

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.06.001

皂角刺中总黄酮含量测定及其抗氧化活性研究*

宋忠兴^{1,2}, 唐志书², 严邑萍³, 史鑫波², 刘妍如², 赵鹏¹

(1. 陕西兴盛德药业有限责任公司, 陕西 铜川 727031; 2. 陕西中医药大学·陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西 咸阳 712046; 3. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000)

摘要:目的 测定回流法和超声法得到皂角刺醇提物和水提物中总黄酮含量, 比较其体外抗氧化活性。方法 采用紫外-可见分光光度法测定皂角刺提取物中总黄酮含量, FRAP法研究总黄酮体外抗氧化能力。结果 皂角刺超声醇提物中总黄酮含量最高(1.38%), 4种提取物对 Fe^{3+} -TPTZ自由基离子均有一定清除作用, 其中回流水提物清除作用最强。结论 建立的方法简便、准确, 可用于皂角刺中总黄酮的含量测定; 回流水提物的抗氧化能力较强。

关键词:皂角刺; 总黄酮; 含量测定; 回流提取; 超声提取; 醇提取; 水提取; 自由基; 抗氧化活性

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)06-0001-03

Content Determination of Total Flavonoids from *Gleditsia Sinensis* and Study on Its Antioxidant Activity

SONG Zhongxing^{1, 2}, TANG Zhishu², YAN Yiping³, SHI Xinbo², LIU Yanru², ZHAO Peng¹

(1. Shaanxi Xingshengde Pharmaceutical Co., Ltd., Tongchuan, Shaanxi, China 727031; 2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Xianyang, Shaanxi, China 712046; 3. The Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, China 712000)

Abstract: Objective To determine the content of total flavonoids in alcohol extracts and water extracts of *Gleditsia sinensis* by reflux method and ultrasound method, and to compare their antioxidant activities *in vitro*. **Methods** UV-visible spectrophotometry was used to determine the content of total flavonoids in the extracts of *Gleditsia sinensis*. FRAP method was used to study the antioxidant activity of total flavonoids *in vitro*. **Results** The content of total flavonoids in the ultrasonic ethanol extract of *Gleditsia sinensis* was the highest (1.38%). The four extracts had certain scavenging effect on free radical ions of Fe^{3+} -TPTZ, and the reflux water extract had the strongest scavenging effect. **Conclusion** The established method is simple and accurate, which can be used for the content determination of total flavonoids from *Gleditsia sinensis*. The reflux water extract has strongest antioxidant activity.

Key words: *Gleditsia sinensis*; total flavonoids; content determination; reflux extraction; ultrasound extraction; alcohol extraction; water extraction; free radical; antioxidant activity

皂角刺又名皂荚刺、皂刺和天丁, 为豆科植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的干燥棘刺, 始载于《本草衍义补遗》, 具有消肿托毒、排脓、杀虫、抗癌之功效, 临床常用于治疗痈疽初起和脓成不溃^[1]。皂角刺资源丰富, 主产于我国河南、山东、陕西等地区。现代研究发现, 皂角刺中含有黄酮类、萜类、甾体类、酚酸类等多种化学成分^[2-3], 具有良好的抗肿瘤、抗菌、免疫调节等作用^[4-5], 但其化学成分与含量测定方面的研究很少, 中国药典也未对其提取方法和含量测定进行规定。我国对皂角刺的研究主要在于化学成分和临床药理方面^[6], 皂角刺中黄酮类成分为其抗肿瘤的主要活性成分, 芦丁则是其中的活性成分之一。为控制皂角刺质量及研究其活性, 本试验中以芦丁为对照品, 采用紫外-可见分光光度法, 对皂角刺醇提物和水提物中总黄酮的含量进行测定^[7-9]。同时, 采用体外抗氧化方法对不同提取物进行评价, 为

合理开发皂角刺相关制剂及产品提供依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

CPD225D 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器<北京>有限公司); FW-1000AD 型高速粉碎机(天津鑫博得仪器有限公司); KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 101-1 型电热鼓风干燥箱(北京科伟永兴仪器有限公司); UV-2600 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

1.2 试剂

皂角刺所用药材采自陕西, 经陕西中医药大学白吉庆教授鉴定为豆科植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的干燥棘刺, 药材标本存放于陕西中医药大学陕西省中药资源产业化协同创新中心; 芦丁对照品(四川省维克奇生物科技有限公司, 批号为 wkq16101104, 纯度大于

*基金项目: 陕西省科技统筹创新工程计划项目[2015KTZDSF02-05-02]。

第一作者: 宋忠兴, 男, 副主任药师, 研究方向为中药新药与产业化开发, (电子信箱) szx74816@sina.com。

98%);总抗氧化能力检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号为S0116);试验用试剂均为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 原药材前处理

将皂角刺药材放入烘箱60℃干燥3h,取200g粉碎,过3号筛,得皂角刺粗粉。干燥至恒重,冷却,备用。

2.2 提取方法

2.2.1 回流提取法^[10]

皂角刺加热回流醇提物:称取5.0g(平行3组)药粉,精密称定,过3号筛,置250mL圆底烧瓶中,加入70%乙醇150mL回流提取2h,滤过,水浴蒸干,残渣用50%乙醇溶解,溶液转移至25mL容量瓶中,经0.22μm微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

皂角刺加热回流水提物:操作同前,仅回流时所加液体由70%乙醇换为水。

2.2.2 超声提取法^[11]

皂角刺超声醇提物:称取5.0g(平行3组)药粉,精密称定,过3号筛,置具塞锥形瓶中,加70%乙醇75mL,超声(功率为250W,频率为40kHz,下同)处理30min,滤过,残渣加70%乙醇75mL,超声处理30min,合并滤液,滤液水浴蒸干,残渣溶于50%乙醇,将溶液转移至25mL容量瓶中,经0.22μm微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

皂角刺超声水提物:操作同前,仅超声时所加液体由70%乙醇换为水。

2.3 总黄酮含量测定

2.3.1 对照品溶液制备

取120℃干燥至恒重的芦丁对照品5.5mg,精密称定,置25mL容量瓶中,加50%乙醇10mL,超声溶解,加50%乙醇定容,摇匀,得质量浓度为0.22g/L的对照品溶液。

2.3.2 最大吸收波长选择

精密量取对照品溶液3mL,置10mL具塞试管中,加5%亚硝酸钠溶液0.3mL,摇匀,静置6min,加入10%硝酸铝溶液0.3mL,摇匀,静置6min,加入1mol/L氢氧化钠溶液4mL,用50%乙醇定容,摇匀,静置15min。置比色皿中,参照空白试剂,并在200~800nm波长范围内扫描。结果表明,芦丁在510nm波长处有最大吸收,故选定检测波长为510nm^[7]。

2.3.3 方法学考察

线性关系考察:精密吸取对照品溶液0,0.25,0.50,1.00,2.00,3.00,4.00mL,其余操作同2.3.2项下“置比色皿中”前,以第一份作为空白对照,于510nm波长处测定吸光度^[7]。以吸光度(Y)为纵坐标、芦丁

质量浓度(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 13.912X - 0.0071$, $r = 0.9998$ ($n = 7$)。结果表明,芦丁质量浓度在0.0055~0.0880g/L范围内与吸光度线性关系良好。

精密度试验:日内精密度,取皂角刺加热回流水提物供试品溶液适量,按2.3.2项下方法操作,1d内连续测定6次,测得吸光度的RSD为1.47% ($n = 6$);日间精密度,取皂角刺加热回流水提物供试品溶液适量,按2.3.2项下方法操作,连续测定3d,测得吸光度的RSD为0.96% ($n = 3$)。结果表明,仪器精密度良好。

稳定性试验:精密吸取皂角刺加热回流水提物供试品溶液适量,于室温下分别放置0,10,20,30,40min时测定吸光度。结果的RSD为2.00% ($n = 5$),表明室温下供试品溶液在40min内稳定。

重复性试验:另取同一批皂角刺药材粉末6份,每份约5g,按2.2项下回流水提物方法提取,依法测定。结果的RSD为1.33% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:称取已知含量的皂角刺样品6份,精密称定,均分为3组,分别按样品中黄酮含量80%,100%,120%的比例加入芦丁对照品溶液,依法进行样品制备及含量测定,并计算加样回收率。结果见表1。

表1 芦丁加样回收试验结果($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
1.02	0.81	1.78	93.83	98.06	2.78
1.00	0.82	1.80	97.56		
0.99	1.02	2.01	100.00		
1.00	1.03	1.99	96.12		
1.00	1.23	2.23	100.00		
1.00	1.19	2.20	100.84		

2.3.4 样品含量测定

称取皂角刺药材粉末约5g,精密称定,依法进行样品制备及含量测定。结果不同提取物中总黄酮的含量有一定差异,总黄酮含量排序依次为超声醇提物(1.38%)>回流醇提物(1.35%)>回流水提物(0.76%)>超声水提物(0.33%),故可选择总黄酮含量最高的超声醇提法提取皂角刺总黄酮。

2.4 皂角刺总黄酮抗氧化活性测定

2.4.1 溶液制备

标准品溶液:取27.8mg总抗氧化能力(T-AOC)测试盒中的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 适量,以水溶解并定容至1mL,此时浓度为100mol/L,以水稀释至0.15,0.30,0.60,0.90,1.20,1.50mmol/L。

FRAP工作液:按试剂盒中的试剂一:试剂二:试剂三(10:1:1, V/V/V)混匀充分,避光37℃孵育,现用现配,2h内用完。

2.4.2 清除 Fe^{3+} 活性测定

在96孔板中分别标定空白孔、标准孔、测定孔,加相应溶液各5 μL ,再分别加入FRAP工作液180 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育3~5 min,检测波长为593 nm,记录吸光度。空白孔测定1次,测定孔和标准孔分别作3组对照,每组测3次。以标准品吸光度(Y)为纵坐标、标准品质量浓度(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=0.2754X+0.0504(r=0.9997)$ 。按上述方程测定不同质量浓度样品吸光度,结果见表2。将上述各提取物样本测得的吸光度代入线性方程,计算总抗氧化能力。

表2 不同质量浓度样品吸光度

样品名称	样品质量浓度(g/L)				
	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
回流水提取物	0.818 8	1.152 9	1.537 4	1.528 0	1.740 7
超声水提取物	0.668 8	0.872 2	1.360 2	1.356 2	1.451 0
回流醇提取物	0.678 6	0.781 8	1.070 8	1.108 9	1.233 5
超声醇提取物	0.553 7	0.716 8	0.907 0	1.111 5	0.553 7

水提取物和醇提取物对 Fe^{3+} 的清除作用分析结果见图1。可见,皂角刺加热回流水提取物对 Fe^{3+} 的清除作用较强,即总抗氧化能力最强。在总黄酮质量浓度为0.1~0.3 g/L范围内,不同提取物还原能力与浓度呈正相关。不同提取物皂角刺总黄酮对 Fe^{3+} 的还原能力排序为回流水提取物>超声水提取物>回流醇提取物>超声醇提取物。

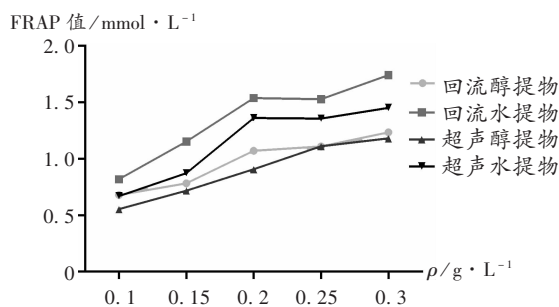


图1 不同提取物的总抗氧化能力趋势图

3 讨论

黄酮类化合物广泛存在于自然界各类植物中,具有多种生物活性^[12],为中药重要的化学成分。目前测定总黄酮的方法以紫外-可见分光光度法和高效液相色谱(HPLC)法多见,本研究中采用紫外-可见分光光度法测定皂角刺中总黄酮含量,方法准确、简单、可靠,可作为皂角刺药材中总黄酮含量的检测方法。回流醇提取物和超声醇提取物中总黄酮含量明显高于相应水提取物。因此,建议在研究以黄酮为药效物质基础时,可以醇提取物为主。

本研究结果显示,不同方法和溶剂提取的皂角刺中总黄酮的含量差异明显,但均有一定的抗氧化能力。

FRAP为 Fe^{3+} 还原抗氧化体系衡量总抗氧化能力指标^[13],目前鲜有皂角刺总黄酮的体外抗氧化研究报道,但实验研究发现,不同提取物对 Fe^{3+} 的还原能力与其总黄酮的含量并无量效关系。同时,水提取物的抗氧化能力均大于醇提取物,表明皂角刺的抗氧化能力与提取溶剂和总黄酮含量均相关,初步推测其抗氧化作用也可能与来自总黄酮中具体的黄酮种类有关,但要确定总黄酮物质中哪种成分起到了抗氧化作用,还需要进一步深入研究。相关研究显示,其抗氧化活性物质可能是总黄酮、酚酸类和萜类等。回流水提取物的抗氧化活性最好,可将其作为下一步的研究重点。目前已开展皂角刺中酚酸类和萜类等成分生物活性效应评价^[14],以期早日将其应用于临床^[15]。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 177-178.
- [2] 徐哲, 赵晓娟, 王漪檬, 等. 皂角刺抗肿瘤活性成分的分离鉴定与活性测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(2): 108-111.
- [3] 刘艳明, 徐青, 薛兴亚, 等. 中药皂角刺的化学组成及液相色谱研究[J]. 精细化工, 2006(10): 967-971.
- [4] 刘建建, 时鹏, 黄涛, 等. 皂角刺提取物体外抑菌杀菌作用研究[J]. 医药导报, 2013, 32(3): 300-302.
- [5] 何峰, 何光志, 张利新, 等. 皂角刺含药血清诱导直肠癌细胞SW-480凋亡及其对Bcl-2/Bax mRNA表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 217-221.
- [6] 李岗, 仙云霞, 王晓, 等. 皂角刺化学成分及其抗肿瘤活性研究[J]. 中草药, 2015, 46(19): 2846-2850.
- [7] 陈海霞, 田吉, 肖顺汉. 皂角刺总黄酮的含量测定[J]. 四川生理科学杂志, 2012, 34(3): 101-103.
- [8] 吴丽红, 任丽英, 陈志钢. 紫叶李果实总黄酮抗氧化性能实验研究[J]. 中国药业, 2017, 26(5): 15-19.
- [9] 邓六勤, 黎梅桂, 吴宝仪. 黄芪多糖的氧化降解及其抗氧化和抗肿瘤活性研究[J]. 中国药业, 2018, 27(1): 13-16.
- [10] 于金倩, 李岗, 仙云霞, 等. 皂角刺的高效液相指纹图谱分析及多组分测定[J]. 中草药, 2017, 48(7): 1416-1419.
- [11] 李菁, 江坤, 殷果, 等. 中药皂角刺的HPLC指纹图谱[J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34(8): 660-666.
- [12] 赵梅, 周淑琴. 黄酮类化合物抗肿瘤作用及其相关机制研究进展[J]. 中国药业, 2011, 20(23): 1-3.
- [13] 吴荣昆, 黄小流, 刘美金, 等. 井冈山马齿苋多糖的体外抗氧化作用及总糖含量测定[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2016, 37(2): 102-106.
- [14] 杨晓峪, 李振麟, 濮社班, 等. 皂角刺化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2015, 34(3): 38-41.
- [15] 汪涛, 承伟, 王佩琪, 等. 皂角刺药理学与临床应用的研究进展[J]. 锦州医学院学报, 2005, 26(6): 60-62.

(收稿日期: 2018-07-21)