

白背三七总黄酮的超声提取工艺及 - 葡萄糖苷酶抑制活性

刘旭, 刘微微, 曹学丽*

(北京工商大学食品学院, 食品添加剂与配料北京高校工程研究中心, 北京 100048)

摘要: 在单因素试验基础上, 对乙醇体积分数、料液比和提取次数3因素进行Box-Behnken设计及响应面分析, 优化白背三七黄酮超声提取条件, 将白背三七粗提物进行分级萃取, 并对不同级分萃取物的黄酮含量及 α -葡萄糖苷酶抑制活性进行了考察。结果表明超声辅助提取白背三七中黄酮化合物的优化工艺参数为乙醇体积分数55%、料液比1:35(g/mL)、提取次数4次, 在此条件下总黄酮得率为3.071%(30.71mg/g), 与预测值(3.095%)基本相符; 经高效液相色谱分析, 粗提物中主要化合物均具有黄酮特征吸收。分级萃取物中以乙酸乙酯相中黄酮含量及 α -葡萄糖苷酶抑制活性最高。

关键词: 白背三七; 黄酮; 超声提取; 响应面分析; α -葡萄糖苷酶抑制活性

Ultrasound-Assisted Extraction of Total Flavonoids from Stems and Leaves of *Gynura divaricata* (L.) DC. and Its Inhibitory Activity on α -Glucosidase

LIU Xu, LIU Wei-wei, CAO Xue-li*

(Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: On the basis of single-factor experiments, three key process parameters including ethanol concentration, solid/liquid ratio and extraction number for the ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from the stems and leaves of *Gynura divaricata* (L.) DC. were optimized by Box-Behnken experimental design coupled with response surface methodology. The inhibitory effects of crude total flavonoid extract and its different solvent fractions on α -glucosidase were investigated. The results showed that the optimal ultrasound-assisted extraction conditions were 55% ethanol as extraction solvent at a material/liquid ratio of 1:35 (g/mL) for 4 repeated extractions. Under these conditions, the actual extraction yield of total flavonoids was 3.071%, which was basically consistent with the predicted value, 3.095%. HPLC analysis revealed that the major components in crude extract had the absorption characteristics of flavonoids.

Key words: *Gynura divaricata* (L.) DC.; flavonoids; ultrasound-assisted extraction; response surface methodology; inhibitory activity on α -glucosidase

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0134-06

白背三七(*Gynura divaricata* (L.) DC.)为菊科菊三七属植物, 又名白子菜^[1], 分布于台湾至华南、西南一带, 喜生于潮湿的阴地上^[2]。民间以白子菜作为药食两用, 如将白子菜新鲜嫩苗煮成菜汤食用, 可缓解多眵、口干、尿黄的症状^[3]; 将新鲜嫩苗煮汤, 每两三天食用一次, 对高血压、高血脂、糖尿病或胃病、失眠等可起到改善症状或巩固疗效的作用^[4-5]。白背三七中含有多类天然有效成分, 包括多糖、黄酮、萜类、生物碱等^[6-8]。黄酮类化合物是自然界普遍存在的一类次生代

谢产物, 是药用植物的主要活性成分之一, 大量研究表明黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎症、抗癌、降血糖、降血脂等生理活性^[9-12], 是新药研发的活性先导物的来源宝库。随着天然高效低毒药物开发研究的日益升温, 作为白背三七中的主要成分之一的黄酮, 其降血糖功效也越来越为人所关注。

目前, 白背三七黄酮的相关研究较少。动物试验结果表明, 白背三七总黄酮可显著降低II型糖尿病模型大鼠血糖^[13]。目前还未见其分子和细胞水平的降血糖活

收稿日期: 2011-09-26

作者简介: 刘旭(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物分离工程。E-mail: lelandliu@163.com

*通信作者: 曹学丽(1967—), 女, 教授, 博士, 研究方向为生物分离工程。E-mail: caoxl@th.btbu.edu.cn

性及机理的相关研究报道。本实验采用超声提取法对白背三七总黄酮的提取工艺进行优化,并就其体外对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用进行初步研究,为白背三七中黄酮类化合物的降血糖活性及作用机理研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

白背三七干燥茎叶(粉碎后过20目筛备用) 山西普净生物技术公司。

氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、无水碳酸钠、二甲基亚砷、无水乙醇(均为分析纯) 北京化工厂;蔗糖(分析纯) 北京奥博星生物技术有限公司;甲醇(色谱纯) 美国Fisher Scientific公司;蒸馏水、超纯水 自制;乙酸(色谱纯) 天津光复精细化工研究所;芦丁标准品 中国食品药品检定研究院;小鼠肠道丙酮粉(Intestinal acetone powders from rat) 美国Sigma公司;拜糖苹 德国拜耳医药保健有限公司。

葡萄糖测定试剂盒(GOD-POD法) 中生北控生物科技股份有限公司;1100高效液相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司;Ultimate XB-C₁₈色谱柱(250mm×4.6mm, 5 μ m) 美国Welch Materials公司;Spectra Max 190型酶标仪 美国MDS公司;纯水机 美国Millipore公司;KQ-400DB超声波清洗机(超声频率50kHz) 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 白背三七总黄酮检测方法

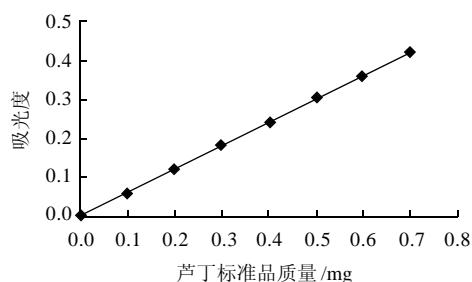


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 Standard curve of rutin

采用亚硝酸钠-硝酸铝分光光度法^[14]检测。精密称取芦丁标品0.0100g,加入适量乙醇溶解,再以乙醇定容至50mL,摇匀备用(芦丁质量浓度0.2mg/mL)。分别移取上述标准液0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5mL至10mL容量瓶中,加70%乙醇溶液至5mL,5%NaNO₂溶液0.3mL,摇匀,放置6min后加入10%Al(NO₃)₃溶液0.3mL,摇匀,反应6min后加入4%NaOH溶液4mL,混匀,用70%乙醇溶液定容至刻度,放置15min后,于510nm测定吸光度,空白不加入芦丁对照品。以A_{510nm}为纵坐标,对照品的质量(mg)为横坐标,绘制标准曲线

(图1),建立回归方程为: $M = 0.5985A + 0.0012$ (M为芦丁标准品的质量/mg, A为吸光度),相关系数 $R^2 = 0.9998$ 。

准确称取1.000g白背三七样品粉末置于锥形瓶中,加入一定体积分数的乙醇溶液,按相应的提取条件超声提取、离心、定容,取适量样品待测液按上述方法进行测定,由回归方程确定样品中总黄酮的含量。

$$\text{总黄酮得率/\%} = \frac{MV_0}{V \times 10^3} \times 100$$

式中: M为一定体积测试液中总黄酮含量/mg; V为测定时所吸取样品试液的体积; V₀为离心后定容的总体积; 10³为质量换算因数。

1.3 单因素试验

1.3.1 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响

准确称取1.000g经干燥的白背三七样品粉末,以料液比1:20(g/mL)的比例分别加入35%、45%、55%、65%、75%、85%乙醇溶液,超声提取30min,离心后取上清液,重复提取3次,合并提取液,定容至60mL后取1mL进行测定;另取6mL置于已称质量的试管中,烘箱中干燥至质量恒定,称量后得浸膏质量,并计算得率。每组试验做3组平行,研究乙醇体积分数对黄酮类化合物得率的影响。

1.3.2 料液比对总黄酮得率的影响

准确称取1.000g经干燥的白背三七样品粉末,以料液比1:10、1:20、1:30、1:40(g/mL)加入65%乙醇溶液,超声提取30min,离心后取上清液,重复提取3次,合并提取液,分别定容至30、60、90、120mL后,取0.5、1.0、1.5、2.0mL提取液对黄酮含量进行测定。每组试验做3组平行,研究料液比对黄酮类化合物得率的影响。

1.3.3 提取次数对总黄酮得率的影响

准确称取1.000g经干燥的白背三七样品粉末,以料液比1:30,加入65%乙醇溶液超声提取30min,连续提取4次,将4次提取液分别离心并定容至30mL,取0.5、1、5、5mL进行测定。每组试验做3组平行,研究提取次数对黄酮类化合物得率的影响。

表1 白背三七总黄酮提取响应面试验因素和水平

Table 1 Factors and their coded levels in the Box-Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
A 乙醇体积分数/%	45	65	85
B 料液比(g/mL)	1:20	1:30	1:40
C 提取次数	2	3	4

1.4 白背三七总黄酮提取响应面试验优化

结合单因素试验结果,采用 Desgin Expert 7 软件,应用 Box-Behnken 设计进行三因素三水平试验(表 1),并利用响应面法对提取条件进行优化。

1.5 总黄酮提取物的高效液相色谱分析

利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)对最优提取条件下所得黄酮粗提物进行分析,得色谱图及各色谱峰的 UV 吸收光谱图。根据黄酮化合物在 280nm 和 360nm 附近的双吸收特征对各色谱峰进行初步定性分析,为进一步黄酮化合物分离纯化确定目标。

色谱条件: Ultimate XB-C₁₈(4.6mm × 250mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-2% 乙酸(B), 梯度洗脱(0~10min, 25% A → 25% A; 10~15min, 25% A → 40% A; 15~20min, 40% A → 40% A; 20~30min, 40% A → 60% A; 30~35min, 60% A → 100% A; 35~45min, 100% A); 检测波长: 254、280、360nm; 流速 1mL/min; 柱温 30℃; 进样量 10 μL。

1.6 α-葡萄糖苷酶抑制活性试验

1.6.1 酶溶液的制备

取小鼠肠道丙酮粉 1g, 加入质量分数 0.9% NaCl 溶液 20mL, 冰浴超声提取每次 30s, 共提取 12 次, 离心取上清液, 即为 α-葡萄糖苷酶溶液。

1.6.2 反应体系的确定

试验分为空白组、阴性组、阳性组、样品组和样品对照组, 按表 2 剂量在 96 孔板中进行加样, 每组 3 个平行孔。首先依次加入 α-葡萄糖苷酶、PBS(pH6.8)、α-葡萄糖苷酶抑制剂, 于 37℃ 温育 15min, 再加入底物溶液(0.5mol/L 蔗糖溶液), 于 37℃ 温育 30min; 温育结束后, 每孔加入 150 μL 0.1mol/L Na₂CO₃ 溶液终止反应; 取 20 μL 终止后的反应溶液于另一 96 孔板中, 加入 200 μL 葡萄糖测定试剂盒溶剂, 于 37℃ 水浴温育 15min, 在酶标仪 505nm 处测定吸光度, 并计算该抑制剂对 α-葡萄糖苷酶的抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{(\text{阴性对照} - \text{空白对照}) - (\text{待测样品} - \text{样品对照})}{\text{阴性对照} - \text{空白对照}}$$

表 2 实验分组

Table 2 Experimental protocols for anti-α-glucosidase activity determination

分组	α-葡萄糖苷酶液	PBS 缓冲液	DMSO	α-葡萄糖苷酶抑制剂	底物(蔗糖)
空白对照组	25(灭活)	75	25		25
阴性对照组	25	75	25		25
阳性对照组	25	50	25	25(拜糖苹)	25
待测样品组	25	75		25	25
样品对照组	25(灭活)	75		25	25

按照上述的实验分组分别测定不同浓度下的 α-葡萄糖苷酶抑制剂对蔗糖底物的抑制率, 从而计算出该抑制剂的 IC₅₀ 值。

1.7 粗提物的分级萃取

取一定量白背三七粗提物, 以超声辅助使其悬于水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取, 体积比为 1:1, 每一级分萃取三次, 合并萃取液, 减压蒸干后备用。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响

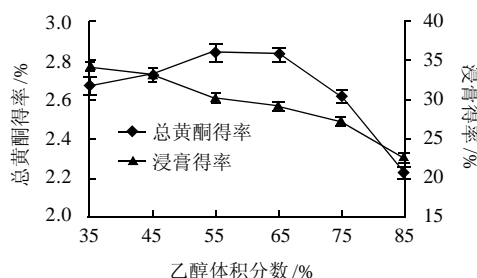


图 2 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on the extraction yield of total flavonoids

从图 2 可以看出, 总黄酮得率随乙醇体积分数在 35%~55% 范围内升高而增加, 乙醇体积分数为 55% 时得率最高, 65%~85% 范围内随乙醇体积分数的升高又迅速下降。随着提取液中水的比例增大, 所得浸膏量不断增加。主要是因为乙醇溶液体积分数不同, 极性不同, 当提取液极性与白背三七中黄酮类化合物极性相似时, 得率最高^[15]; 而随着提取液中水的比例增加, 水溶性物质增多, 所得浸膏量随之增加。乙醇体积分数为 55% 和 65% 时所得黄酮含量相差无几, 而 55% 乙醇提取得到浸膏量高, 说明其中杂质含量较高。

2.1.2 料液比对总黄酮得率的影响

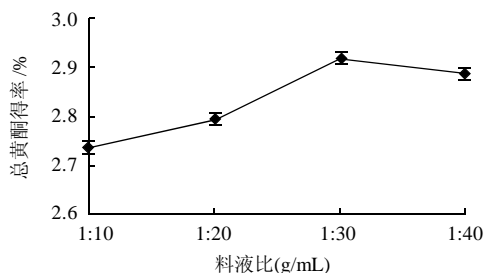


图 3 料液比对总黄酮得率的影响

Fig.3 Effect of material/liquid ratio on the extraction yield of total flavonoids

由图3可以看出,在料液比(g/mL)由1:10到1:30变化的过程中,总黄酮得率逐渐升高;当料液比达到1:30时总黄酮得率达到最高;继续增加提取液的比例,总黄酮得率稍有降低。原因可能是提取液比例过大时,其他成分溶出较多,影响了黄酮物质的提取。

2.1.3 提取次数对总黄酮得率的影响

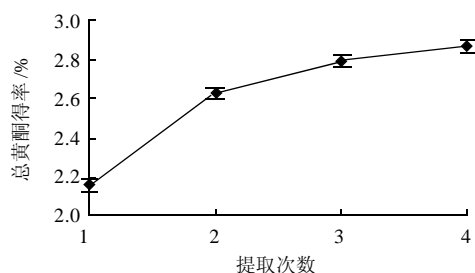


图4 提取次数对总黄酮得率的影响

Fig.4 Effect of number of repeated extractions on the extraction yield of total flavonoids

由图4可以看出,以每次提取时间30min,随着提取次数的增加,总黄酮累计得率不断升高,但增加幅度不断减小。以4次提取黄酮的量作为总量,则前3次提取得黄酮占总量的97.38%,基本提取完全。

2.2 响应面法对总黄酮提取条件的优化

响应面分析试验所得结果如表3所示。利用统计软件Design Expert 7对所得数据进行分析,表4为回归分析结果,进行回归拟合,得方程为:

$$Y = 0.087371X_1 + 0.042144X_2 + 0.85542X_3 - 0.000087625X_1X_2 - 0.00116X_1X_3 - 0.00212X_2X_3 - 0.000750769X_1^2 - 0.000412575X_2^2 - 0.099532X_3^2 - 1.53535$$

($R^2 = 0.9967$)

表3 响应面试验分析及结果

Table 3 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	A	B	C	总黄酮得率/%
1	-1	0	-1	2.7348
2	-1	-1	0	2.8677
3	-1	0	1	3.0231
4	0	0	0	2.8992
5	0	0	0	2.9669
6	1	0	-1	2.1183
7	1	0	1	2.3138
8	0	-1	1	2.8812
9	0	-1	-1	2.6038
10	1	-1	0	2.2586
11	1	1	0	2.3088
12	0	0	0	2.9368
13	0	1	1	2.9669
14	0	1	-1	2.7743
15	0	0	0	2.9594
16	0	0	0	2.9744
17	-1	1	0	2.9880

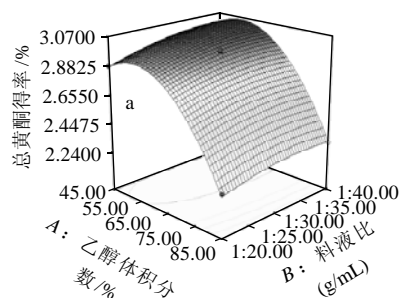
通过方差分析,可以看出A(乙醇体积分数)、B(料液比)和C(提取次数)3个因素对总黄酮得率影响极显著,因素影响顺序为乙醇体积分数>提取次数>料液比。经拟合检验可知, $P < 0.0001$,差异极显著,说明该方程与实际情况拟合很好,能够正确地反映白背三七总黄酮得率与乙醇体积分数、料液比和提取次数之间的关系。失拟检验 $P = 0.7588 > 0.05$,不显著,说明本试验无其他因素的显著影响,模型是合适的。

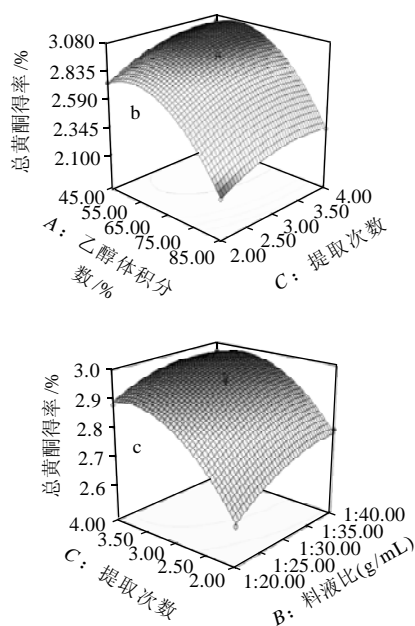
表4 响应面方差分析结果

Table 4 Analysis of variance for the fitted regression model

参数	自由度	平方和	均方	F值	P值
总模型	9	1.45	0.16	234.44	< 0.0001
A	1	0.85	0.85	1244.01	< 0.0001
B	1	0.023	0.023	33.15	0.0007
C	1	0.11	0.11	165.61	< 0.0001
AB	1	0.001229	0.001229	1.79	0.2229
AC	1	0.002153	0.002153	3.14	0.1199
BC	1	0.001798	0.001798	2.62	0.1497
A ²	1	0.38	0.38	553.02	< 0.0001
B ²	1	0.007167	0.007167	10.44	0.0144
C ²	1	0.042	0.042	60.75	0.0001
线性项	9	0.46	0.051	55.33	0.0008
二次项	3	0.001118	0.0003725	0.40	0.7588
交互项	6	0.45	0.076	82.06	0.0004
失拟项	3	0.001118	0.0003725	0.40	0.7588
随机误差	4	0.003689	0.0009222		
总残差	7	0.004806	0.0006866		
总和	16	1.45			

由图5可知,回归方程存在极大值,由Design Expert 7软件分析可得最大响应值为3.095%(30.95mg/g),最优提取条件为乙醇体积分数53.28%、料液比1:36.17、提取次数为3.6次。为验证响应面的可行性,采用所得到的优化后的提取条件对总黄酮提取率进行验证实验,所采用的实际操作条件为乙醇体积分数55%、料液比1:35、提取4次,在此条件下,得总黄酮得率为3.071%(30.71mg/g)。





a.乙醇体积分数与料液比; b.乙醇体积分数和提取次数; c.提取次数和料液比。

图5 各因素对总黄酮得率影响的响应面和等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots showing the interactive effects of extraction conditions on the extraction yield of total flavonoids

2.3 白背三七总黄酮提取物的 HPLC 分析

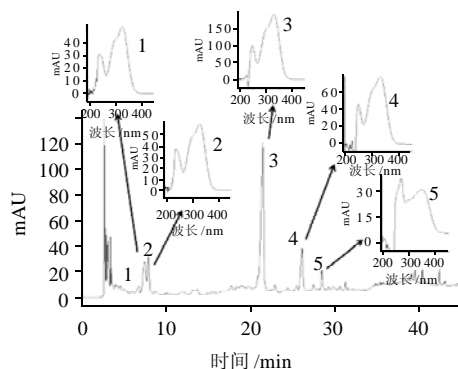


图6 白背三七总黄酮提取物的 HPLC 色谱图及主要成分的 UV 光谱图

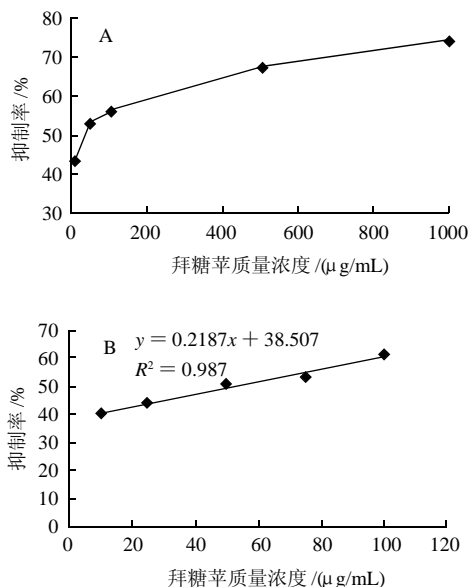
Fig.6 HPLC profile of crude total flavonoid extract and UV absorption spectra of major components in it

如图6所示,白背三七黄酮粗提取物中各成分能够在HPLC谱图中达到较好的分离。由UV吸收光谱分析可知,所标注的各峰均在280nm及360nm附近显示明显的吸收,初步判断可能为黄酮类化合物,可作为后续单体分离纯化及活性研究的主要目标物质。按1.2节方法进行测定,提取物中总黄酮含量为9.71%。

2.4 白背三七中总黄酮的 α -葡萄糖苷酶抑制活性

2.4.1 阳性组拜唐苹的 α -葡萄糖苷酶抑制活性

将拜唐苹分别稀释为10、50、100、500、1000 $\mu\text{g/mL}$,以抑制剂质量浓度为横轴、对应的抑制率为纵轴,绘制抑制曲线(图7A)。根据抑制曲线确定拜唐苹抑制活性的大致线性范围,取10、25、50、75、100 $\mu\text{g/mL}$ 对抑制率作线性曲线(图7B),可得拜唐苹对蔗糖底物的 α -葡萄糖苷酶半抑制质量浓度(IC_{50})为52.55 $\mu\text{g/mL}$ 。



A.抑制曲线; B.线性曲线。

图7 拜唐苹的 α -葡萄糖苷酶抑制活性曲线

Fig.7 α -glucosidase inhibitory curve of acarbose

2.4.2 白背三七总黄酮 α -葡萄糖苷酶抑制活性

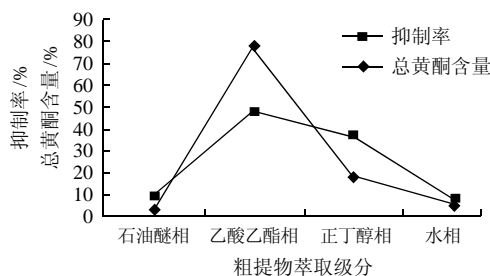


图8 不同级分 α -葡萄糖苷酶抑制活性及黄酮含量

Fig.8 Comparison of anti- α -glucosidase activity and flavonoid content of different solvent fractions of crude extract

准确称取石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相及水相各5mg,以DMSO溶解,以对应抑制率为纵轴,绘制抑制曲线。再称取上述4个级分适量,以70%乙醇溶液溶解,按1.2节方法测定各级分中黄酮含量,并绘制曲线。如图8可知,乙酸乙酯相黄酮含量及 α -葡萄糖苷酶抑制活性均为最高;从4个级分总体来看,黄酮

含量高,其抑制活性相对也较高,两者之间可能具有一定的相关性,故将乙酸乙酯相萃取物作为下一步研究的重点。

3 结 论

结合单因素试验,采用 Box-Behnken 设计和响应面分析法对白背三七中黄酮的超声提取工艺进行优化,确定优化的提取条件为乙醇体积分数 55%、料液比 1:35(g/mL)、提取 4 次,提取率的极大值可以达到 3.071%(30.71mg/g)。对黄酮提取率影响最大的因素为乙醇体积分数,其次是提取次数和料液比。

以洗脱梯度的方式,建立了白背三七黄酮粗提物 HPLC 检测方法,使主要化合物得到较好的分离,由其吸收波长可知,具有明显的黄酮化合物特征吸收,可作为后续试验的主要目标化合物。

将白背三七粗提物分级萃取后,对各级分 α -葡萄糖苷酶抑制活性及黄酮含量进行了测定,并对它们之间相关性进行了初步讨论。本研究结果为白背三七中降血糖活性成分分离纯化及降血糖机理的进一步研究奠定了较好基础。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大词典: 上册[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 756.
- [2] 广东植物研究所. 海南植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1974: 4161.
- [3] 陈磊. 白背三七降血糖物质基础研究[D]. 西安: 第二军医大学, 2009.
- [4] 洗寒梅, 周蓉, 刘雯, 等. 白子菜不同药用部位挥发油的含量测定及其气相色谱-质谱联用分析[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 858-859.
- [5] 洗寒梅, 周蓉, 韦乃球. 壮药神仙草的性状及民间应用[J]. 亚太传统医药, 2007, 3(9): 29-30.
- [6] 胡勇. 白背三七降血糖活性成分的研究[D]. 南京: 江苏省中国科学院植物研究所, 2004.
- [7] ERHARD R, ALEXANDRA E, HELMUT W. Pyrrolizidine alkaloids from *Gynura divaricata*[J]. Planta Med, 1996, 62(4): 386.
- [8] 郭巨先, 杨暹. 华南主要野生蔬菜的脂肪酸成分分析[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(2): 47-50.
- [9] LEE C H, LIN Yang, JIN Xexu, et al. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides[J]. Food Chem, 2005, 90(4): 735-741.
- [10] GUARDIA T, ROTELLI A E, JUAREZ A O, et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat[J]. Farmaco, 2001, 56(9): 683-687.
- [11] LI Yanling, FANG Hao, XU Wenfang. Recent advance in the research of flavonoids as anticancer agents[J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2007, 7(7): 663-678.
- [12] LIM S S, JUNG S H, JI J, et al. Synthesis of flavonoids and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues[J]. J Pharm Pharmacol, 2001, 53(5): 653-668.
- [13] 姜曼花. 白背三七多糖及黄酮的提取测定与降血糖作用研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2009.
- [14] 元晓梅, 蒋明蔚, 胡正芝. 聚酰胺吸附-硝酸铝显色法测定山楂及山楂制品中的总黄酮含量[J]. 食品与发酵工业, 1996(4): 27-32.
- [15] 樊瑞胜, 陈平, 刘岩, 等. 桔皮类黄酮乙醇提取工艺研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2006, 22(4): 97-100.