酸浆茎叶黄酮精制工艺及抗氧化活性研究

Refining flavonoids from stems and leaves of *Physalis alkekengi* and their antioxidant activity

李 群¹ 孙明哲¹ 吴 威¹ 姜秀娟² 曹柏营²

LI Qun¹ SUN Ming-zhe¹ WU Wei¹ JIANG Xiu-juan² CAO Bai-ying²

(1. 长春职业技术学院食品与生物技术分院, 吉林 长春 130033;

2. 吉林工程技术师范学院食品工程学院, 吉林 长春 130052)

(1. Food and Biological Technology College, Changchun Vocational Institute of Technology, Changchun, Jilin 130033, China; 2. Food Engineering College, Jilin Engineering Normal University, Changchun, Jilin 130052, China)

摘要:以 AB-8 吸附树脂优化酸浆茎叶黄酮精制工艺,并评价其体外和体内抗氧化活性。试验结果表明,以 70% 的乙醇水溶液为洗脱剂,洗脱流速 2 mL/min,酸浆茎叶黄酮纯度可达 39.16%。精制酸浆茎叶黄酮对 NO₂⁻· 和 ABTS⁺· 的清除率分别为 81.36% 和 91.49%,对亚油酸脂质过氧化抑制率为 85.26%;精制酸浆茎叶黄酮不仅增加了小鼠的胸腺系数和脾脏系数(P<0.05),而且明显提高了血清 T-AOC、GSH-Px 和 SOD 活性(P<0.05),降低 MDA 含量(P<0.01),说明精制酸浆茎叶黄酮具有较强的体外和体内抗氧化活性。

关键词:酸浆;黄酮;精制;大孔吸附树脂;抗氧化活性

Abstract: The flavonoids from stems and leaves of *Physalis alkekengi* (PSF) were refined by macroporous adsorption resin, and their antioxidant activities were evaluated in vitro and in vivo. The PSF were obtained using with AB-8 macroporous adsorption resin washed by 70% ethanol, and the purity was 39.16%. After refining, the scavenging activities of PSF on NO₂⁻· and ABTS⁺· were 81.36% and 91.49%. The anti-oxidative capability in linoleic acid lipid overoxidation system was 85.26%. The refined PSF not only significantly increased thymus index and spleen index(P<0.05), but also increased the activity of T-AOC, GSH-Px and SOD in serum(P<0.05) and decreased the content of MDA in serum(P<0.01). The refined PSF showed strong antioxidant activity in vitro and in vivo.

Keywords: *Physalis alkekengi*; Flavonoids; Refining; Macroporous adsorption resin; Antioxidant activity

酸浆(*Physalis alkekengi* L.)属多年生茄科植物,别名红姑娘、灯笼草^[1-3]。酸浆宿萼、全草、果实均可入药,具有清热解毒、化痰止咳的功效^[4],在《维吾尔医常用药材》中记载了成熟酸浆全草的抗炎、护肝和利尿等功效^[5]。酸浆茎叶中含有木犀草素、槲皮素和挥发油等化学成分^[6-7],木犀草素等黄酮类化合物在抗炎^[8]、抗菌^[9]、抗肿瘤^[10]、抗病毒^[11]等方面具有显著的生理活性,因此,值得深入探究酸浆茎叶的功效成分及其作用机理。

目前关于酸浆宿萼黄酮提取、纯化及生物活性研究的报道较多^[12-14],但酸浆茎叶黄酮的报道仅体现在黄酮含量方面^[15],关于酸浆茎叶黄酮的提取工艺优化、精制及抗氧化活性方面未见报道。本研究拟以长白山野生酸浆茎叶为原料,提取酸浆茎叶黄酮,利用大孔树脂进行精制工艺优化,并从体外和体内评价酸浆茎叶黄酮的抗氧化活性,为酸浆资源的精深加工提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

酸浆茎叶:采自长白山山区,自然晾干,试验前用烘箱(60~70℃)干燥后粉碎、过 80 目筛子备用;

SPF 昆明小鼠[合格证号:SCXK(辽)2015-003];辽宁长生生物技术有限公司。

1.1.2 试剂与仪器

ABTS[2,2'-氨基-二(3-乙基-苯并噻唑啉磺酸-6)铵盐]:分析纯,美国 Sigma 公司;

XDA-1、D101、AB-8 和 X-5 型大孔吸附树脂:天津允开树脂科技有限公司;

T-AOC(总抗氧化能力)、GSH-Px(谷胱甘肽过氧化物酶)、SOD(超氧化物歧化酶)、MDA(丙二醛)检测试剂盒:山

基金项目:吉林省教育厅十二五科技规划项目(编号:吉教科合字 2015 第 391 号)

作者简介:李群,女,长春职业技术学院讲师,硕士。

通信作者:姜秀娟(1979—),女,吉林工程技术师范学院讲师,硕士。

E-mail:jiangxiujuan2006@163.com

收稿日期:2018-07-28

东博科生物产业有限公司;

亚硝酸钠、氯化亚铁、亚油酸、硫氰酸等:分析纯;

紫外可见分光光度计:UV-2102C型,尤尼柯(上海)仪器有限公司;

多功能粉碎机:CS-700Y型,永康市天祺盛世工贸有限公司;

分析天平:AL104型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

旋转蒸发器:RE52-99型,上海亚荣生化仪器厂;

真空冷冻干燥机:ALPHA 1-4 LD PLUS型,德国 Marin Christ 公司;

离心机:1-16型,德国 Sigma 公司;

全自动生化分析仪:BK-400 BIOBASE 系列分立式,济南鑫贝西生物技术有限公司。

1.2 酸浆茎叶黄酮粗提取物的制备

以72%乙醇作为提取溶剂,按1:28(g/mL)料液比,在67℃的条件下提取酸浆茎叶3.8h,过滤,减压浓缩,冷冻干燥备用。

1.3 酸浆茎叶黄酮粗提取物的精制

1.3.1 吸附率与解吸率的计算 参照文献[16]测定酸浆茎叶黄酮含量,分别按式(1)、(2)计算吸附率和洗脱率。

$$A = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%, \quad (1)$$

$$D = \frac{C_2}{C_0 - C_1} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

A——吸附率,%;

D——解吸率,%;

C_0 ——粗提液中酸浆茎叶黄酮的含量,mg/g;

C_1 ——大孔树脂吸附后的酸浆茎叶黄酮含量,mg/g;

C_2 ——洗脱后溶液中酸浆茎叶黄酮含量,mg/g。

1.3.2 大孔吸附树脂的优选 取5g酸浆茎叶黄酮粗提取物冻干粉,用500mL去离子水溶解完全,得到酸浆茎叶黄酮粗提液(黄酮含量0.52mg/g)。再称取XDA-1、D101、AB-8和X-5型大孔吸附树脂各5g,与50mL酸浆茎叶黄酮粗提液置于三角瓶中,室温震荡24h,过滤除去树脂,测定滤液中酸浆茎叶黄酮含量,计算吸附率;取吸附饱和后的树脂,以50mL70%的乙醇溶液,室温震荡12h,测定酸浆茎叶黄酮含量,并计算洗脱率。

1.3.3 静态吸附曲线 称取AB-8型大孔树脂5g,与50mL酸浆茎叶黄酮粗提液混合置于三角瓶中,室温震荡,每隔20min测定酸浆茎叶黄酮的含量,并绘制吸附率—时间曲线。

1.3.4 吸附液体积的影响 称取AB-8型大孔树脂5g,分别加入酸浆茎叶黄酮粗提液25,50,75,100,125,150mL于三角瓶中,室温震荡12h,测定滤液中酸浆茎叶黄酮含量,计算吸附率。

1.3.5 洗脱剂的优化 配制浓度为10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%的乙醇溶液各50mL,加

入吸附饱和的AB-8树脂5g,室温震荡12h后过滤,测定其中的酸浆茎叶黄酮含量,并计算洗脱率。

1.3.6 洗脱流速的优化 预处理完毕后,将大孔树脂装于层析柱中(Φ 6.0cm $\times$ 80cm),平衡12h,加入酸浆茎叶黄酮粗提液20mL,待粗提液全部进入树脂层后,以70%乙醇进行洗脱,调整洗脱流速分别为0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0mL/min,洗脱完毕,合并洗脱液并测定酸浆茎叶黄酮含量,计算洗脱率。

1.4 酸浆茎叶黄酮体外抗氧化活性

(1) 对亚硝基离子的清除作用:参照文献[17]。

(2) 对ABTS⁺·的清除作用:参照文献[18]。

(3) 对亚油酸脂质过氧化的抑制作用:参照文献[19]。

(4) 总抗氧化能力(T-AOC)的测定:按照试剂盒说明书测定。

1.5 酸浆茎叶黄酮体内抗氧化活性

1.5.1 动物分组及给药 取18~22g的SPF昆明小鼠60只,适应饲养1周,随机分为5组,即对照组(生理盐水)、抗坏血酸组(15mg/kg·BW)、酸浆茎叶黄酮低剂量组/PSF-L(100mg/kg·BW)、酸浆茎叶黄酮中剂量组/PSF-M(200mg/kg·BW)和酸浆茎叶黄酮高剂量组/PSF-H(400mg/kg·BW)。试验时间为5周,灌胃给药,每周计量小鼠体重,按式(3)计算小鼠体重增量,最后一次给药4h后,摘除眼球并取血,分离血清(4000r/min,20min),最后放入-80℃冰箱中备用。采血完毕后处死小鼠,解剖并取胸腺、肝脏和脾脏,清洗干净后吸干称重,然后分别按式(4)~(6)计算小鼠的胸腺系数、肝脏系数和脾脏系数。

$$B = \frac{M_2 - M_1}{M_1} \times 100\%, \quad (3)$$

$$T = \frac{X}{M_2} \times 100\%, \quad (4)$$

$$L = \frac{G}{M_2} \times 100\%, \quad (5)$$

$$S = \frac{P}{M_2} \times 100\%, \quad (6)$$

式中:

B——小鼠体重增量,%;

T——小鼠胸腺系数,%;

L——小鼠肝脏系数,%;

S——小鼠脾脏系数,%;

M_1 ——小鼠初体重,g;

M_2 ——小鼠终体重,g;

X——小鼠胸腺重量,g;

G——小鼠肝脏重量,g;

P——小鼠脾脏重量,g。

1.5.2 小鼠血清生化指标测定 在4℃下解冻小鼠血清,按试剂盒操作说明测定血清T-AOC、GSH-Px、SOD和MDA含量。

1.6 数据处理

试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 19.0和Origin 8.5软件分

析数据显著性并绘图。

2 结果与分析

2.1 酸浆茎叶黄酮的精制工艺优化

2.1.1 大孔树脂优选 不同大孔吸附树脂对酸浆茎叶黄酮的吸附率和洗脱率见图 1。由图 1 可知,AB-8 树脂对酸浆茎叶黄酮的吸附率和洗脱率最高,分别达到 86.25%和 88.37%,明显优于其他树脂。AB-8 属于弱极性树脂,对酸浆茎叶黄酮中的酚羟基和糖甙键的结合能力较强,同时洗脱也比较容易,因此本试验选用 AB-8 树脂精制酸浆茎叶黄酮粗提液。

不同大写字母表示吸附率之间差异显著;不同小写字母表示洗脱率之间差异显著($P < 0.05$)。

图 1 不同大孔树脂对酸浆茎叶黄酮吸附率和洗脱率的影响

Figure 1 The adsorption and desorption of microporous adsorbent resins on PSF

2.1.2 静态吸附曲线 AB-8 树脂对酸浆茎叶黄酮的吸附过程较缓慢,主要包含物理吸附和化学吸附,其吸附速率与时间的关系见图 2。由图 2 可见,随吸附时间的延长,酸浆茎叶黄酮的吸附率呈先增加后平缓的趋势,超过 200 min 后,吸附率变化较小,吸附树脂达到物理饱和状态,此时吸附率可达 82.25%,AB-8 树脂吸附酸浆茎叶黄酮属于单分子吸附^[20],更加利于酸浆茎叶黄酮的洗脱。

2.1.3 吸附液体积的影响 由图 3 可见,随着酸浆茎叶黄酮粗提液吸附体积的增加,吸附率在 15 BV 时达到最大值(84.89%),之后吸附趋于下降状态,在 30 BV 时吸附率降至 81.85%,由于吸附液浓度过大造成树脂堵塞,影响酸浆茎叶黄酮的吸附,导致吸附率降低。

图 2 静态吸附速率曲线

Figure 2 The curve of Static adsorption rate of PSF

不同字母表示吸附率差异显著($P < 0.05$)

图 3 酸浆茎叶黄酮吸附体积对吸附率的影响

Figure 3 The effect of PSF volume on adsorption rate

2.1.4 洗脱剂的优化 由图 4 可见,在乙醇浓度 70% 时达到最大值(82.68%),此时吸附树脂中的大部分酸浆茎叶黄酮都被洗脱出来,而后洗脱率随乙醇浓度的增大而减小。乙醇浓度 70% 时,酸浆黄酮与洗脱溶剂间的缔合作用力最强,能够更多地从树脂上解吸下来,乙醇浓度增大后,缔合作用力减弱,解吸率降低。

2.1.5 洗脱流速的优化 由图 5 可见,洗脱流速在 0.5~2.0 mL/min 时,洗脱率呈线性增大,在 2.0 mL/min 时,达到

不同字母表示洗脱率差异显著($P < 0.05$)

图 4 乙醇浓度对洗脱率的影响

Figure 4 The effect of ethanol content on desorption rate of PSF

不同字母表示洗脱率差异显著($P < 0.05$)

图 5 洗脱流速对洗脱率的影响

Figure 5 Effect of flow velocity on desorption rate of PSF

最大值(84.38%),此后,洗脱流速继续增加,但洗脱率减小。洗脱流速过低时,树脂内部的酸浆黄酮洗脱不够充分,洗脱周期延长;而洗脱流速过大则导致部分黄酮未能及时被洗脱出来,同样导致洗脱率降低。因此,综合考虑,洗脱流速确定为2.0 mL/min。

2.2 酸浆茎叶黄酮体外抗氧化活性

利用 AB-8 大孔树脂精制后酸浆茎叶黄酮纯度达到 39.16%。对精制酸浆茎叶黄酮进行体外抗氧化活性评价,试验结果见图 6。酸浆茎叶黄酮浓度在 6.25~800.00 μg/mL 时,NO₂⁻·清除率随之上升,并在 800.00 μg/mL 时达到最大(81.36%),稍低于抗坏血酸对照组,但其 NO₂⁻·的清除率强于红枣核总黄酮^[17](100 μg/mL 时清除率约 30%);

ABTS⁺·清除率呈上升趋势,最大值为 91.49% (800.00 μg/mL),其清除能力与四齿四棱草总黄酮^[21]相当;酸浆茎叶黄酮对亚油酸脂质过氧化的抑制率逐渐增大,并在黄酮浓度 800.00 μg/mL 时达到最大(85.26%),其抗油脂过氧化能力强于石榴汁^[22](800 μg/mL 时清除率约 82.4%);酸浆茎叶黄酮浓度在 800.00 μg/mL 时,表现出的总抗氧化能力最强,达到 26.73 U/mL,强于柳花的乙酸乙酯提取物^[23](16.9 U/mL)。酸浆茎叶黄酮不仅对 NO₂⁻·和 ABTS⁺·的清除作用较强,而且对亚油酸脂质过氧化也有一定的抑制效果,虽然抗氧化能力弱于抗坏血酸对照组,但酸浆茎叶黄酮作为一种天然抗氧化剂,也表现出较强的抗氧化活性。

图 6 酸浆茎叶黄酮的体外抗氧化活性

Figure 6 The antioxidant activities of PSF in vitro

2.3 酸浆茎叶黄酮体内抗氧化活性

2.3.1 酸浆茎叶黄酮对小鼠体质指数的影响 酸浆茎叶黄酮对小鼠体质指数的影响见表 1。由表 1 可见,与对照组比较,抗坏血酸组、酸浆茎叶黄酮低、中、高剂量组的体重增量和肝脏系数未发生显著变化(P>0.05),表明酸浆茎叶黄酮的毒性较低,动物的脏器未发生明显的病变及损伤;在不同剂量的酸浆茎叶黄酮组中,胸腺系数和脾脏系数都明显高于对照组(P<0.05),表明酸浆茎叶黄酮对小鼠的免疫功能具有一定的调节作用,效果优于抗坏血酸组(P<0.05)。酸浆茎叶黄酮表现出一定的免疫调节活性。

2.3.2 酸浆茎叶黄酮对小鼠血清生化指标的影响 由表 2 可见,抗坏血酸组、酸浆茎叶黄酮低、中、高剂量组的 T-AOC、GSH-Px 和 SOD 水平明显高于对照组(P<0.05),且中、高剂

量组均高于抗坏血酸组(P<0.01);抗坏血酸组、酸浆茎叶黄酮各剂量组的 MDA 水平明显低于对照组(P<0.01),表明酸浆茎叶黄酮可显著降低小鼠体内脂质过氧化物的含量。酸浆茎叶黄酮各剂量组都表现出较好的抗氧化活性。

3 结论

本研究优化了酸浆茎叶黄酮精制工艺,并评价其体外和体内抗氧化活性。AB-8 型大孔吸附树脂是精制酸浆茎叶黄酮的最佳树脂,上样体积为 15 BV,洗脱剂为 70%的乙醇,洗脱流速为 2 mL/min,酸浆茎叶黄酮纯度可达 39.16%;精制酸浆茎叶黄酮不仅在体外具有较强的 NO₂⁻·和 ABTS⁺·清除作用,而且对油脂的脂质过氧化也具有一定的抑制作用;精制酸浆茎叶黄酮可提高小鼠血清的 T-AOC、GSH-Px 和 SOD 活性,降低 MDA 含量,且存在一定的剂量效应关系。

表 1 酸浆茎叶黄酮对小鼠体质指数的影响[†]Table 1 The effect of PSF on body index in mice ($n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹ ·BW)	体重增量/%	胸腺系数/%	脾脏系数/%	肝脏系数/%
对照组	0	12.21±1.06	0.15±0.11	0.31±0.15	4.72±0.56
抗坏血酸组	15	12.31±2.23	0.22±0.15**	0.39±0.12**	4.75±0.43
PSF-L	100	12.25±1.12	0.24±0.17**	0.33±0.16△△	4.73±0.65
PSF-M	200	12.28±2.31	0.28±0.12**△△	0.38±0.14**	4.68±0.52
PSF-H	400	12.25±1.52	0.32±0.14**△△	0.43±0.13**△△	4.71±0.18

† *表示 P<0.05, **表示 P<0.01(与对照组比较);△表示 P<0.05,△△表示 P<0.01(与抗坏血酸组比较)。

表 2 酸浆茎叶黄酮对小鼠血清生化指标的影响[†]Table 2 The effect of PSF on biochemical value in serum of mice($n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹ ·BW)	T-AOC/(U·mL ⁻¹)	GSH-Px/(μmol·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
对照组	0	9.43±1.46	31.74±2.31	202.39±7.25	41.81±2.35
抗坏血酸组	15	10.49±2.37**	40.63±3.28**	256.34±6.18**	31.65±2.72**
PSF-L	100	9.81±2.51**△△	37.56±2.41**△△	241.43±4.59**△△	37.46±1.34**△△
PSF-M	200	10.25±2.17**△△	39.12±2.92**	261.42±4.15**△	32.65±1.24**
PSF-H	400	10.63±2.24**△△	45.45±3.01**△△	272.16±3.41**△△	29.48±1.57**△△

† *表示 P<0.05, **表示 P<0.01(与对照组比较);△表示 P<0.05,△△表示 P<0.01(与抗坏血酸组比较)。

酸浆茎叶黄酮表现出较强的体外和体内抗氧化活性,关于酸浆茎叶黄酮抗氧化活性的机制及其他生物活性将在后续研究中进行探讨。

参考文献

- [1] 杨晓虹, 陈滴, 周晓平, 等. 酸浆果实无机元素和氨基酸的含量测定[J]. 人参研究, 2000, 12(2): 34-36.
- [2] 徐伟, 李迎楠, 高雪清, 等. 复合酶对红菇娘果浆酶解条件的优化[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 114-117.
- [3] 葛玉, 段玉峰, 刘俊花, 等. 黑龙江酸浆果实及宿萼的成分分析[J]. 营养学报, 2006, 28(6): 529-530
- [4] 许惠芳, 王艳丽, 郭瑜, 等. 酸浆果总皂苷提取工艺及其体外生物活性研究[J]. 食品工业, 2017, 38(11): 131-137.
- [5] 周正辉, 焦连庆, 于敏, 等. 锦灯笼根茎挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. 特产开发, 2012, 34(1): 69-71.
- [6] 舒尊鹏, 徐炳清, 邢娜, 等. 锦灯笼化学成分[J]. 中国实验方剂学, 2014, 20(21): 99-102.
- [7] 谢瑶瑶. 酸浆茎叶化学成分的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009: 4-12.
- [8] ALI Ahmed F, JAHAN N. Optimization of culture condition, phytoconstituents and cytotoxicity of *Xylaria hypoxylon* (L.) Grev[J]. Jahangirnagar University J. Biol. Sci., 2017, 6(2): 1-9.
- [9] 贺怡琼, 于宏伟, 史宝胜, 等. 野生酸浆根茎叶提取物的抑菌活性及其稳定性研究[J]. 食品科技, 2016(4): 208-212.
- [10] LIANG L F, KURTÁN T, MÁNDI A, et al. Structural, stereochemical, and bioactive studies of cembranoids from Chinese soft coral *Sarcophyton trocheliophorum* [J]. Tetrahedron, 2018, 74(15): 1 933-1 944.
- [11] BIMAKR M, RAHMAN R A, TAIP F S, et al. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactiveflavonoid compounds from spearmint(*Mentha spicata* L.) leaves[J]. Food and Bioproducts Processing, 2011, 89(1): 67-72.
- [12] 赵丹, 张秀玲. 酸浆宿萼黄酮提取工艺优化与自由基清除活性研究[J]. 食品科技, 2013(1): 232-236.
- [13] 邱莉, 姜志虎, 刘红霞, 等. 酸浆宿萼的黄酮苷类化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(12): 744-747.
- [14] 敬思群, 郑力, 苏俊. 酸浆宿萼总黄酮和多糖的提取及含量测定[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(6): 82-84.
- [15] 赵跃刚, 程东岩, 范艳君, 等. 酸浆不同药用部位中总黄酮的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2 781-2 782.
- [16] 曹柏营, 戚颖欣, 姜秀娟, 等. 藤本豆荚总黄酮提取及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(23): 56-60.
- [17] 范艳丽, 张博, 李梓溢, 等. 红枣核总黄酮的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(3): 95-100.
- [18] 曹清明, 邬靖宇, 钟海雁, 等. 油茶叶中黄酮的超声辅助提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 162-166.
- [19] 汪光华, 唐树平, 彭名军, 等. 高良姜中 4 种黄酮化合物的体外抗氧化能力及抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(5): 168-172.
- [20] 吕雄文, 李俊, 邹宇宏, 等. 老鹰茶总黄酮降血糖作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2008, 15(2): 119-121.
- [21] 陈飞, 何先元, 周卯勤, 等. 超声辅助提取四齿四棱草中总黄酮及其抗氧化活性[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(1): 96-101.
- [22] 张洁. 石榴汁的抗氧化作用研究[D]. 济南: 山东大学, 2008: 26-28.
- [23] 王苗苗, 韩飞, 李慕春. 柳花提取物总黄酮含量及抗氧化活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(16): 20-23.