

连翘不同部位连翘苷含量测定及其 抗氧化活性的测定

黄九林¹, 魏春雁², 李庆华³

(1. 安康学院, 陕西 安康 725000; 2. 吉林省农业科学院 农业环境与资源中心, 吉林 长春 130033; 3. 吉林医药学院 医学实验中心, 吉林 吉林 132013)

摘要:为综合利用连翘, 现采用超声波辅助法提取连翘苷, HPLC 法测定连翘苷, DPPH 自由基清除法评价抗氧化活性, 对测定连翘不同部位提取液连翘苷含量及其抗氧化活性进行了研究。结果表明: 超声波辅助提取法的最佳提取条件为甲醇含量 75%, 提取 30 min, 物料比为 8:1, 提取次数为 2 次; 连翘叶中连翘苷含量显著高于连翘花和果实; 连翘花、果实、叶提取液抗氧化活性较强。表明连翘苷在连翘叶中含量较高, 连翘不同部位提取液都具有较强的抗氧化活性。

关键词:连翘; 超声波辅助法; 连翘苷; 抗氧化

中图分类号: S685.24

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2011)11-0084-03

连翘 [*Forsythiae suspensa* (Thunb.) Vahl.] 主要分布于我国中西部地区, 有清热解毒、散结消肿之功效, 主治温热、丹毒、斑疹等症^[1]。目前, 国内外学者对连翘化学成分及生理活性研究较多, 发现其具有较高抗氧化活性。人们对于连翘的药用价值主要集中在连翘果实上, 对于连翘花和连翘叶的利用还没有完全开发, 其叶和种子也有很高的药用价值和保健价值。现采用超声波辅助法提取连翘苷, 采用 HPLC 法测定连翘苷含量, 对连翘不同部位提取液的抗氧化活性进行初步研究, 旨在为其综合开发利用提供参考。

1 材料

供试材料为连翘花、叶和果实, 采自安康长寿医药有限公司。供试仪器为中草药粉碎机 FW80(北京科伟永兴仪器有限公司)、超声波清洗器 SY2200(上海声源超声波仪器设备有限公司)、紫外-可分光光度计 754P(上海光谱仪器有限公司)、高效液相色谱仪 LC-10ATVP(日本岛津)和多功能烘烤箱 101A-1(上海市实验仪器总厂)。供试试剂有甲醇(西安化学试剂厂)、DPPH(sigma)、VC(天津市登峰化学试剂厂)和连翘

苷(同田生物技术公司)。

2 方法

2.1 连翘苷含量测定

2.1.1 对照溶液的制备 精密称取连翘苷对照品 5.6 mg 置于 10 mL 容量瓶中, 用 75% 甲醇定容至刻度, 用微孔滤膜(4.5 μm)过滤, 作为对照溶液。

2.1.2 提取方法 采用超声波辅助法提取连翘苷, HPLC 法测定连翘苷含量, 进行正交试验(见表 1)。

表 1 正交试验结果

| 试验号 | 因素 | | | | 含量/% |
|-----|------------|--------------|------|------|------|
| | 乙醇含量 /% | 提取时间 /min | 物料比 | 提取次数 | |
| 1 | 75 | 20 | 6 | 1 | 0.24 |
| 2 | 75 | 30 | 8 | 2 | 0.43 |
| 3 | 75 | 40 | 10 | 3 | 0.35 |
| 4 | 80 | 20 | 8 | 3 | 0.24 |
| 5 | 80 | 30 | 10 | 1 | 0.37 |
| 6 | 80 | 40 | 6 | 2 | 0.31 |
| 7 | 85 | 20 | 10 | 2 | 0.29 |
| 8 | 85 | 30 | 6 | 3 | 0.22 |
| 9 | 85 | 40 | 8 | 1 | 0.33 |
| T1 | 1.02 | 0.77 | 0.77 | 0.94 | |
| T2 | 0.92 | 1.02 | 1.00 | 1.03 | |
| T3 | 0.84 | 0.99 | 1.01 | 0.81 | |

2.1.3 连翘提取液的制备 将连翘花、叶、果实 50℃ 烘干, 粉碎, 过 20 目筛, 精密称取 1 g, 置于具塞三角瓶中, 精确加入 8 mL 75% 乙醇, 超声波提取 30 min, 提取 2 次, 过滤, 合并滤液定容至

收稿日期: 2011-09-07

第一作者简介: 黄九林(1981-), 男, 四川省广安市人, 硕士, 讲师, 从事天然产物研究。E-mail: huangjiulin@yahoo.com.cn.

50 mL,用微孔滤膜(4.5 μm)过滤,作为样品溶液。

2.1.4 连翘苷含量测定 取上述样品溶液 10 μL ,通过高效液相色谱仪测定连翘提取液中连翘苷的含量^[2]。标准品及连翘提取液色谱图见图 1,图 2。

色谱条件:柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$;柱型号为 C-18;检测器为紫外光度检测器;波长为 270 nm;梯度方式为高压梯度;流动相为甲醇:水(1:1)。

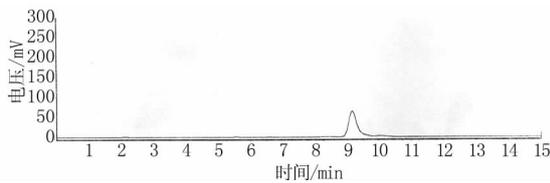


图 1 连翘苷标准品色谱图

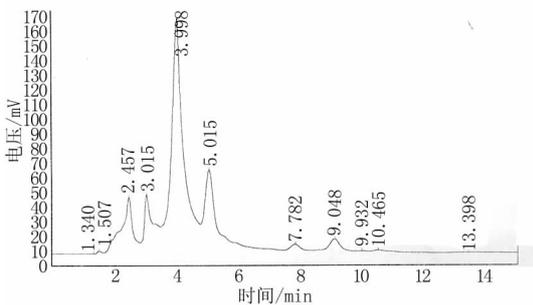


图 2 连翘提取液色谱图

2.1.5 连翘苷标准曲线的绘制 分别精密吸取体积为:3、5、10、15 和 20 μL 的连翘苷标准品溶液,按 2.1.4 项所列条件测定连翘苷含量,得连翘苷标准品色谱图。按进样量对连翘苷峰面积做标准曲线,得出连翘苷色谱峰面积(Y)与连翘苷进样量(X)之间的回归方程为: $Y = 4\ 000\ 000X - 0.437\ 6$, $R^2 = 0.999$ 。结果表明,进样量在 1.68~11.2 μg 有良好的线性关系。

2.2 抗氧化活性测定

2.2.1 DPPH 自由基样品溶液的制备 精密称取 23.7 mg 的 DPPH 对照品,用甲醇定容至 500 mL。得到浓度为 47.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的自由基样品溶液。分别取 2、4、6、8 和 10 mL DPPH 溶液,定容至 10 mL,分别测定各溶液的吸光度,得到标准曲线。得出吸光度(Y)与 DPPH 浓度(X)之间的回归方程为: $Y = 0.022\ 6X + 0.005$, $R^2 = 0.999\ 5$ 。表明 DPPH 浓度为 9.48~37.92 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有良好的线性关系。

2.2.2 超声波辅助法提取连翘苷 鲜样用自来水冲净后于 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温鼓风干燥箱中干燥至恒重,干燥的样品用粉碎机粉碎,过 1.2 mm 的筛子。取粉碎样品 5.0 g,加无水甲醇 150 mL 室温下超声波辅助提取 30 min,过滤。滤渣重新加无水甲醇 150 mL 相同条件下再提取 1 次。合并两次提取液,40 $^{\circ}\text{C}$ 减压蒸干。用 50% 的乙醇重新溶解,去除叶绿素,滤液用 50% 乙醇定容至 50 mL 摇匀,作供试样品液备用。每个样品重复 3 次。

2.2.3 DPPH 自由基清除试验 分别精密吸合适浓度连翘提取物溶液,各精密加入 2 mL 浓度为 47.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液,用甲醇定容至 10 mL。室温下避光静置 1 h 后于 516 nm 处测定吸光度^[3]。

DPPH 自由基的清除率计算公式:

$$\text{抑制率}/\% = \frac{(DPPH \cdot)_{t=0} - (DPPH \cdot)_t}{(DPPH \cdot)_{t=0}}$$

$\times 100$

式中 $(DPPH \cdot)_{t=0}$ 为体系中 DPPH 自由基初始浓度时的吸光度值; $(DPPH \cdot)_t$ 为 t 时刻溶液中 DPPH 自由基的浓度的吸光度值^[2]。以样品对 DPPH 自由基清除率作图,就可以得到清除 50% DPPH 自由基时所需样品的量,即 EC_{50} 值。

3 结果与分析

3.1 超声波辅助提取连翘苷

超声提取法利用超声波产生的强烈振动、高加速度、空化效应和搅拌作用等,可加速有效成分进入溶剂,从而提高提出率,缩短提取时间,并且避免高温对提出成分的影响。由表 1 确定其最佳提取方法为乙醇含量 75%,提取 30 min,物料比为 8:1,提取次数为 2 次。

3.2 连翘提取液对 DPPH 自由基清除活性

采用超声波提取法提取抗氧化活性化合物时,如果溶剂中含有水,水在超声波作用下会产生自由基,降低提取物的抗氧化活性,因此选用无水甲醇作为提取溶剂^[4]。

连翘花、叶和果实提取液连翘苷含量及抗氧化活性测定结果见图 3 及表 2。由表 2 可知:(1)连翘花和果实中连翘苷含量比较低,连翘叶中连翘苷含量比较高,新叶明显高于老叶;(2)连翘花、叶和果实提取液都具有较高的抗氧化活性,但连翘花和果实提取液的抗氧化活性明显高于连翘叶

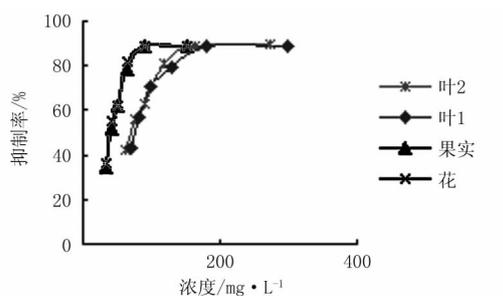


图3 连翘提取液对DPPH抑制率

表2 连翘提取液连翘苷含量及EC₅₀

| 项目 | 采收日期 | 连翘苷含量/% | EC ₅₀ /mg·mg ⁻¹ |
|----|-------|---------|---------------------------------------|
| 花 | 04-25 | 0.38 | 4.26 |
| 叶1 | 04-25 | 2.25 | 7.27 |
| 叶2 | 10-01 | 0.69 | 7.41 |
| 果实 | 10-01 | 0.37 | 4.35 |

提取液;(3)新叶提取液的抗氧化活性略高于老叶提取液,连翘花提取液的抗氧活性略高于果实提取液;(4)连翘苷含量与连翘提取液抗氧化活性没

有显著线性关系。

4 结论

连翘花、果实和叶提取物都具有较强的抗氧化活性,可以作为天然抗氧化剂的来源。其抗氧化活性需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 中国科学院北京植物所. 高等植物图鉴:第三册[M]. 北京: 科学出版社,1974.
- [2] 曲欢欢,李白雪,燕菲,等. 用清除有机自由基 DPPH 法评价连翘不同部位抗氧化作用[J]. 中国中药信息杂志, 2008(S1):32-34.
- [3] Larrauri J A, Sanchez M C, Saura C F. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels[J]. Agric Food Chem, 1998, 46:2694.
- [4] Paniwnyk L, Beaufoy E, Lorimer J P, et al. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*[J]. Ultrason Sonochem, 2001, 8:299-301.

Study on Content of Phillyrin and the Antioxidative Capacity of Different Parts of *Forsythia suspensa*

HUANG Jiu-lin¹, WEI Chun-yan², LI Qing-hua³

(1. Ankang College, Ankang, Shanaxi, 725000; 2. Agricultural Environment and Resource Center of Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin, 130033; 3. Jilin Medical College, Jilin, Jilin, 132013)

Abstract: In order to determine the content of phillyrin and the antioxidant activities of different parts of *Forsythia suspensa*, ultrasonic extraction was applied to extract phillyrin, the antioxidant activities were assayed through scavenging effects to DPPH radical, and the content of forsythin of *Forsythia suspensa* was determined by HPLC. The results showed that the best extraction condition was the methyl alcohol content 75%, with draws 30 minutes, the material ratio was 8:1, the extraction number of times was twice. The content of phillyrin in forsythia leaf was higher than forsythia flower and fruit obviously. Both different parts of *Forsythia suspensa* had antioxidant activity. So the content of phillyrin in forsythia leaf was higher and different parts of *Forsythia suspensa* had antioxidant activity.

Key words: *Forsythia suspensa*; ultrasonic extraction; phillyrin; antioxidation

