

大叶补血草根茎总黄酮的提取和抗氧化活性研究

陈梅, 葛鹏, 何春霞* (新疆应用职业技术学院石油与化学工程系, 新疆奎屯 833200)

摘要 [目的]研究大叶补血草根茎总黄酮提取物的抗氧化活性。[方法]采用超声提取考察不同产地不同溶剂提取的大叶补血草总黄酮含量;采用Fenton反应体系、改良的邻苯三酚自氧化体系和硫代巴比妥酸(TBA)法分别测定大叶补血草总黄酮对羟自由基、超氧阴离子自由基和脂质过氧化的抑制作用。[结果]醇提总黄酮的产率高于水提取,产于阿勒泰的大叶补血草总黄酮含量略高;抗氧化试验结果显示,大叶补血草总黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 的产生和脂质过氧化均具有抑制作用,产于阿勒泰地区的大叶补血草中总黄酮的抗氧化活性略高于伊犁地区的,而醇提取液的抗氧化活性明显大于水提取的活性,当浓度达到0.83 mg/mL时,醇提取液对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除率达98.9%。[结论]大叶补血草根茎总黄酮含量可观,作为抗氧化剂具有很好的开发应用价值和前景。

关键词 大叶补血草;根茎;总黄酮;提取;抗氧化活性

中图分类号 R282.71 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)19-0190-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.19.055



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Extraction and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from the Root of *Limonium gmelinii* (Wiid) Kuntze

CHEN Mei, GE Peng, HE Chun-xia (Department of Petroleum and Chemical Engineering, Xinjiang Applied Vocational Technical College, Kuitun, Xinjiang 833200)

Abstract [Objective] The research aimed to study the antioxidant activity of the total flavonoid extract from the rhizome of *Limonium gmelinii*. [Method] The content of total flavonoids in *Limonium gmelinii* from different areas was investigated by ultrasonic extraction with different solvents. Fenton reaction, improved pyrogallol autoxidation system and TBA method were used to measure the inhibition effect of $\cdot\text{OH}$, O_2^- and lipid peroxidation by total flavonoids. [Result] The yield of total flavonoids from alcohol extraction was higher than that from water extraction, and the content of total flavonoids from ALTGL was slightly higher; the results of anti-oxidation experiments showed that the total flavonoids possessed certain inhibition effect of $\cdot\text{OH}$, O_2^- and lipid peroxidation, the antioxidant activity of ALTGL slightly higher than KTGL, and that of alcohol extract was significantly greater than water extract, the clearance rate of hydroxyl free radical by alcohol extract was reached 98.9% when the concentration of 0.83 mg/mL. [Conclusion] The total flavonoids content of *Limonium gmelinii* root is considerable, and it has great development application value and prospect as an antioxidant.

Key words *Limonium gmelinii* (Wiid) Kuntze; Rhizome; Total flavonoids; Extract; Antioxidant activity

大叶补血草(*Limonium gmelinii*(Wiid)Kuntze)系白花丹科补血草属多年生草本耐盐旱中生植物,主要分布于新疆的阿勒泰、伊犁等地区,其根茎是新疆维吾尔族和哈萨克族的传统用药,主要用于妇科疾病,比如宫颈糜烂、子宫内膜炎等炎症的治疗以及子宫出血、尿血等病症的止血治疗。王仁^[1]的《哈萨克药志》记载了大叶补血草在民间用于治疗妇科疾病的多种附方,全草的黄酮类化合物含量丰富。后续的研究也证明了该草富含黄酮物质,2006年,哈萨克斯坦阿尔·法拉比国立大学的Zhusupova教授的课题小组从大叶补血草中纯化分离得到了槲皮素、芦丁、杨梅素及其糖苷类等黄酮类化合物^[2]。2009年Smirnova等^[3]对西西伯利亚10种中草药的研究中发现,大叶补血草叶中总黄酮含量达1.98 mg/g,并且对DPhPG自由基具有良好的清除活性,能较强烈地诱导抗氧化基因*katG*的表达。大叶补血草总黄酮对模型小鼠的急性酒精性肝损伤有一定的保护作用,其作用机制可能与黄酮类化合物的抗氧化作用有关^[4]。该试验通过大叶补血草黄酮对羟自由基、超氧阴离子自由基和脂质过氧化的抑制来检测其抗氧化活性,为大叶补血草的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 大叶补血草原料采自新疆阿勒泰地区阿勒

泰市周边(ALTGL)和伊犁地区奎屯市泉沟水库周边(KTGL);芦丁(Rutin,生化试剂,上海药品检验所);卵磷脂和抗坏血酸V_c为食品级;其余均为国产分析纯。

粉碎机JC-100(凯元工贸有限公司);超声波提取仪(上海新芝生物技术研究所);RE-52A旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III循环水式多用真空泵(上海科恒实业有限公司);DZF-6020型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司);752型紫外-可见分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.2 总黄酮含量测定

1.2.1 标准曲线的绘制^[5]。准确称取恒重芦丁5.0 mg,60%的乙醇溶解后,定容至50 mL,得到浓度为0.1 mg/mL的标准溶液。分别精确量取芦丁标准溶液0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL置于10 mL比色管中,加5% NaNO₂ 0.3 mL,摇匀,静置6 min,加10% Al(NO₃)₃ 0.3 mL,摇匀,静置6 min,加10%的NaOH 4 mL,用60%乙醇定容,混匀,第一比色管作为空白对照,显色15 min后在510 nm下测吸光度。以质量浓度(mg/mL)为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $y = 16.377x - 0.0111$ ($R^2 = 0.9983$)。

1.2.2 总黄酮的提取。取干燥根茎粉碎,过75目筛,得阿勒泰大叶补血草粗粉ALTGL和奎屯大叶补血草粗粉KTGL。准确称取两份ALTGL和KTGL粗粉各30 g,加入70%乙醇和蒸馏水,分别用醇和水进行超声波提取3次,每次20 min,合并滤液后减压旋蒸至浸膏,置真空干燥箱中干燥,称重。准确称取总黄酮粗提物制备成1 mg/mL试样液进行含量测定。

基金项目 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(201318101-18)。
作者简介 陈梅(1981—),女,江苏沛县人,讲师,硕士,从事化学分析的教学和科研工作。*通信作者,副教授,硕士,从事有机化学研究。
收稿日期 2019-03-07

1.2.3 总黄酮含量测定。准确移取 1 mL 总黄酮试样液置于 10 mL 比色管中,按照“1.2.1”的方法进行含量测定。总黄酮含量的计算方法如下:

$$\text{试液中总黄酮含量(mg/mL)} = \frac{\text{总黄酮的浓度} \times \text{定容体积} \times 100\%}{\text{滴加试液体积数} \times \text{试液浓度}}$$

$$\text{样品中总黄酮含量(mg/g)} = \frac{\text{试液中总黄酮含量} \times \text{粗提物重} \times 1000}{\text{样重}}$$

1.3 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除活性的测定 采用 Fenton 反应体系^[6]。 $\cdot\text{OH}$ 的检测:取 0.75 mmol/L 邻二氮菲、pH 7.40 的 150 mmol/L PBS、0.75 mmol (NH_4)₂Fe(SO_4)₂,每加一管立即混匀,最后加 0.01% 的过氧化氢(损)或者双蒸水(未损),置 37 °C 保温 60 min,分别测 536 nm 吸光度,得 $A_{\text{损}}$ 与 $A_{\text{未损}}$, $\Delta A_{536} = A_{\text{未损}} - A_{\text{损}}$ 。

样品清除羟自由基的检测:依上述方法,取 0.75 mmol/L 邻二氮菲、0.75 mmol/L (NH_4)₂Fe(SO_4)₂、150 mmol/L pH 7.40 的 PBS、0.01% H_2O_2 ,加不同浓度各萃取物或 V_c 0.5 mL,以同浓度萃取物作为参比测 536 nm 吸光度,即 $A_{\text{样}}$ 。

$\cdot\text{OH}$ 清除率计算法: $\cdot\text{OH}$ 清除率 = $(A_{\text{样}} - A_{\text{损}}) / (A_{\text{未损}} - A_{\text{损}}) \times 100\%$

1.4 超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除活性的测定 采用改良的邻苯三酚自氧化法,稍有改动^[7]。邻苯三酚自氧化率的测定:加入 pH 8.34 的 50 mmol/L PBS 4.5 mL、蒸馏水 0.5 mL,25 °C 保温 20 min,加入预热的 45 mmol/L 邻苯三酚溶液 10 μL (对照管用 10 μL 10 mmol/L 盐酸代替邻苯三酚溶液),立刻计时并迅速摇匀,1 min 后在波长 325 nm 下每隔 30 s 测定吸光度,每分钟吸光度增加值为 ΔA_0 。

样品清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的测定:操作方法同上,加入邻苯三酚前分

别加不同浓度各萃取物 0.5 mL。计算加样后邻苯三酚自氧化速率 ΔA_1 。

$$\text{O}_2^{\cdot-}\text{清除率 } Sp \text{ 的计算公式为: } Sp = [(\Delta A_0 - \Delta A_1) / \Delta A_0] \times 100\%$$

1.5 抑制脂质过氧化的测定^[8]

1.5.1 脂质体的制备。20 mg 卵磷脂溶于 5 mL 0.05 mol/L 的 PBS 缓冲液中(pH=7.4),冰浴,磁力搅拌 10 min 形成卵磷脂悬浊液(所得液体为单层小体积脂质体),置于 0 °C 条件下保存。

1.5.2 脂质自由基清除活性的测定。在 10 mL 比色管中加入 0.2 mL 的脂质体液体,加入不同浓度的试样液(样品管),混匀,加入 50 mmol/L FeSO_4 溶液 50 μL ,用 PBS 补足 3 mL,模型管不加试样液,空白管不加 FeSO_4 溶液,然后将模型管和样品管一同置于 37 °C 水浴中温育 40 min,每 5 min 振摇一次。温育完成后,各管加入 10% 三氯乙酸 1.0 mL、0.8% 硫代巴比妥酸(TBA)1 mL,混匀,置 100 °C 水浴 15 min,冷却后 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液在 532 nm 处测定吸光度^[9]。脂质过氧化的抑制率 = $(A_{\text{模}} - A_{\text{样}}) / (A_{\text{模}} - A_{\text{空}}) \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 大叶补血草根茎中总黄酮的含量 从表 1 可以看出,用 60% 乙醇的提取效果优于水提取,说明一些大分子黄酮极性比较弱,在水中溶解小,使得总黄酮的水提取率比较低。而从采集地来看,阿勒泰地区采摘的大叶补血草总黄酮含量比奎屯采摘略高一些,这可能与其生长的环境和气候有关系。Smirnova 等^[3]对大叶补血草的叶进行了黄酮类化合物的醇提,含量为 1.98 mg/g,可见,大叶补血草根茎部的黄酮是叶部含量的 10 倍左右。

表 1 多种方法提取大叶补血草根茎中总黄酮的含量

Table 1 Total flavonoids content from *Limonium gmelinii* of different extraction methods

方法 Method	粗提物重 Crude extract weight/g	吸光度 Absorbance	总黄酮含量 Total flavonoids content/mg/g	
			试液 Test solution	样品 Sample
醇提 ALTGL Alcohol extraction ALTGL	3.332 1	0.322	0.203 4	22.6
水提 ALTGL Water extraction ALTGL	2.953 0	0.271	0.172 2	17.0
醇提 KTGL Alcohol extraction KTGL	3.177 8	0.310	0.196 1	20.8
水提 KTGL Water extraction KTGL	2.797 3	0.268	0.170 4	15.9

2.2 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除活性 比较不同产地不同提取方法获得的总黄酮粗提物对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除活性,结果表明(图 1),大叶补血草总黄酮对羟自由基具有良好的清除作用,产地为阿勒泰的大叶补血草,其总黄酮的清除活性略优于奎屯产地的大叶补血草,醇提取总黄酮的清除活性强于水提取的总黄酮,当浓度达 0.83 mg/mL 时,醇提 ALTGL 和醇提 KTGL 总黄酮的清除率分别为 98.9% 和 94.6%。

2.3 超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除活性 从图 2 可看出,随着样品溶液浓度的不断增加,总黄酮对超氧阴离子自由基的清除能力均呈上升趋势。不同产地的 2 种提取物对超氧阴离子自由基的清除能力不相上下,醇提物的清除作用强于水提物。当浓度小于 13 mg/mL 时,清除率的增加迅速,而后增

加试样溶液的浓度,清除率增加不明显。

2.4 抑制脂质过氧化的作用 图 3 显示不同产地大叶补血草,不同溶剂提取的总黄酮对由 Fe^{2+} 引发的卵磷脂磷酸缓冲液单层小体积脂质体过氧化的抑制作用,结果表明,在试验的浓度范围内,2 种醇提取总黄酮对脂质过氧化的抑制率相当,并且与试液浓度存在剂量依赖关系明显,即随着试样浓度的增加,对脂质过氧化的抑制作用加强。醇提 ALTGL 和醇提 KTGL 总黄酮对脂质过氧化的抑制能力明显胜于水提取总黄酮,当浓度为 16.7 mg/mL 时,其抑制率分别为 91%、89% 和 24%。

3 结论与讨论

黄酮类化合物广泛存在于自然界的植物中,属植物次生

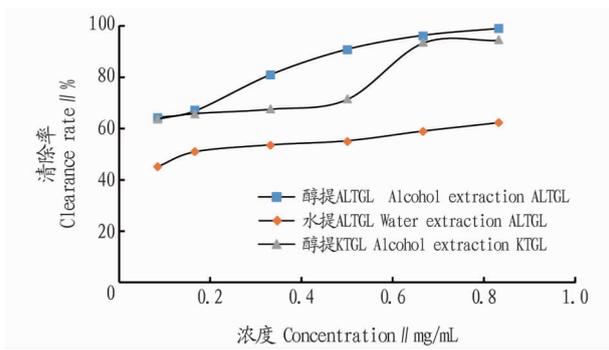


图1 大叶补血草总黄酮对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除活性

Fig. 1 Scavenging activity of total flavonoids from *Limonium gmelinii* on hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)

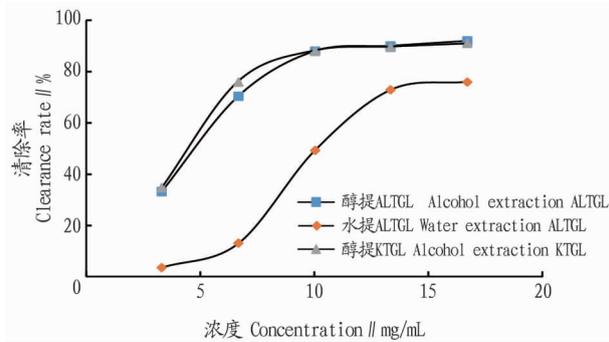


图2 大叶补血草总黄酮对 $\text{O}_2\cdot^-$ 的清除活性

Fig. 2 Scavenging activity of total flavonoids from *Limonium gmelinii* on $\text{O}_2\cdot^-$

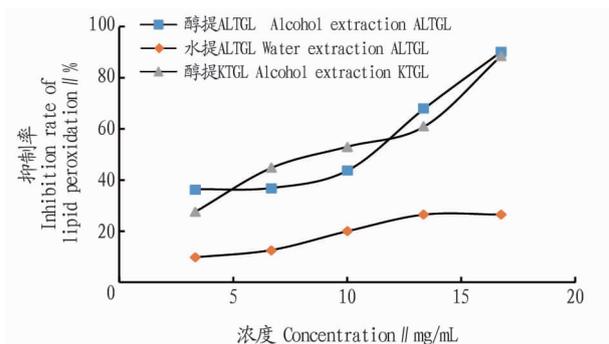


图3 大叶补血草总黄酮对脂质的抗氧化作用

Fig. 3 The antioxidant effects of total flavonoids from *Limonium gmelinii* on lipid

代谢产物,具有众多的生理功能,可用于降低血管的脆性、改善血管的通透性以防治心脑血管疾病,还可延缓衰老、护肝

解肝毒、抗肿瘤等。黄酮对衰老、心血管疾病等病症的预防和治疗作用主要是基于对自由基的清除和捕获、延缓或防止脂质过氧化物的发生^[10-11]。黄酮类化合物是大叶补血草最重要的生物活性物质,赋予大叶补血草多样的药用价值。该试验采用乙醇和水作为提取溶剂对不同地区采摘的大叶补血草根茎进行总黄酮的提取,结果表明,以60%乙醇为溶剂,有效成分黄酮类化合物的溶出率更高;而从采集地来看,阿勒泰地区采摘的大叶补血草的醇提和水提总黄酮含量分别为22.6、17.0 mg/g,比奎屯采摘的分别高出7.9%、6.5%。

抗氧化试验结果显示,大叶补血草总黄酮对羟自由基、超氧阴离子自由基的产生和脂质过氧化均有一定的抑制作用,其清除率与样品浓度呈剂量依赖关系,随样液浓度增加,清除效果增强。醇提取液的抗氧化活性明显大于水提液的活性,当浓度达0.83 mg/mL时,醇提取液对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除率达98.9%,对阿勒泰地区的大叶补血草根(ALTGL)和伊犁地区(奎屯)采集大叶补血草的根茎(KTGL)的抗氧化活性比较研究表明,ALTGL对羟自由基的清除能力略高于KTGL,而对超氧阴离子自由基和脂质过氧化的抑制能力相当。

参考文献

- [1] 王仁. 哈萨克药志[M]. 乌鲁木齐:新疆科学技术出版社,2008:98-99.
- [2] ZHUSUPOVA G E, ABIL' KAEVA S A. Dimeric prodelphinidins from *Limonium gmelinii* roots. III [J]. Chemistry of natural compounds, 2006, 42(2): 164-168.
- [3] SMIRNOVA G V, VYSOCHINA G I, MUZYKA N G, et al. The antioxidant characteristics of medicinal plant extracts from Western Siberia [J]. Applied biochemistry and microbiology, 2009, 45(6): 638-641.
- [4] 谭成玉, 池晓会, 刘斌, 等. 大叶补血草总黄酮制备及对急性酒精性肝损伤模型小鼠的影响 [C]//第一届《药学报》药学前沿论坛暨2015年中国药学会中药与自然药物专业委员会会议论文摘要集. 北京:中国药学会, 2015: 132.
- [5] 曹春艳. 响应面法优化银杏叶黄酮提取工艺 [J]. 中国食品学报, 2014, 14(4): 78-86.
- [6] 郭豫梅. 鸡油菌中总黄酮含量的测定及抗氧化活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(7): 96-99.
- [7] 姬云涛, 季雅静, 王新鲁, 等. 疏毛罗勒提取物抗氧化活性分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(6): 932-934.
- [8] 何春霞, 曹文尧. 新疆欧洲鳞毛蕨黄酮的提取及抗氧化活性 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(6): 278-280.
- [9] 何瑞雪. 水溶性大豆多糖铁配合物的制备、性质及结构研究 [J]. 广州:华南理工大学, 2012.
- [10] CHEN J W, ZHU Z Q, HU T X, et al. Structure-activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical-scavenging effects [J]. Acta pharmacologica sinica, 2002, 23(7): 667-672.
- [11] DE WHALLEY C V, RANKIN S M, HOULT J R S, et al. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages [J]. Biochemical pharmacology, 1990, 39(11): 1743-1750.

(上接第161页)

- [21] 郭新梅, 陈耀锋, 曹团武. 禾谷镰刀菌粗毒素对不同抗性水平小麦品种细胞膜透性的影响 [J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2): 186-190.
- [22] 何晓明, 谢大森, 彭庆务, 等. 节瓜抗镰刀菌突变体的筛选和特性研

究 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(2): 172-175.

- [23] 杨亚君, 陶晔, 李川, 等. 腐霉枯萎病菌毒素在坪草抗病性筛选中的应用研究 [J]. 草业学报, 2008, 17(3): 93-98.
- [24] 台莲梅, 许艳丽, 闫凤云. 应用尖孢镰刀菌毒素滤液鉴定大豆品质抗性初探 [J]. 植物保护, 2006, 32(3): 49-52.