

DOI:10.11937/bfyy.201606029

乙醇回流法提取伸筋草总黄酮 工艺及其体外抗氧化活性

杨申明, 范树国, 王振吉, 杨泽智

(楚雄师范学院 化学与生命科学学院, 云南 楚雄 675000)

摘要:以伸筋草为试材,在单因素试验的基础上,以总黄酮提取率为指标,采用正交实验 $L_9(3^4)$ 优化乙醇辅助回流提取总黄酮的最佳工艺条件,并通过总黄酮对羟基自由基和 1,1-苯基-2-苦肟基自由基的清除能力来评价其抗氧化性。结果表明:最佳提取工艺参数为乙醇体积分数 75%,液料比 60:1 mL/g,提取时间 150 min,提取温度 80℃,在此条件下,总黄酮的平均提取率为 1.82%;总黄酮质量浓度为 0.014 0 mg/mL 时,对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{DPPH}\cdot$ 的清除率可分别达 72.65%和 93.02%,说明总黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{DPPH}\cdot$ 有较好的清除能力。

关键词:伸筋草;总黄酮;提取工艺;抗氧化性

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)06-0116-05

伸筋草 (*Lycopodium herba*) 为石松科植物石松 (*Lycopodium japonicum* Thunb.) 的干燥全草^[1-2]。在全国各地均有分布,主要生长在海拔 100~1 000 m 的草丛和灌木丛中。全草具有祛风除湿、舒筋活络、消肿镇痛等功效。现代药理研究^[2-5]表明,伸筋草具有抗炎、抗菌、免疫调节、清除自由基等作用。研究表明^[6-8],伸筋草的化学成分主要含有生物碱、黄酮及三萜酸类化合物。

黄酮类化合物具有较强的抗氧化、清除自由基、抗菌及抗病毒等^[9-10]生物活性及药理作用,很可能是伸筋草清除自由基作用的有效成分之一。目前,有关伸筋草中黄酮类物质的提取工艺及抗氧化性等方面的研究尚鲜见报道。该试验以伸筋草为材料,采用乙醇回流法对提取伸筋草总黄酮的工艺进行优化。同时,以抗坏血酸为对照,并通过羟基自由基、 $\text{DPPH}\cdot$ 自由基的清除率来评价伸筋草总黄酮的抗氧化能力,旨在为伸筋草的综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料伸筋草采自云南楚雄,经鉴定为石松科植物石松 (*Lycopodium japonicum* Thunb.) 的干燥全草。样品烘干(60℃)后,用粉碎机粉碎后过 40 目,得干粉,保存备用。

供试试剂:芦丁(rutin),纯度 $\geq 98\%$;1,1-苯基-2-苦肟基自由基($\text{DPPH}\cdot$)、抗坏血酸、无水乙醇、亚硝酸钠、氢氧化钠、硝酸铝、30%过氧化氢、硫酸亚铁、水杨酸,以上各药剂均为分析纯。

供试仪器:紫外可见分光光度计(UV-2100 型,上海尤尼柯仪器有限公司);电子天平(CP214C 型,上海精密科学仪器有限公司);恒温水浴锅(HH-2 型,金坛市大地自动仪器厂);循环水式真空泵(SHZ-III A 型,巩义市予华仪器有限责任公司);电执鼓风干燥箱(202-00 型,上海市崇明实验仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 总黄酮含量测定 参考韦松基等^[11]的方法,用芦丁作标准品,采用 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaNO_2 分光光度法测定总黄酮含量。以吸光度为纵坐标,芦丁质量浓度 $C(\text{mg/mL})$ 为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $A = 11.167\ 86C - 0.003\ 18$,相关系数 $R = 0.999\ 8$ 。结果表明,芦丁质量浓度在 0.00~0.06 mg/mL 范围内线性良好,因此,可用于伸筋草总黄酮含量测定。伸筋草总黄酮提取率按下式计算: $Y(\%) = (C \times N \times V) / M \times 100$,式中: C 为总黄酮的质量浓度(mg/mL); N 为稀释倍数; V

第一作者简介:杨申明(1976-),男,云南双柏人,本科,实验师,现主要从事天然有机产物化学研究及教学工作。E-mail:ysm@cxtc.edu.cn.

责任作者:王振吉(1983-),男,辽宁绥中人,博士,副教授,现主要从事天然产物化学等研究工作。E-mail:wangzj@cxtc.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31300370);云南省重点建设学科资助项目(05YJJSXK03);楚雄师范学院重点建设学科基金资助项目(05YJJSXK03);云南省高校科技创新团队支持计划资助项目(IRTSTYN)。

收稿日期:2015-12-14

为提取液的体积(mL); M 为伸筋草干粉的质量(g)。

1.2.2 提取工艺单因素试验 在预试验的基础上,考察不同的乙醇体积分数对黄酮提取的影响。在液料比40:1 mL/g、提取温度80℃、提取时间120 min时,选择不同的乙醇体积分数45%、55%、65%、75%、85%进行提取比较;不同的液料比对黄酮提取的影响:以体积分数75%的乙醇为溶剂,在提取温度80℃、提取时间120 min时,选择不同的液料比20:1、30:1、40:1、50:1、60:1 mL/g进行提取比较;不同的提取时间对黄酮提取的影响:以体积分数75%的乙醇为溶剂,在液料比50:1 mL/g、提取温度80℃时,选择不同的提取时间30、60、90、120、150 min进行提取比较;不同的提取温度对黄酮提取的影响:以体积分数75%的乙醇为溶剂,在液料比50:1 mL/g、提取时间120 min时,选择不同的提取温度50、60、70、80、90℃进行提取比较,从而确定各因素的相互影响作用。

1.2.3 提取工艺正交实验 在单因素试验的基础上,根据伸筋草总黄酮提取率的实际情况,以乙醇体积分数、液料比、提取时间和提取温度为自变量,用 $L_9(3^4)$ 正交表设计正交实验,考察伸筋草总黄酮提取率的影响,因素水平如表1所示。

表1 正交实验因素与水平

Table 1 Factor and level of orthogonal experiment

水平 Level	A 乙醇体积分数 Volume fraction of ethanol/ %	B 液料比 Liquid-solid ratio /(mL · g ⁻¹)	C 提取时间 Extraction time /min	D 提取温度 Extraction temperature /℃
1	65	40:1	90	70
2	75	50:1	120	80
3	85	60:1	150	90

1.2.4 伸筋草总黄酮抗氧化活性的测定 伸筋草总黄酮对羟基自由基的清除作用:参考文献[12-13]的方法,稍作改动。分别配质量浓度为0.002 8、0.005 6、0.008 4、0.011 2、0.014 0 mg/mL的伸筋草总黄酮提取液,取1.0 mL于试管中,分别加9 mmol/L的水杨酸-乙醇溶液和9 mmol/L的FeSO₄溶液各2.0 mL,再加8.8 mmol/L的H₂O₂溶液2.0 mL后用蒸馏水定容至10 mL,在35℃水浴中反应35 min后,在510 nm波长处测定吸光度,以蒸馏水作空白。同时,以同浓度的抗坏血酸作阳性对照,计算·OH的清除率。 $E(\%) = [A_0 - (A_x - A_{x_0})]/A_0 \times 100$,式中: A_0 为空白对照液的吸光度; A_x 为加H₂O₂提取液的吸光度; A_{x_0} 为不加H₂O₂提取液的本底吸光度。伸筋草总黄酮对DPPH自由基的清除作用:参考文献[14-15]的方法,稍作改动。向2.5 mL 2×10^{-4} mol/L的DPPH乙醇溶液中加入1 mL质量浓度分别为0.002 8、0.005 6、0.008 4、0.011 2、0.014 0 mg/mL的伸筋草总黄酮提取液,反应25 min后,在517 nm波长处测定吸光度,记为 A_i ;同时测定1.0 mL乙醇溶液与

2.5 mL 2×10^{-4} mol/L的DPPH乙醇混合液的吸光度,记为 A_c ,及1 mL质量浓度分别为0.002 8、0.005 6、0.008 4、0.011 2、0.014 0 mg/mL的伸筋草总黄酮提取液与2.5 mL无水乙醇的吸光度,记为 A_b 。同时,以同浓度的抗坏血酸作阳性对照,计算DPPH·的清除率。 $E(\%) = [1 - (A_i - A_b)/A_c] \times 100$,式中: A_i 为DPPH与伸筋草提取液的吸光度值; A_b 为无水乙醇与伸筋草提取液的吸光度; A_c 为DPPH与无水乙醇混合液的吸光度。

1.3 数据分析

所有试验均重复3次,结果取平均值,利用Excel软件作图,对试验结果进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇体积分数对伸筋草总黄酮提取效果的影响

从图1可以看出,乙醇体积分数在45%~75%范围内,伸筋草总黄酮提取率随乙醇体积分数的增大而提高。当乙醇体积分数为75%时,提取率最高,之后随乙醇体积分数的增大,伸筋草总黄酮提取率有下降趋势。这可能是乙醇体积分数太大,伸筋草中的色素、脂溶性物质等大量溶出,影响伸筋草总黄酮的溶出,导致提取率下降。故选体积分数65%~85%的乙醇用于优化试验。

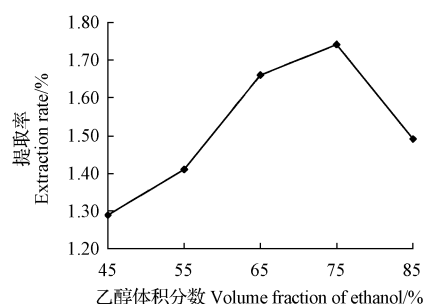


图1 乙醇体积分数对总黄酮提取效果的影响

Fig. 1 Effect of the volume fraction of ethanol on the extraction rate of total flavonoids

2.1.2 液料比对伸筋草总黄酮提取效果的影响 从图2可以看出,液料比在(20:1)~(50:1) mL/g范围内,伸筋草总黄酮提取率随液料比的增大而增大。当液料比为50:1 mL/g时,提取率最大,之后随液料比的增大,伸筋草总黄酮提取率有下降趋势。可能是液料比太小,升温速度加快,有利于伸筋草中总黄酮的溶出;液料比太大,升温速度变慢,不利于伸筋草中总黄酮的溶出,导致提取率下降。故选液料比(40:1)~(60:1) mL/g用于优化试验。

2.1.3 提取时间对伸筋草总黄酮提取效果的影响 从图3可以看出,当回流提取时间在30~120 min范围内,伸筋草总黄酮提取率随回流提取时间的延长而增大。

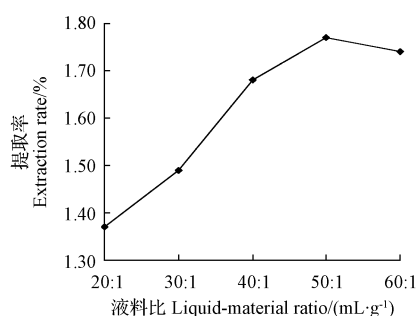


图2 液料比对总黄酮提取效果的影响

Fig. 2 Effect of liquid material ratio on the extraction rate of total flavonoids

当回流提取时间延长到 120 min 后,伸筋草总黄酮提取率有下降趋势。这可能是回流提取时间过短,伸筋草中总黄酮不能充分溶出,提取率不高;回流提取时间过长,伸筋草总黄酮在长时间的高温下受分解,导致提取率下降。故选回流提取时间 90~150 min 用于优化试验。

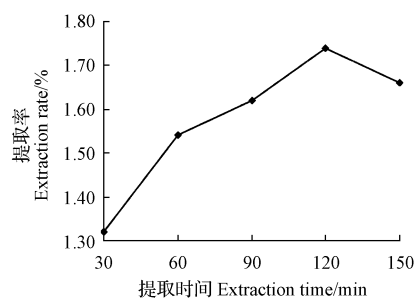


图3 提取时间对总黄酮提取效果的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on the extraction rate of total flavonoids

2.1.4 提取温度对伸筋草总黄酮提取效果的影响 从图 4 可以看出,当回流提取温度在 50~80℃ 范围内,伸筋草总黄酮提取率随回流提取温度的升高而增大,当回流提取温度升高到 80℃ 后,伸筋草总黄酮提取率有下降趋势。这可能是回流提取温度过高,使乙醇浓度降低,减少伸筋草中黄酮类物质的溶出,同时回流提取温度过

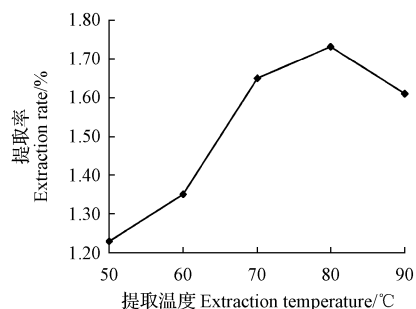


图4 提取温度对总黄酮提取效果的影响

Fig. 4 Effect of extraction temperature on the extraction rate of total flavonoids

高,也会破坏伸筋草中的黄酮结构,导致提取率下降。故选回流提取温度 70~90℃ 用于优化试验。

2.2 正交实验结果

由表 2 可知,影响伸筋草总黄酮提取率的主次顺序依次为:乙醇体积分数>提取温度>液料比>提取时间。优化后的最佳提取工艺参数为:乙醇体积分数 75%,液料比为 60:1 mL/g,提取时间 150 min,提取温度 80℃。在此条件,测得伸筋草总黄酮平均提取率 1.82%,高于正交实验中伸筋草总黄酮提取率的最高(1.73%)结果,并且重现性良好,RSD 为 1.93%。优选出的工艺提取率高,操作简单,可用于伸筋草中总黄酮的提取。

表2 正交实验结果

试验序号 Test No.	水平 Level A B C D				提取率 Extraction rate/%
1	1	1	1	1	1.35
2	1	2	2	2	1.42
3	1	3	3	3	1.51
4	2	1	2	3	1.41
5	2	2	3	1	1.53
6	2	3	1	2	1.73
7	3	1	3	2	1.48
8	3	2	1	3	1.26
9	3	3	2	1	1.38
K ₁	1.43	1.41	1.45	1.42	最佳组合为:A ₂ B ₃ C ₃ D ₂
K ₂	1.56	1.40	1.40	1.54	
K ₃	1.37	1.54	1.51	1.39	
极差 R	0.19	0.14	0.11	0.15	

2.3 伸筋草总黄酮抗氧化性分析

2.3.1 清除羟基自由基能力评价 羟基自由基是活性氧中对生物体危害最大、毒性最强的一种自由基,能与细胞中的分子发生反应对机体造成损伤^[16],清除羟基自由基的能力是评价抗氧化物的重要指标^[17]。从图 5 可以看出,伸筋草总黄酮在质量浓度为 0.002 8~0.014 0 mg/mL 范围内,对羟基自由基有清除作用,其清除率最大为 72.65%。与同质量浓度的抗坏血酸相比,伸筋草总黄酮对羟基自由基的清除效果稍弱于抗坏血酸,但伸筋草总黄酮依然表现出很强的清除羟基自由基的能力。

2.3.2 清除 DPPH 自由基能力评价 DPPH· 是一种稳定自由基,当样品中含有抗氧化物时,抗氧化物能提供一个电子与 DPPH· 配对,使 DPPH 的特征紫色消失,根据 DPPH 的褪色程度可间接评价抗氧化剂的抗氧化性^[18]。从图 6 可看出,伸筋草总黄酮在质量浓度为 0.002 8~0.014 0 mg/mL 范围内,清除 DPPH 自由基的能力逐步增强,其清除率最大为 93.02%。与同质量浓度的抗坏血酸相比,伸筋草总黄酮清除 DPPH 自由基的效果强于抗坏血酸,这表明伸筋草总黄酮具有较强的清除 DPPH 自由基的能力。

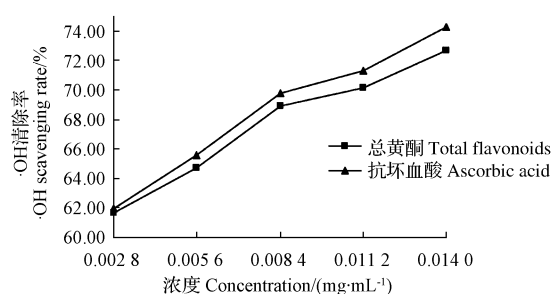


图5 不同浓度的伸筋草总黄酮与抗坏血酸对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除效果

Fig. 5 Scavenging ability of different concentration total flavonoids in *Lycopodium herba* and ascorbic acid on hydroxyl free radical

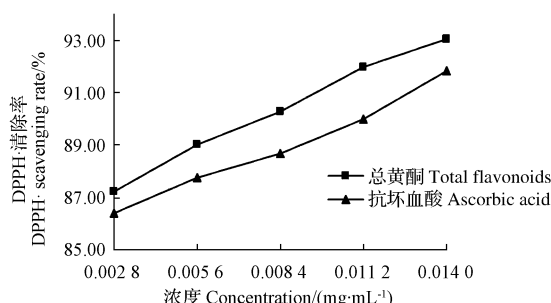


图6 不同浓度的伸筋草总黄酮与抗坏血酸对DPPH自由基的清除效果

Fig. 6 Scavenging ability of different concentration total flavonoids in *Lycopodium herba* and ascorbic acid on DPPH free radical

3 结论与讨论

试验采用乙醇回流法提取伸筋草总黄酮,经过优化后得到的最佳提取工艺参数:乙醇体积分数为75%,液料比为60:1 mL/g,回流提取时间为150 min,回流提取温度为80℃,在此工艺条件下进行回流提取,得到伸筋草总黄酮的平均提取率为1.82%,大于正交实验中最高提取物的提取率(1.73%),此提取工艺重现性良好,提取率高,优选出工艺操作简单可靠,可用于伸筋草总黄酮的提取。

该研究采用比色法从清除羟基自由基、DPPH自由基2个方面测定了伸筋草总黄酮的抗氧化性。体外抗氧化性试验结果表明,伸筋草总黄酮类化合物对 $\cdot\text{OH}$ 和DPPH \cdot 均有较强的清除作用,在伸筋草总黄酮质量

浓度为0.0028~0.0140 mg/mL范围内,随着总黄酮质量浓度的增大,对 $\cdot\text{OH}$ 和DPPH \cdot 的清除率增大,即抗氧化能力增强。

该研究结果表明,伸筋草总黄酮具有较强的抗氧化活性,是一种具有较大开发价值的药用植物,相关研究结果对伸筋草总黄酮的提取及抗氧化活性成分的开发具有重要意义。然而,伸筋草中黄酮类化合物的抗氧化活性成分及抗氧化作用机理还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 云南省药物研究所编著. 云南天然药物图鉴[M]. 第1卷. 昆明:云南科技出版社,2007:201.
- [2] 滕翠翠,何永志,王颖,等. 伸筋草化学成分及药理作用研究进展[J]. 医学综述,2008,14(20):47-57.
- [3] 叶盛英,杨本明,杜欣,等. 中药伸筋草研究概况[J]. 药实践杂志,2009,27(1):18-19.
- [4] 邹桂欣,尤献民,吴怡. DPPH法评价伸筋草不同提取物清除自由基的能力[J]. 药物评价研究,2012,35(5):359-361.
- [5] 史利利,何永志. 伸筋草石松三萜化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):90-92.
- [6] 李墨妍,刘杰,张玉波,等. 伸筋草的化学成分研究[J]. 中草药,2015,46(1):33-37.
- [7] 蔡卓亚,周自桂,李萍,等. 伸筋草化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药,2015,46(2):297-304.
- [8] 邹桂欣,尤献民,侯政. 不同产地伸筋草紫外可见光谱鉴别[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(12):14-15.
- [9] 陈业高. 植物化学成分[M]. 北京:化学工业出版社,2004:229.
- [10] 徐向容,王文华,李华斌. 荧光法测定 Fenton 反应产生的羟自由基[J]. 分析化学,1998,26(12):1460-1463.
- [11] 韦松基,蒙万香,戴忠华. 壮药饭汤子中总黄酮的含量测定[J]. 时珍国医国药,2010,21(6):1356-1358.
- [12] 刘玉芬,夏海涛. 响应面法优化碱黄芩提取工艺及其体外抗氧化作用[J]. 食品科学,2012,33(12):63-68.
- [13] 鲁晓翔,唐津忠. 紫背天葵中总黄酮的提取及其抗氧化性研究[J]. 食品科学,2007,28(4):145-147.
- [14] 王敏,魏益民,高锦明. 苦养黄芩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(3):278-283.
- [15] SHE G M, XU C, LIU B, et al. Polyphenolic acids from mint (the aerial of *Mentha haplocalyx* Briq.) with DPPH radical scavenging activity[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(4):359-362.
- [16] 谢云涛,马国平,何玉凤,等. BPR 硫脲催化光度法对羟基自由基的检测及清除作用[J]. 化学通报,2006(6):458-461.
- [17] 殷军,葛青,毛建卫,等. 竹叶多糖的组成及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技,2013,34(2):100-103.
- [18] 张汇,鄢嫫,聂少平,等. 黑灵芝不同部位多糖成分分析及抗氧化活性[J]. 食品科学,2011,32(1):56-61.

Ethanol Reflux Method Extraction and Antioxidant Activities of Total Flavonoids From *Lycopodium herba*

YANG Shenming, FAN Shuguo, WANG Zhenji, YANG Zezhi

(Department of Chemistry and Life Science, Chuxiong Normal University, Chuxiong, Yunnan 675000)

大孔吸附树脂纯化黄花柳花总黄酮工艺研究

方 贺, 宋 旺 弟, 陈 文

(石河子大学 药学院, 新疆 石河子 832000)

摘 要:以黄花柳花为试材,采用紫外分光光度法,选择5种不同型号的树脂进行静态吸附试验,筛选出对其吸附解吸性能高的树脂,再通过动态吸附与解吸试验研究上样浓度、树脂上样量、洗脱剂及流速等条件对黄花柳花总黄酮纯化效果的影响,优化维药黄花柳花总黄酮的大孔树脂纯化工艺。结果表明:AB-8型大孔吸附树脂对黄花柳花总黄酮具有较好的吸附解吸效果,最佳纯化条件为黄花柳花待纯化液浓度为3.13 g/L,调节上样液pH 4.2,上样量5.5 mL/g,以1.0 mL/min流速上样,依次用10 BV蒸馏水淋洗,6 BV 70%乙醇以2.0 mL/min流速洗脱,得纯化液。经AB-8纯化后的黄花柳花总黄酮纯度达51.99%。AB-8型大孔吸附树脂能有效提高黄花柳花中总黄酮纯度,并符合中药有效部位研究要求。

关键词:黄花柳花;大孔树脂;总黄酮;纯化工艺

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)06-0120-05

黄花柳(*Salix caprea* L.)属杨柳科(Salicaceae)柳属(*Salix*. L)植物,又名羊柳,生于新疆阿尔泰地区的河谷或林缘,外蒙古、西伯利亚及欧洲各地均有分布^[1],其生长速度快,可防沙固土,是经济实用的维吾尔药材之一。其维吾尔药名为比地木西克,民间多以嫩枝、叶、根、茎皮和花入药,且常与玫瑰花、牛舌草、香青兰等维药组方治疗心血管疾病^[2]。其性湿寒、味辛,维吾尔医学认为

其具有补脑补心、爽心止痛、生湿止渴、清热解肿、滋补眼睛、降逆止吐等功效^[3]。

药理研究表明黄花柳花具有抗炎,抗癌,抗氧化以及抑制肿瘤等生物活性^[4-6],但其有效成分尚不明确。黄花柳花化学成分主要为黄酮、黄酮苷类化合物^[7]。目前国内对黄花柳花的总黄酮进行了提取与含量测定等研究^[8-9],故对其总黄酮的富集将为后续有效成分的研究奠定基础。AB-8大孔吸附树脂为聚苯乙烯型弱极性聚合物吸附剂,目前已广泛应用在黄酮类化合物的分离提纯中,具有较好的分离纯化效果^[10]。该试验选用AB-8、D101、HZ841、HPD600以及聚酰胺树脂用于黄花柳花总黄酮的富集,考察了AB-8大孔吸附树脂分离纯化黄花柳花黄酮的工艺参数,确定了最佳的吸附、解吸条件,以期黄花柳花总黄酮的分离纯化提供相关方法与技术参数。

第一作者简介:方贺(1990-),女,硕士研究生,研究方向为药物新剂型研究。E-mail:358831940@qq.com.

责任作者:陈文(1967-),男,博士,教授,研究方向为药物新剂型研究。E-mail:chen-wen2000@126.com.

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2011ZX09401-007)。

收稿日期:2015-12-16

Abstract: The optimal ethanol reflux extraction conditions of total flavonoids from *Lycopodium herba* were studied. In order to increase the extraction yield of total flavonoids, the ethanol reflux extraction conditions of total flavonoids from *Lycopodium herba* was optimized by orthogonal test $L_9(3^4)$ based on the single-factor tests. Meanwhile, the antioxidant activity of total flavonoids from *Lycopodium herba* was evaluated by means of the scavenging capacity of the hydroxyl free radical and the DPPH free radical. The results showed that the optimum extraction parameters were 75% of the volume fraction of ethanol, 60:1 mL/g of liquid material ratio, 150 minutes of extraction time, 80°C of extraction temperature, and under these conditions, the average extraction rate of total flavonoids was 1.82%. When the concentration of total flavonoids was 0.014 0 mg/mL, the scavenging rates of total flavonoids on $\cdot\text{OH}$ and DPPH \cdot were 72.65% and 93.02%, respectively, which implied that the total flavonoids had good ability to scavenge $\cdot\text{OH}$ and DPPH \cdot .

Keywords: *Lycopodium herba*; total flavonoids; extraction process; antioxidant properties