

## 不同提取法对广金钱草总黄酮抗氧化活性的影响研究<sup>①</sup>

林瑶<sup>1</sup>, 谭冰<sup>2</sup>, 韦文荣<sup>3</sup>, 张天育<sup>3</sup>, 钟建<sup>4</sup>, 刘春媚<sup>4</sup>, 黄锁义<sup>1②</sup>

(1. 右江民族医学院药学院, 广西 百色 533000 E-mail: linyao929@163.com;

2. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院药学院 2014 级药学本科 1 班, 广西 百色 533000;

4. 右江民族医学院药学院 2012 级药学本科 2 班, 广西 百色 533000)

**摘要:** **目的** 研究不同提取法对广金钱草总黄酮提取物体外抗氧化活性的影响。**方法** 以乙醇为溶剂采用回流法和超声法提取广金钱草总黄酮, 并对两种提取法所得提取物进行一系列体外抗氧化活性的测定。**结果** 回流法提取物清除 DPPH 自由基、超氧自由基和羟基自由基的  $IC_{50}$  值分别为 0.037 mg/ml、0.034 mg/ml 和 0.034 mg/ml。超声法提取物清除 DPPH 自由基、超氧自由基和羟基自由基的  $IC_{50}$  值分别为 0.041 mg/ml、0.050 mg/ml 和 0.036 mg/ml。**结论** 用回流法和超声法提取广金钱草总黄酮具有良好的抗氧化性和清除自由基的作用, 但回流提取法提取物的抗氧化性和清除自由基的作用较超声法强。

**关键词:** 广金钱草; 黄酮提取物; 体外抗氧化性; 超声提取法; 回流提取法

**中图分类号:** R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2016)04-0364-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.04.003

### Effects of different extraction methods on antioxidant activity of total flavonoids from *Herba Desmodii*

Lin Yao<sup>1</sup>, Tan Bing<sup>2</sup>, Wei Wenrong<sup>3</sup>, Zhang Tianyu<sup>3</sup>, Zhong Jian<sup>4</sup>, Liu Chunmei<sup>4</sup>, Huang Suoyi<sup>1</sup>

(1. *Pharmacy College, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China*  
E-mail: linyao929@163.com; 2. *Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for  
Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China*; 3. *Undergraduate Student, Grade 2014  
of Pharmacy College, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000,  
Guangxi, China*; 4. *Undergraduate Student, Grade 2012 of Pharmacy College,  
Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China*)

**Abstract:** **Objective** To study the effects of different extracting methods on antioxidant activity of total flavonoids from *Herba Desmodii*. **Methods** A reflux extraction method and an extraction ultrasonic method were used to extract *Herba Desmodii* flavonoid using ethanol as solvent. A series of determinations for in vitro antioxidant activity of *Herba Desmodii* flavonoid extracts obtained by two extracting methods were carried out.

**Results** The  $IC_{50}$  values of reflux extracts in DPPH free radical scavenging, superoxide radical scavenging and hydroxyl radical scavenging were 0.037 mg/ml, 0.034 mg/ml and 0.034 mg/ml, respectively. The  $IC_{50}$  values of ultrasonic extracts in DPPH free radical scavenging, superoxide radical scavenging and hydroxyl radical scavenging were 0.041 mg/ml, 0.050 mg/ml and 0.036 mg/ml, respectively. **Conclusion** The *Herba Desmodii* flavonoids extracted by reflux extraction method and ultrasonic extraction method have good antioxidant and free radical scavenging results, but the reflux extracts have better antioxidant and free radical scavenging results than ultrasonic extracts.

**Key words:** *Herba Desmodii*; flavonoid extract; antioxidant activity in vitro; ultrasonic extraction; reflux extraction

① **基金项目:** 国家中医药管理局“十二五”中医药重点学科中药化学建设项目(国中医药人教发[2012]32号); 广西高校右江流域特色民族药研究重点实验室项目; 右江民族医学院 2012~2013 年度院级科研项目(右医院字[2013]66号); 2015 年度广西高校科学技术研究项目(KY2015LX291)

② **通讯作者,** E-mail: huangsuoyi@163.com

广金钱草是一种常用的中草药,是豆科植物中广金钱草[*Desmodium styracifolium* (Osh.) Merr.]的地上干燥部分,收录在《中华人民共和国药典》2010 年版中<sup>[1]</sup>。广金钱草有清热利湿、通淋排石作用<sup>[2]</sup>,含有黄酮类、皂苷类、鞣质和生物碱等诸多成分<sup>[3-5]</sup>。经过药理研究证明:广金钱草的总黄酮拥有预防草酸钙结石形成及复发的作用<sup>[6-7]</sup>,另外,还有着显著的抗炎<sup>[8]</sup>和增加冠脉血流量等的作用<sup>[9-10]</sup>。

本文拟研究其黄酮化合物的体外抗氧化活性作用,依次对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)由基、超氧自由基、羟基自由基的清除能力以及还原  $\text{Fe}^{3+}$  能力进行分析,对于开发中草药,从而获得更好的天然的抗氧化剂,逐渐取代一些存在一定的毒性、致畸性和潜在的致癌性的化学合成的抗氧化剂,具有十分重要的现实意义,并为广金钱草的全方位开发应用积累有价值的资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 原料 广金钱草购买于百色市生物药品连锁公司健康药房,经百色市食品药品检验所黄必奎副主任药师鉴定为正品广金钱草。

1.1.2 主要试剂 试剂芦丁标准品(纯度:98%,批号:100080-200306,来源:上海永叶生物科技有限公司);DPPH(梯希爱上海化成工业发展有限公司);铁氰化钾(广州化学试剂厂);三氯乙酸(国药集团化学试剂有限公司);邻苯三酚(上海迈坤化工有限公司);无水乙醇、乙醚、正丁醇、盐酸等试剂均为国产分析纯;双蒸馏水(右江民族医学院科学实验中心制备的三蒸水)。

1.1.3 主要仪器 FW100 型高速万能粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);BS/BT223S 电子分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司,精度:0.1 mg);H-11 型电热式恒温水浴锅(江苏金坛宏凯仪器厂);SHB-III 型循环水真空泵(广州市星烁仪器有限公司);RE-3000A(3L)型旋转蒸发仪(上海亚荣生化生化仪器厂);台式离心机(上海安亭科学仪器厂);78WH-1 恒温磁力搅拌器(杭州蓝天化验仪器厂);722 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);KS260 摇床(上海普林斯顿生物科技发展有限公司);ALPHA1-2/LD-plus 冷冻干燥机(广州倍立思仪器有限公司)。

1.2 方法 将广金钱草烘干,用粉碎机粉碎成细粉备用。

1.2.1 回流法提取 称取 50 g 广金钱草细粉于 1 000 ml 圆底烧瓶中,加 60%乙醇 500 ml 于圆底烧瓶中,将烧瓶置于 90 ℃水浴中回流提取 2 h,过滤。滤渣再加 500 ml 60%乙醇回流提取 2 h,过滤。重复回流提取 3 次,合并 3 次滤液,减压回收乙醇至滤液剩下

400 ml 左右,80 ℃水浴浓缩至膏状,用 60%乙醇溶解于 500 ml 容量瓶中并定容至刻度,得回流提取法的样品溶液。

1.2.2 超声法提取 称取 50 g 广金草细粉于 1 000 ml 圆底烧瓶中,加 60%乙醇超声提取 2 h,过滤,滤渣再加 60%乙醇 500 ml 超声提取 2 h,过滤。重复超声提取 3 次,合并 3 次滤液,减压回收乙醇至滤液剩下 400 ml 左右,80 ℃水浴浓缩至膏状,用 60%乙醇溶解于 500 ml 容量瓶中并定容至刻度。得超声提取法的样品溶液。

### 1.2.3 含量测定

1.2.3.1 芦丁标准溶液的配制 准确称取芦丁 1.0000 g 于 100 ml 干净的小烧杯中用 60%乙醇溶解,转移至 100 ml 的容量瓶中,用 60%乙醇润洗 3 次小烧杯,3 次润洗液均转移到容量瓶并定容至刻度。得芦丁标准样品液。

1.2.3.2 芦丁标准曲线的绘制<sup>[11]</sup> 本实验以芦丁为标准品,分别配置 6 个不同浓度梯度的芦丁标准液,以空白试剂作对照液,在 510 nm 处测定吸光值。以吸光度值为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,得到回归方程:  $Y = 16.774X - 0.0062$ ,  $R = 0.9998$ ,结果表明,在上述条件下,吸光度值与芦丁的浓度呈良好的线性关系。

1.2.3.3 提取物含量的测定 采用亚硫酸钠-硫酸铝比色法测定总黄酮的含量<sup>[12]</sup>,精密吸取样品液 1 ml 于 10 ml 容量瓶中,按标准曲线的制备方法来测定样品液的吸光值,计算得回流提取样品液中的总黄酮的提取率为 0.45 mg/100 g 生药,超声法提取样品液中总黄酮的提取率为 0.39 mg/100 g 生药。

1.2.4 总黄酮提取物对 DPPH 自由基的清除能力测定<sup>[13]</sup> DPPH 是一种稳定的自由基,能与还原剂发生氧化还原反应,而本身被还原,由原来的深紫色变为浅黄色,能用紫外可见分光光度法测定其含量。取 0.5 ml 新鲜配制的 DPPH 溶液( $C = 6 \times 10^{-4}$  mol/L),置于 10 ml 具塞试管中,分别加入不同体积的样品溶液,用无水乙醇定容至 5 ml,室温下黑暗中反应半小时,用无水乙醇调零,于 510 nm 处测定其吸光值 A。以高浓度逐渐稀释的方法来检测不同总黄酮浓度样品液对 DPPH 自由基的清除能力,以 DPPH 自由基清除率为 50%时的样品液浓度( $\text{IC}_{50}$ )来衡量样品对 DPPH 自由基的清除能力。 $\text{IC}_{50}$  越小,表明样品液清除 DPPH 自由基的能力越强。

$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [(A_1 - A_2)/A_1] \times 100\%$ ,其中  $A_1$  为反应时间  $t = 0$  时的空白吸光值, $A_2$  为反应时间  $t = 0.5$  h 时的吸光值。

1.2.5 总黄酮提取物清除超氧自由基能力的测定<sup>[14]</sup>

本实验采用邻苯三酚自氧化法进行总黄酮提取物清

除超氧自由基能力测定。其具体步骤如下:取 4 ml 0.05 mol/L、pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液于具塞试管中,在 25 ℃ 水浴中预热 20 min,分别加入以体积递增法配制不同浓度的样品液 1 ml,再加入 0.8 ml 由 10 mmol/L HCl 配制的 2.5 mmol/L 邻苯三酚,摇匀后于 25 ℃ 水浴中准确反应 4 min,时间到后马上加入 2 滴 10 mmol/L HCl 来终止反应,用蒸馏水调零,于 320 nm 处测定其吸光值 A。

超氧自由基清除率公式:清除率(%)=[1-(A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>)/A<sub>0</sub>]×100%,其中 A<sub>0</sub> 为加邻苯三酚而不加样品液的吸光值;A<sub>1</sub> 为加样品液和邻苯三酚时的吸光值;A<sub>2</sub> 为加样品液而不加邻苯三酚时的吸光值。

### 1.2.6 总黄酮提取物对羟基自由基清除能力的测定

本实验参照 Fenton 反应的方法建立反应体系模型<sup>[15]</sup>,利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 Fe<sup>2+</sup> 反应生成 OH·。Fe<sup>2+</sup> 与邻菲罗啉在 pH=2~9 的范围内能形成稳定的橙红色络合物,在 510 nm 处有最大的吸收峰。反应式:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Fe<sup>2+</sup>→Fe<sup>3+</sup>+OH·+OH<sup>-</sup>,如果反应体系中加入有能清除 OH· 的被测物,与邻菲罗啉竞争 OH·,进而使有色物质的生成减少,反应液颜色变浅。当加入广金钱草总黄酮溶液时,广金钱草总黄酮能清除反应液中游离的 OH·,故可通过测定其吸光值间接计算出样品液中总黄酮提取物对 OH· 的清除率。

羟基自由基清除率(%)=(A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>)/(A<sub>0</sub>-A<sub>1</sub>)×100%,其中 A<sub>0</sub> 为加样品液不加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;A<sub>1</sub> 为加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 不加样品液;A<sub>2</sub> 为加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和样品液。

采用 Fenton 反应生成 OH·,在 10 ml 具塞试管中依次加入 5 mmol/L 邻菲罗啉 0.2 ml,Tris-HCl 缓冲溶液(50 mmol/L,pH6.6)1 ml,7.5 mmol/L 硫酸亚铁 0.2 ml,1%过氧化氢 0.2 ml,和不同体积的广金钱草总黄酮提取溶液,用无水乙醇定容至 10 ml,于 37 ℃ 恒温水浴锅内反应 1 h,在 510 nm 处测定其吸光值。

1.2.7 还原 Fe<sup>3+</sup> 能力的测定 采用普鲁士兰法测定样品液还原 Fe<sup>3+</sup> 的能力。在 15 ml 具塞试管加入不同浓度的样品液 2 ml 后,依次加入磷酸盐缓冲液(C=0.2 mol/L,pH6.6)2 ml,1%铁氰化钾 2 ml,混合均匀后于 50 ℃ 水浴中反应 20 min,然后分别加入 2 ml 10%三氯乙酸,混匀,若出现沉淀则离心(3 000 r/min)10 min,取上清液 2 ml,加入 2 ml 蒸馏水和 0.1%三氯化铁 0.1 ml,混匀后以空白试剂作对照液,于 700 nm 处测定其吸光值,吸光值增大说明还原能力增强。

## 2 结果

### 2.1 总黄酮提取物对 DPPH 自由基的清除能力测定

见图 1。两种提取方法在实验浓度 0.020~0.080 mg/ml 内,随着总黄酮提取物浓度的增加,对 DPPH

自由基的清除能力也随着增大,当 DPPH 自由基清除率为 50%时,回流法提取总黄酮的 IC<sub>50</sub> 为 0.037 mg/ml,超声法提取总黄酮的 IC<sub>50</sub> 为 0.041 mg/ml。清除效果:回流法>超声法。

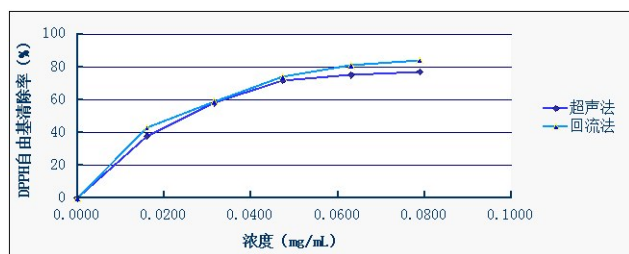


图 1 广金钱草总黄酮提取物对 DPPH 自由基的清除率

### 2.2 总黄酮提取物清除超氧自由基能力的测定 见图 2。

在实验浓度 0.020~0.100 mg/ml 中,随着浓度的增大,清除超氧自由基的能力也增强,当清除率为 50%时,回流法提取物的 IC<sub>50</sub> 为 0.034 mg/ml,超声法提取物 IC<sub>50</sub> 为 0.050 mg/ml。清除效果:回流法>超声法。

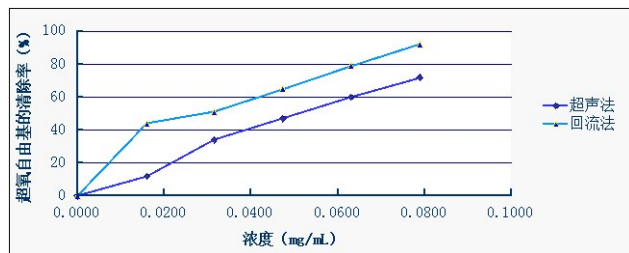


图 2 广金钱草总黄酮提取物对超氧自由基的清除率

### 2.3 总黄酮提取物对羟基自由基清除能力的测定 见图 3。

在实验浓度 0.020~0.100 mg/ml 内,随着浓度的增大,提取物对羟基自由基的清除能力也随着增大。当清除率为 50%时,回流法提取物的 IC<sub>50</sub> 为 0.034 mg/ml,超声法提取物的 IC<sub>50</sub> 为 0.036 mg/ml。清除效果对比不明显。

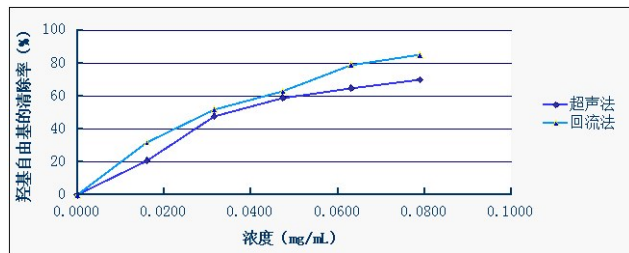


图 3 广金钱草总黄酮提取物对羟基自由基的清除率

### 2.4 还原 Fe<sup>3+</sup> 能力的测定 见图 4。随着广金钱草



总黄酮浓度的增大,其还原能力增强。在相同的条件下,回流提取总黄酮还原  $\text{Fe}^{3+}$  的能力较超声提取总黄酮的强。

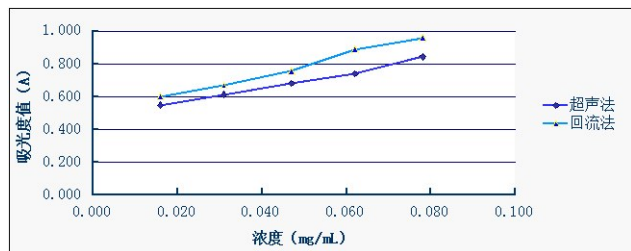


图 4 广金钱草总黄酮提取物还原  $\text{Fe}^{3+}$  的能力

### 3 讨论

黄酮类(flavonoides)的化合物是由植物进行光合作用产生的一类化合物,它的药用价值不错,具有广泛的药理活性,比如:抗心脑血管病、抗炎镇痛、抗衰老、抗氧化、抗癌抗肿瘤、抗辐射、治疗骨质疏松、降血糖、抑菌抗病毒、免疫调节等药理活性<sup>[16-17]</sup>,而且,相较于化学合成药具有不良反应小的特点。而现代研究表明<sup>[18-19]</sup>,氧化损伤机制在疾病的发生发展过程中起到十分重要的作用,而且中药中起到治疗效果的成分是具有抗氧化性的。如今许多多发性的疾病如心脑血管疾病、癌症及老年痴呆等的发病都与自由基损伤有着不同程度的关系。因此黄酮类化合物一直是人们寻找新药的一个重要领域。

上述实验结果表明,用回流法和超声法提取的广金钱草总黄酮对 DPPH 自由基、超氧自由基和羟基自由基均具有清除作用,而且,在一定的条件下,随着广金钱草总黄酮浓度的增大,清除能力也随之增大。此外,广金钱草总黄酮具有还原  $\text{Fe}^{3+}$  的能力,并且,在一定条件下,还原能力的大小与广金钱草总黄酮的浓度呈正比,说明:广金钱草总黄酮具有一定的抗氧化活性,可作为抗氧化剂进行研究。且回流提取法清除 DPPH 自由基、超氧自由基与还原  $\text{Fe}^{3+}$  的能力较超声法强。本实验所建立的回流提取方法与超声提取方法相比,具有较高的富集和提取效率,方法迅速、经济,更利于工业大生产的实际应用,可为利用广金钱草总黄酮进行新药开发提供依据。

近年来,植物药的研究受到广泛青睐,而黄酮类化合物的广谱药理作用更受青睐。黄酮类化合物是一大类天然产物,广泛存在于植物界,是许多中草药的有效成分,具有很高的药用价值。在自然界中,最常见的有黄酮和黄酮醇,其他的还包括双氢黄(醇)、异黄酮、双黄酮、黄烷醇、查尔酮、橙酮、花色苷及新黄酮类等<sup>[20-21]</sup>。广金钱草中黄酮含量较高,具有很高的开发利用价值,值得综合利用。

### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2015 年版第一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:44-45.
- [2] 蓝荣叁,刘桂胜,阙露露,等. 急诊体外震波碎石治疗输尿管结石 528 例报告[J]. 右江民族医学院学报,2008,30(6):988.
- [3] 杨峻山,苏亚伦,王玉兰. 广金钱草化学成分的研究[J]. 药学学报,1993,28(3):197-201.
- [4] 苏亚伦,王玉兰,杨峻山. 广金钱草黄酮类化学成分的研究[J]. 中草药,1993,24(7):343-344.
- [5] 王植柔,白先忠,刘锋,等. 广金钱草化学成分的研究[J]. 广西医科大学学报,1998,15(3):10-14.
- [6] 王植柔,白先忠,覃光熙,等. 广金钱草主要成分防治尿石症的实验研究[J]. 中华泌尿外科杂志,1991,12(1):13-16.
- [7] 李静,贺绍君,刘德义,等. 金钱草防治泌尿系统结石机理研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2015,17(3):97-81.
- [8] 阎婷,李益生. 金钱草总黄酮的抗炎活性[J]. 中国老年学杂志,2015,35(19):5394-5396.
- [9] 熊颖,王俊文,邓君. 金钱草和广金钱草的药理作用比较[J]. 中国中药杂志,2015,40(11):2106-2111.
- [10] 范文昌,梅全喜,赖海标. 广金钱草的药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国药房,2010,31(21):2961-2963.
- [11] 张丽丹,罗建华,蒙春越,等. 鸡骨草总黄酮提取及对羟自由基清除作用[J]. 微量元素与健康研究杂志,2007,24(2):44-46.
- [12] 王欣,李向,王红庆. 诸葛菜黄酮类化合物提取方法和抗氧化性研究[J]. 安徽农业科学杂志,2007,35(27):8667-8669.
- [13] 温昭君,何燕平,吴韦柳,等. 茉莉花茎的体外抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(8):1866-1867.
- [14] 潘延啟,文全泰,黄礼德,等. 土人參多糖的抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(1):30-32.
- [15] 莫丽玲,肖词英,黄锁义,等. 八角叶总黄酮的提取及其捕获自由基作用研究[J]. 中国野生植物资源,2011,30(1):50-53.
- [16] 朱丹,袁芳,孟坤,等. 黄酮类化合物的研究进展[J]. 中华中医药杂志,2007,22(6):387.
- [17] 李红,郅洁,马彦梅,等. 沙枣黄酮的提取及其抗氧化作用的研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(1):35.
- [18] Arruda SF, Souza EMT, Siqueira EMA. Carotenoids from malnga (*Xanthosoma sagittifolium*) leaves protect cells against oxidative stress in rats[J]. Int J Vitam Nutri Res,2005,75(2):161-168.
- [19] Jagtap UB, Panaskar SN, Bapat VA. Evaluation of Antioxidant Capacity and Phenol Content in Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) Fruit Pulp[J]. Plant Foods Hum Nutr,2010,65(2):102.
- [20] 罗建华,黄锁义. 益母草总黄酮的提取及其对羟自由基的清除作用[J]. 右江民族医学院学报,2006,28(5):710-712.
- [21] 夏杏洲,张辉,魏传晚. 榕树叶中黄酮类化合物的提取条件研究[J]. 食品研究与开发,2002,23(5):35-37.

收稿日期:2016-02-02;修回日期:2016-05-30