

淫羊藿总黄酮水提工艺优化及抗氧化活性研究

【摘要】目的：探究淫羊藿总黄酮的水提工艺，通过单因素试验来研究料液比、提取时间和提取温度对其提取率的影响，并分析淫羊藿中总黄酮的抗氧化活性。**方法：**将总黄酮提取率作为测定指标，采用水提法提取淫羊藿中的总黄酮；在单因素试验的基础上，利用正交实验法优选出最佳的提取条件；根据消除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基和羟基自由基的能力，在体外评估淫羊藿总黄酮的抗氧化活性。**结果：**根据正交实验的结果，获得了最佳的提取工艺条件，即：料液比是 1：70 (g:mL)、水提的温度是 90 °C、水提的时间为 2.5 h，淫羊藿总黄酮提取率是 10.39%；抗氧化的研究表明，与抗坏血酸相比，在同等条件下，在 0.01~0.10 mg/mL 范围内，对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基的清除率优于抗坏血酸；在 0.1~0.4 mg/mL 范围内，对羟基自由基的清除率优于抗坏血酸的羟基自由基的清除率。**结论：**本实验所用到的提取方法是稳定可靠的，其抗氧化活性研究结果可为淫羊藿资源的开发与利用提供一定的科学依据。

【关键词】淫羊藿；总黄酮提取率；单因素实验；正交实验；抗氧化活性

Optimization of Water Extraction Process and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from *Epimedium*

[Abstract] Objectives: Exploring the water extraction process of total flavonoids from *Epimedium*. A single-factor test was used to investigate the effects of material-to-liquid ratio, extraction time and extraction temperature on its extraction rate. Study on the antioxidant activity of total flavonoids in *Epimedium*. **Methods:** Total flavonoid extraction rate was used as the measurement index. Extraction of total flavonoids using aqueous extraction. Based on the single-factor test, the optimal extraction conditions were optimized by orthogonal experiments. In vitro evaluation of the antioxidant activity of total flavonoids of *Epimedium* based on their ability to eliminate 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine radicals and hydroxyl radicals. **Results:** The optimal extraction process conditions were screened by orthogonal experiments. The material-to-liquid ratio was 1: 70 (g: mL), the temperature of water extraction was 90 °C, and the time of water extraction was 2.5 h. The extraction rate of total flavonoids of *Epimedium* under this condition was 10.39%. The results of antioxidant studies showed that the extracts showed better scavenging of 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine radical than ascorbic acid in the range of 0.01 to 0.10 mg/mL under the same conditions; The scavenging rate of hydroxyl radicals in the range of 0.1 to 0.4 mg/mL was better than that of hydroxyl radicals from ascorbic acid. **Conclusions:** The extraction method used in this experiment is stable and reliable, and the results of the antioxidant activity study can provide a scientific basis for the development and utilization of *Epimedium* resources.

[Keywords] *Epimedium* Extraction rate of total flavonoids Single factor experiment Orthogonal experiment Antioxidant activity

目 录

1 前言	1
2 材料与方法	3
2.1 材料、试剂与仪器.....	3
2.1.1 材料、试剂.....	3
2.1.2 实验主要仪器.....	3
2.2 方法.....	4
2.2.1 溶液配制.....	4
2.2.2 标准曲线的绘制与回归方程的建立.....	4
2.2.3 总黄酮浓度的测定.....	4
2.2.4 单因素试验设计.....	5
2.2.5 正交试验设计.....	5
2.2.6 验证实验.....	5
2.2.7 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除能力的测定.....	6
2.2.8 羟基自由基清除能力的测定.....	6
3 结果与分析	7
3.1 标准回归曲线测定结果.....	7
3.2 单因素实验结果.....	7
3.2.1 料液比对淫羊藿总黄酮提取率的影响.....	7

3.2.2 水提时间对淫羊藿总黄酮提取率的影响	8
3.2.3 水提温度对淫羊藿总黄酮提取率的影响	9
3.3 正交实验结果	10
3.4 验证实验结果	11
3.5 抗氧化性实验结果	12
3.5.1 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除能力的测定结果	12
3.5.2 羟基自由基清除能力的测定结果	13
4 讨论	14
5 结论与展望	15
5.1 结论	15
5.2 展望	15
参考文献	17
综述	19
致 谢	20

1 前言

淫羊藿 (*Epimedium*) 是一种常见的中草药, 也称为地肤子、淫羊草^[1-2]。其性味辛、甘、温, 在传统中药中有着广泛的应用, 主要用于治疗肝肾阳虚、阳痿早泄等疾病, 近年来一直是国内外研究的热点之一^[3-5]。淫羊藿以黄酮类为主要成分, 其中还包括酚苷类、木脂素类以及生物碱类等多种成分^[6]。淫羊藿总黄酮有多种提取方法, 如热水提取法、醇加热回流提取法等。一般情况下多选择正交实验法、响应面法来优化淫羊藿的总黄酮的提取工艺^[7], 通常正交实验法应用较多。本实验运用正交实验法对淫羊藿总黄酮水提工艺及抗氧化活性进行实验探究, 为其日后更深化的研讨提供一定的参考根据。

随着人口的快速增长, 工业的进步和技术的创新, 淫羊藿的黄酮提取研究得到不断深入。其中热水提取法别号煎煮法, 正常情况下需要操作两到三次, 过滤出来的药液要混合在一个容器内, 达到浓缩的目的。醇加热回流提取法作为提取黄酮类化合物使用最普遍的技术, 在一般情况下利用了乙醇作为提取溶剂。马慧萍等人运用这种方法提取, 在正交实验后得到淫羊藿苷和总黄酮较好的提取率, 为 83.75%和 81.03%, 它的重复性比较好^[8]。这种操作措施资金消耗较低, 对环境污染不严重, 可以普及。但是具体情况要具体分析, 因为每个样品的主要黄酮含量会不同, 所以与它相干的工艺参数以及醇的最佳浓度不可能一样。用这个方法提取, 如果用到乙醇, 那么它的浓度应该在 50%~70%之间; 超声波辅助提取法实际是使细胞的细胞膜和细胞壁破碎, 从而让它的化学成分能够进入到细胞外或者让溶剂从外进入到细胞内, 进而更好地提取目标成分, 主要应用了热效应、机械效应与空化效应这几个原理。张俊生等人使用正交实验优化了相关条件, 最后得到质量分数到达 2.246%的淫羊藿总黄酮^[9]; 对于超声波法的使用, 侯莹莹等人通过相关实验得到一个最终提取工艺, 在验证实验中得到了 0.66%的提取率, 接近理论值^[10]; 刘茂顺等使用酸碱沉淀法这一方法, 经过实验得到提取率为 6.67%的淫羊藿总黄酮^[11]; 微波辅助提取的方法是让细胞中的水分气化而破坏细胞壁。然后得到目标成分^[12]。周国保等

人使用了这个方法进行了实验，得到转移率是 10.7%，提取率方面，淫羊藿苷的是 2.54%，淫羊藿总黄酮的是 29.7%^[13]；超高压提取法则是通过压力的作用让细胞中的内外渗透压急剧变大，使流体静压力作用于药材，通常在 10 到 1000 Mpa 之间。张翔等人应用了这个方法，同时把超高压提取法与传统的热水浸提法、超声波提取法对比，表明超高压提取法是占优的^[14]。以上谈到的这几种提取工艺方案各有各的特点与短处，对于提取率较好的醇提法来看，它所用到的乙醇在对环境形成影响的同时，也有可能会引发爆炸和火灾等，安全与环保这一方面有待改进。酸碱沉淀法在酸碱值这一块要非常重视，它的合理调控需要更多的精力成本。超声波辅佐提取和微波辅助提取也是个更优的选择，同时它的提取率也较高。水提法适用于工业化大生产，它的规模可以进一步扩大，通过技术改革升级等，可以不断进步。水提法作为一种常见的制备淫羊藿总黄酮的方法，可以有效提高提取物的产量和有效成分的纯度。因此，不断优化淫羊藿总黄酮的水提法制备过程，以期为该领域的相关研究提供有用的参考。

淫羊藿是一种广泛应用于中药配方中的草本植物，具有多种生物活性，如抗肿瘤、抗炎和抗氧化等。其中，淫羊藿总黄酮是其主要活性成分之一，并且其抗氧化活性备受关注。抗氧化活性是指化合物对自由基和氧化应激的抵抗能力，具有重要的生物学意义和医学价值。而对于淫羊藿总黄酮的抗氧化活性的探求，基于自然产物的成分并不简单且具备多种多样的生物活性，从而易发生多种化学反应。抗氧化活性研究是天然产物领域的研究热点^[15-16]。因此，本次试验以淫羊藿总黄酮对两种自由基的消除能力对其抗氧化能力进行探究试验，可以为淫羊藿总黄酮的合理开发和利用提供了新的思路和方法，同时也为淫羊藿在抗氧化领域的应用奠定了一定的基础，对淫羊藿总黄酮抗氧化活性后续的研究具有一定的参考价值。

本试验先是考查了淫羊藿总黄酮的水提工艺，取得最佳提取条件后，应用于后续的抗氧化实验的样品制作，既有对传统工艺的改进，也有通过对抗氧化实验探索淫羊藿这一中药材应用于药品、食品、化妆品等领域的发展前景。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

2.1.1 材料、试剂

本实验所用材料为淫羊藿，来源为甘肃兰山区宝御康堂。

表1-1所列为本实验所需试剂。

表1-1 实验所需试剂

名称	来源
无水乙醇	广东光华科技股份有限公司
亚硝酸钠	天津市福晨化学试剂厂
氢氧化钠	天津市福晨化学试剂厂
硝酸铝	广东广试剂科技有限公司
芦丁标准品	源叶生物有限公司
亚硝酸铝	天津市福晨化学试剂厂
硫酸亚铁	广州化学试剂厂
水杨酸	天津市大茂化学试剂厂
过氧化氢	广州化学试剂厂
1,1-二苯基-2-三硝基苯肼	梯希爱（上海）化成工业发展有限公司
抗坏血酸（VC）	天津市天新精细化工开发中心
95%乙醇	广东光华科技股份有限公司

2.1.2 实验主要仪器

表 2-1 所 列 为 本 实 验 所 需 仪 器 。

表2-1 实验所需仪器

名称	型号	生产厂家
紫外分光光度计	721N	上海仪电分析仪器有限公司
万分之一电子天平	JA5003N	上海佑科仪器仪表有限公司
循环水式多用真空泵	SHZ-D3	河南省予华仪器有限公司
粉碎机	1000Y	永康市铂欧五金制品有限公司
恒温水槽	HWS26	上海-恒科学仪器有限公司

2.2 方法

2.2.1 溶液配制

(1) 在实验室中配制标准溶液，将10 mg的芦丁标准品精确地称取到一个50mL的容量瓶中，随后添加20 mL蒸馏水，在室温下溶解标准品，然后加足蒸馏水至容量刻度线，并充分摇匀。

(2) 在实验室中配制供试溶液：取100 g淫羊藿样品，制成80目粉末，然后从中精确称取0.5 g淫羊藿粉末加入圆底烧瓶中，按照一定的料液比例加入蒸馏水，加热水浴提取一定时间；过滤得到滤液，合并滤液，最后加入适量蒸馏水定容至50 mL，得到供试溶液。

2.2.2 标准曲线的绘制与回归方程的建立

使用精准的移液管，分别取芦丁标准溶液0.00 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.30 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80 mL、1.00 mL，加入到8个10 mL的容量瓶中。接下来，按照黄酮的显色方法，将5%亚硝酸钠0.3 mL、10%硝酸铝0.3 mL、1%氢氧化钠溶液4 mL分别加入每个容量瓶中。最后，使用蒸馏水至容量刻度线，并彻底摇匀。每加入一种试剂前均需要混合摇匀，并室温下放置6 min。制备芦丁标准溶液，作为实验的空白对照组，在波长为510 nm

的光线下，测量样品的吸光度，并将其作为纵坐标。同时，以样品的浓度作为横坐标，在相关的软件平台上可视化绘制标准曲线，得回归方程。

2.2.3 总黄酮浓度的测定

从供试溶液中取出1mL，加入到一个10 mL的容量瓶中。接下来，使用2.2.2部分描述的方法，测量样品吸光度。然后使用公式1，计算总黄酮的提取率。

$$\text{提取率} = \left[\frac{c \times n \times V}{m \times 1000} \right] \times 100\% \quad (\text{公式1})$$

其中：总黄酮的浓度用c表示，单位为mg/mL；稀释倍数用n表示；提取液的体积用V表示，单位为mL；淫羊藿粉末的质量用m表示，单位为g。

2.2.4 单因素试验设计

实验逐步研究了原料和溶剂的比例、水提时间以及水提温度对提取率的影响。

精密称取0.5 g淫羊藿粉末，分别以料液比为1:50、1:60、1:70、1:80、1:90（g/mL）进行水提，水提时间均为1.5 h，水提温度为70 °C。测定吸光度，按照2.2.3中的方法计算。

精密称取0.5 g淫羊藿粉末，采用1:60的料液比，水提时间分别设置为1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.0 h和3.5 h，在水提温度为70 °C的条件下进行实验。测定吸光度，按照2.2.3中的方法计算。

精密称取0.5 g淫羊藿粉末，水提温度分别设置为50 °C、60 °C、70 °C、80 °C和90 °C，料液比为1: 60，水提时间为1.5 h开展实验。测定吸光度，按照2.2.3中的方法计算淫羊藿总黄酮提取率。

2.2.5 正交试验设计

基于单因素实验的结果，选取淫羊藿总黄酮提取率作为评价指标，采用正交实验设计，以料液比、水提温度和水提时间为考察因素，设置三个水平，进一步优化淫羊藿总黄酮的水提工艺条件。

2.2.6 验证实验

在正交实验得到结果后，分析后，最优提取工艺条件得以明确，以之为基础，展开验证实验。称取药粉 3 份，在选择最佳提取工艺条件下，制备样品，显色之后，测定它的吸光度值大小，代入相关公式中计算淫羊藿总黄酮的提取率。

2.2.7 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除能力的测定

在精确称量 1 mg 的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼后，将其转移到 10 mL 容量瓶中。随后，加入适量无水乙醇，加至刻度线定容，摇匀后可以得到浓度为 0.1 mg/mL 的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼储备液，需在避光条件下保存备用。精密称取抗坏血酸和淫羊藿黄酮提取液适量，用蒸馏水配制成浓度为 0.01、0.03、0.05、0.10、0.50 mg/mL 的样品溶液。在混合液中分别吸取样品溶液 0.3 mL 和 0.9 mL 的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼储备液，混匀后放置于室温、避光条件下反应 30 分钟。在反应结束后，通过在 517 nm 处测定吸光度，记录吸光度值为 A_1 。随后，分别吸取 0.9 mL 的储备液和 0.3 mL 的蒸馏水，按照同样的方法测得吸光度值 A 。最后，吸取 0.9 mL 的无水乙醇和 0.3 mL 的样品溶液，按照同样的方法测得吸光度值 A_2 。计算公式如公式 2 所示。

$$\eta_{\text{DPPH}} \cdot (\%) = \frac{[A - (A_1 - A_2)]}{A} \times 100\% \quad (\text{公式2})$$

2.2.8 羟基自由基清除能力的测定

精密称取抗坏血酸和淫羊藿黄酮提取液适量，然后用蒸馏水配制成浓度为 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL 的各样品系列溶液。分别吸取各样品溶液 1.0 mL，依次加入 1.0 mL 的 FeSO_4 (10.0 mmol/L)、1.0 mL 水

杨酸-乙醇溶液(10.0 mmol/L)和1.0 mL过氧化氢(8.0 mmol/L)溶液于试管中，在37 °C的恒温水浴中反应30 min后,静置30 min,在波长510 nm处测定其吸光度值

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。

如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/265120002343011134>