

追风伞总黄酮提取工艺优选及其体外抗氧化作用考察

叶敏*, 孔维兵, 王小英

(毕节学院化学与化学工程学院, 贵州 毕节 551700)

[摘要] **目的:** 优选追风伞中总黄酮的提取工艺, 并考察其体外抗氧化作用。**方法:** 以总黄酮得率为指标, 选取料液比、乙醇体积分数、回流时间与温度为考察因素, 采用单因素试验和正交试验优选追风伞总黄酮的提取工艺; 采用紫外分光光度法测定追风伞总黄酮对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用和还原能力。**结果:** 追风伞总黄酮的最佳提取工艺为乙醇体积分数 65%, 料液比 1:25, 回流温度 65 ℃, 回流时间 4 h, 黄酮得率 1.69%; 追风伞总黄酮具有较好的还原能力和抑制自由基的能力, 且随黄酮质量浓度的增加, 还原能力和抑制能力提高。**结论:** 追风伞总黄酮具有明显的抗氧化作用。

[关键词] 追风伞; 黄酮; 提取工艺; 抗氧化作用

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0044-03

Optimization of Extraction Technology and Investigation of *in vitro* Antioxidation for Total Flavonoids from *Lysimachia paridiformis*

YE Min*, KONG Wei-bing, WANG Xiao-ying

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Bijie University, Bijie 551700, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total flavonoids from *Lysimachia paridiformis*, and investigate its *in vitro* antoxidation. **Method:** With yield of total flavonoids as index, single factor and orthogonal test were used to optimized extraction technology of total flavonoids from *L. paridiformis* with solid-liquid ratio, the concentration of ethanol, reflux time and temperature as factors; Scavenging action and reducing power of total flavonoids on hydroxyl radical and superoxide anion free radical were determined by UV spectrophotometry. **Result:** Optimum extraction technology of total flavonoids from *L. paridiformis* was: ethanol concentration 65%, ratio of solid-liquid 1: 25, reflux temperature 65 ℃, extraction time 4 h, yield of total flavonoids of 1.69%; Total flavonoids from *L. paridiformis* had good reducing power and ability to inhibit free radical, and reducing power and scavenging hydroxyl radical activity increased with increasing the concentration of total flavonoids. **Conclusion:** total flavonoids from *L. paridiformis* had significant antoxidation.

[Key words] *Lysimachia paridiformis*; flavonoids; extraction technology; antoxidation

追风伞主要分布在我国西南地区, 在贵州作为苗药使用, 具有祛风通络、活血止痛等功效, 临床用于治疗风湿痹痛、四肢拘挛、半身不遂、骨折等症, 其所含黄酮类成分含量丰富^[1-2]。本试验拟采用单因素试验与正交试验优选追风伞中总黄酮的提取工艺, 并考察总黄酮的抗氧化作用, 为追风伞的资源综

合利用提供基础数据。

1 材料

FA2004N 型电子分析天平(上海菁海仪器有限公司), V-5800 型可见分光光度计(上海元析仪器有限公司), 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 200707), 其余试剂均为国产分析纯, 追风伞药材购于毕节市利民中西药店, 经毕节学院蒋洁云副教授鉴定为报春花科植物狭叶落地梅 *Lysimachia paridiformis* Franch. var. *stenophylla* Franch. 的全草或根, 50 ℃ 烘干后粉碎成粉末, 备用。

2 方法与结果

2.1 追风伞总黄酮的提取 称取追风伞粉末 3 g 于 250 mL 烧瓶中, 加入一定体积分数的乙醇溶液加

[收稿日期] 20120818(004)

[基金项目] 贵州省固体废弃物综合利用科技创新人才团队项目(黔科合人才团队[2010]4011号)

[通讯作者] * 叶敏, 硕士, 讲师, 从事中草药活性成分的分离与纯化方面的研究, Tel: 15721748638, E-mail: yemin0213@163.com

热回流提取,过滤后得滤液和滤渣,滤渣按上述方法提取2次,合并滤液,减压浓缩,加入相应体积分数的乙醇溶液定容至50 mL量瓶,作为总黄酮试液。

2.2 追风伞总黄酮的含量测定

2.2.1 标准曲线的绘制^[3] 精确称取芦丁对照品0.010 g,加85%乙醇溶解并定容至100 mL量瓶中,制成0.1 g·L⁻¹的芦丁对照品溶液。准确吸取0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL芦丁对照品溶液至25 mL比色管中,分别编号为0~5,用85%乙醇补至10 mL,加入5%亚硝酸钠溶液0.80 mL,混匀,放置10 min;加入10%硝酸铝溶液0.80 mL,混匀,放置10 min;加入4%氢氧化钠溶液10 mL,混匀后放置10 min;加入85%乙醇至刻度,摇匀,放置10 min后于510 nm波长处测定各管的吸光度(A,以0号管为空白),以芦丁质量浓度(C)为横坐标,A为纵坐标,得到回归方程 $A = 17.325C + 0.0713$ ($R^2 = 0.9946$),线性范围0.004~0.029 g·L⁻¹。

2.2.2 样品测定^[4] 准确移取黄酮试液1 mL,置于10 mL量瓶中,按2.2.1项下方法在510 nm波长处测定A,根据回归方程计算出黄酮质量浓度(以85%乙醇为空白),按下式计算总黄酮得率。

$$\text{总黄酮得率} = CV_1V_2/1000mV_0 \times 100\%$$

式中C为黄酮质量浓度;V₀为测定A时所用样液的体积;V₁为测定时样液稀释的体积;V₂为样液定容的体积;m为样品质量。

2.3 提取工艺优选

2.3.1 单因素试验

2.3.1.1 乙醇体积分数考察 称取追风伞粉末3 g,共4份,分别加入25倍量体积分数为55%,65%,75%,85%的乙醇溶液,于75℃恒温水浴中回流提取2 h,按2.2.1方法测定A,结果总黄酮得率分别为1.1%,1.65%,1.03%,0.41%。说明65%乙醇提取时总黄酮得率最大,继续增加乙醇体积分数,黄酮得率呈现下降趋势。可能随乙醇体积分数的提高,使得蛋白质等生物大分子在其发生凝聚并滞留在颗粒内部的通道内,从而加大了黄酮类物质扩散的阻力,水的减少同时削弱了对颗粒细胞的溶胀,所以乙醇体积分数提高到一定程度后黄酮类物质的浸出率反而降低^[8]。

2.3.1.2 料液比考察 称取追风伞粉末3 g,共4份,按料液比1:15,1:25,1:35,1:45加入65%乙醇溶液,于75℃恒温水浴中回流提取2 h,按2.2.1项下方法测定A,结果总黄酮得率分别为0.35%,1.03%,0.91%,0.9%。说明料液比1:25时黄酮得

率最高,之后随料液比的增大,总黄酮提取效果反而降低,可能是因为较大料液比对多糖类物质的溶解度增大^[9]。

2.3.1.3 回流时间考察 称取追风伞粉末4份,每份3 g,加25倍量65%乙醇于75℃恒温水浴中分别回流提取2,3,4,5 h,按2.2.1项下方法测定A,结果总黄酮得率分别为0.69%,1.43%,1.64%,1.16%。说明回流4 h时,总黄酮得率最大,之后随着时间的延长,黄酮得率反而下降,可能是因为回流时间太长,已经溶出的化合物成分相互发生作用,从而破坏某些黄酮类化合物的结构^[9]。

2.3.1.4 回流温度考察 称取追风伞粉末4份,每份3 g,加25倍量65%乙醇分别于60,65,70,75℃恒温水浴回流提取4 h,按2.2.1项下方法测定A,结果总黄酮得率分别为0.62%,1.17%,0.76%,0.69%。说明65℃时总黄酮得率最大,继续升高温度,黄酮得率呈现下降趋势。可能是因为一些对温度比较敏感的黄酮类物质会被破坏^[9]。

2.3.2 正交试验 在单因素试验基础上,以总黄酮得率为指标,选取乙醇体积分数、料液比、回流温度、回流时间为考察因素进行正交试验。因素水平见表1,试验安排及结果见表2。

表1 追风伞中总黄酮的提取工艺正交试验因素水平

水平	A	B	C	D
	乙醇体积分数/%	料液比/g·mL ⁻¹	回流温度/℃	回流时间/h
1	55	1:25	60	3
2	65	1:35	65	4
3	75	1:45	70	5

表2 追风伞中总黄酮的提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	总黄酮得率/%
1	1	1	1	1	1.15
2	1	2	2	2	1.49
3	1	3	3	3	1.16
4	2	1	2	3	1.67
5	2	2	3	1	1.58
6	2	3	1	2	1.42
7	3	1	3	2	1.53
8	3	2	1	3	1.13
9	3	3	2	1	1.33
K ₁	1.267	1.450	1.233	1.353	
K ₂	1.557	1.400	1.497	1.480	
K ₃	1.330	1.303	1.423	1.320	
R	0.290	0.147	0.264	0.160	

由表2结果可知,4个因素对总黄酮得率的主要影响顺序为乙醇体积分数>回流温度>回流时间>料液比,确定最佳工艺条件为A₂B₁C₂D₂,即乙

醇体积分数 65%, 料液比 1:25, 回流温度 65℃, 回流时间 4 h。在最佳工艺条件下, 通过验证试验得到追风伞总黄酮得率为 1.69%。

2.4 体外抗氧化试验

2.4.1 还原能力的测定^[5] 还原能力是考察活性物质提供电子或氢原子的能力, 是物质抗氧化能力的一种表现形式^[9]。本试验采用铁氰化钾法。取不同质量浓度(0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.45 mg·L⁻¹)总黄酮样品溶液 2 mL, 加入 pH 6.6 磷酸盐缓冲溶液 2.5 mL 和 1% 铁氰化钾溶液 2.5 mL, 摇匀, 于 50℃ 水浴中保温 20 min; 加入 10% 三氯乙酸溶液 2.5 mL, 混合后离心, 取上清液 2.5 mL 并加入蒸馏水 2.5 mL 和 0.1% 三氯化铁溶液 0.5 mL, 迅速混匀, 测定溶液在 700 nm 波长处的吸光度(A), 结果分别为 0.189, 0.265, 0.425, 0.565, 0.698。

2.4.2 羟自由基的生成及清除率的测定^[6] 羟自由基是目前已知的氧化性最强的自由基, 反应性极强, 几乎可以和所有细胞成分发生反应, 对机体危害极大^[10]。本试验采用 Fenton 反应进行测定。在 1.5 mL 5 mmol·L⁻¹ 邻二氮菲无水乙醇溶液中加入 0.75 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4) 4.0 mL, 充分混匀后加入 7.5 mmol·L⁻¹ 硫酸亚铁溶液 1.0 mL, 每加 1 种试剂立即摇匀, 加入不同质量浓度(0.025, 0.05, 0.075, 0.10, 0.125 mg·L⁻¹)总黄酮样品溶液 2.5 mL, 最后加入 1% H₂O₂ 1.0 mL。将反应液于 37℃ 水浴中保温 1 h, 在 536 nm 处测定 A。空白组以等体积蒸馏水代替样品溶液测定 A; 对照组以蒸馏水代替 1% H₂O₂ 和样品溶液测定 A, 按下式计算清除率分别为 24.1%, 73.5%, 77.3%, 81.5%, 88.6%。说明追风伞总黄酮对羟基自由基的清除作用随质量浓度的增加而增强, 不同质量浓度总黄酮对羟自由基均具有一定的抑制能力。

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

2.4.3 超氧阴离子自由基的生成及清除率的测定^[7] 采用邻苯三酚法进行测定。取 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol·L⁻¹, pH 8.2) 4.5 mL 和蒸馏水 2 mL 置于试管中, 混合均匀, 室温下平衡 4 min, 加入 7 mmol·L⁻¹ 邻苯三酚溶液 0.4 mL, 迅速混匀后转入比色皿中, 在 325 nm 处每隔 30 s 测定 A₀, 计算每分钟 A 的增加量 ΔA₀; 依上法, 取 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL 和不同质量浓度(0.025, 0.05, 0.075, 0.10, 0.125 mg·L⁻¹)总黄酮提取液 2 mL, 混匀后在室温下放置 4 min, 立即加入邻苯三酚溶液 0.4 mL, 测定加入总黄酮提取液后每分钟 A 的增加 ΔA, 重复 3 次试验,

求平均值, 按下式计算清除率分别为 11.1%, 18.8%, 24.0%, 30.2%, 32.5%。说明追风伞总黄酮对超氧阴离子自由基的清除作用随总黄酮质量浓度的增加而增强。

$$\text{清除率} = (\Delta A_0 - \Delta A) / \Delta A_0 \times 100\%$$

3 讨论

自由基是细胞的正常代谢产物, 当机体内自由基产生过多或机体清除自由基能力下降时, 会对 DNA, 蛋白质和脂质等生物大分子产生氧化损伤作用, 引起机体组织器官发生各种病变^[6], 因此, 对清除自由基的抗氧化剂的研究受到人们的普遍关注, 寻找安全、有效的天然抗氧化剂已成为当前研究的热点。本试验采用乙醇回流提取法提取追风伞总黄酮, 通过单因素实验和正交实验确定了追风伞中总黄酮的最佳提取工艺条件, 同时初步探讨了追风伞中的黄酮提取物的抗氧化效果, 结果表明追风伞总黄酮具有较好的还原能力和抑制自由基生成的能力, 且随总黄酮质量浓度的增加, 其还原能力和抑制自由基能力有一定程度的提高。说明追风伞总黄酮具有一定的体外抗氧化能力。

[参考文献]

- [1] 张援虎, 何丽, 关焕玉, 等. 追风伞中黄酮类成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14): 1824.
- [2] 齐柳娅, 郁建平, 田晶, 等. 追风伞总黄酮抗风湿活性的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(4): 369.
- [3] 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.
- [4] 徐桂花, 于颖. 溶剂提取法提取银杏叶总黄酮的工艺研究[J]. 农业科学, 2008, 29(3): 37.
- [5] 李金凤, 段玉清, 马海乐, 等. 板栗壳中多酚的提取及体外抗氧化性研究[J]. 林产化学与工业, 2010, 30(2): 53.
- [6] 罗超, 刘露明, 邢惟青, 等. 石参总黄酮抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 198.
- [7] 李红, 郅洁, 马彦梅, 等. 沙枣黄酮的提取及其抗氧化作用的研究[J]. 2010, 21(1): 35.
- [8] 林向成, 汤泉, 罗杨合. 千年健中总黄酮的提取及其抗氧化活性研究[J]. 2012, 39(5): 96.
- [9] 艾力江, 阿卜杜热依木, 木合布力, 等. 昆仑雪菊中总黄酮提取工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(12): 129.
- [10] 庄永亮, 孙丽平, 尚小丽. 红托竹荪菌盖多糖的提取及抗氧化能力的研究[J]. 林产化学与工业, 2011, 31(3): 45.

[责任编辑 全燕]