

草珊瑚总黄酮稳定性研究

郁建生, 罗显华

(铜仁职业技术学院, 贵州 铜仁 554300)

摘 要: 以草珊瑚总黄酮含量为指标考察其提取液的稳定性, 研究结果表明: 乙醇提取法草珊瑚总黄酮稳定性好、提取率高, 其提取率是沸水提取法的 3.25 倍; 在八种常用的附加稳定剂中以硫代硫酸钠, 亚硫酸钠对总黄酮的稳定性影响较大, 可使总黄酮含量降低 21.98%~12.07%; 草珊瑚提取液中总黄酮含量在存放三年中平均每年降低 0.86%, 在 100℃ 加热 30min 后降低 0.82%, 变化甚微, 是非常稳定的; 强光直射 30h 可使提取液中总黄酮含量平均下降 10.27%, 对稳定性影响较大; 提取液的 pH 值在 4~6 时总黄酮含量最稳定。

关键词: 草珊瑚总黄酮; 提取液; 稳定性; 研究

Study on Stability for Flavonoids Extracted from *Sarcandrae glabra* Nahal

YU Jian-sheng, LUO Xian-hua

(Tongren Vocational Institute, Tongren 554300, China)

Abstract: The stability was studied with flavonoids extracted from *Sarcandrae glabra* Nahal as indexes. The research results expressed that the ethanol extracting rate of flavonoids from *Sarcandrae glabra* Nahal is the highest, 3.25 times more than the boiling water extraction. However for the eight kinds additives commonly used, sodium thiosulphate and sodium sulfate make the flavonoids to decrease 21.98%~12.07%; The flavonoid contents become less when the raw material has been stored longer and the flavonoid's contents descended also decrease in average 24.74% annually. The flavonoids assayed in the extraction liquid remain stable after being placed three years whereas the flavonoids in average decrease only 0.86% annually and also decrease only 0.82% after being heated to put out the germ. The strong light shooting for 30 hours can make the flavonoids to decrease averagely 10.27%. The flavonoids in the extraction liquid are most stable in pH 4~6.

Key words flavonoids from *Sarcandrae glabra* extraction liquid stability; studies

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0044-04

草珊瑚 [*Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai] 又名肿节风、九节茶、接骨金粟兰、接骨木等, 系金粟兰科草珊瑚植物, 为多年生常绿草本或亚灌木, 药、食两用。在我国长江以南各省均有分布, 特别是云、贵、川较为多见。草珊瑚叶苦辛、性温、有祛风通络、活血祛瘀、止血止痛、接骨续筋之功效, 民间常用来治疗风湿痹症, 跌打损伤等^[1]及作茶饮, 已有数百年的历史。

现有研究表明黄酮类化合物是草珊瑚中含量最多、最主要的活性成分之一。草珊瑚总黄酮具有抗菌消炎、清热解毒、抗多种肿瘤、促进骨折愈合、改善血液循环、镇痛、抗疲劳、抗氧化、抑制流感病毒等多种生物活性^[1-5]。急性毒性试验表明草珊瑚及其提取物属实际无毒; 动物精子畸性试验, 小鼠骨髓细胞微核试验等

均为阴性, 未发现致突变作用, 所以是非常安全的^[6-7]。目前, 草珊瑚的加工产品有草珊瑚注射液、草珊瑚口服液、草珊瑚浸膏、草珊瑚胶囊、草珊瑚含片、草珊瑚片、草珊瑚保健茶、草珊瑚奶糖、草珊瑚保健饮料、草珊瑚洗面奶、草珊瑚牙膏、草珊瑚洗发香波等数十种之多^[8]。草珊瑚在医药品、保健用品、保健食品领域中的应用越来越广泛, 但对草珊瑚总黄酮在不同状态下的稳定性研究尚未见报道。为了更合理的开发利用草珊瑚资源, 本研究以草珊瑚总黄酮含量为考察指标, 分别考察提取工艺、稳定剂、加热、pH、存放时间、光照、温度等因素对草珊瑚总黄酮稳定性的影响, 研究保持草珊瑚总黄酮稳定性的各种最佳条件因素, 从而为生产中最有效的开发利用草珊瑚总黄酮、发挥草珊瑚的最大经济效益提供科学依据。

收稿日期: 2006-05-16

基金项目: 贵州省省长专项资金项目(黔省专合字(2005)261号);

贵州省“十一五”农业科技攻关项目(黔科合NY字[2006]3020)

作者简介: 郁建生(1956-), 男, 教授, 硕士, 主要从事天然药物的研究。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

实验用草珊瑚全草均采自贵州省江口县梵净山岳同一地点,由铜仁职业技术学院生物技术重点实验室进行鉴定及采用统一的干燥方法加工制样,避免背景干扰。

所用试剂 NaNO_2 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 NaHSO_3 、 NaSO_3 、EDTA、吐温-80等均为分析纯;标准品芦丁(纯度大于98%) 美国Sigma公司;乙醇为95%食用酒精。

TU-1800紫外可见分光光度计 北京普析;RE-52旋转蒸发仪 上海亚荣;不锈钢提取锅 武汉立中;PHSJ-3F精密酸度计 上海雷磁;ALG5/10自动灌装封口机 上海国彩;电子天平 美国奥豪斯。

1.2 方法

1.2.1 草珊瑚总黄酮的测定方法

草珊瑚总黄酮的测定方法采用芦丁比色法^[9],测定波长500nm,回归方程: $C=84.317A-0.77361$, ($r=0.9997$);加样回收的平均回收率99.37%,RSD=1.85% ($n=6$);精密测定RSD=0.85%。

1.2.2 草珊瑚总黄酮的沸水提取法

取草珊瑚全株(除根)干品制粗粉50g,根据 $L_9(3^4)$ 正交设计沸水提取筛选出的最优水平组合 $A_3B_3D_1C_2$ 进行提取(即采用100℃温度、加水量(固液比)10倍、每次1h、提取2次)。合并提取液过滤,滤液浓缩至糖浆状时止,搅拌加入95%乙醇至含醇量达65%以上,以沉淀除去蛋白质、淀粉、脂肪、多糖等,过滤除去沉淀,减压回收乙醇,趁热过滤,加等量水定容并调pH5~7后冷藏静置过滤,得总黄酮粗提液,过AB-8型大孔吸附树脂柱分离纯化,过柱完后用60%乙醇洗脱,减压回收乙醇,过滤,按一定的百分浓度用蒸馏水溶解定容,得总黄酮提取液,按1.2.1方法进行测定。

1.2.3 草珊瑚总黄酮的乙醇提取法

取草珊瑚全草(除根)制粗粉50g,根据 $L_9(3^4)$ 正交设计筛选出的最优水平组合 $A_1B_3D_3C_3$ 进行乙醇浸提(即采用10倍量的60%乙醇、80℃温度、每次3h、提取3次)。提取后合并醇提液过滤,减压回收乙醇,趁热过滤,加等量蒸馏水定容并调pH5~7后冷藏静置过滤,得总黄酮粗提液,过AB-8型大孔吸附树脂柱分离纯化,过柱完后用60%乙醇洗脱,减压回收乙醇,过滤,按一定的百分浓度用蒸馏水溶解定容,得总黄酮提取液,按

1.2.1方法进行测定。

2 结果与分析

2.1 提取工艺对草珊瑚总黄酮稳定性的影响

表1 提取工艺对草珊瑚总黄酮稳定性的影响
Table 1 Effects of extraction technics on stability of the flavonoids of *Sarcandrae glabra*

沸水提取法		乙醇提取法	
总黄酮含量($\mu\text{g/ml}$)	提取率(%)	总黄酮含量($\mu\text{g/ml}$)	提取率(%)
22.683	2.13	55.423	6.93

对比表1中两种不同的提取方法可知,乙醇提取法草珊瑚总黄酮稳定性好,提取率高;沸水提取法草珊瑚总黄酮稳定性差,提取率低;乙醇提取法对草珊瑚总黄酮的提取率是沸水提取法的3.36倍。

2.2 不同稳定剂^[10]对草珊瑚总黄酮稳定性的影响

取草珊瑚全草(除根)干品制粗粉,按1.2.3法制成总黄酮提取液,取8份,分别加入不同的稳定剂(加入量EDTA、吐温-80为0.1%,其余均为0.2%)后100℃灭菌30min,按1.2.1方法测定,结果见表2。

从表2可知,硫代硫酸钠、亚硫酸钠对总黄酮的稳定性影响较大,可使总黄酮含量降低21.98%~12.07%,在生产中应避免使用;而VC、偏重亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、吐温-80等稳定剂对总黄酮的稳定性影响小或无影响,适合选用。

2.3 加热对草珊瑚总黄酮稳定性的影响

取草珊瑚全草(除根)干品制粗粉,按1.2.3法制成总黄酮提取液,取3份,100℃加热30min,按1.2.1法测定,加热前后总黄酮稳定性变化见表3。

表3 加热对草珊瑚总黄酮稳定性的影响
Table 3 Effects of heating on stability of the flavonoids of *Sarcandrae glabra*

样品	总黄酮含量($\mu\text{g/ml}$)	
	加热前	加热后
20050106	36.564	36.226
20050208	40.106	39.60
20050310	46.514	46.344
平均值	41.062	40.724

从表3可见,加热后3批样品总黄酮含量平均下降0.338 $\mu\text{g/ml}$,占总量的0.82%,变化小是非常稳定的。

2.4 不同pH值对草珊瑚总黄酮稳定性的影响

表2 不同稳定剂对草珊瑚总黄酮稳定性影响

Table 2 Effects of different additional pharmaceutical on stability of the flavonoids of *Sarcandrae glabra*

稳定剂	VC	偏重亚硫酸钠	亚硫酸氢钠	亚硫酸钠	硫代硫酸钠	EDTA	吐温-80	未加
颜色	浅棕红	浅棕红	浅棕红	浅棕红	棕红	棕红	棕红	棕红
pH值	5.22	5.73	5.59	6.31	5.97	5.93	5.99	6.09
总黄酮含量($\mu\text{g/ml}$)	18.96	18.62	18.79	16.43	14.49	18.62	18.70	18.69

表4 不同pH值对草珊瑚总黄酮稳定性的影响
Table 4 Stability of flavonoids influenced by different pH values

pH	2.9	3.9	4.9	5.9	6.9	7.9	8.9	9.9	未调
样1总黄酮含量($\mu\text{g/ml}$)	18.113	20.896	21.064	22.414	18.788	18.125	16.511	14.570	22.112
样2总黄酮含量($\mu\text{g/ml}$)	21.832	23.977	24.543	25.667	21.685	20.875	19.136	17.294	24.985
样3总黄酮含量($\mu\text{g/ml}$)	20.543	22.434	23.415	24.657	21.125	20.474	18.847	16.943	24.258

表7 温度对草珊瑚总黄酮稳定性影响
Table 7 Effects of temperature on stability of flavonoids of *Sarcandrae glabra*

样品	总黄酮含量($\mu\text{g/ml}$)														
	灭菌后室温存放(d)					灭菌后37~40℃存放(d)					灭菌后2~4℃存放(d)				
	0	30	60	180	360	0	15	30	60	180	0	15	30	60	180
031202	48.762	48.760	48.750	48.681	48.288	48.762	48.762	48.751	48.705	48.412	48.762	48.760	48.755	48.729	48.288
031204	46.583	46.583	46.572	46.495	46.225	46.583	46.581	46.570	46.513	46.226	46.583	46.581	46.576	46.537	46.093
031206	48.421	48.418	48.411	48.310	48.096	48.421	48.420	48.409	48.364	48.101	48.421	48.419	48.410	48.356	47.892
平均值	47.922				47.536	47.922				47.580	47.922				47.424

取草珊瑚全草(除根)干品制粗粉三份,按1.2.3方法制成草珊瑚总黄酮提取液,各取八份,分别用4% NaOH及10% H_2SO_4 调不同的pH值,100℃加热30min,按1.2.1方法测定,结果见表4及图1。

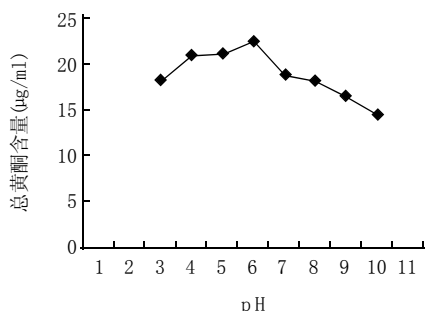


图1 不同pH值对草珊瑚总黄酮含量稳定性影响

Fig.1 Stability of flavonoids affected by different pH values

表4结果表明,三批提取液的pH值均在4~6时总黄酮含量高最稳定。

2.5 自然存放时间对草珊瑚制剂总黄酮稳定性的影响

取草珊瑚全草(除根)干品制粗粉3份,按1.2.3法制成总黄酮提取液,装入玻璃器皿中密封,100℃加热30min灭菌,在自然条件下存放三年,按1.2.1方法定期对草珊瑚总黄酮进行测定,其稳定性变化见表5。

表5 自然存放时间对草珊瑚制剂总黄酮稳定性的影响

Table 5 Effects to put aside for safe-keeping time on stability of product flavonoids made from *Sarcandrae glabra*

时间	总黄酮含量($\mu\text{g/ml}$)			
样品	200104	200204	200304	200404
20010126	35.483	35.314	35.061	34.724
20010230	17.776	17.607	17.439	17.186
20010401	31.267	31.014	30.677	30.424
平均值	28.175	27.978	27.726	27.445

从表5可见,三批提取液样品从2001年4月到

2004年4月在存放三年过程中总黄酮含量平均每年降低0.243 $\mu\text{g/ml}$,占总量的0.86%,所以比较稳定、变化小。

2.6 光照对草珊瑚总黄酮稳定性的影响

取草珊瑚全草(除根)干品制粗粉3份,按1.2.3法制成总黄酮提取液,装入玻璃器皿中密封,100℃加热30min灭菌,分别在无光照下存放一年,室内光放置30d,强光下放置10、30h,按1.2.1方法对草珊瑚总黄酮进行测定,结果见表6。

表6 光照对草珊瑚总黄酮稳定性的影响

Table 6 Effects of illumination on flavonoids stability

样品	总黄酮含量($\mu\text{g/ml}$)				
	0光照	无光照1年	室内光30d	强光10h	强光30h
20030201	21.467	21.353	20.980	20.310	19.462
20030202	19.484	19.329	19.041	18.451	17.439
20030203	19.157	18.993	18.451	17.860	16.764
平均值	20.036	19.892	19.491	18.874	17.888

从表6可知,3批提取液样品无光照下存放一年总黄酮含量平均下降0.72%;室内光放置30d后平均下降2.72%;受强光照10h后总黄酮含量平均下降5.80%;强光照30h后平均下降10.72%,强光照对总黄酮的稳定性影响较大,在存放中应避免强光照。

2.7 温度对草珊瑚总黄酮稳定性影响

取草珊瑚全草(除根)干品制粗粉3份,按1.2.3法制成总黄酮提取液,装入玻璃器皿中密封,100℃加热30min灭菌后分别在不同的温度下存放,按1.2.1方法定期对所含总黄酮进行测定,观察其稳定性,结果见表7。

表7表明,灭菌后室温存放一年总黄酮含量平均下降0.81%;在37~40℃存放180d总黄酮含量平均下降0.71%;在2~4℃存放180d总黄酮含量平均下降1.04%;室温存放对草珊瑚总黄酮稳定性影响小,其产品完全可以室温下存放。

3 结论与讨论

3.1 $L_9(3^4)$ 正交设计筛选出的沸水提取最优水平组合(即温度 100℃、加水量(固液比)10 倍、每次 1h、提取 2 次)及乙醇浸提最优水平组合(即 10 倍量的 60% 乙醇、80℃ 温度、每次 3h、提取 3 次)对草珊瑚总黄酮进行提取并通过 AB-8 型大孔吸附树脂柱分离纯化,比较两种提取工艺对草珊瑚总黄酮稳定性的影响。结果表明,乙醇提取法草珊瑚总黄酮稳定性好、提取率高,其提取率是沸水提取法的 3.25 倍。

3.2 在天然植物提取液的生产中,常常加入抗氧化剂及金属络合剂等附加剂以防止和延缓有效成分的氧化分解,加入助溶剂以增加提取液的澄明度。而这些附加剂的加入既要保护提取液中的天然活性成分不受氧化分解,又要不影响提取液的稳定性、澄明度和活性作用。实验表明,硫代硫酸钠、亚硫酸钠对草珊瑚总黄酮的稳定性影响较大,可使总黄酮含量降低 21.98%~12.07%,在生产中应避免使用。而 VC、偏重亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、吐温-80 等对草珊瑚总黄酮稳定性影响小均可选用,加入抗氧化剂后并可使提取液的颜色浅淡而改善提取液的澄明度。但 VC、偏重亚硫酸钠、亚硫酸氢钠等偏弱酸性,对提取液 pH 值有不同程度影响,在生产中应注意调整。

3.3 在草珊瑚注射液、口服液等的加工生产中,常常需要加热灭菌以有利于产品的长时间保存,三批提取液在 100℃ 加热 30min 灭菌后总黄酮含量平均下降 0.338 μg/ml,占总量的 0.82%;所以草珊瑚总黄酮在 100℃ 加热 30min 是比较稳定的,含量变化小,此有利于草珊瑚产品的灭菌保存。

3.4 在草珊瑚总黄酮的提取生产中,pH 值是总黄酮质量稳定性的一项重要指标,对总黄酮的稳定性影响较大。试验表明,提取液的 pH 值在 4~6 时总黄酮含量高最稳定。

3.5 对自然存放时间不同的草珊瑚提取液考察表明:

三批提取液样品从 2001 年 4 月到 2004 年 4 月在存放三年过程中总黄酮含量平均每年降低 0.243 μg/ml,占总量的 0.86%,所以比较稳定,变化小。

3.6 黄酮类化合物是广泛存在于植物中的一类黄色色素,因分子中含有碱性氧原子能与酸结合成盐,又称黄碱素。而色素受光照影响较大。实验表明,三批提取液样品受室内散射光照 30d 总黄酮含量平均下降 2.72%;强光直射 10h 平均下降 5.80%,强光直射 30h 平均下降 10.72%。而强光直射对草珊瑚总黄酮稳定性影响大,可使总黄酮分解含量降低。所以在保存使用中应避免强光长时间直射。

3.7 草珊瑚总黄酮在不同温度下存放实验结果表明,灭菌后室温存放一年总黄酮含量平均下降 0.81%;在 37~40℃ 存放 180d 总黄酮含量平均下降 0.71%;在 2~4℃ 存放 180d 总黄酮含量平均下降 1.04%;室温存放对草珊瑚总黄酮稳定性影响小,其产品完全可以室温下存放。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1997.
- [2] 王浴生, 邓文龙, 薛春生. 中药药理与应用[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000: 714.
- [3] 龙维英. 草珊瑚浸膏对流行性感冒病毒的抑制效果观察[J]. 江西中医药, 1989, 20(3): 41.
- [4] 戴培兴, 洪永副. 肿节风抗肿瘤化学成分初步研究[J]. 中草药, 1981, 12(3): 9.
- [5] 蒋伟哲, 孔晓龙. 肿节风片对恶性肿瘤和免疫功能的影响[J]. 广西医科大学学报, 2001, 18(1): 39.
- [6] 夏勇, 傅剑云, 徐彩菊. 草珊瑚浸膏的急性毒性和致突变性探讨[J]. 浙江中医学院学报, 1996(5): 36.
- [7] 孙建琴, 孙晓红. 草珊瑚的毒性研究[J]. 贵阳医学院学报, 1998(1): 23.
- [8] 郁建生. 草珊瑚的药用保健功能[J]. 铜仁职业技术学院学报, 2005(4): 39.
- [9] 郁建生. 分光光度法测定复方草珊瑚注射液中总黄酮含量方法的探讨[J]. 中医医药杂志, 2002(3): 41.
- [10] 曹春林, 施顺清. 中药药剂学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1989: 396.

美国《化学文摘》收录期刊

《中国学术期刊文摘(英文版)》收录期刊