

双水相萃取荒漠肉苁蓉总黄酮及其抗氧化活性

肖星辉, 张向前, 李桂芳, 李予霞*

(石河子大学 生命科学学院, 新疆 石河子 832003)

摘要: 采用乙醇-盐双水相萃取法研究荒漠肉苁蓉总黄酮的萃取工艺及其体外抗氧化性。采用正交试验法对荒漠肉苁蓉总黄酮的提取工艺进行了优化;通过对羟基自由基和 DPPH· 的清除率对其抗氧化活性进行评价。荒漠肉苁蓉总黄酮最佳提取工艺条件:料液比为 1:50(g/mL),提取溶剂为 50% 的乙醇溶液,提取时间为 3.5 h,提取温度为 90℃,此条件下肉苁蓉中总黄酮平均得率可达到(13.04±0.06)%;最佳双水相分离体系为 EtOH-K₂HPO₄,分离条件为 70% EtOH、0.2 g/mL K₂HPO₄、荒漠肉苁蓉提取液体积分数 14%;双水相萃取工艺对荒漠肉苁蓉总黄酮的富集倍数为 2.85;荒漠肉苁蓉总黄酮对 DPPH· 和 ·OH 的最高清除率分别 91.8% 和 35.9%,表明荒漠肉苁蓉总黄酮对 DPPH· 的清除效果强于 ·OH,具有较好的抗氧化活性。

关键词: 荒漠肉苁蓉;黄酮;正交试验;EtOH-K₂HPO₄体系;抗氧化活性

Aqueous Two-phase Extraction of Total Flavonoids from *Cistanche deserticola* Y.C.Ma and the Antioxidant Activity of the Extracts

XIAO Xing-hui, ZHANG Xiang-qian, LI Gui-fang, LI Yu-xia*

(College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China)

Abstract: Aqueous two-phase extraction was applied to extract the total flavonoids in *Cistanche deserticola* Y. C. Ma and the antioxidant ability of the extracts in vitro was also investigated. Orthogonal tests were employed to optimize the extraction technology. The antioxidant ability of the extraction solution was evaluated according to its scavenging activity and reducing power for DPPH· and ·OH. The optimal feed liquid ratio, the ratio between ethanol and water, extraction time and extraction temperature were 1:50 (g:mL), 50% ethanol solution, 3.5 hours and and extraction temperature 90℃, respectively. The concentration of total flavonoids in *Cistanche deserticola* Y. C. Ma could reach (13.04 ± 0.06)%. The best aqueous two-phase separation system was EtOH-K₂HPO₄. The optimal ratio between ethanol and water, mass concentration of potassium hydrogen phosphate anhydrous and volume fraction of flavonoids extract were 0.7 (mL:mL), 0.2 g/mL and 14%, respectively. The concentration of the total flavonoids in *Cistanche deserticola* Y. C. Ma was enriched 2.85 times with aqueous two-phase extraction. The highest scavenging rates of total flavonoids of DPPH· and ·OH were 91.8% and 35.9% respectively, indicating that the total flavonoids scavenging effect of DPPH· on free radical was stronger than that of ·OH.

Key words: *Cistanche deserticola* Y. C. Ma; total flavonoids; orthogonal experiment; the system of EtOH-K₂HPO₄; antioxidant ability

基金项目:国家自然科学基金项目“古尔班通古特沙漠荒漠肉苁蓉种质资源遗传多样性研究”(31460070)

作者简介:肖星辉(1995—),男(汉),本科生,研究方向:生化与分子生物学的研究。

* 通信作者:李予霞(1970—),女,副教授,研究方向:药物资源的开发研究。

肉苁蓉(*cistanche*)为列当科(*Orobanchaceae*)多年生草本植物,多生于藜科(*Chenopodiaceae*)梭梭属(*Haloxylon*)植物梭梭(盐木)(*Haloxylon ammodendron*)和白梭梭(*Haloxylon persicum*)的根部,具有很强的抗旱、抗寒、耐盐碱特性。新疆荒漠肉苁蓉素有沙漠人参的美誉^[1]。随着生物衰老学说及自由基生命科学的发展,黄酮也因其具有强的抗氧化性和强的清除自由基的能力而受到广泛的重视,是一种在医药、食品等领域具有广泛开发前景的天然抗氧化剂,许多富含黄酮类化合物的植物、中草药资源被开发利用出来^[2-4]。前期研究表明,肉苁蓉具有抗衰老、抗氧化、增强免疫力等功能。为综合开发利用肉苁蓉资源,对新疆荒漠肉苁蓉中总黄酮提取工艺、纯化及体外抗氧化活性进行了研究,以期为进一步提取纯化新疆荒漠肉苁蓉黄酮做出参考,也为进一步探讨其药理活性、资源保护和中药制剂等综合利用提供试验依据。

1 材料

1.1 试剂与原料

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH):美国 sigma 公司;芦丁(批号:100080-200707):中国食品药品检验研究院;L-(+)-抗坏血酸(V_c)、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT):国药集团化学试剂有限公司;其他试剂均为国产分析纯级。

荒漠肉苁蓉:新疆古尔班通古特沙漠各沙区。

1.2 仪器

UV-2700 紫外分光光度计:岛津仪器有限公司;真空干燥箱:上海实验仪器厂;SHB-A(Ⅲ)循环式真空泵:天津天有利科技有限公司;ANKEGL-20G-2 型离心机:上海安亭科学仪器厂;电子天平:德国赛多利斯集团;恒温水浴锅:上海博讯公司;N-1100S-W 旋转蒸发仪:深圳赛普仪科技有限公司;Thermo fisher 离心机:赛默飞世尔科技公司。

2 试验方法

2.1 荒漠肉苁蓉总黄酮的测定^[5]

样品荒漠肉苁蓉中黄酮得率测定:准确移取 1.0 mL 的样品液于比色管中测定吸光度。根据标准回归方程: $Y=0.1091X-0.0091$, 计算黄酮质量。总黄酮得率按如下公式计算:

$$\text{黄酮得率}/\% = CV/M \times 100$$

式中: C 为提取液浓度, g/mL; V 为提取液原始体积, mL; M 为所取荒漠肉苁蓉粉末质量, g。

2.2 正交试验优化总黄酮提取工艺条件

根据正交试验设计原理,在单因素试验的基础

上,每个因素选取 3 个对总黄酮得率影响较大的水平,建立 $L_9(3^4)$ 试验组合,以总黄酮得率为评价指标,对各因素的 3 个水平进行编码(见表 1),优化古尔班通古特沙漠中荒漠肉苁蓉总黄酮的提取工艺。

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	A 温度/℃	B 时间/h	C 料液比/(g/mL)	D 乙醇浓度/%
1	70	2.5	1:45	30
2	80	3	1:50	40
3	90	3.5	1:55	50

2.3 乙醇-无机盐双水相体系分离纯化总黄酮

采用浊度法^[6],绘制无机盐(Na_2CO_3 、 K_2CO_3 、草酸钠、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 K_2HPO_4 5 种盐作为试验用无机盐)双水相体系相图。

荒漠肉苁蓉总黄酮的萃取与纯化:将提取的肉苁蓉粗黄酮配置成一定浓度的黄酮溶液(黄酮含量 0.15 g)加入到已知无机盐/乙醇的双水相体系中,充分振荡,静置 1 h 左右,记录上下相的体积,分别测出上下相的黄酮浓度,进而计算出相比 R ,分配系数 K ,萃取率 Y 。计算公式:

$$\text{相比}(R) = \frac{V_a}{V_b}$$

式中: V_a 是上相体积, mL; V_b 是下相体积, mL。

$$\text{分配系数}(K) = \frac{C_a}{C_b}$$

式中: C_a 是上相黄酮浓度, mg/mL; C_b 是下相黄酮浓度, mg/mL。

$$\text{萃取率}/Y = \frac{K}{K + \frac{1}{R}} \times 100$$

式中: Y 为萃取率, %; K 为分配系数; R 为相比。

2.4 验证试验及总黄酮纯化倍数的测定

称取荒漠肉苁蓉粗提物 2.00 g,按最佳工艺条件进行双水相萃取,读取上、下相体积,分析上、下相中肉苁蓉总黄酮的量,计算 R 、 K 和 Y 。取乙醇相(上相)挥干溶剂,得黄酮浸膏。分别精密称取 3 份醇提浸膏,配置成一定质量浓度的供试液,测定黄酮,计算萃取后黄酮的纯化倍数。

2.5 抗氧化性试验

按照正交试验确定的荒漠肉苁蓉总黄酮提取最佳条件进行提取,提取液离心(4 000 r/min)10 min,取上清液,经双水相分离纯化液回收乙醇溶剂后浓缩干燥即得荒漠肉苁蓉总黄酮粗提物。配制适宜质量浓度溶液进行抗氧化活性试验。DPPH·清除率的测定和羟自由基清除率的测定参照文献[7-9]。计算公式如下:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}/\%=\frac{A_1-(A_2-A_3)}{A_1}\times 100$$

式中: A_1 为溶剂与样液混合液的吸光度; A_2 为样液与 DPPH $\cdot$ 反应后的吸光度; A_3 为溶剂与 DPPH 混合液的吸光度。

$$\text{羟自由基清除率}/\%=\frac{A_x-A_0}{A_1-A_0}\times 100$$

式中: A_x 为样品组吸光度; A_1 为对照组吸光度; A_0 为空白组吸光度。

3 结果与分析

3.1 正交试验法提取荒漠肉苁蓉总黄酮最佳工艺结果分析

称取干燥的荒漠肉苁蓉粉末 2.0 g 于锥形瓶中,按正交表安排(表 1)进行试验,提取液过滤,减压浓缩至 20 mL,浓缩液用 30 %的乙醇定容至 50 mL,即为总黄酮提取液。从中取 1 mL 样品按照 2.1 中的测定方法对其进行处理和测量,结果分析见表 2、表 3。

表 2 正交试验设计及结果分析

Table 2 The experimental results of orthogonal test					
编号	因素				总黄酮 得率/%
	A 温度	B 时间	C 料液比	D 乙醇浓度	
1	1	1	1	1	9.250
2	1	2	2	2	9.488
3	1	3	3	3	10.074
4	2	1	2	3	10.015
5	2	2	3	1	9.857
6	2	3	1	2	10.435
7	3	1	3	2	10.581
8	3	2	1	3	12.272
9	3	3	2	1	12.582
$\bar{K}_1$	9.604	9.949	10.652	10.563	
$\bar{K}_2$	10.102	10.539	10.695	10.168	
$\bar{K}_3$	11.812	11.030	10.171	10.787	
R	2.21	1.08	0.52	0.62	

表 3 显著性检验(方差分析)

Table 3 Significance test (ANOVA)					
方差来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
模型	32.409	8	4.051	151.082	***
温度	23.945	2	11.972	444.69	***
时间	5.307	2	2.654	98.964	***
液料比	1.368	2	0.684	25.511	**
乙醇浓度	1.789	2	0.895	33.365	**
误差	0.483	18	0.027		
总计	3 019.31	27			
校正后总计	32.892	26			

注: ** $P<0.01$ (极显著); *** $P<0.001$ (非常显著)。 $R^2=0.985$, Adj. $R^2=0.979$ 。

从各因素的显著性水平差异看出,荒漠肉苁蓉总黄酮得率的影响次序是:提取温度>提取时间>乙醇浓度>料液比,且对总黄酮得率的影响都达到了极显著水平($P<0.001$);通过各因素间的交互作用及其对多糖得率影响的相关性分析得知:温度与时间对总黄酮的得率有非常显著的影响,提取温度与时间也具有一定的相关性($P<0.001$);乙醇浓度与提取时间的相关性($P<0.05$)小于上述两种组合的交互作用,这一结论与方差分析一致。从而说明:影响荒漠肉苁蓉提取的决定因素为提取温度和回流的时间。最佳提取工艺为 $A_3B_3C_3D_3$,即提取温度为 90 $^{\circ}\text{C}$,料液比为 1 : 50(g/mL),乙醇浓度为 50 %,回流时间为 3.5 h。经验证,该条件下荒漠肉苁蓉总黄酮得率为(13.04 $\pm$ 0.06) %,均高于单因素提取所获总黄酮得率。

3.2 双水相总黄酮提纯工艺的确立

3.2.1 5 种盐相图的绘制和分相能力的考察

室温下构建了 5 种盐—双水相体系(EtOH 与 Na_2CO_3 、 K_2CO_3 、 NaOOCCOONa 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 K_2HPO_4 的双水相体系),并绘制了 5 种盐与无水乙醇形成的双水相相图,结果如图 1 所示。

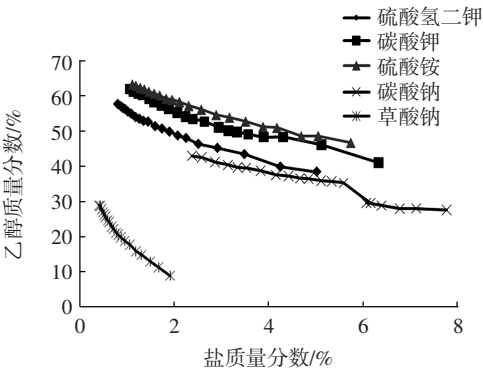


图 1 5 种盐—乙醇形成的双水相体系图

Fig.1 Aqueous two-phase system of five kinds of salt ethanol

由图 1 可知,5 种盐—乙醇皆可以形成双水相体系,通过各综合因素分析: K_2HPO_4 分相能力强,且分相范围大、稳定,分配系数也大,黄酮几乎都分布于上相。在此基础上筛选最佳 EtOH/ K_2HPO_4 双水相体系。

3.2.2 最佳提取黄酮的 EtOH/ K_2HPO_4 双水相体系的确立

双水相萃取是一种新型的黄酮类化合物的分离纯化方法。在双水相中,当 H_2O 与 EtOH 体积比一定时,盐越多,下相的体积越大,盐的量达到一定时会析出晶体;而当盐和 EtOH 的质量一定时,水过多就形不成双水相体系,水过少易析出晶体^[10],所以需要确定适当 H_2O 、盐与 EtOH 的体积比,结果见图 2。

由图 2(A)可知,当 φ 乙醇=80 % 时,随着 K_2HPO_4

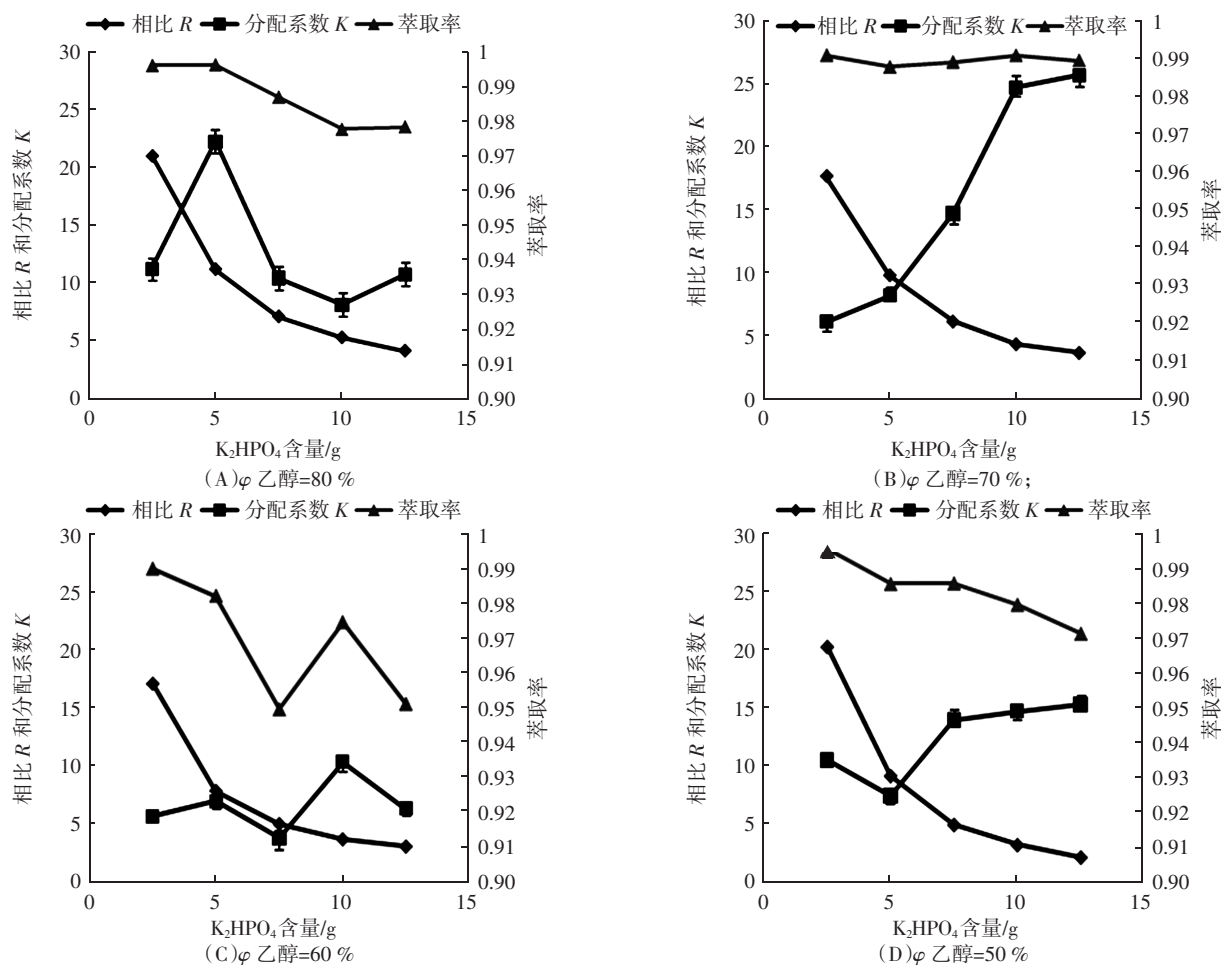


图2 不同双水相体系对黄酮萃取率的影响

Fig.2 Effect of different aqueous two phase systems on the extraction rate of total flavonoids

量的加入,相比随之降低,下相的体积增大,萃取率也略呈下降趋势。 K_2HPO_4 的加入量为5 g时,萃取率达到最大,但分配系数不稳定。由图2(B)可知,当 φ 乙醇=70 %时,随着 K_2HPO_4 的增加,分配系数增大,相比下降,对萃取率的影响也不是太大, K_2HPO_4 的加入量为10 g时,萃取率达到最大为99.07 %。由图2(C)可知, K_2HPO_4 的加入量对黄酮萃取率的影响较大,且随盐量的增加总体呈现下降趋势。由图2(D)可知,在 φ 乙醇=50 %时,随着 K_2HPO_4 质量的增加,黄酮萃取率呈现下降趋势,且影响相对较大。总体分析,各体系(乙醇和水的体积比一定的情况下)相比是随着盐浓度的增加而逐渐变小,即盐的增加会导致下相的体积增大,相比减小^[10]。故以黄酮的萃取率及提纯工艺为目标对各因素进行综合分析后,拟确定提取荒漠肉苁蓉总黄酮的最佳双水相萃取体系为: φ 乙醇=70 %, K_2HPO_4 量为10.0 g,在此体系中,分配系数为24.66,相比为4.33,萃取率达99.07 %。

3.3 验证试验及纯化倍数结果

精密称取3份荒漠肉苁蓉粗提品(用10 mL水溶

解,含黄酮0.15 g),按试验获得的最佳萃取工艺条件即 φ 乙醇=70 %, $\rho(K_2HPO_4)=0.2$ g/mL,在此双水相体系中萃取荒漠肉苁蓉总黄酮,测定上、下相中黄酮含量,计算 R 、 K 和 Y ,试验结果如表4所示。

表4 验证试验结果

Table 4 The results of validation test

样品	R	K	Y
1	4.33	24.66	99.07
2	4.13	24.38	99.35
3	4.48	24.83	98.82

试验结果表明在最佳萃取工艺条件下,两相中总黄酮的分配系数平均值为24.62 ($n=3$, $RSD=0.66$ %),乙醇相中黄酮的最大萃取率可达99.08 % ($n=3$, $RSD=0.18$ %)。

按照最佳工艺条件萃取荒漠肉苁蓉总黄酮,测定双水相萃取前后粗品中总黄酮的量,试验结果显示萃取前后粗品中总黄酮的含有量分别为 (13.04 ± 0.06) % ($n=3$, $RSD=1.23$ %)和 (37.16 ± 0.31) % ($n=3$, $RSD=1.31$ %),萃取后粗品中总黄酮的含有量是萃取前的2.85倍。

3.4 荒漠肉苁蓉黄酮的抗氧化活性

荒漠肉苁蓉总黄酮粗提物对自由基的清除试验结果见图3。

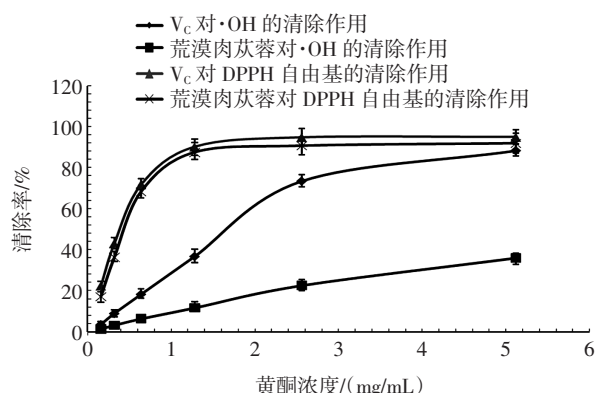


图3 荒漠肉苁蓉总黄酮对自由基的清除效果

Fig.3 The clearance ability of total flavonoids of *Cistanche deserticola* Y.C. Ma to DPPH· and hydroxyl free radical

试验结果表明,在 0~5.2 mg/mL 范围内,荒漠肉苁蓉黄酮对 DPPH 自由基和·OH 具有极好的清除能力,随着肉苁蓉黄酮质量浓度的增加,清除作用增强,具有一定的量效关系,但均低于 Vc 的抑制效果,这一结果与欧阳杰^[11]结果一致。从图中可以看出,荒漠肉苁蓉总黄酮对于清除 DPPH 自由基的能力远远大于·OH 基的能力,表明荒漠肉苁蓉总黄酮对不同自由基的清除能力不同。荒漠肉苁蓉总黄酮质量浓度大于 2.56 mg/mL 时,随着质量浓度的增加对 DPPH 自由基清除能力影响逐渐减弱不大,此时的清除率为 73.32%,清除率最高可达 91.8%;对·OH 的清除能力最大可 35.9%,此时荒漠肉苁蓉黄酮的质量浓度为 5.12 mg/mL。

4 讨论

本研究根据传统中药药剂的制备方法,利用回流法提取荒漠肉苁蓉黄酮类有效成分,并进行纯化及抗氧化活性测定,旨在为今后研发肉苁蓉制剂的质量和疗效奠定基础^[12]。试验结果如下:

1) 采用正交试验法优化了回流提取新疆荒漠肉苁蓉总黄酮的工艺,最佳提取工艺条件为提取温度为 90℃,料液比为 1:50(g/mL),乙醇浓度为 50%,回流时间为 3.5 h。在此条件下,荒漠肉苁蓉总黄酮得率为 (13.04±0.06)%,均高于单因素提取所获总黄酮得率。影响荒漠肉苁蓉总黄酮得率大小的因素主次顺序为:提取温度>提取时间>乙醇体积分数>料液比,其中提取时间与提取温度因素之间的交互作用显著,对荒漠肉苁蓉总黄酮得率影响较大。

2) 试验结果表明利用乙醇—盐双水相体系萃取

纯化荒漠肉苁蓉中的总黄酮是可行的。乙醇-K₂HPO₄ 双水相体系萃取荒漠肉苁蓉总黄酮的最佳工艺条件为: φEtOH=70%, ρ(K₂HPO₄)=0.2 g/mL。粗提物加入量为 0.15 g,混合后形成双水相,相比为 4.31,分配系数为 24.62,上相中最大萃取率达 99.08%。双水相萃取后荒漠肉苁蓉总黄酮纯度提高了 2.85 倍,纯度达 37.16%。说明 EtOH/K₂HPO₄ 双水相萃取体系分离纯化荒漠肉苁蓉具有一定的选择性。

3) 荒漠肉苁蓉总黄酮可以有效清除 DPPH 自由基和·OH,且量效关系显著,其清除 DPPH 自由基的能力高于·OH;对 DPPH 自由基清除率最高可达 91.8%,·OH 的清除率只有 35.9%。

黄酮类化合物的分离提纯对医药及食品工业是十分重要的,组成双水相的一些无机盐对生物活性物质无伤害,因此不会引起生物物质失活或变性。本研究发现,虽然黄酮的萃取率高,但其纯度不高,原因是双水相不具有特异性和专一性^[12],在肉苁蓉中含有其他的一些易溶于乙醇的物质进入有机相,而导致黄酮的纯度降低,所以对于提高黄酮的纯度还需要进一步探究。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:化学工业出版社,2010
- [2] 唐栩,许东晖,梅雪婷,等.26 种黄酮类天然活性成分的药理研究进展[J].中药材,2013,26(1): 46-54
- [3] 马锐,吴胜本.中药黄酮类化合物药理作用及作用机制研究进展[J].中国药物警戒,2013,10(5): 286-289
- [4] 龙春,高志强,陈凤鸣,等.黄酮类化合物的结构—抗氧化活性关系研究进展[J].重庆文理学院学报(自然科学版),2006,5(12): 13-17
- [5] 刘惠东,李桂芳,牛亮仲,等.维药多伞阿魏中总黄酮提取工艺研究及含量测定[J].中华中医药杂志,2016,31(1): 310-312
- [6] 董树国,赖红伟,陆钊.双水相萃取在黄酮类化合物分离分析中的应用[J].广州化工,2009,37(7): 43-44
- [7] 高建德,刘雄,范凌云,等.肉苁蓉酶解提取工艺及抗氧化活性研究[J].中成药,2014,36(12): 2621-2624
- [8] 刘德胜,刘琳琳,刘为忠.落地生根总黄酮提取工艺及其清除自由基作用的研究[J].中成药,2012,34(11): 2236-2239
- [9] 张黎明,李瑞超,郝利民,等.响应面优化玛咖叶总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2014,30(4): 233-239
- [10] 丁霞,张允楠,杨云,等.丙酮-K₂HPO₄ 双水相体系萃取大蓟总黄酮[J].中成药,2015,37(1): 231-233
- [11] 刘伯言,欧阳杰.肉苁蓉苯乙醇苷的提取、纯化和抗氧化活性研究[D].石河子:石河子大学,2014
- [12] 朱晓玉,刘雄,高建德,等.肉苁蓉资源概况及药理作用新进展[J].甘肃中医药大学学报,2016,33(4): 91-93

收稿日期:2016-12-15