

曹剑锋, 刘其高, 蒋小飞, 等. 阴地蕨总黄酮的提取及抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(21): 228–231.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.058

阴地蕨总黄酮的提取及抗氧化活性研究

曹剑锋^{1,2}, 刘其高¹, 蒋小飞^{1,2}, 周进康¹, 欧岳姣¹, 徐连巧¹

(1. 贵州师范学院化学与生命科学学院, 贵州贵阳 550018; 2. 贵州师范学院药用植物生物技术研究所, 贵州贵阳 550018)

摘要:利用超声波辅助提取技术对阴地蕨根的总黄酮提取工艺进行优化研究, 同时考察黄酮提取液的还原力和清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)以及 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基的能力。通过单因素试验和正交试验分析影响黄酮提取率的主要因素, 结果发现, 影响阴地蕨种黄酮提取率的因素主次顺序为乙醇浓度 > 料液比 > 提取时间 > 提取温度; 最佳提取条件为乙醇浓度 90%, 料液比 1 g : 70 mL, 提取温度 60 ℃, 提取时间 40 min。阴地蕨根总黄酮提取液具有较强的还原力, 对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、DPPH \cdot 均有明显的清除作用。通过正交试验得出清除每种自由基的最佳提取工艺。

关键词:阴地蕨; 总黄酮; 提取工艺; 抗氧化活性; 药理效用; 开发利用

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)21-0228-04

阴地蕨 [*Botrychium ternatum* (Thunb) Sw.] 为阴地蕨科阴地蕨属植物, 别称一朵云、小春花、四块瓦等^[1], 具有清热解暑、平肝熄风、止咳、止血、明目去翳等作用^[2], 药用价值高。现代药理学研究表明, 阴地蕨具有增强机体免疫力^[3]、祛痰^[4]、抗肿瘤^[5]、抗氧化^[6]、改善肝功能以及阻断和逆转肝纤维化等功效^[7]。对阴地蕨成分的研究表明, 阴地蕨含有丰富的黄酮类化合物^[8]。黄酮类物质因具有活性高、作用广泛等特点而被用于医药、保健食品及化妆品等领域^[9-11]。因此, 本试验采用超声波辅助法提取阴地蕨根中的总黄酮, 并采用正交试验优化确定最佳提取工艺, 对总黄酮抗氧化活性进行研究, 以期对阴地蕨根黄酮的药理效用研究及天然的抗氧化剂开发利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

以阴地蕨根为试验材料。试验所用试剂包括芸香苷标准品(上海源叶生物科技有限公司); 亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、

水杨酸、硫酸亚铁(FeSO_4)、过氧化氢(H_2O_2)、三羟基氨基甲烷、邻苯三酚、盐酸、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁(国药化学基团有限公司)等为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

KQ5200E 型超声波清洗机、FW135 粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); 722 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); 80-2B 型离心机(江苏正基仪器有限公司); 旋转蒸发仪(EYELA-N-1100, 东京理化器械株式会社)。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的绘制 采用硝酸铝络合紫外分光光度法, 以芸香苷标准品为标准样绘制标准曲线。通过测定不同质量浓度芸香苷标准品在 510 nm 处的吸光度, 得到标准曲线回归方程 $y = 10.53x + 0.008$, 其中, y 表示测试样品液在 510 nm 处的吸光度, x 表示样品液的浓度, 标准曲线适用范围为 0 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ ^[12]。

1.3.2 阴地蕨根总黄酮提取及含量的测定 准确称取阴地蕨根干粉末 0.08 g, 并将其置于 10 mL 离心管中, 按一定料液比(g : mL)添加乙醇溶液, 采用一定功率超声波在一定时间内提取总黄酮。提取液在 4 000 r/min 的转速下离心 5 min, 滤渣以同样条件提取、离心、合并上清液, 然后用乙醇溶液定容至 25 mL。取定容好的样品 2 mL 进行检测, 每个水平的试验在相同条件下提取 3 个平行样^[13-14]。

用制作标准曲线的方法测定阴地蕨根提取液中总黄酮的吸光度, 根据标准曲线的回归方程计算提取液总黄酮的质量

Methods, 2013, 6(1): 309–316.

[13] 黎爽, 刘蕊, 马博凯. 反相高效液相色谱法测定水果中有机酸含量[J]. 现代科学仪器, 2013(3): 145–146.

[14] 赵和涛. 红茶加工中有机关代谢及对茶叶香气形成的影响[J]. 茶叶通讯, 1993(1): 25–27.

[15] 谢娇枚, 罗敏燕, 刘易凡, 等. 陈年祁门红茶品质分析[J]. 湖南农业科学, 2012(21): 100–102, 105.

[11] Wang M, Qu F, Shan X Q, et al. Development and optimization of a method for the analysis of low-molecular-mass organic acids in plants by capillary electrophoresis with indirect UV detection[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 989(2): 285–292.

[12] Barros L, Pereira C, Ferreira I C. Optimized analysis of organic acids in edible mushrooms from Portugal by ultra fast liquid chromatography and photodiode array detection[J]. Food Analytical

收稿日期: 2017-07-02

基金项目: 贵州省教育厅自然基金(编号: 黔教合 KY 字[2015]374); 贵州省科技厅自然科学基金重点项目(编号: 黔科合基础[2016]1415); 贵州省一流师资团队建设项目(编号: 黔高教发[2017]158号); 贵州省茶籽资源综合利用工程研究中心项目(编号: 黔教合 KY 字[2017]020)。

作者简介: 曹剑锋(1971—), 男, 甘肃天水人, 博士, 教授, 研究方向为天然药物。Tel: (0851) 85816647; E-mail: cxf266@126.com。

浓度,根据公式(1)计算总黄酮提取率。

$$\text{提取率} = \frac{\text{测量质量浓度} \times \text{稀释倍数} \times \text{提取液体积}}{\text{材料粉末质量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.3 正交试验设计 依据单因素试验结果,设计正交试验,正交试验的因素水平见表1,优化黄酮提取工艺,并检测提取物清除·OH、O₂⁻·、DPPH·的能力及其总还原力。

表1 正交试验的因素水平

水平	A:料液比 (g/mL)	B:提取时间 (min)	C:乙醇浓度 (%)	D:提取温度 (℃)
1	1:50	40	70	40
2	1:60	50	80	50
3	1:70	60	90	60

1.3.4 提取物体外抗氧化活性试验

1.3.4.1 清除·OH能力的测定 参考樊琛等的方法^[15]测定提取物对·OH的清除能力。向带塞10 mL试管中依次加入1 mL样品溶液、2 mL 1.8 mmol/L FeSO₄溶液、2 mL 1.8 mmol/L水杨酸-乙醇溶液和2 mL 1.96 mmol/L H₂O₂溶液。以蒸馏水代替样品液做空白对照,设其在510 nm处的吸光度为D₀,样品溶液的吸光度为D_x,不加显色剂H₂O₂时的蒸馏水对照组吸光值为D₁;整个反应时间为30 min,平行测定3次。根据公式(2)计算·OH清除率:

$$K_1 = [D_0 - (D_x - D_1)] / D_0 \times 100\% \quad (2)$$

1.3.4.2 清除O₂⁻·能力的测定 参照储维维等的方法^[16]测定提取物对O₂⁻·的清除能力。取2 mmol/L的Tris-盐酸缓冲溶液(pH值8.2)4.5 mL,加入带塞10 mL试管中,置于恒温水浴锅中并在25℃条件下水浴预热20 min后,分别加入2.0 mL试样溶液和0.4 mL 5 mmol/L邻苯三酚溶液,混匀后于25℃条件下水浴反应5 min,加入1.0 mL 1.6 mmol/L HCl终止反应,测定样品溶液在波长为325 nm处的吸光度D₁;以蒸馏水为空白对照,在同样的条件下测定其吸光度D₀,平行测定3次。根据公式(3)计算清除率:

$$K_2 = (D_0 - D_1) / D_0 \times 100\% \quad (3)$$

1.3.4.3 清除DPPH·能力的测定 参照李波等的方法^[17]测定提取物对DPPH·的清除能力。将DPPH用无水乙醇配制成0.2 mmol/L的溶液,分别吸取2.0 mL的样品溶液和2.0 mL的DPPH溶液,避光混匀,反应30 min后,于517 nm波长处测定吸光度值D₁;另取2.0 mL不同质量浓度总黄酮乙醇溶液,加入2.0 mL无水乙醇混合均匀后测定吸光度D₂;测定2.0 mL蒸馏水加入2.0 mL DPPH(1 mmol/L)溶液后的吸光度D₀。根据公式(4)计算DPPH·清除率:

$$K_3 = [1 - (D_1 - D_2) / D_0] \times 100\% \quad (4)$$

1.3.4.4 总还原力的测定 参照董兰芳等的方法^[18]测定提取物的总还原力。取2.0 mL样品溶液,加入2.5 mL磷酸缓冲液(浓度为0.2 mol/L,pH值为6.6)和2.5 mL 1%铁氰化钾[K₃Fe(CN)₆]溶液。将此混合物在50℃条件下放置20 min后,加入2.5 mL 10%的三氯乙酸,然后离心10 min,吸取2.5 mL上清液,加入2.5 mL蒸馏水和0.5 mL 0.1%三氯化铁,均匀混合后在700 nm波长处测定吸光度D₁。用蒸馏水做空白对照,在同样的条件下测定其吸光度D₀,平行测定3

次。按公式(5)计算提取物的总还原力:

$$K = (D_1 - D_0) / D_1 \times 100\% \quad (5)$$

2 结果与分析

2.1 阴地蕨根总黄酮提取单因素试验结果

2.1.1 料液比对黄酮提取率的影响 由图1可知,当料液比低于1 g:60 mL时,随着料液比的增大,总黄酮提取率增加,当料液比为1 g:60 mL时,提取率达到最大值,而当料液比继续增大时提取率降低。

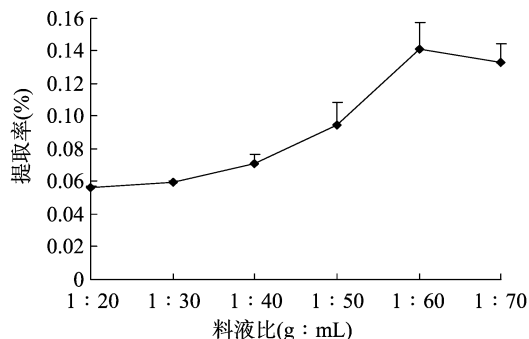


图1 料液比对阴地蕨根中总黄酮提取率的影响

2.1.2 温度对黄酮提取率的影响 由图2可知,在温度低于60℃时,随着提取温度的升高,黄酮提取率整体呈增大趋势,当提取温度达到60℃时,提取率增加到最大值,而且当温度再升高时,提取率不再增加。说明升高温度有利于黄酮类物质的溶出,但温度升高到一定程度时,可能会导致一些黄酮类物质的结构被氧化破坏,从而导致总黄酮提取率降低^[19]。

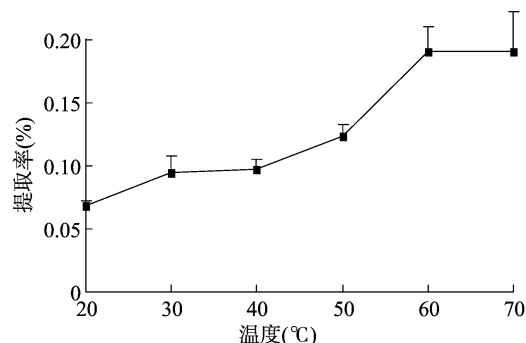


图2 温度对阴地蕨根中总黄酮提取率的影响

2.1.3 提取时间对黄酮提取率的影响 由图3可知,随着提取时间的增加,阴地蕨根的总黄酮提取率呈先增大后减小的趋势,当提取时间为50 min时,提取率增加到最大值,而随着提取时间的继续延长,提取率减小。可能的原因是一部分黄酮类物质被超声波分解,导致总黄酮提取率下降^[20-21]。

2.1.4 乙醇浓度对黄酮提取率的影响 由图4可知,乙醇浓度过低,不利于阴地蕨根的总黄酮提取,低浓度乙醇条件下,黄酮的提取率较低,随着乙醇浓度的提高,提取率先增大后减小,当乙醇浓度超过80%时,提取率随着乙醇浓度的增大而降低。

2.1.5 提取次数对黄酮提取率的影响 由图5可知,随着提取次数的增多,阴地蕨根总黄酮提取率逐渐增大,当提取次数≥2次时,提取率的增长量较少。

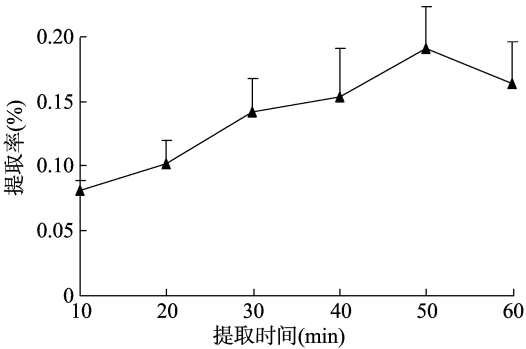


图3 提取时间对阴地蕨根中总黄酮提取率的影响

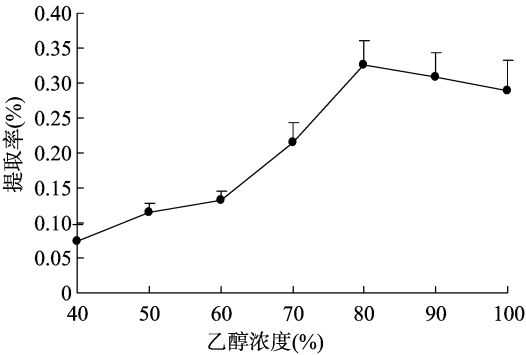


图4 乙醇体积分数对阴地蕨根中总黄酮提取率的影响

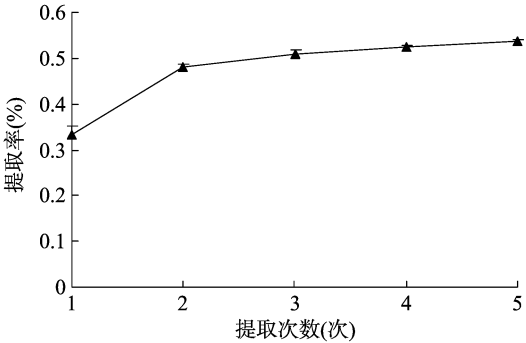


图5 提取次数对阴地蕨根中总黄酮提取率的影响

2.2 正交试验与抗氧化活性分析

2.2.1 正交试验结果与分析 由表 2 可知,4 种因素对提取效果的影响与“2.1”节的单因素试验结果基本相同,各因素水平之间的极差大小依次为 C>A>B>D,因此影响阴地蕨根总黄酮提取率的因素主次顺序表现为乙醇浓度>料液比>提取时间>提取温度。由正交试验结果可知,最佳提取工艺为 C₃A₃D₃B₁,即乙醇浓度为 90%,料液比为 1 g:70 mL,温度为 60℃,提取时间为 40 min。

2.2.2 清除·OH 正交试验结果 由表 3 可知,各试验组黄酮提取物对·OH 的清除作用差异较大,4 种因素对黄酮提取物清除羟基自由基能力的影响表现为 C>D>B>A,最佳试验条件为 C₁D₁B₂A₃,即乙醇浓度为 70%,提取温度为 40℃,提取时间为 50 min,料液比为 1 g:70 mL。

2.2.3 清除 DPPH· 正交试验结果 由表 4 可知,各试验组黄酮提取物对 DPPH· 都有一定的清除作用,且 4 种因素对黄酮提取物清除羟基自由基能力的影响表现为 D>A>C>B,且最佳试验条件为 D₃A₂C₂B₁,即提取温度为 60℃,料液比为 1 g:60 mL,乙醇浓度为 80%,提取时间为 40 min。

表 2 提取正交试验结果

试验号	A	B	C	D	提取率(%)
1	2	1	2	1	1.59
2	3	2	1	1	0.51
3	1	3	3	1	1.33
4	3	1	3	2	3.33
5	1	2	2	2	1.00
6	2	3	1	2	0.6
7	1	1	1	3	0.72
8	2	2	3	3	2.04
9	3	3	2	3	2.63
均值 1	1.02	1.88	0.61	1.14	
均值 2	1.41	1.18	1.74	1.64	
均值 3	2.47	1.52	2.23	1.80	
极差	1.45	0.70	1.63	0.66	

表 3 清除·OH 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	实际清除率(%)
1	2	1	2	1	17.42
2	3	2	1	1	65.38
3	1	3	3	1	14.81
4	3	1	3	2	0.37
5	1	2	2	2	20.25
6	2	3	1	2	5.99
7	1	1	1	3	17.57
8	2	2	3	3	-1.32
9	3	3	2	3	7.06
均值 1	17.54	11.78	29.65	32.54	
均值 2	7.36	28.10	14.91	8.87	
均值 3	24.27	9.29	4.62	7.77	
极差	16.91	18.81	25.03	24.77	

表 4 清除 DPPH· 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	实际清除率(%)
1	2	1	2	1	21.87
2	3	2	1	1	16.81
3	1	3	3	1	13.94
4	3	1	3	2	26.40
5	1	2	2	2	21.05
6	2	3	1	2	25.55
7	1	1	1	3	23.04
8	2	2	3	3	27.67
9	3	3	2	3	30.86
均值 1	19.34	23.77	21.80	17.54	
均值 2	25.03	21.84	24.59	24.33	
均值 3	24.69	23.45	22.67	27.19	
极差	5.69	1.93	2.79	9.65	

2.2.4 清除 O₂⁻· 正交试验结果 由表 5 可知,各试验组黄酮提取物对 O₂⁻· 都有较好的清除作用,且 4 种因素对黄酮提取物清除羟基自由基能力的影响表现为 C>D>B>A,最佳试验条件为 C₂D₃B₁A₃,即乙醇浓度为 80%,提取时间为 40 min,提取温度为 60℃,料液比为 1 g:70 mL。

表 5 清除 O_2^- · 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	实际清除率 (%)
1	2	1	2	1	66.77
2	3	2	1	1	31.19
3	1	3	3	1	58.75
4	3	1	3	2	79.40
5	1	2	2	2	63.02
6	2	3	1	2	44.66
7	1	1	1	3	55.18
8	2	2	3	3	78.51
9	3	3	2	3	89.45
均值 1	58.98	67.12	43.68	52.24	
均值 2	63.32	57.57	73.08	62.36	
均值 3	66.68	64.29	72.22	78.38	
极差	7.70	9.55	29.40	26.14	

2.2.5 总还原力正交试验结果 由表 6 可知,黄酮提取物的总还原力较强,且 4 种因素对黄酮提取物还原能力的影响表现为 $A > D > B > C$,最佳试验条件为 $A_3D_3B_1C_3$,即料液比为 1 g : 70 mL,提取温度为 60 ℃,提取时间为 40 min,乙醇浓度为 90%。

表 6 总还原力正交试验结果

试验号	A	B	C	D	实际清除率 (%)
1	2	1	2	1	97.10
2	3	2	1	1	95.61
3	1	3	3	1	96.47
4	3	1	3	2	97.57
5	1	2	2	2	96.90
6	2	3	1	2	97.28
7	1	1	1	3	97.18
8	2	2	3	3	97.53
9	3	3	2	3	97.55
均值 1	96.85	97.29	96.69	96.40	
均值 2	97.31	96.68	97.18	97.25	
均值 3	97.91	97.10	97.19	97.42	
极差	1.06	0.61	0.50	1.02	

3 结论

本研究在单因素试验的基础上,进一步采用正交试验优化阴地蕨根中总黄酮提取工艺条件,结果发现,影响阴地蕨根总黄酮提取率的因素主次顺序依次为乙醇浓度 > 料液比 > 提取时间 > 提取温度;优化后的提取工艺条件为乙醇浓度 90%,料液比 1 g : 70 mL,温度 60 ℃,时间 40 min。试验结果为进一步研究开发利用阴地蕨奠定了基础。

抗氧化性结果表明,阴地蕨根黄酮提取物清除各自由基的最佳提取条件存在差异,其中清除 $\cdot OH$ 的最佳提取条件为乙醇浓度 70%,料液比 1 g : 70 mL,提取温度 40 ℃,提取时间 50 min;清除 DPPH \cdot 的最佳提取条件为乙醇浓度 80%,料液比 1 g : 60 mL,提取温度 60 ℃、提取时间 40 min;清除 O_2^- · 的最佳提取条件为提取乙醇浓度 80%,料液比 1 g : 70 mL,提取温度 60 ℃,提取时间 40 min;总还原力的最

佳提取工艺为乙醇浓度 90%,料液比 1 g : 70 mL,提取温度为 60 ℃,提取时间 40 min。阴地蕨根黄酮类化合物对 $\cdot OH$ 、 O_2^- ·、DPPH \cdot 均具有较强的清除作用,且其总还原能力强,说明阴地蕨根中的黄酮是一种很好的、潜在的抗氧化植物资源。

参考文献:

- [1] 张杭,张敬杰,刘亚华,等. 贵州苗医常用的蕨类植物[J]. 中国民族药杂志,2012(7):27-28.
- [2] 刘芹,黎远军,鲁宗成,等. 阴地蕨生物学功能的研究进展[J]. 中国医药导报,2014,11(23):151-153.
- [3] 庄捷,阮君山. 小春花滴丸对小鼠免疫功能的影响[J]. 福建中医药,2007,38(3):40-41.
- [4] 王少明,阮君山. 小春花对小鼠二阶段皮肤乳头状瘤的抑制作用[J]. 中药材,2008,31(3):418-420.
- [5] 王少明,阮君山,庄捷. 小春花口服液对慢性支气管炎模型小鼠病理形态影响及祛痰作用[J]. 福建中医药,2001,32(3):18-19.
- [6] 黎远军,刘芹. 阴地蕨提取物对运动训练大鼠肾脏抗氧化能力的影响[J]. 江西农业学报,2015,27(5):84-86.
- [7] 阮君山,庄捷,周欢,等. 小春花对肝纤维化小鼠肝功能及 TGF β_1 、CTGF 水平的影响[J]. 福建医药杂志,2011,33(6):86-88.
- [8] 陈敏,林宇星,林凌,等. 高效液相色谱法测定小春花口服液木犀草素含量[J]. 福建医科大学学报,2007,41(4):361-362.
- [9] 杨转琴,王磊,范娜,等. 柚皮黄酮化合物含量及抗氧化活性的研究[J]. 食品科学,2006,27(4):102-105.
- [10] 杜蕾,李新华,张振. 超声波辅助提取黑花生衣黄酮工艺优化[J]. 食品工业科技,2013,34(17):259-263.
- [11] 沙迪,姜芝伊,徐红艳. 山核桃壳中黄酮提取及其抗氧化活性测定[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):319-322.
- [12] 薛梅,李晓英,周卫平. 龙牙百合花总黄酮提取工艺及抗氧化性[J]. 江苏农业科学,2017,45(2):182-184.
- [13] 白生文,汤超,田京,等. 沙棘果渣总黄酮提取工艺及抗氧化活性分析[J]. 食品科学,2015,36(10):59-64.
- [14] 陶永元,舒康云,董洪丽,等. 西番莲黄酮的提取及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2014,35(17):25-29.
- [15] 樊琛,杜晓,程霜,等. 金银花抗自由基能力的检测[J]. 食品研究与开发,2015,36(20):134-137.
- [16] 储维维,张焯,段晓梅,等. 大理野生蕨菜总黄酮的提取及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2016,37(2):52-57.
- [17] 李波,包怡红,高峰,等. Sephadex LH-20 纯化红松球烯片多酚及其体外抗氧化研究[J]. 食品工业科技,2014,35(7):57-61.
- [18] 董兰芳,张琴,童潼,等. 方格星虫体腔液多糖的提取及体外抗氧化活性[J]. 食品研究与开发,2015,36(11):46-49.
- [19] 毛迪锐,姜贵全,张卓睿,等. 超声波辅助提取文冠果壳总黄酮的工艺及其抗氧化性研究[J]. 食品工业科技,2015,36(19):237-242.
- [20] 王丽,邵金良,魏茂琼,等. 普洱茶中黄酮类化合物含量的测定方法[J]. 江苏农业学报,2016,32(6):1410-1415.
- [21] 林晓,于恩江,刘珊珊,等. 三七渣总黄酮提取及其抗氧化活性的研究[J]. 食品研究与开发,2015,36(11):43-46.