

王枣子叶总黄酮纤维素酶-超声辅助提取工艺的优化及其抗氧化活性

曹稳根, 李梅梅, 王 晴, 段 红, 翟科峰
(宿州学院生物与食品工程学院, 安徽 宿州 234000)

摘要: **目的** 优化王枣子叶总黄酮纤维素酶-超声辅助提取工艺, 并评价其抗氧化活性。**方法** 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、料液比、超声功率、超声时间为影响因素, 总黄酮得率为评价指标, 响应面法优化提取工艺。考察总黄酮对 DPPH·、·OH 的清除作用。**结果** 最佳条件为乙醇体积分数 64%, 料液比 1:39, 超声功率 130 W, 超声时间 16 min, 总黄酮得率为 13.92%。总黄酮对 DPPH· 的清除作用与其质量浓度呈正相关, 在 0.25 mg/mL 时清除率达 93.55%, 而在 0.09 mg/mL 时对·OH 的清除率达 88%。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于纤维素酶-超声辅助提取具有较强抗氧化活性的王枣子叶总黄酮。

关键词: 王枣子叶; 总黄酮; 纤维素酶-超声辅助提取; 抗氧化活性; 响应面法; DPPH·; ·OH

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)11-2840-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.003

Cellulase-ultrasonic assisted extraction process optimization and anti-oxidant activity of total flavonoids from *Isodon amethystoides* leaves

CAO Wen-gen, LI Mei-mei, WANG Qing, DUAN Hong, ZHAI Ke-feng
(College of Biology and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou 234000, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the cellulase-ultrasonic assisted extraction process for total flavonoids from *Isodon amethystoides* (Benth) Cy Wu et Hsuan leaves and to evaluate their anti-oxidant activity. **METHODS** With ethanol concentration, solid-liquid ratio, ultrasonic power and ultrasonic time as influencing factors, total flavonoids yield as an evaluation index, the extraction process was optimized by response surface method on the basis of single factor test. The scavenging effects of total flavonoids on DPPH· and ·OH were investigated. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 64% for ethanol concentration, 1:39 for solid-liquid ratio, 130 W for ultrasonic power, and 16 min for ultrasonic time, the total flavonoids yield was 13.92%. The scavenging effect of total flavonoids on DPPH· demonstrated a significant positive correlation with their concentration, and the scavenging rate reached 93.55% at 0.25 mg/mL, whose scavenging rate on ·OH reached 88% at 0.09 mg/mL. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the cellulase-ultrasonic assisted extraction of total flavonoids with strong anti-oxidant activity from *I. amethystoides* leaves.

KEY WORDS: *Isodon amethystoides* (Benth) Cy Wu et Hsuan leaves; total flavonoids; cellulase-ultrasonic assisted extraction; anti-oxidant activity; response surface method; DPPH·; ·OH

王枣子 *Isodon amethystoides* (Benth) Cy Wu et Hsuan 为唇形科香茶菜属多年生草本植物, 是该属少有的药食两用植物, 主要分布于安徽省宿州市埇桥区夹沟镇等山区, 是宿州当地有名的传统草药, 民间常用于治疗疮疖、恶疮、肿瘤、肺结核、肺脓疡、老慢支等多种疾病, 具有抗氧化、抗炎、抗肿

瘤、抗血栓、抗癌等药理作用^[1-6]。大量研究表明,黄酮具有抗氧化、抗衰老、抗疲劳、抗类风湿关节炎、抗菌、抗病毒、抗癌、防治糖尿病肾病等多种药理活性^[7-21],越来越受到广泛关注,虽然王枣子茎叶中也含有丰富的该类成分^[3,6],但尚无关于其提取工艺的报道。

因此,本实验采用纤维素酶-超声辅助提取王枣子叶总黄酮,不仅能缩短提取时间,还可大大提高总黄酮提取率,同时优化该工艺,评价该成分抗氧化活性,以期为该药材开发利用提供依据。

1 材料

HK-04A 200 g 型手提式粉碎机(广州市旭朗机械设备有限公司);U-3310 型紫外分光光度计(日本 Hitachi 公司);XO-250 型超声波细胞粉碎仪(南京先欧仪器制造有限公司);RE-52 型旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂);PH 酸度计(德国赛多利斯公司)。芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100080-201408);纤维素酶(上海源叶生物科技有限公司,活性 50 U/mg);1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH,批号 W3008E46572,美国 Sigma 公司);其他试剂均为分析纯。王枣子叶购自宿州绿源中医药科技有限公司,经安徽中医药大学药学院周建理教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 药材预处理 将新鲜王枣子叶置于 55℃烘箱中干燥 2 h,控制其含水量在 5% 以内,粉碎后过 80 目筛,装入干燥磨口瓶中备用。

2.2 总黄酮提取液制备 精密称取 0.5 g “2.1”项下预处理药材,加入 50 倍量 2% 纤维素酶溶液,50℃下酶解 6 h 后在 75℃热水中灭酶 10 min^[25],冷却浓缩至粘稠状,按一定乙醇体积分数、料液比、超声功率、超声时间进行处理,滤液定容至 100 mL 量瓶中,即得。

2.3 总黄酮含量测定

2.3.1 线性关系考察 精密称取干燥至恒定质量的芦丁对照品 0.013 7 g,80%乙醇完全溶解后定容于 25 mL 量瓶中,得到 0.548 mg/mL 对照品溶液,精密吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 至 25 mL 比色管中,80%乙醇定容至 10 mL,加入 0.7 mL 5% 亚硝酸钠溶液反应 6 min,加入 0.7 mL 10% 硝酸铝溶液摇匀后静止 6 min,再加入 5 mL 10% 氢氧化钠溶液混合均匀,80%乙醇定容至 25 mL,静置 15 min,于 510 nm 波长处测定吸光度,平行 3 次,取平均值。以溶液质量浓度为横坐

标(X),吸光度为纵坐标(A)进行回归,得方程为 $A = 11.134 0X + 0.005 2$ ($r = 0.999 8$),在 0~0.12 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.3.2 得率测定 精密吸取“2.2”项下提取液 1 mL,按“2.3.1”项下方法测定吸光度,平行 3 次,取平均值,计算总黄酮得率,公式为得率=(总黄酮质量浓度×提取液体积/预处理药材质量)×100%,预处理药材取自“2.1”项下。

2.3.3 精密度试验 精密吸取对照品溶液 1 mL,按“2.3.1”项下方法测定 6 次吸光度,测得其 RSD 为 0.84%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 精密称取同一批“2.1”项下预处理药材 6 份,每份 0.5 g,按“2.2”项下方法制备提取液,各精密吸取 1 mL,按“2.3.1”项下方法测定吸光度,测得其 RSD 为 1.12%,表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 精密称取同一批“2.1”项下预处理药材 6 份,每份 0.5 g,按“2.2”项下方法制备提取液,各精密吸取 1 mL,按“2.3.1”项下方法每隔 15 min 测定吸光度 1 次,持续 120 min,测得其 RSD 为 1.21%,表明溶液在 120 min 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取同一批“2.1”项下预处理药材 6 份,每份 0.50 g,按“2.2”项下方法制备提取液,各精密吸取 1 mL,置于 25 mL 比色管中,精密加入对照品溶液 1 mL,按“2.3.1”项下方法测定吸光度,测得总黄酮平均加样回收率为 98.90%,RSD 为 1.19%。

2.4 单因素试验 图 1A 显示,随着乙醇体积分数增加,总黄酮得率先升后降,在 60% 时达到最大值 13.96%;图 1B 显示,随着“2.1”项下预处理药材料液比的增加,总黄酮得率先升后降,在 1:40 时达到最大值 15.07%;图 1C 显示,随着超声功率增加,总黄酮得率先升后降,在 125 W 时达到最大值 13.63%;图 1D 显示,随着提取时间延长,总黄酮得率先升后降,在 16 min 时达到最大值为 13.94%。因此,确定最佳单因素为乙醇体积分数 60%,料液比 1:40,超声功率 125 W,提取时间 16 min。

2.5 响应面法 在单因素试验基础上,选择乙醇体积分数(A)、料液比(B)、超声功率(C)、超声时间(D)作为影响因素,总黄酮得率(Y)作为评价指标,采用 4 因素 3 水平响应面法优化提取工艺,因素水平见表 1,结果见表 2。

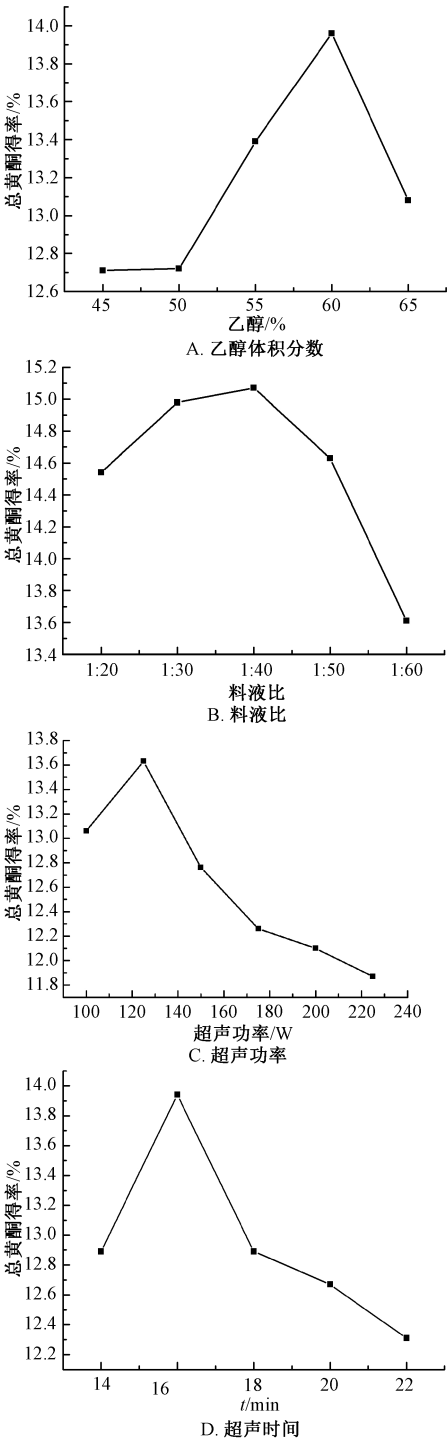


图 1 各因素对总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effects of various factors on total flavonoids yield

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 乙醇/%	B 料液比	C 超声功率/W	D 超声时间/min
-1	55	1：30	100	14
0	60	1：40	125	16
1	65	1：50	150	18

表 2 试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	A	B	C	D	Y 总黄酮得率/%
1	0	-1	1	0	13.90
2	0	0	0	0	14.13
3	1	-1	0	0	13.40
4	0	0	0	0	14.37
5	0	-1	-1	0	13.30
6	0	1	0	1	13.53
7	0	1	-1	0	13.70
8	-1	0	-1	0	13.46
9	0	0	-1	1	12.89
10	0	0	0	0	14.24
11	0	-1	0	-1	13.65
12	0	1	0	-1	13.60
13	0	0	1	1	13.75
14	-1	0	0	-1	13.57
15	0	0	0	0	14.34
16	1	0	0	-1	13.66
17	1	1	0	0	13.25
18	0	0	0	0	14.11
19	-1	1	0	0	12.71
20	-1	0	1	0	12.96
21	0	0	-1	-1	13.25
22	-1	-1	0	0	13.22
23	-1	0	0	1	13.45
24	0	1	1	0	13.44
25	0	-1	0	1	13.58
26	1	0	0	1	13.13
27	1	0	-1	0	12.49
28	0	0	1	-1	13.26
29	1	0	1	0	13.49

通过 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 数据进行拟合，得到二次多元回归方程为 $Y = 14.24 + 0.0025A - 0.068B + 0.14C - 0.055D + 0.090AB + 0.37AC - 0.10AD - 0.21BC + 0.21CD - 0.63A^2 - 0.32B^2 - 0.49C^2 - 0.31D^2$ ，方差分析见表 3。

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	5.06	14	0.36	6.40	0.000 7
A	7.500×10^{-5}	1	7.500×10^{-5}	1.328×10^{-3}	0.971 4
B	0.056	1	0.056	0.99	0.336 1
C	0.25	1	0.25	4.42	0.054 2
D	0.036	1	0.036	0.64	0.436 1
AB	0.032	1	0.032	0.57	0.461 4
AC	0.55	1	0.55	9.70	0.007 6
AD	0.042	1	0.042	0.74	0.402 9
BC	0.18	1	0.18	3.27	0.091 9
BD	-8.882×10^{-16}	1	-8.882×10^{-16}	-1.573×10^{-14}	1.000 0
CD	0.18	1	0.18	3.20	0.095 4
A ²	2.56	1	2.56	45.38	<0.000 1
B ²	0.66	1	0.66	11.75	0.004 1
C ²	1.56	1	1.56	27.70	0.000 1
D ²	0.64	1	0.64	11.38	0.004 5
残差	0.79	14	0.056	—	—
失拟项	0.73	10	0.073	5.26	0.061 9
纯误差	0.056	4	0.014	—	—
总和	5.58	28	—	—	—
R ²	0.864 8	—	—	—	—
变异系数/%	1.76	—	—	—	—
信噪比	9.544	—	—	—	—

由此可知,模型 $P<0.01$,表明模型极显著;失拟项 $P>0.05$,表明模型拟合程度良好;变异系数为 1.76%,表明模型精确度良好;信噪比 >4 ,表明模型可用于分析和预测;因素 AC 、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 具有显著影响($P<0.01$);各因素影响程度依次为超声功率(C) $>$ 料液比(B) $>$ 超声时间(D) $>$ 乙醇体积分数(A)。

响应面分析见图 2~3。由此可知,超声功率与

乙醇体积分数交互作用最强,曲线陡峭,等高线呈椭圆形,对提取工艺有显著影响;超声功率与料液比、超声功率与超声时间交互作用次之,曲线较陡峭,等高线呈椭圆形,对提取工艺有一定影响;乙醇体积分数与料液比、乙醇体积分数与超声时间交互作用较小,曲线平缓,等高线呈近圆形,对提取工艺无明显影响。

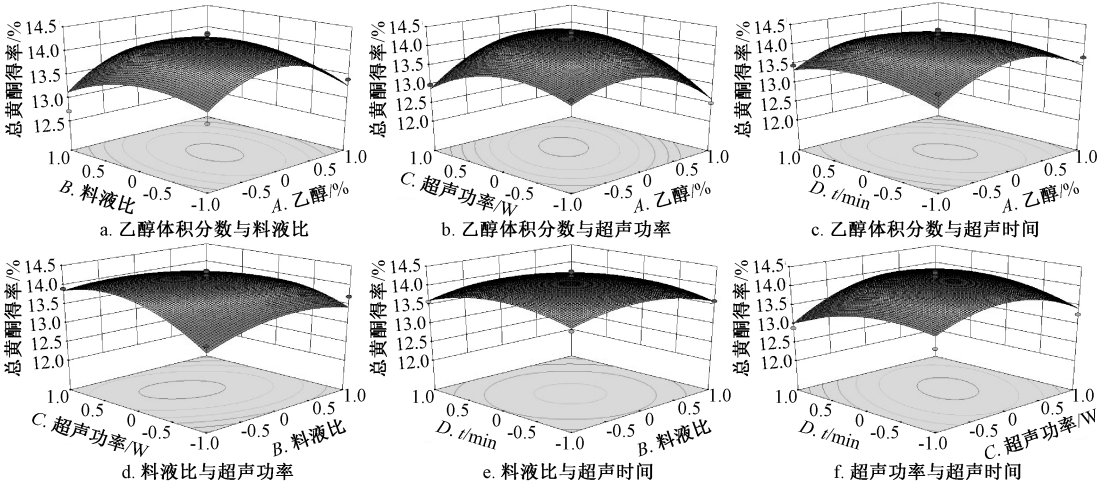


图 2 各因素响应面图(三维曲面图)

Fig. 2 Response surface plots for various factors (three-dimensional surface plots)

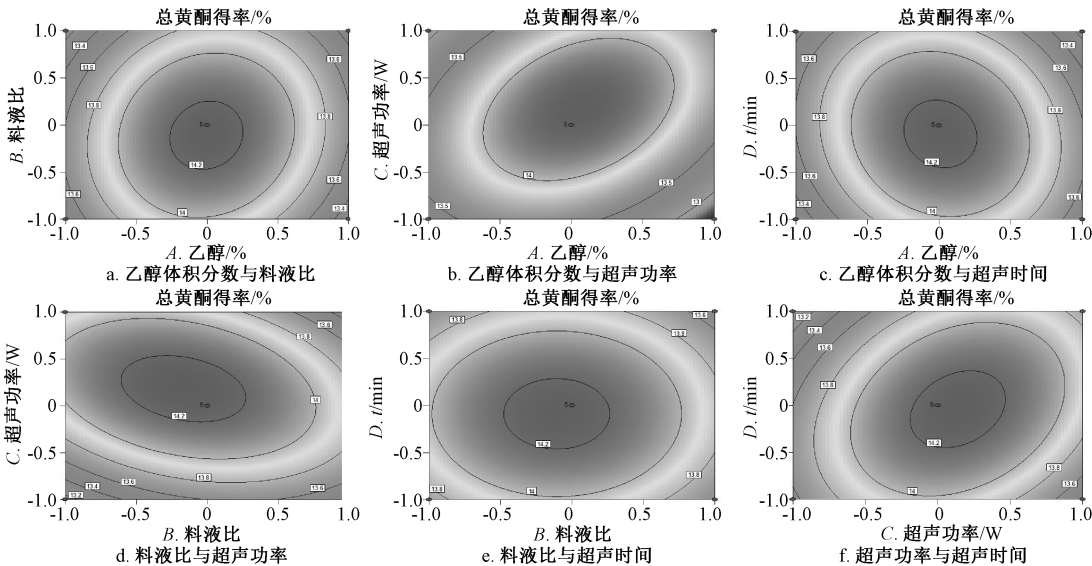


图 3 各因素响应面图(等高线图)

Fig. 3 Response surface plots for various factors (contour plots)

通过 Design-Expert 软件,得到最优工艺为乙醇体积分数 64%,料液比 1 : 39,超声时间 16 min,超声功率 130 W,总黄酮得率为 13.96%。再按上述优化工艺进行 3 批验证试验,测得总黄酮得率为 13.92%,与预测值 13.96% 接近,表明该

工艺稳定可靠。

2.6 抗氧化活性研究

2.6.1 对 DPPH· 的清除作用 按文献[22] 报道的方法,取 5 支具塞试管,加入 0.1 mmol/L DPPH 溶液各 3 mL,再加入“2.2”项下提取液各 3 mL,

摇匀后静置 30 min, 以无水乙醇调零, 在 517 nm 波长处测定吸光度 A_i ; 取无水乙醇、提取液各 3 mL, 混合后在 517 nm 波长处测定吸光度 A_j ; 取无水乙醇、DPPH 溶液各 3 mL, 混合后在 517 nm 波长处测定吸光度 A_0 , 平行 3 次, 计算清除率, 公式为清除率 = $[1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$ 。

体系中的抗氧化物质通过提供电子与 DPPH· 的配对作用来使其褪色, 依据其程度可以衡量清除活性强弱^[22]。图 4 显示, 对 DPPH· 的清除作用与总黄酮质量浓度呈正相关, 在 0.25 mg/mL 时清除率达 93.55%。

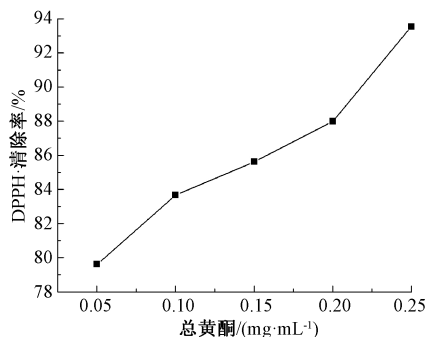


图 4 总黄酮对 DPPH· 的清除作用

Fig. 4 Scavenging effect of total flavonoids on DPPH·

2.6.2 对·OH 的清除作用 按文献[23]报道的方法, 取 5 支具塞试管, 加入“2.2”项下提取液各 2 mL, 再依次加入 6 mmol/L FeSO₄ 溶液 0.5 mL、1.5 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 2 mL、0.1% H₂O₂ 溶液 0.5 mL, 在 37 ℃ 下反应 15 min, 在 510 nm 波长处测定吸光度 A_x ; 以蒸馏水代替 H₂O₂ 溶液, 同法测定吸光度 A_{x0} ; 以蒸馏水代替提取液, 同法测定吸光度为 A_0 , 平行 3 次, 计算清除率, 公式为清除率 = $[1 - (A_x - A_{x0}) / A_0] \times 100\%$ 。

过氧化氢广泛存在于生物体和食物中, 根据 Fenton 反应原理, 当遇到还原性金属离子 (Fe²⁺) 时会释放出氧化能力很强的羟自由基 (·OH), 水杨酸可与其反应生成有色物质, 而当反应体系中含有能清除·OH 的成分时, 就会与水杨酸产生竞争作用, 使有色产物生成量减少^[22-23]。图 5 显示, 随着总黄酮质量浓度升高, 对·OH 的清除作用不断增强, 在 0.07~0.09 mg/mL 范围内更明显, 其中在 0.09 mg/mL 时清除率达 88%。

3 讨论

响应面法以多元二次回归方程为函数估算工具, 通过对回归方程进行分析来优化工艺参数, 具

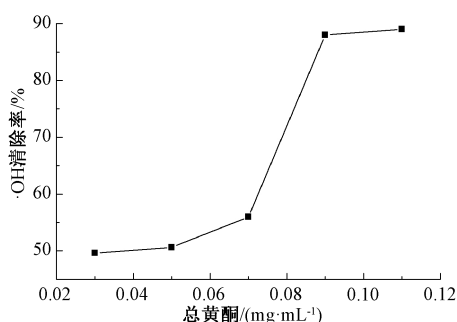


图 5 总黄酮对·OH 的清除作用

Fig. 5 Scavenging effect of total flavonoids on ·OH

有操作简便、预测准确的特点^[24]。纤维素酶可破坏药用植物细胞壁, 改善细胞壁通透性, 促进黄酮内容物溶出, 具有作用条件温和、耗时长等特点。超声提取利用其空化效应和搅拌作用来破坏植物细胞壁, 具有时间短、节省溶剂等特点^[25-26]。

本实验采用纤维素酶-超声辅助提取王枣子叶总黄酮, 得到最优工艺为乙醇体积分数 64%, 料液比 1 : 39, 超声功率 130 W, 超声时间 16 min, 总黄酮得率为 13.92%。抗氧化活性实验结果显示, 王枣子叶总黄酮对 DPPH· 的清除作用与其质量浓度呈正相关, 在 0.25 mg/mL 时清除率达 93.55%, 而在 0.09 mg/mL 时对·OH 的清除率达 88%。由此可知, 该方法稳定可靠, 所提取的王枣子叶总黄酮不仅含有量高, 而且抗氧化活性也较强, 应用前景广阔。

参考文献:

- [1] 周艳萍, 翟科峰, 段红, 等. 宿州特色植物王枣子的研究进展[J]. 凯里学院学报, 2018, 36(6): 47-51.
- [2] 滕井通, 周明, 薛建平, 等. 王枣子提取物抗氧化活性的研究[J]. 河南农业大学学报, 2018, 52(6): 998-1002.
- [3] 缪成贵, 时维静, 魏伟, 等. 王枣子总黄酮影响佐剂性关节炎大鼠病理的分子机制研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(17): 3411-3416.
- [4] 张亚楠, 姜丽丽, 薛宏宇. 中草药王枣子萜类成分及其药理作用研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(9): 1998-2001.
- [5] 翟科峰, 段红, 曹稳根, 等. HPLC 法测定王枣子中齐墩果酸的含量[J]. 宿州学院学报, 2015, 30(6): 93-95.
- [6] 缪成贵, 熊友谊, 秦梅颂, 等. 王枣子总黄酮对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用及机制研究[J]. 四川大学学报 (医学版), 2018, 49(3): 374-379.
- [7] 王慧芳, 赵飞燕, 刘勇军, 等. 文冠果叶总黄酮微波辅助酶提取工艺的优化及其抗氧化、抑菌活性[J]. 中成药, 2020, 42(2): 290-296.
- [8] 党艺航, 吕家乐, 任艳, 等. 苦竹枝总黄酮提取工艺的

优化及其体外抗炎活性[J]. 中成药, 2018, 40(2): 331-335.

[9] 杜银香, 张建伟, 胡泽华, 等. 华中枸骨叶总黄酮超声提取工艺的优化及其抑菌作用[J]. 中成药, 2019, 41(9): 2200-2203.

[10] 朱 丽, 黄 松, 林 吉, 等. 蒲葵子总黄酮提取工艺的优化及其体外抗肿瘤活性[J]. 中成药, 2018, 40(9): 1959-1964.

[11] Shah M, Parveen Z, Khan M R. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the stem bark of *Sapindus mukorossi* [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17: 526.

[12] Lee C H, Park J H, Cho J H, *et al.* Effect of *Oenanthe javanica* extract on antioxidant enzyme in the rat liver[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128(12): 1649-1654.

[13] Hwang S J, Park S J, Kim J D. Component analysis and antioxidant activity of *Oenanthe javanica* extracts[J]. *Korean J Food Sci Technol*, 2013, 45(2): 227-234.

[14] 刘威良, 黄艾祥. 黄酮类化合物抗疲劳作用研究进展[J]. 热带农业科学, 2019, 39(2): 81-90.

[15] 燕晓婷, 陈华国, 周 欣. 黄酮类化合物抗类风湿关节炎作用及机制研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(6): 1101-1108.

[16] 陈 迪, 方莲花, 杜冠华. 黄酮类化合物抗肺动脉高压的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(3): 297-300.

[17] 程艳刚, 李国艳, 谭金燕, 等. 黄酮类化合物抗心肌缺血作用机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(6): 82-85.

[18] 柯春林, 任茂生, 王 娣, 等. 黄酮化合物抗菌机理的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(2): 388-391.

[19] 魏良柱, 李筱玲. 黄酮类化合物药理活性研究进展[J]. 陕西农业科学, 2014, 60(12): 52-56.

[20] 杨 楠, 贾晓斌, 张振海, 等. 黄酮类化合物抗肿瘤活性及机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(3): 373-381.

[21] 翁竞玉, 陈 俊, 刘坤玲, 等. 天然黄酮类化合物防治糖尿病肾病的研究进展[J]. 药学研究, 2018, 37(10): 593-596.

[22] 曹稳根, 段 红, 翟科峰, 等. 野生豆腐柴叶总黄酮抗氧化活性研究[J]. 滁州学院学报, 2016, 18(5): 40-43.

[23] 任顺成, 陈雅妮. 玉米须黄酮分级萃取及其抗氧化活性研究[J]. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2014, 35(2): 16-20.

[24] 袁茹楠, 胡浩斌, 韩舜禹, 等. 响应面法优化超声-微波提取甘草渣总黄酮工艺[J]. 中成药, 2017, 39(3): 504-508.

[25] 田佳琦, 徐艳阳, 宋勃欣, 等. 纤维素酶-超声辅助提取玉米须槲皮素工艺优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(4): 1667-1673.

[26] 何兰香, 丁 科, 谢明华, 等. 酶法-超声提取黄精总黄酮及其抗氧化活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(9): 1075-1080.

阿胶脆性的客观表征

孙阳恩^{1,2}, 李 丽², 金玉翠², 于学龙², 张雅丽², 王春艳², 刘海滨², 张 淹^{2*}
(1. 山东中医药大学, 山东省中医经典名方协同创新中心, 山东 济南 250355; 2. 东阿阿胶股份有限公司, 国家胶类中药工程技术研究中心, 山东 聊城 252201)

摘要: **目的** 对阿胶脆性进行客观表征。**方法** 采用物性测试仪考察压缩模式、穿刺模式、三点弯曲模式, 并优化相关参数, 以筛选阿胶脆性的测试模式和参数。**结果** 阿胶最佳脆性检测模式为三点弯曲, 最佳条件为测前速率 1 mm/s, 测后速率 10 mm/s, 测试速率 0.5 mm/s, 支点间距 5 cm, 最佳表征参数为脆裂应力。**结论** 该方法可实现阿胶脆性的精确量化表征评价, 能为该药材品质评价分级及生产工艺优化提供参考。

关键词: 阿胶; 脆性; 物性测试仪

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)11-2845-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.004

收稿日期: 2019-09-04
基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC170246); 山东省重大科技创新工程项目 (2019JZZY020907); 泰山产业领军人才工程专项经费资助项目 (TSCY 20180234); 山东省中医经典名方协同创新中心资助项目 (2018KFY03)
作者简介: 孙阳恩 (1986—), 男, 硕士, 工程师, 从事中药研发工作。Tel: (0635) 3261967, E-mail: sunyangen@126.com
*** 通信作者:** 张 淹 (1976—), 男, 硕士, 副主任中药师, 从事中药研发工作。Tel: (0635) 3261967, E-mail: DCP_DEEJ@163.com