淫羊藿药渣总糖提取工艺、剩余黄酮含量测定与抗氧化活性研究*

潘 雄[1**], 李齐激[2], 杨 勇[1,2], 杨 娟[2], 杨小生[2***]
(1. 贵州大学 药学院,贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院 天然产物化学重点实验室,贵州 贵阳 550014)

[摘 要] **目的:** 了解淫羊藿药渣中总糖与黄酮的残留情况,为淫羊藿药渣的二次开发提供运用依据。**方法:** 以水为提取剂,考察提取温度、提取时间和料液比对淫羊藿药渣总糖提取率的影响;在单因素试验获得最优淫羊藿药渣总糖提取工艺的基础上,采用正交试验确定淫羊藿药渣中总糖的最佳提取工艺,采用紫外 - 可见分光光度法,以芦丁为对照品,在 270 nm 处测定吸光度,计算总黄酮的含量并测定其抗氧化活性。**结果:** 提取时间为 3 h时淫羊藿药渣总糖提取率最大,2 h 略小于 3 h,当提取时间再增加时提取率反而有所下降,从时间成本等因素考虑,选择 2 h 为最佳提取时间;提取温度为 90 ℃时淫羊藿药渣总糖提取率最大,当提取温度再增加,提取率下降,以 90 ℃为最佳提取温度;料液比为 1∶ 30 时,淫羊藿药渣总糖提取率最大,以此料液比作为最佳提取条件;影响淫羊藿药渣总糖提取率的各因素主次顺序为提取温度(A) > 料液比(C) > 提取时间(B),提取温度为 100 ℃,提取时间为 3 h,料液比为 1∶30 时,淫羊藿药渣总糖的提取率为 4.03%;淫羊藿药渣中 36% 左右的黄酮类物质对 DPPH 自由基有较好的清除作用。**结论:** 选择最佳提取工艺可增加淫羊藿药渣中总糖的提取率,且淫羊藿药渣中一定量的黄酮类物质对 DPPH 自由基有较好的清除作用。

[关键词] 中草药提取物; 淫羊藿药渣; 总糖; 提取工艺; 正交试验; 黄酮; 抗氧化
[中图分类号] R931.71;R931.4 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2017)07-0767-05
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.07.006

Study on the Optimization of Extraction Technique of Total Sugar and Content Test and Antioxidant Activity of Flavonoids from *Herba Epimedii* Residue

PAN Xiong[1], Li Qiji[2], YANG Yong[1,2], YANG Juan[2], YANG Xiaosheng[2]
(*1. Pharmaceutical College, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the condition of total sugar and flavonoids in the residue of *Herba Epimedii* and to provide reference for *Herba Epimedii* residue secondary development. **Method**: Taking water as extracting agent, investigating effect of extracting temperature, extracting time and feed fluid on extracting ratio of *Herba Epimedii* residue total sugar. Optimized *Herba Epimedii* residue total sugar extracting technique was obtained from single factor test, adopting orthogonal test to determine the best extracting technique of *Herba Epimedii* residue total sugar; the absorbance was measured at 270 nm using UV-Vis spectrophotometry, rutin as the reference substance. The total flavonoid content was calculated and antioxidant activity was tested. **Result**: Best extraction rate of total sugar was 3 h, 2 h condition was slightly less than 3 h condition; while the increase of extraction time might lead the

*[基金项目]国家自然科学基金项目(81460597);贵州省科技厅农业攻关重点项目[黔科合 NY(2015)3005 - 1 号]
**贵州大学药学院 2015 级硕士研究生
***通信作者 E-mail:gzcnp@sina.cn
网络出版时间:2017 - 07 - 13 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170713.2305.013.html

extraction rate to decrease. Considering time cost, 2 h was the best extraction time. While the extraction temperature was 90 ℃, residue total sugar extraction rate was the best, while the increase of extraction temperature might lead the extraction rate would decrease; 90 ℃ should be the best extraction temperature. When the extracting agent ratio was 1∶30, residue total sugar extraction rate was the best; such extracting agent ratio should serve as the best extraction condition; influencing order of residue total sugar extraction rate were as follows: extraction temperature (A) > extraction rate (C) > extraction time (B). At 100 ℃, extraction time as 3 h, ratio of solid to liquid 1∶30, the extracting rate of total sugar reached 4.03 %. The remaining flavonoids in *Herba Epimedii* residue reached 36 % and had a better ability for the DPPH free radical scavenging. **Conclusion**: Optimal extraction technique could increase the extraction rate of residue total sugar extraction rate, while remaining flavonoids in *Herba Epimedii* residue had a better ability for the DPPH free radical scavenging.

[**Key words**] Chinese herbal medicine extracts ;*Herba Epimedii* residue; total sugar; extraction techniques; orthogonal expermien; flanovoid; anti-oxidation

随着我国中医药事业的迅速发展,中药药渣废弃量日益增加,年排放量达 3 000 万吨[1]。然而,目前对中药药渣的利用率还比较低,多采用焚烧、填埋等方式处理,也有部分被用作肥料施于田间、园林等。但在肥料运用方面,其肥效如何还有待研究,土壤微生物对它的分解转化能力和植物对它的吸收利用等情况都还需要研究认定,如果处理不当,它不仅是浪费,而且可能影响土质,因此怎样合理开发利用中药药渣,是一项值得研发的事业,亦属于中药二次开发[2]。目前,对淫羊藿属植物的研究大多是药理药效,而对提取工艺的研究相对较少[3];此外,长期以来人们更关注淫羊藿药材的药物成分,而忽略了对其药渣的研究,提取后的药渣一般都是直接丢弃,而淫羊藿药渣中总糖为营养物质的重要组成成分,黄酮类化合物为为主要活性成分,具有调节内分泌、改善心血管功能及抗肿瘤等药理活性[4-6],而这些成分未得到充分效利用,因此本试验针对淫羊藿药渣中总糖提取工艺与剩余黄酮的含量测定同时对其抗氧化活性进行研究,以期为淫羊藿药渣的综合利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),HH-4 恒温水浴锅(江苏省金坛市友联仪器研究所),XP-200 高速中药粉碎机(吉首市中诚制药机械厂),SHB-B95A 型循环水真空泵(郑州长城科工贸有限公司),UV-1800 型紫外可见分光光度计(岛津仪器(苏州)有限公司),XRC-08 超声波清洗器(成都鑫荣诚超声波科技有限公司),BZF-50 真空干燥箱(上海云泰仪器仪表有限公司)。淫羊藿药渣及淫羊藿原药材(贵州同济堂提供),苯酚,硫酸,葡萄糖,1,1 - 二苯基 - 2 - 苦基肼(DPPH),抗坏血酸,芦丁,醋酸钾,硝酸铝,乙醇,及纯水等。

1.2 淫羊藿药渣总糖的提取工艺

1.2.1 葡萄糖标准曲线的制作[7] 称取 105 ℃干燥到恒重的葡萄糖标准品 10.00 mg 置于100 mL容量瓶中,定容,得到葡萄糖标准液,置于冰箱中备用。分别取葡萄糖标准溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL于试管中,加水补足 2 mL,加新配制的 6% 苯酚 1 mL,浓硫酸 5 mL,迅速摇匀;沸水浴 20 min,冷却后 490 nm 处测吸光度值,求得回归方程 $A = 0.012\ 949 \times C + 0.022\ 7$,相关系数 $r = 0.999\ 1$,其中 C 为葡萄糖标准溶液浓度(mg/L),A 为 490 nm 下吸光度。

1.2.2 操作流程 淫羊藿药渣→65 ℃恒温干燥→粉碎→称取样品 0.5 g(精确到 1 mg)→加水恒温浸提→抽滤→取抽滤的液体→苯酚 - 硫酸法测定吸光度值→计算总糖得率。

1.3 淫羊藿药渣总糖提取条件单因素试验

1.3.1 提取时间选择试验 准确称取样品约 0.5 g(精确到 1 mg),以料液体比 1∶20,提取温度为90 ℃,分别考察提取时间为 1、2、3、4、5 h 时淫羊藿药渣总糖的提取率。

1.3.2 提取温度选择试验 准确称取样品约 0.5 g(精确到1 mg),提取时间由 1.2.2 确定,以料液体比 1∶20,分别考察提取温度为 60、70、80、90、100 ℃时淫羊藿药渣总糖的提取率。

1.3.3 提取料液比选择试验 准确称取样品约

0.5 g(精确到 1 mg),提取时间由 1.2.2 确定,提取温度由 1.2.2 确定,分别考察料液比为 1∶10、1∶20、1∶30、1∶40、1∶50(g/mL)时淫羊藿药渣总糖的提取率。

1.4　正交试验法优化提取淫羊藿药渣总糖条件

在单因素试验的基础上,以提取时间、温度和料液比 3 个因素作为主要因素,进行 L9(3^4)正交试验,因素与水平见表 1。

表 1　正交实验因素水平

Tab. 1　Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素		
	A/h	B/℃	C/g·mL
1	2	80	1∶20
2	2.5	90	1∶30
3	3	100	1∶40

注:A 表示时间,B 表示温度,C 表示料液比

1.5　淫羊藿药渣剩余黄酮的含量测定[8]

1.5.1　试样的制备　取样品粉末 1 g,精确到1 mg。置于烧杯中,加 95% 乙醇 30 mL,50 ℃超声 30 min;取出后冷却后过滤,转移到 50 mL 容量瓶中,95% 乙醇稀释至刻度,摇匀、待测,每组重复 3 次。

1.5.2　芦丁标准曲线的绘制　精密吸取芦丁对照品溶液(1.0 g/L)1、2、3、4、5 mL,分别置于50 mL 容量瓶中;加入 95% 乙醇至总体积为 15 mL,依次加入硝酸铝溶液(100 g/L)1 mL,醋酸钾溶液(9.8 g/L)1 mL,摇匀,加水至刻度,摇匀,静置1 h。用 1 cm 比色杯于 270 nm 处,以 30% 乙醇溶液为空白,测定吸光度。求得回归方程 A = C × 0.033 7 ~ 0.004 1,相关系数 r = 0.999 8,C 为淫羊藿对照品浓度(mg/L),A 为 270 nm 下吸光度。

1.5.3　样品的测定　取样 2.1.1 中样品液10 mL,置于 50 mL 容量瓶,加入 95% 乙醇稀释至刻度,依次加入硝酸铝溶液(100 g/L)1 mL,醋酸钾溶液(9.8 g/L)1 mL,摇匀,静置 1 h,270 nm 处测定其吸光度,根据标准回归方程计算淫羊藿药渣剩余黄酮的含量。

1.6　DPPH 自由基清除实验

参照 Srinivasa RK 等方法[9],测定淫羊藿药渣总黄酮提物的 DPPH 自由基清除率。取 DPPH(0.2 mmol/L)乙醇溶液 2 mL,加入到装有 2 mL 不同浓度淫羊藿药渣总黄酮提液的试管中,摇匀;然后在 37 ℃水浴中保温 30 min,于 517 nm 处测定吸光度,记为 A_i;用无水乙醇 2 mL 代替总黄酮提液,测得吸光度 A_0;用抗坏血酸(Vc)作阳性对照。每个实验重复 3 次。淫羊藿药渣总黄酮的抗氧化活性用 DPPH 自由基清除率来表示。公式为:DPPH 自由基清除率(%) = $(A_0 - A_i)/A_0 \times 100$

2　结果

2.1　时间对淫羊藿药渣总糖提取率的影响

由图 1 可知,提取时间为 3 h 时淫羊藿药渣总糖提取率最大,2 h 略小于 3 h,当提取时间再增加时提取率反而有所下降。从时间成本等因素考虑,选择 2 h 为最佳提取时间。

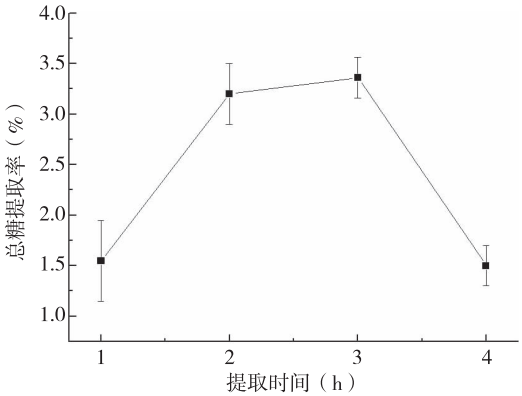


图 1　时间对淫羊藿总糖提取率的影响

Fig. 1　Effects of time on the yield of total sugar in *Herba Epimedii* residue

2.2　温度对淫羊藿药渣总糖提取率的影响

由图 2 可知,提取温度为 90 ℃时淫羊藿药渣总糖提取率最大,当提取温度再增加,提取率下降。故 90 ℃为最佳提取温度。

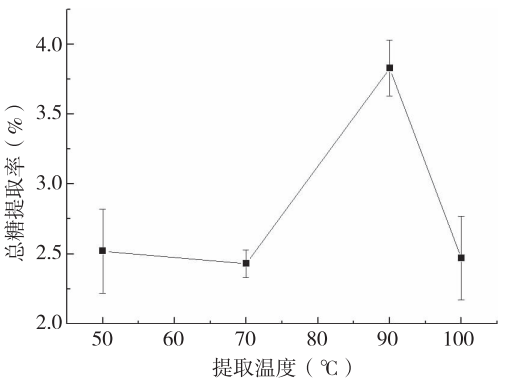


图 2　温度对淫羊藿总糖提取率的影响

Fig. 2　Effects of temperature on the yield of total sugar in *Herba Epimedii* residue

2.3　料液比对淫羊藿药渣总糖提取率的影响

由图3可知,料液比为1:30时,淫羊藿药渣总糖提取率最大。故料液比为1:30时为最佳提取条件。

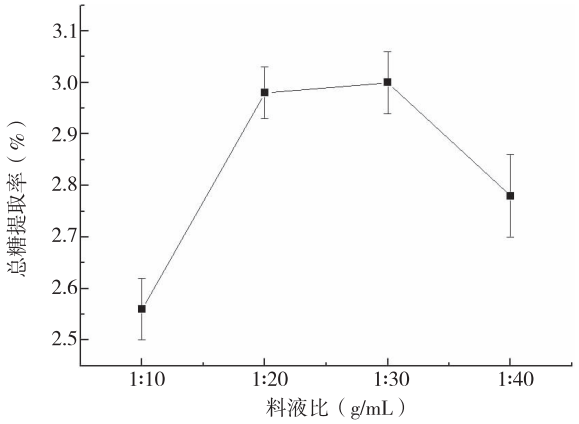


图3 液料比对总糖提取率的影响

Fig. 3 Effects of different ratio of solvent-to-solid on the yield of total sugar *in Herba Epimedii* residue

2.4 淫羊藿药渣总糖提取工艺的确定

影响淫羊藿药渣总糖提取率的各因素主次顺序为提取温度(A)>料液比(C)>提取时间(B)。正交试验对淫羊藿药渣总糖的提取工艺进行优化后,得最优工艺参数应为A3B3C2,即提取温度为100 ℃,提取时间为3 h,料液比为1:30。见表2。

表2 淫羊藿药渣总糖提取率的正交实验结果及极差分析

Tab. 1 Results of orthogonal experiment and the analysis of difference

实验号	因素			取率(%)
	A(h)	B(℃)	C(g/mL)	
1	1	1	1	3.20
2	1	2	2	3.19
3	1	3	3	3.37
4	2	1	2	3.31
5	2	2	3	3.15
6	2	3	1	3.31
7	3	1	3	3.44
8	3	2	1	3.09
9	3	3	2	4.03
K_1	9.75	9.96	9.60	
K_2	9.78	9.42	10.53	
K_3	10.56	10.71	9.96	
R	0.81	1.29	0.93	

注:A为提取时间,B为提取温度,C为料液比,R为同列K_i的极差值

2.5 淫羊藿药渣总黄酮含量

由表3可知,与原药材中的黄酮成分含量相比较,淫羊藿药渣中还有36%左右的剩余量。见表3。

表3 淫羊藿药渣提取液中黄酮含量

Tab. 3 Flavonoids content in in *Herba Epimedii* residue

药渣质量(g)	1.0 270 g	药渣质量(g)		
	(原药)	1.007	1.009	1.000
吸光度	0.408	0.141	0.138	0.130
黄酮含量(mg/L)	121.250	43.230	43.910	40.840
剩余黄酮含量的百分比(%)	100.000	36.360	36.860	34.590

2.6 淫羊藿药渣总黄酮的测定

通过对淫羊藿药渣总黄酮提取液及Vc溶液进行体外抗氧化试验,结果见表4。可知在相同条件下,对DPPH自由基清除率比Vc溶液弱,但也有较好的抗氧化活性,且随浓度增大,抗氧化活性逐渐增强。

表4 淫羊藿药渣总黄酮与Vc溶液对DPPH的清除率

Tab. 4 Effect of flavonoids in *Herba Epimedii* residue on DPPH radical scavenging rate

浓度(mg/L)	DPPH自由基清除率(%)	
	淫羊藿药渣总黄酮	Vc
16.0	43.4	58.3
12.8	36.0	44.9
9.6	28.8	34.4
6.4	20.1	21.7
3.2	9.3	10.1

3 讨论

本试验首次以淫羊藿药渣为材料,在单因素获得的基础上,采用正交试验探讨了提取时间、提取温度、料液比这3个因素对淫羊藿药渣总糖提取率的影响,确定了总糖提取的最佳工艺参数,即提取温度为100 ℃,提取时间为3 h,料液比为1:30。在此条件下总糖的提取率为4.03%。该提取工艺的研究为淫羊藿药渣再利用等工作奠定了较好的应用基础。黄酮类物质是淫羊藿药材中一类重要药用成分,具有广泛的生物活性和药用价值,主要表现在抗肿瘤、护肝、抗氧化、抗自由基等方面[10-11]。本试验发现,与原药材中的黄酮成分含量相比较,药渣中还有36%左右的剩余量,而且具有一定的抗氧化活性。因此可以采用酒精对淫羊藿药渣中剩余黄酮进行再提取,提取的黄酮可作为抗氧化剂

添加于各类食品或作为药用,从而提高淫羊藿药渣的再开发利用价值。

4　参考文献

[1] 周达彪,唐懋华. 中药渣农业循环利用模式产业化探讨[J]. 上海蔬菜, 2007(6):112 – 115.

[2]庄毅,洪净. 药用真菌双向性固体发酵工程与中成药药渣再开发[J]. 中国中药杂志, 2006(22):1918 – 1919.

[3]付亮,袁璟亚,丁春邦,等. 淫羊藿药渣中多糖的提取及其体外抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技, 2016(1):116 – 120.

[4]马婷,王丽娜,李子坚,等. 淫羊藿苷抗肿瘤作用的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2017(9):1505 – 1508.

[5]许碧连,吴铁. 淫羊藿总黄酮药理作用的研究现状[J]. 中国临床药理学与治学, 2003(1):115 – 117

[6]刘江亭,林永强,张学兰,等. 白术麸炒前后饮片和水煎液中总糖、多糖含量测定比较[J]. 中医药学报, 2016(5):15 – 17.

[7]陈纬,邹焰. 人参、淫羊藿增强小鼠免疫功能的协同作用[J]. 遵义医学院学报, 2001(1):2 – 6.

[8]张俊生,陈莉华,汤小虎,等. 淫羊藿总黄酮的超声辅助提取及其抗氧化活性[J]. 生物加工过程, 2012(1):13 – 18.

[9]Srinivasa RK, Chaudhury PK, Pradhan A. Evaluation of anti – oxidant activities and total phenolic content of Chromolaena odorata[J]. Food & Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2010(2):729 – 731.

[10]高锦明,植物化学[M]. 北京:科学出版社, 1995:156 – 191.

[11]雷永涛,李莉,郝小燕,等. 淫羊藿总黄酮的提取和分离纯化工艺研究[J]. 贵阳医学院学报, 2012(2):137 – 140.

(2017-04-18 收稿,2017-06-26 修回)
中文编辑: 刘　平; 英文编辑: 赵　毅

(上接第 762 页)

[12]Martelli C, Dei S, Lambert C, et al. Inhibition of P-glycoprotein-mediated Multidrug Resistance (MDR) by N, N-bis(cyclohexanol)amine aryl esters: Further restriction of molecular flexibility maintains high potency and efficacy[J]. Bioorg Med Chem let, 2011(21):106 – 109.

[13]Burg D, Riepsaame J, Pont C, et al. Peptide-bond modified glutathione conjugate analogs modulate GSTpi function in GSH-cojugation, drug sensitivity and JNK signaling[J]. Biochem Pharmacol, 2006(3):268 – 277.

[14]Perez-Sayans M, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, et al. Multidrug resistance in oral squamous cell carcinoma: The role of vacuolar ATPase[J]. Cancer Lett, 2010(2):135 – 143.

[15]Sun LR, Zhong Ji, Cui SX, et al. Modulation of P-glycoprotein activity by the substituted quinoxalinonc compound of QA3 in Adriamycin-resistant K562/A02 cells[J]. Pharmacol Rep, 2010(2):333 – 342.

[16]Ling X, He X, Apontes P, et al. Enhancing effectiveness of the MDR-sensitive compound T138067 using advanced treatment with negative modulators of the drug-resistant protein survivin[J]. AM J Transl Res, 2009(4):393 – 405.

(2017-02-18 收稿,2017-04-29 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 苏晓庆

(上接第 766 页)

[8]Reid JL, Wright TC, Stoler MH, et al. Human Papillomavirus oncogenic mRNA testing for cervical cancer screening[J]. American Journal of Clinical Pathology, 2015(3):473 – 483.

[9]Doorbar JJNM, Quint W, Banks L, et al. The Biology and life-cycle of human papillomaviruses[J]. Vaccine, 2012(Suppl. 5):F55 – F70.

[10]Schiller JTSM, Castellsague X, Garland SM. A Review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines[J]. Vaccine, 2012(Suppl. 5):F123 – F138.

[11]吴芳, 安永康, 朱艳琴. 内质网应激与肿瘤细胞凋亡研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2014(9):2228 – 2231.

[12]Zhu G, Lee ASAU. Role of the Unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis[J]. Journal of Cellular Physiology, 2015(7):1413 – 1420.

[13]Dong D, Dubeau L, Bading J, et al. Spontaneous and controllable activation of suicide gene expression driven by the stress-inducible grp78 promoter resulting in eradication of sizable human tumors[J]. Human Gene Therapy, 2004(6):553.

[14]周玮. GRP78 的表达与肿瘤发生发展的关系—Meta 分析[D]. 武汉:华中科技大学, 2011.

(2017-04-07 收稿,2017-06-26 修回)
中文编辑: 刘　平; 英文编辑: 乐　萍