总酚酸提取量的变化趋势与总黄酮相似,故选择料液比 1:20。

2.4 正交试验设计 预试验确定提取数 2 次,选择乙醇体积分数、提取时间、料液比为考察因素,每个因素设置 3 个水平,以总黄酮和总酚酸提取量为评价指标,称取锦灯笼鲜果 9 份,每份 5 g,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 锦灯笼果实提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 回流时间/h	C 料液比/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	75	0.5	1:15
2	80	1	1:20
3	85	1.5	1:25

表 2 锦灯笼果实提取工艺正交试验安排及直观分析

No.		A	B	C	D(空白)	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	
						总黄酮	总酚酸
1		1	1	1	1	0.250	0.872
2		1	2	2	2	0.278	1.118
3		1	3	3	3	0.238	1.055
4		2	1	3	2	0.258	1.119
5		2	2	1	3	0.362	0.739
6		2	3	2	1	0.434	1.069
7		3	1	2	3	0.631	1.084
8		3	2	3	1	0.487	1.143
9		3	3	1	2	0.575	0.666
总黄酮	K_1	0.255	0.380	0.396	0.390		
	K_2	0.351	0.376	0.448	0.371		
	K_3	0.564	0.416	0.328	0.410		
	R	0.309	0.040	0.120	0.039		
总酚酸	K_1	1.015	1.025	0.759	1.028		
	K_2	0.976	1.000	1.090	0.968		
	K_3	0.964	0.930	1.106	0.959		
	R	0.051	0.095	0.347	0.069		

表 3 锦灯笼果实中总黄酮和总酚酸提取工艺方差分析

方差来源		SS	f	MS	F	P
总黄酮	A	0.150	2	0.075	50.00	<0.05
	B	0.003	2	0.0015	1.00	>0.05
	C	0.002	2	0.001	7.33	>0.05
	D(误差)	0.003	2			
总酚酸	A	0.004	2	0.002	1.00	>0.05
	B	0.015	2	0.0075	3.75	>0.05
	C	0.230	2	0.115	57.50	<0.05
	D(误差)	0.004	2			

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

由直观分析可知,各因素对总黄酮提取量的影响顺序为 $A > C > B$,对总酚酸提取量的影响则为 $C > B > A$ 。方差分析表明乙醇体积分数对总黄酮提取量具有显著性影响,液料比对总酚酸提取量具有显著性影响。综合考虑,确定最佳提取工艺为 $A_3B_1C_2$,即加 20 倍量 85% 乙醇回流提取 2 次,每次 0.5 h。

2.5 验证试验 称取锦灯笼鲜果 5 g,按优选的工艺条件进行 3 次验证试验,结果总黄酮和总酚酸平均提取量分别为 0.618, 1.152 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 依次为 1.66%, 1.19%。

2.6 清除 ABTS^+ 能力的测定

2.6.1 ABTS⁺·的配制^[10] 将7 mmol·L⁻¹的ABTS和2.45 mmol·L⁻¹的过硫酸钾等体积混合,室温避光放置12~16 h,形成ABTS储备液,用10 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释,使其于734 nm处吸光度 $A = 0.7 \pm 0.02$,即得。

2.6.2 Vc对照品溶液的制备 称取Vc 8.8 mg,置于50 mL量瓶中,用水溶解并定容至刻度,即得,备用。

2.6.3 Vc标准曲线的绘制 精密量取Vc对照品溶液3,4,5,6,7,8 mL,分别置于10 mL量瓶中,加水定容至刻度,各精密量取0.1 mL与ABTS⁺·工作液3.9 mL混合,振荡6 s,静置15 min。以10 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 7.4)为空白对照,于734 nm处测定A,计算清除率,以质量浓度为横坐标,清除率为纵坐标,得回归方程 $Y = 89\ 217.142\ 9X + 18.473\ 9$ ($R^2 = 0.999\ 4$),线性范围300~800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

ABTS自由基清除率 = $(1 - A_{\text{样品}}/0.7) \times 100\%$

2.6.4 样品溶液的制备 称取锦灯笼果实3份,每份5 g,分别按优选的工艺条件回流提取,过滤,合并滤液,即得,备用。

2.6.5 抗氧化活性考察 称取样品滤液0.1 mL与ABTS⁺·工作液3.9 mL混合,按2.6.3项下方法测得A分别为0.079,0.083,0.086,计算清除率分别为88.71%,88.14%,87.71%,利用回归方程计算Vc抗氧化当量分别为314.8,312.4,310.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$,说明锦灯笼果实具有较好的体外抗氧化活性。

3 讨论

预试验量取芦丁对照品溶液和样品溶液各2 mL,按2.1.2项下方法显色,显色后溶液于190~1 000 nm进行紫外-可见光谱扫描,结果二者的最大吸收波长均为510 nm,故选择以芦丁为对照品在510 nm处测定锦灯笼果实中总黄酮含量。

现代药理研究表明,锦灯笼果实具有降血糖、增强免疫、抗氧化等作用^[11-13],具有巨大的开发潜力。本文以总黄酮、总酚酸提取量为考察指标,同时结合体外抗氧化活性试验优选提取工艺,使锦灯笼果实的醇提工艺更合理、科学和客观。

[参考文献]

- [1] 孙启时. 辽宁地道药材[M]. 北京:中国医药科技出版社,2009:445.
- [2] 武海燕,索全伶,李俊. 药用植物酸浆的研究进展[J]. 内蒙古石油化工,2007,34(2):5.
- [3] Ciz M, Denev P, Kratchanova M, et al. Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals[J]. Oxid Med Cell Longev, 2012, 2012(1):1.
- [4] Khalid A L, Didier B, Valérie H, et al. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria[J]. Plant Signaling Behavior, 2012, 7(6):636.
- [5] 何文静,张帆,田树革,等. Folin-Ciocalteu比色法测定啤酒花中总多酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):58.
- [6] 李静,聂继云,李海飞,等. Folin-酚法测定水果及其制品中总多酚含量的条件[J]. 果树学报, 2008, 25(1):126.
- [7] 徐保利,管慧洁,李慧,等. 锦灯笼果实总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21):33.
- [8] 吴晓青,陈丹,邱红鑫,等. 芙蓉李中总多酚含量测定方法的优选[J]. 中国中医药科技, 2011, 18(2):131.
- [9] 龚文菲,汪铁山,林敬明. 小油桐叶中总多酚的含量测定[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(6):1321.
- [10] Iris C Z, Roxana M O, María I I. Autographic assay for the rapid detection of antioxidant capacity of liquid and semi-solid pharmaceutical formulations using ABTS⁺ immobilized by gel entrapment[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2011, 11(3):1159.
- [11] 王玮. 锦灯笼的营养保健功能及药用价值[J]. 中国食物与营养, 2008(3):55.
- [12] Kang H, Kwon S R, Choi H Y. Inhibitory effect of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* extract and its chloroform fraction on LPS or LPS/IFN- γ -stimulated inflammatory response in peritoneal macrophages[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135(1):95.
- [13] Zheng Y L, Chen Y, Ren Y P, et al. An ultra-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of three physalins in rat plasma and its application to pharmacokinetic study of *Physalis alkekengi* var. *franchetii* (Chinese lantern) in rats[J]. J Pharmaceut Biomed, 2012, 58(1):94.

[责任编辑 全燕]