

蚊子草抗氧化物提取工艺优选及抗氧化活性考察

闫向竹, 严铭铭*, 邵帅, 田雨, 孙永嘉, 周媛, 赵大庆
(长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] 目的: 优选蚊子草抗氧化物的提取工艺并测定抗氧化提取物及其纯化物的抗氧化活性。方法: 以总黄酮和总酚酸含量为指标, 采用正交试验法优选蚊子草抗氧化物的提取工艺; 采用 DPPH 法研究抗氧化提取物及其纯化物的体外抗氧化活性。结果: 最佳提取工艺为 10 倍量 65% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 2.0 h; 抗氧化提取物及其纯化物的 DPPH 自由基清除率分别约为 70%, 90%。结论: 优选的提取工艺稳定、可靠; 蚊子草抗氧化物及其纯化物具有较强的体外抗氧化活性。

[关键词] 蚊子草; 正交试验; 提取工艺; 抗氧化活性; 总黄酮; 总酚酸

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0010-04

Optimization of Extraction Technology for Antioxidants from *Filipendula palmate* and Investigation of Its Antioxidant Activity

YAN Xiang-zhu, YAN Ming-ming*, SHAO Shuai, TIAN Yu,
SUN Yong-jia, ZHOU Yuan, ZHAO Da-qing

(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process for antioxidants from *Filipendula palmate*, and to determine antioxidant activity of antioxidant extract and its purified. **Method:** With the content of total flavonoids and total phenolic acid as indexes, extraction process of antioxidants from *F. palmate* was to optimized by orthogonal test; *In vitro* antioxidant activity of antioxidant extract and its purified was investigated by DPPH method. **Result:** Optimum extraction technology was selected as follow: reflux extracted 3 times with 10 folds the amount of 65% ethanol, 2.0 h each time; DPPH clearance rate of antioxidant extract and its purified were 70%, 90%. **Conclusion:** Optimized extraction process was stable, reliable; And antioxidant extract and its purified

[收稿日期] 20120228(029)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑项目(2007BAI38B05)

[第一作者] 闫向竹, 硕士, 从事中药有效成分提取及应用研究, Tel: 13514492487, E-mail: yanxiangzhu@163.com

[通讯作者] * 严铭铭, 博士, 教授, 从事中药有效成分提取及应用研究, Tel: 13578990277, E-mail: yanmm595@yahoo.com.cn

的贴剂, 以此减少误差。体外透皮结果为 7% 氮酮对罗通定的促渗效果优于 10% 草果油, 经过查阅资料^[5] 草果挥发油具有镇痛、解热、抗菌、抗病毒等作用, 选用 10% 草果油作为罗通定贴剂的促渗剂, 可起到药辅合一的作用。

[参考文献]

- [1] 赵巧玲. 罗通定缓释片的研究[M]. 北京: 军事医学科学院. 2005, 16(3): 1.
- [2] 崔利利, 马云淑, 汉会勋, 等. 3 种挥发油对罗通定贴剂

的经皮促渗作用考察[J]. 中华中医药杂志, 2011, 27(1): 193.

- [3] 沈留英. 草豆蔻、草果和白豆蔻挥发油体外促透皮作用研究[D]. 云南: 云南中医学院, 2009.
- [4] 刘继勇, 顾清, 胡晋红, 等. 痹痛宁贴剂的制备及体外释放、透皮吸收研究[J]. 中成药, 2004, 26(6): 437.
- [5] 彭建明, 马杰, 张爱霞. 近年来草果的研究进展概况[J]. 中成药, 2006, 28(7): 1036.

[责任编辑 全燕]

had a strong *in vitro* antioxidant activity.

[**Key words**] *Filipendula palmate*; orthogonal test; extraction technology; antioxidant activity; total flavonoids; total phenolic acid

蚊子草为蔷薇科植物蚊子草属的带根全草,别名合叶子^[1],为长白山民间中药材,具有祛风除湿、发汗退热、止血的功效^[2]。目前对旋果蚊子草研究较多,其富含黄酮及酚酸类成分,具有抗肿瘤、抗氧化活性、抗溃疡、免疫调节等药理活性,且已载入《欧洲药典》^[3-4],但对民间药材蚊子草的研究较少。为充分开发利用这一民间药用资源,本试验对蚊子草进行抗氧化提取物的提取及其抗氧化活性研究。

1 材料

UV-1700 型分光光度计(日本岛津),METTLER-AE240 型电子分析天平(瑞士 METTLER 公司),DT100 型电子天平(美国双杰兄弟有限公司),DZF-6050 型真空干燥箱(上海博迅实业有限公司),HX-400A 型高速中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金药具厂),MK3 型酶标仪[热电(上海)仪器有限公司]。

蚊子草(采于吉林省长白县,经长春中医药大学姜大成教授鉴定为蔷薇科蚊子草属植物蚊子草 *Filipendula palmate* (Pall) Maxim 的带根全草),芦丁对照品(批号 0721-200010,北京药品生物制品检定所),没食子酸对照品(批号 110831-200302,中国药品生物制品检定所),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH, Sigma 公司),维生素 C 对照品(Vit C, Sigma 公司),所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定^[5-7]

2.1.1 对照品溶液的制备 取芦丁对照品适量,精密称定,用无水乙醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,制成 $0.452 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液;取没食子酸对照品适量,精密称定,用无水乙醇溶解并定容至 100 mL 量瓶中,制成 $0.368 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液制备 取蚊子草醇提干膏 20 mg,精密称定,加无水乙醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,即得。

2.1.3 总黄酮含量

2.1.3.1 最大吸收波长的确定^[5] 精密量取上述芦丁对照品溶液 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,加 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,用无水乙醇稀释定容至刻度,摇匀,放置 15

min,以相应试剂为空白,于 400 ~ 700 nm 波长测定吸光度。确定最大吸收波长为 510 nm。

2.1.3.2 标准曲线的绘制 精密量取芦丁储备液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,按 2.1.2.1 项下方法操作,于 510 nm 波长处测定其吸光度(A)。以吸光度为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标绘制标准曲线。得回归方程 $A = 11.214C + 0.0045$ ($r = 0.9997$),结果表明芦丁在 2.26 ~ 13.56 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好线性关系。

2.1.4 总酚酸含量

2.1.4.1 最大吸收波长的确定^[6] 精密量取没食子酸对照品溶液 1 mL 于 25 mL 量瓶中,加无水乙醇 5 mL,加 0.3% 的十二烷基硫酸钠溶液 2 mL, 0.6% 三氯化铁-0.9% 铁氰化钾(1:0.9)混合液 2 mL,摇匀,暗处放置 5 min,加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液至刻度,摇匀,暗处放置 20 min,以相应试剂为空白,于 600 ~ 800 nm 波长测定 A。确定最大吸收波长为 730 nm。

2.1.4.2 标准曲线的绘制 精密量取没食子酸储备液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 分别置于 25 mL 量瓶中,按 2.1.3.1 项下方法操作,于 730 nm 波长处测定其 A。以 A 为纵坐标,以 C 为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $A = 0.5612C - 0.1092$ ($r = 0.9971$)。结果表明没食子酸在 0.294 ~ 1.47 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好线性关系。

2.2 样品溶液的制备及测定

2.2.1 总黄酮样品溶液 取蚊子草抗氧化提取物(即醇提干膏)20 mg,精密称定,加无水乙醇超声 15 min,定容至 25 mL 量瓶中,精密吸取 1 mL 于 10 mL 量瓶中,按照 2.1.2.1 项下方法操作,于 510 nm 波长处测定其 A,依据回归方程计算其含量。

2.2.2 总酚酸样品溶液 取蚊子草醇提干膏 2.66 mg,精密称定,加无水乙醇超声 15 min,定容至 100 mL 量瓶中。精密吸取上述溶液 5 mL 于 25 mL 量瓶中,按照 2.1.3.1 项下方法操作,于 730 nm 波长处测定其 A,根据回归方程计算含量。

2.3 体外抗氧化活性研究^[8-10]

2.3.1 溶液的制备 取 DPPH 试剂、Vit C 对照品适量,精密称定,加无水乙醇溶解,分别制成 21.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液及 25.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Vit C 溶液。

取待测样品适量,精密称定,无水乙醇超声溶解,制成 25.0 mg·L⁻¹ 的样品溶液。

2.3.2 抗氧化活性测定 移取样品溶液 100 μL 于 96 孔酶标板中,加入 100 μL 上述 DPPH 溶液,避光静置 30 min,用酶标仪于 490 nm 处测定 A_i。用无水乙醇溶液代替样品溶液测得 A₀。无水乙醇代替 DPPH 测得 A_j。

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

2.4 提取工艺优选^[8-11]

2.4.1 乙醇体积分数考察 选用 10 倍量体积分数分别为 50% ,60% ,70% ,80% ,90% 的乙醇,加热回流提取 3 次,每次 1 h,按 2.1.2.1 项下方法计算总黄酮含量,结果采用 70% 乙醇提取时含量较高,故在正交试验设计时,将乙醇体积分数设为 65% ,70% ,75% 3 个因素。

2.4.2 正交试验 选取乙醇体积分数、溶剂用量、提取次数及提取时间为考察因素,采用四因素三水平设计正交试验。称取蚊子草药材 50 g,按正交试验方案进行提取、过滤、回收溶剂、真空干燥,得干膏,备用。因素水平表见表 1,正交试验结果及安排见表 2,方差分析见表 3,4。

表 1 蚊子草提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A 提取 数/次	B 溶剂用量/倍	C 乙醇 体积分数/%	D 提取时间/h
1	1	10	65	1.0
2	2	12	70	1.5
3	3	14	75	2.0

根据直观分析结果可知,各因素影响次序为 A > C > D > B,即提取次数 > 乙醇体积分数 > 提取时间 > 溶剂量,最佳提取工艺为 A₃B₃C₁D₃。以极差最小的 B 因素为误差项进行方差分析,A 因素影响极显著,C 因素影响显著,结合生产实际,最后确定最佳提取工艺为 A₃B₁C₁D₃,即加 10 倍量 65% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 2.0 h。

2.5 验证试验 称取 3 批蚊子草药材,按最佳提取工艺进行验证试验,结果总黄酮质量分数分别为 14.10% ,14.40% ,14.30% ;总酚酸质量分数分别为 18.19% ,18.16% ,18.15% ;DPPH 清除率分别为 70.63% ,73.62% ,74.69% ;Vit C 清除率为 96.59%。说明由优选工艺稳定可行,制得的蚊子草醇提干膏具有较高的 DPPH 清除率,即具有显著 DPPH 自由基清除能力。

2.6 抗氧化活性研究

表 2 蚊子草提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	总黄酮 含量/%	总酚酸 含量/%
1	1	1	1	1	7.955	8.863
2	1	2	2	2	6.307	7.900
3	1	3	3	3	5.601	7.315
4	2	1	2	3	12.520	15.682
5	2	2	3	1	8.903	11.251
6	2	3	1	2	12.526	15.689
7	3	1	3	2	8.858	12.294
8	3	2	1	3	14.523	18.190
9	3	3	2	1	12.596	15.776
总黄酮 K ₁	19.863	29.333	35.004	29.453		
K ₂	33.949	29.733	31.423	27.691		
K ₃	35.977	30.722	23.361	32.644		
R	16.114	1.390	11.642	4.953		
总酚酸 K ₁	24.079	36.839	42.742	35.890		
K ₂	42.621	37.341	39.358	35.883		
K ₃	46.261	38.780	30.860	41.187		
R	7.394	0.647	3.961	1.768		

表 3 总黄酮含量方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	51.352	2	25.676	150.56	<0.01
B(误差)	0.341	2	0.171	1.00	
C	23.707	2	11.854	69.51	<0.05
D	4.202	2	6.160	12.32	

注: F_{0.05}(2,2) = 19.00, F_{0.01}(2,2) = 99(表 4 同)。

表 4 总酚酸含量方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	94.343	2	47.172	139.47	<0.01
B(误差)	0.676	2	0.338	1.00	
C	24.984	2	12.492	36.94	<0.05
D	6.242	2	3.121	9.23	

2.6.1 纯化物的制备 取蚊子草药材 200 g,按最佳提取工艺制得醇提干膏,加水 2 000 mL 使溶解,加至 HPD 600 型大孔吸附树脂柱(内径 10 cm,长 100 cm)上,用蒸馏水洗至颜色不变,分别用 5 BV 体积分数为 30% ,50% ,70% 的乙醇进行梯度洗脱,收集各部分乙醇洗脱液,回收乙醇至无醇味,减压干燥(60 ℃),制得纯化物,即样品 1,2,3。

2.6.2 纯化物的抗氧化活性研究 取样品 1,2,3

适量,精密称定,按 2.3.1 项下方法配制 DPPH 储备液、Vit C 溶液及样品溶液,计算 DPPH 清除率,结果分别为 82.16% ,89.41% ,94.69%。Vit C 清除率为 96.59%。由结果可知,蚊子草抗氧化提取物经 HPD 600 型大孔吸附树脂柱纯化的到的样品 1,2,3 的清除率均 >80%,其中以样品 3 清除率最高,且接近于 Vit C 清除率,由此表明,获取蚊子草中抗氧化活性有效部位,应采用 HPD 600 型大孔吸附树脂,主要收集其 70% 乙醇洗脱液。

3 讨论

DPPH 法是判定药物体外抗氧化活性的经典试验方法,常用紫外分光光度计测量,本试验则选用酶标仪操作,通过全波长扫描发现 DPPH 自由基较大吸收峰在 485 ~ 510 nm,依据光谱吸收图反映的吸收峰特征,选取 490 nm 作为检定波长。通过紫外分光光度计法及酶标仪法操作的结果表明,用酶标仪测量所得的数据更加快速、准确。

本课题组对蚊子草中总苷、总蛋白、总酚酸、总黄酮、总多糖等各部位进行了初步活性研究,发现其中总黄酮、总酚酸具有较好的抗氧化活性,为更合理地提出蚊子草中的抗氧化活性部分,本试验选择总黄酮及总酚酸含量为考察指标,进行乙醇提正交试验优选。预实验结果表明,HPD 600 型树脂对蚊子草抗氧化提取物的富集要优于其他类型树脂。故以 HPD 600 型树脂进行纯化。本试验抗氧化活性研究证实蚊子草具有较高的清除自由基的能力,即高抗氧化活性,根据这一特性可开发功能性食品、保健品、化妆品等。

[参考文献]

[1] 《长白山植物药志》编写组,长白山植物药志[M]. 长

春:吉林人民出版社,1982:406.

- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:4,10,146,161.
- [3] 赵中振,萧培根. 当代药用植物典. 第3册[M]. 香港:世界图书出版公司,2008:192.
- [4] E. Ю. Авдеева. КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ФРАКЦИИ *Filipendula ulmaria* (L.) MAXIM. С ВЫСОКОЙАнтиоксидантной активно стью [J]. ХИМИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, 2008 (3):115.
- [5] 付颖超,严铭铭,黄耀玲,等. 节节草总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 中华中医药杂志,2010,25(10):1580.
- [6] 海平,苏雅乐其其格. 蒙药小白蒿中总黄酮提取及其抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):59.
- [7] Ueno A, Oguri N, Hori K. Pharmaceutical studies on ferns. 18. Chemical components in leaves of *Sphenomehs chusanan* Cope1 and *Cyatheaufau-Copel* [J]. Jpn J Pharma,1963,83:420.
- [8] Blois M S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical[J]. Nature, 1958, 181:1199.
- [9] 唐勇,赵靖,张婷,等. 植物总抗氧化能力的微孔板定量测定及评价[J]. 第三军医大学学报,2008,30(6):517.
- [10] Marja P, Kähkönen. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds[J]. J Agric Food Chem, 1999,47:3954.
- [11] 陈象青,刘圣,方焱,等. 多指标正交试验优选当归提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):25.

[责任编辑 仝燕]