

淫羊藿总黄酮清除 DPPH 自由基的 紫外 - 可见吸收光谱研究

姚金龙

(江西省医药学校制药工程系,江西 南昌 330200)

摘要:目的 研究淫羊藿总黄酮的提取、分离及纯化工艺,建立紫外-可见吸收光谱滴定法,评价淫羊藿总黄酮清除 DPPH 自由基的抗氧化活性。方法 通过保持其它条件不变,分别考察浸提温度、料液比和乙醇浓度对提取液中淫羊藿总黄酮含量的影响,设计三因素三水平的正交实验,提取温度 60℃-80℃,乙醇浓度 50%-70%,料液比 1:35-1:15,做 3 次平行实验,优化淫羊藿总黄酮的最佳提取工艺条件。结果 温度 70℃、60%乙醇浓度和 1:25 料液比是最优提取工艺条件,淫羊藿精提液中总黄酮质量浓度为 10.15 μg/ml,含量为 31.72%。光谱滴定法结果表明,淫羊藿总黄酮的质量浓度≥0.002 mg/ml 时,清除率达 79.17%。结论 淫羊藿总黄酮对 DPPH 自由基有很好的清除能力,抗氧化活性强。

关键词:淫羊藿总黄酮;紫外-可见吸收光谱;DPPH 自由基;抗氧化

中图分类号:R285;TS201.2

文献标识码:A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2020.20.053

文章编号:1006-1959(2020)20-0164-03

Study on the UV-Vis Absorption Spectra of Scavenging DPPH Free Radicals by Total Flavonoids of Epimedium

YAO Jin-long

(Department of Pharmaceutical Engineering,Jiangxi Medical School,Nanchang 330200,Jiangxi,China)

Abstract:Objective To study the extraction, separation and purification process of total flavonoids of epimedium, and establish a UV-Vis absorption spectrometric titration method to evaluate the antioxidant activity of total flavonoids of epimedium in scavenging DPPH free radicals.Methods By keeping other conditions unchanged, the effects of extraction temperature, material-to-liquid ratio and ethanol concentration on the total flavonoids content of epimedium in the extract were investigated respectively. An orthogonal experiment with three factors and three levels was designed, and the extraction temperature was 60℃-80℃,the ethanol concentration is 50%-70%, the material-liquid ratio is 1:35-1:15, three parallel experiments are performed to optimize the optimal extraction process conditions of the total flavonoids of epimedium.Results Temperature 70℃, 60% ethanol concentration and 1:25 solid-liquid ratio were the optimal extraction conditions. The mass concentration of total flavonoids of epimedium extract was 10.15 μg/ml and the content was 31.72%. The results of spectrometric titration showed that when the mass concentration of total flavonoids of epimedium ≥ 0.002 mg/ml, the clearance rate reached 79.17%.Conclusion The total flavonoids of epimedium had good scavenging ability to DPPH free radicals and strong antioxidant activity.

Key words: Total flavonoids of epimedium;UV-Vis absorption spectroscopy;DPPH free radical; Antioxidant

现代医学研究表明,自由基氧化损伤是引起多种疾病的根源^[1],自由基的进攻会使生命机体内的生物大分子如核酸(DNA、RNA)、酶、蛋白质、糖等发生氧化损伤,并导致生物膜的脂质过氧化,对内脏器官、免疫系统的形态功能产生影响^[2]。目前,已有研究证实羟基自由基 OH·能与 DNA 碱基发生加成反应造成 DNA 链的断裂和碱基对的损伤^[3];超氧自由基 O₂⁻与生物膜中的磷脂发生过氧化连锁反应,破坏膜的稳定性和完整性,甚至造成细胞的坏死;过剩的 O₂⁻还会引起炎症和肿瘤等^[4]。因此,清除自由基的研究已经成为了当今药理学领域的一大热点,研究发现,淫羊藿总黄酮^[5]具有优越的抗氧化性能,

该类化合物可以与自由基发生氧化还原反应,从而调节细胞处于还原状态,抵抗机体损伤,减少疾病的产生^[7],具有较好的研究前景。但目前淫羊藿总黄酮的提取工艺较多,提取质量不一,为其在临床的进一步应用造成了困难。为此,本文以淫羊藿总黄酮为研究对象,采用控制温度、乙醇浓度和料液比正交实验方法来优化淫羊藿总黄酮的最佳提取工艺条件,旨在为淫羊藿总黄酮的进一步研究提供帮助。

1 材料与仪器

主要仪器包括分光光度计、水浴锅、天平、干燥箱、烘干器等,试剂包括 DPPH、淫羊藿苷、乙醇(AR)、乙酸乙酯(AR)等,具体来源情况见表 1。

表 1 主要仪器与试剂

仪器	来源	材料	来源
T6 新世纪紫外分光光度计	北京普析通用仪器有限责任公司	淫羊藿叶	亳州市大西北药业有限责任公司
HH-2 数显恒温水浴锅	国华电器有限公司	DPPH	美国 Sigma 公司
MC 电子天平	梅特勒-托利多仪器有限公司	淫羊藿苷	美国 Sigma 公司
101-3AB 型电热鼓风干燥箱	天津市泰斯特仪器有限公司	乙醇(AR)	北京苏喆化工有限公司
HC-2000 粉碎机	永康市天祺盛世工贸有限公司	乙酸乙酯(AR)	北京苏喆化工有限公司
索氏提取器			
KQ-C 玻璃仪器气流烘干机	巩义市予华仪器有限责任公司		

作者简介:姚金龙(1992.11-),男,江西上饶人,硕士,主要从事中药活性成分及质量标准研究

2 方法与结果

2.1 淫羊藿总黄酮粗提液的制备 取淫羊藿叶粉碎,过 60 目筛,准确称取淫羊藿粉末 5.0 g,置于 250 ml 圆底烧瓶中,加入 60%乙醇 45 ml 室温浸泡辅助浸提 30 min,70 ℃回流 2 次,2 h/次,将提取液抽滤,得总黄酮粗提液。保持其它条件不变,分别考察浸提温度、料液比和乙醇浓度 3 个单因素对提取液中淫羊藿总黄酮含量的影响,设计三因素三水平的正交实验,优化得出淫羊藿总黄酮提取率最高的最佳条件,且每个单因素做三次平行实验。以淫羊藿总黄酮提取率为标准,因素水平见表 2,最后确定一种最优提取工艺,用于淫羊藿总黄酮的提取。

表 2 正交实验因素水平

水平	A 温度(℃)	B 乙醇浓度(%)	C 料液比
1	60	50	1:15
2	70	60	1:25
3	80	70	1:35

实验结果显示,影响淫羊藿总黄酮提取率的因素大小次序为:C>B>A,B 和 C 因数的 R 较大,说明淫羊藿总黄酮提取率主要受乙醇浓度和料液比 2 个因素制约,而提取温度影响不显著。根据 K 值的大小可知,淫羊藿总黄酮提取的最优条件为 A2B2C2,即微波功率为中低火-中火(300 W),提取温度为 70 ℃,乙醇浓度为 60%,料液比为 1:25,见表 3。

表 3 正交实验结果

因数	A 温度(℃)	B 乙醇浓度(%)	C 料液比	实验结果
1	1	1	1	0.318
2	1	2	2	0.590
3	1	3	3	0.575
4	2	1	2	0.591
5	2	2	3	0.603
6	2	3	1	0.532
7	3	1	3	0.492
8	3	2	2	0.589
9	3	3	1	0.525
K ₁	0.494	0.467	0.458	
K ₂	0.575	0.594	0.590	
K ₃	0.535	0.544	0.565	
R	0.081	0.127	0.132	

2.2 淫羊藿总黄酮的分离纯化 取淫羊藿粗提液,用乙酸乙酯萃取,萃取液旋转蒸发浓缩,真空低温干燥至恒重,得浸膏,称取适量浸膏加入适量蒸馏水配制成一定浓度的淫羊藿总黄酮精提液备用。

2.3 淫羊藿苷标准曲线的绘制 准确称取淫羊藿苷标准品 1.0 mg,用无水乙醇溶液稀释定容至 10 ml,摇匀,得淫羊藿苷储备液。分别精密吸取 0、0.25、0.50、0.75、1.0、1.25 ml 的淫羊藿苷储备液于一系列 25 ml 的比色管中,用无水乙醇稀释至刻度,摇匀。

以试剂空白作参比,在 $\lambda_{\max}=260$ nm 处测量其吸光度 A,以吸光度对淫羊藿苷溶液的浓度 C 作图,绘制标准曲线,用最小二乘法进行回归,得到吸光度 A 和淫羊藿苷标准溶液的浓度 C 的回归方程: $A=14.274C-0.0029$ ($r=0.9989$),见图 1。

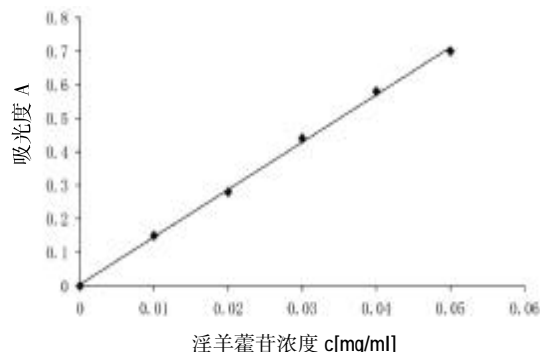


图 1 淫羊藿苷标准曲线

2.4 淫羊藿总黄酮含量的测定 按照 2.3 中的方法定量测定淫羊藿精提液在不同条件下的吸光度值,对应淫羊藿苷标准曲线方程,查找得到测定液中的总黄酮含量。经测定,淫羊藿精提液中总黄酮质量浓度为 10.15 $\mu\text{g/ml}$,含量达 31.72%。

2.5 DPPH 体系稳定性 研究随着时间的变化,DPPH 自由基的醇溶液中吸光度值的变化。结果发现,在 1 h 内,A 值保持稳定,见图 2,因此所有样品应在 1 h 之内测定完毕。

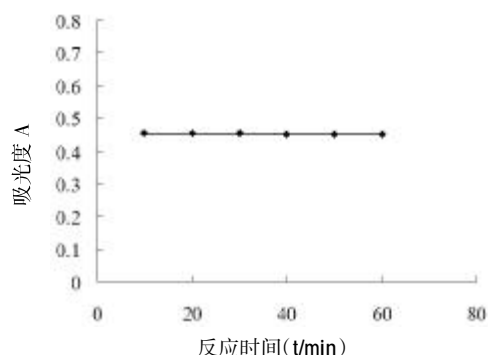


图 2 DPPH 体系稳定性

2.6 DPPH 反应体系的吸收光谱及测定波长的确定 在 DPPH 自由基清除法中,有机溶剂中的 DPPH 可形成稳定的具有两个典型的特征吸收峰的自由基,自由基颜色为紫红色。当反应体系中存在抗氧化剂时,抗氧化剂能提供出相应个数的氢原子和电子给 DPPH 自由基,使其生成 DPPH2,DPPH2 可以改变溶液的吸光度值和特征吸收峰,峰值变弱,吸光度降低。在此反应中,被测物质的抗氧化能力可以有体系颜色的变化来表示,颜色褪色越多,说明抗氧化能力越强。实验中用 UV-Vis 光谱对 DPPH 自由基溶液进行扫描。结果显示,DPPH 溶液在 517 nm 和 328 nm 处出现特征吸收峰,而淫羊藿总黄酮的吸收峰在 260 nm,见图 3。说明淫羊藿总黄酮本身在 517 nm 处不会对 DPPH 测定造成光谱干扰,因此实验以

517 nm 作为 DPPH 自由基清除实验的检测波长。

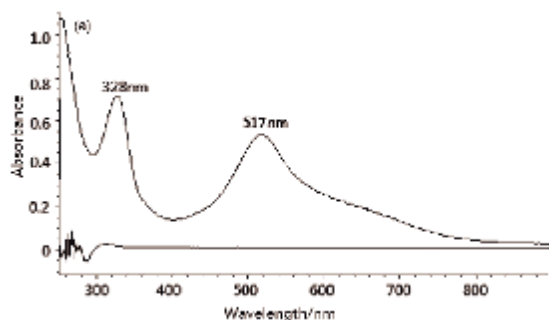
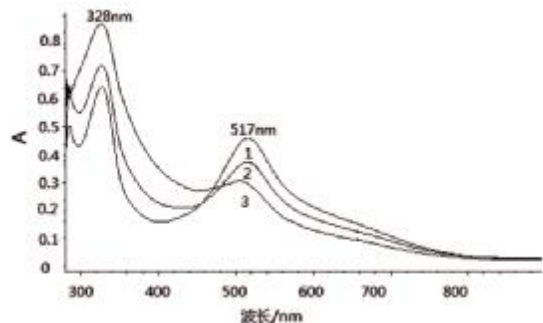


图 3 DPPH 溶液的 UV-Vis 吸收光谱图

2.7 DPPH 稳定性实验 新鲜配制的 DPPH 溶液在波长为 328 nm 和 517 nm 处有很强的特征吸收峰,见图 4。DPPH 溶液在 ≤ 1 h 时,稳定性好,但若长时间放置在室温下,并且在光照氧化条件下,放置时间越长,DPPH 溶液颜色会由紫红色变浅,吸光度值在波长为 517 nm 处降低明显。结果表明,DPPH 溶液的光吸收值会受到光照强度和温度高低的影响。因此,为了得到准确的测试结果,DPPH 溶液保存环境必须是低温,反应也应在避光低温条件下完成。



注:1:新鲜配制的 DPPH 在波长为 328 nm 和 517 nm 处有强吸收,吸光度 $A_1=0.65$, $A_2=0.46$;2:曝光触氧(在室温下放置 5 h) $A_1=0.72$, $A_2=0.37$;3:曝光触氧(在室温下放置 10 h) $A_1=0.87$, $A_2=0.30$

图 4 DPPH 在波长为 328 nm 和 517 nm 处的吸光度

2.8 DPPH 自由基清除实验 避光精密称定一定量的 DPPH,用乙醇作溶剂,配制成为 5.0 mmol/L 的储备液, -20°C 存放,现用现配。准确移取 4.5 ml DPPH 标准液于 10 ml 比色管中,分别加入不同体积相同浓度的样品,构成浓度梯度,其中一支管中不加样品溶液(空白),用无水乙醇做溶剂,稀释定容至刻度线 5.0 ml 处,摇匀,避光静置,室温下反应 0.5 h,测定溶液的 $A_{517\text{nm}}$ 值。计算其清除率,清除率按下式计算:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_{\text{样}}}{A_0} \times 100\%$$

式中 A_0 为空白管的吸光度; $A_{\text{样}}$ 为样品管的吸光度。

淫羊藿总黄酮提取液对 DPPH \cdot 的清除作用见图 5。在一定的浓度范围内,DPPH \cdot 的清除率随淫羊藿总黄酮浓度的增加而增大,当淫羊藿总黄酮浓度的增加到一定浓度时,清除率稳定在一定范围内。当清除率达 50% 时,淫羊藿总黄酮的质量浓度为:

$\text{IC}_{50}=0.00092 \text{ mg/ml}$ 。淫羊藿总黄酮的质量浓度 $\geq 0.002 \text{ mg/ml}$ 时,清除率达最大,最大清除率为 79.17%。这说明淫羊藿总黄酮对 DPPH \cdot 有较强的清除作用。

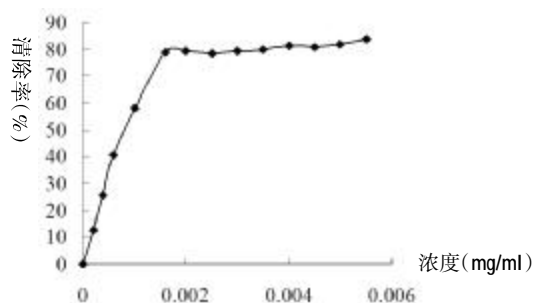


图 5 淫羊藿总黄酮对 DPPH \cdot 清除率的影响

3 讨论

现代医学研究表明,自由基氧化损伤^[6]是能够诱发多种疾病,因此,清除自由基的研究已经成为了当今药理学领域的一大热点,研究也已发现,淫羊藿^[9]总黄酮具有良好的抗氧化性能,该类化合物可以与自由基发生氧化还原反应,从而调节细胞处于还原状态,抵抗机体损伤,减少疾病的产生,本论文通过正交实验,得出了在温度 70°C 、60%乙醇浓度和 1:25 料液比的最优提取工艺条件下,淫羊藿精提液中总黄酮质量浓度为 $10.15 \mu\text{g/ml}$,含量达 31.72%。通过光谱滴定法结果表明,淫羊藿总黄酮的质量浓度 $\geq 0.002 \text{ mg/ml}$ 时,清除率达 79.17%。表明淫羊藿总黄酮对 DPPH 自由基有很好的清除能力,抗氧化活性强。

参考文献:

- [1]戴玥,郑佳,郑黎强.抗氧化物质和自由基产物与脑卒中关系的研究进展[J].实用医学杂志,2019,35(3):489-491.
- [2]王卫东,王裕祥,王永虎,等.西宁地区自由基与膝关节骨性关节炎分级的相关性研究[J].青海医药杂志,2020,50(1):1-4.
- [3]张德莉,朱圣姬,罗光富,等.自由基与 DNA 氧化损伤的研究进展[J].三峡大学学报,2004,26(6):563-567.
- [4]刘宇,李耀,万永灵,瑞芬太尼对内毒素诱导的急性肺损伤大鼠氧自由基、炎症因子及肺纤维化的影响[J].中国免疫学杂志,2020,36(9):1086-1087.
- [5]凌关庭.抗氧化食品与健康[M].北京:化学工业出版社,2004:123-344.
- [6]罗则华,杜倩,奚鑫,等.基于网络药理学的淫羊藿抗疲劳作用机制研究[J].中草药,2020,51(11):2997-3003.
- [7]Hong Z,Bing H,Tianxiu W,et al.Extraction, purification and anti-osteoporotic activity of a polysaccharide from Epimedium brevicornum Maxim.in vitro[J].International Journal of Biological Macromolecules,2020(156):1135-1145.
- [8]王卫东,王裕祥,王永虎,等.西宁地区自由基与膝关节骨性关节炎分级的相关性研究[J].青海医药杂志,2020,50(1):1-5.
- [9]罗则华,杜倩,奚鑫,等.基于网络药理学的淫羊藿抗疲劳作用机制研究[J].中草药,2020,51(11):2997-3003.

收稿日期:2020-06-11;修回日期:2020-06-26

编辑/成森