

文章编号: 1000-5013(2012)01-0055-05

枇杷叶总黄酮的提取及其脂质体的抗氧化活性

黄丽燕¹, 韩磊¹, 刘青¹, 刘珍伶², 李珍珍¹

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 兰州大学 化学化工学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 采用乙醇回流法提取枇杷叶中黄酮类物质, 制备黄酮脂质体, 并考察其抗氧化活性及各因素对总黄酮提取率的影响. 优化总黄酮脂质体制备处方, 并测定其抗氧化活性. 优化结果表明: 最佳提取工艺中乙醇体积分数为 70%, 料液比为 1:60, 提取温度为 80 °C, 提取时间为 1.5 h; 黄酮脂质体最佳处方中卵磷脂与胆固醇的质量比为 4:1, 卵磷脂与黄酮的质量比为 20:1, 磷酸盐缓冲液 pH 值为 5.8. 体外抗氧化结果显示: 不同质量比的黄酮及其脂质体对猪油都具有一定的抗氧化作用, 且随着其剂量的增加而增强; 质量分数相同时, 黄酮脂质体的抗氧化效果优于黄酮溶液, 且与抗坏血酸有较好的协同抗氧化增效作用.

关键词: 枇杷叶; 黄酮; 脂质体; 抗氧化

中图分类号: R 284.2; TQ 289

文献标志码: A

黄酮是一类重要的有机化合物, 其药用价值已引起人们的广泛关注^[1]. 由于黄酮有较强的抗氧化活性, 与合成抗氧化剂(如二丁基羟基甲苯、丁基羟基茴香醚等)等相比, 具有高效、低毒、价廉、易得等优点, 日益受到重视. 然而, 黄酮易氧化, 将其制成载药脂质体后, 可提高黄酮的稳定性. 脂质体具有缓释作用, 可达到抗氧化的长效作用, 且脂质体低毒、生物降解性好, 将黄酮制备成脂质体后有很好的应用前景. 近年来, 国内外都非常重视将黄酮类化合物开发成食品添加剂, 已开发添加黄酮类化合物的可乐型饮料、面包、啤酒等, 其口感好、易保存、不用另加保鲜剂, 并且添加物本身具有一定的抑菌、杀菌等功效^[2]. 枇杷在我国分布广泛, 枇杷叶是我国传统中药, 具有抗炎、止咳作用. 黄酮是枇杷叶中的主要有效成分之一^[3]. 目前, 种植的枇杷主要是采摘果实, 枇杷叶是废弃物而未得到有效利用, 既浪费又污染环境. 本文从枇杷叶中提取、分离总黄酮, 制备成黄酮脂质体, 并对其抗氧化性能进行研究.

1 实验部分

1.1 材料和仪器

芦丁标准品(湖南农业大学生物科学技术学院); 枇杷叶(华侨大学); 抗坏血酸、亚硝酸钠、冰乙酸、可溶性淀粉、大豆卵磷脂、胆固醇、石油醚(60~90 °C)等(分析纯, 上海国药集团化学试剂有限公司).

752N 型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); TDL-60B 型台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司); BS124S 型分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); HH-S 型数显恒温水浴锅, XH-C 型漩涡混合器(江苏常州市国立试验设备研究所); R 系列旋转蒸发器(上海申生科技有限公司); S-3500N 型扫描电子显微镜(日本日立公司).

1.2 材料处理

采摘新鲜枇杷叶, 用自来水将其背面绒毛等杂物冲洗干净, 晾至表面无水, 置于 60 °C 烘箱, 粉碎过 60 目筛备用.

1.3 芦丁标准曲线

准确称取 10 mg 于 120 °C 下干燥恒定质量的芦丁标准品, 加入体积分数为 60% 的乙醇溶解, 定容

收稿日期: 2011-07-25

通信作者: 刘青(1970-), 女, 副教授, 主要从事药理学研究. E-mail: liuq@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20972061); 国务院侨办科研基金资助项目(10QZR15)

至 100 mL 容量瓶中,摇匀可得 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芦丁标准液. 分别取 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 的标准液于 25 mL 容量瓶中,不足 10 mL 的用 60% 乙醇补足,加入 0.8 mL, 5% 的 NaNO_2 试液,混匀,放置 6 min. 然后,加入 0.8 mL, 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,混匀,放置 6 min,再加入 10 mL, $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液,混匀,用蒸馏水定容至 25 mL,摇匀,放置 15 min. 最后,在 510 nm 处测混合液的光密度,以光密度值 $D(510)$ 对芦丁质量浓度 C 作标准曲线图. 由此可得标准曲线方程为 $Y=9.95X-0.0138$, 相关系数 $R^2=0.9975$, 在 $0.01 \sim 1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好.

1.4 枇杷叶总黄酮醇提工艺^[4-7]

提取液经粗滤和石油醚萃取后,在旋转蒸发器进行蒸干,产品用 60% 的乙醇定容至 100 mL 容量瓶中,摇匀备用. 然后,精确吸取 1.0 mL 提取液,其他操作与节 1.3 相同,测定其在 510 nm 光密度值以确定其浓度.

1.5 枇杷叶黄酮脂质体的制备^[6-10]

1.5.1 空白脂质体 称取 0.37 g 的磷酸氢二钠与 2.0 g 的磷酸二氢钠,加蒸馏水适量,溶解并稀释至 1 L (pH=5.7),配制成磷酸盐缓冲液(PBS). 称取 0.9 g 的大豆卵磷脂和 0.3 g 胆固醇于 50 mL 小烧杯中,加 1~2 mL 无水乙醇,置于 65~70 °C 水浴中,搅拌使溶解,旋转该小烧杯使磷脂的乙醇液在杯壁上成膜,用吸耳球轻吹风,将乙醇挥去. 另取 30 mL 磷酸盐缓冲液于小烧杯并置于 65~70 °C 水浴中,保温待用. 取预热的 30 mL 磷酸盐缓冲液,加至含有磷脂和胆固醇脂质膜的小烧杯中,于 65~70 °C 水浴中搅拌水化 10 min; 随后将小烧杯置于磁力搅拌器上,室温下搅拌 30~60 min, 如果溶液体积减少,可补水至 30 mL,混匀,即得空白脂质体. 最后,将所得脂质体溶液通过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜两遍,进行整粒,于电子显微镜下观察脂质体的形态.

1.5.2 黄酮脂质体 首先确定影响脂质体包封率、形态、粒径分布的 3 种主要因素,即卵磷脂与胆固醇质量比、卵磷脂与黄酮质量比、磷酸缓冲液 pH 值. 各因素设定 3 水平,依据 $L_9(3^3)$ 做正交试验. 称取一定量的卵磷脂、胆固醇置 500 mL 的圆底烧瓶中,加入 1~2 mL 无水乙醇,将乙醇提取的黄酮溶液经抽滤旋转蒸干后用磷酸盐缓冲液进行稀释. 实验中,除将磷酸盐缓冲液换成枇杷叶的黄酮溶液外,其他步骤同空白脂质体制备,即采用被动载药的方法制备的黄酮脂质体.

1.6 测定方法

1.6.1 枇杷叶黄酮脂质体包封率的测定^[11-12] 准确吸取等量空白脂质体和黄酮脂质体于两支离心管中, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 将上清液以离心后的空白脂质体作为对照,进行光密度值测定,代入芦丁标准曲线回归方程,可得未包入脂质体中药物量 ($\rho_{\text{游}}$). 另准确吸取等量空白脂质体和黄酮脂质体于试管中,分别加适量无水乙醇破乳,漩涡 3 min 后,以 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清液以空白脂质体为对照,测定光密度值,代入芦丁标准曲线回归方程,可得总药物量 ($\rho_{\text{总}}$). 包封率 (η) 的计算为

$$\eta = (\rho_{\text{总}} - \rho_{\text{游}}) / \rho_{\text{总}} \times 100\%$$

1.6.2 过氧化值的测定^[13-17] 称取 7 份 30 g 油脂于容器(1 份为空白对照组,1 份为脂质体空白对照组,2 份分别按油的质量的 0.05%, 0.50% 添加黄酮,2 份按油的质量的 0.05%, 0.50% 添加黄酮脂质体,1 份按油的质量的 0.05% 添加特丁基氢醌(TBHQ)作为对比组)中,混合均匀,置于 $(60 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$ 的恒温烘箱中,每隔 12 h 搅拌 1 次,并交换其在烘箱中的位置. 定时取样检测猪油的过氧化值(POV). 过氧化值测定按国家标准 GB/T 5009.37-2003《食用植物油卫生标准的分析方法》的规定进行操作.

1.6.3 协同抗氧化性能的测定 选用抗坏血酸(Vc)作为增效剂,与黄酮脂质体按一定比例混合均匀一起加入基质油中进行观察、测定.

2 结果与分析

2.1 枇杷叶总黄酮的醇提优化^[5]

在单因素考察的预试验基础上,选取乙醇体积分数(φ)、提取时间(t)、提取温度(θ)、料液比($m:V$)作为考察因素,依据 $L_9(3^4)$ 做正交试验,结果如表 1 所示. 表 1 中: γ 为黄酮得率; R 为极差.

用极差分析法对试验的因素进行显著性分析,如表 2 所示. 表 2 中: SS 为平方和; DF 为自由度;

MS 为均方值; F 为均方比. 从表 2 可知: 因素 A 的均方比 F_A 为 146.4, 远大于 F 临界值 ($F_{0.05}(2, 2) = 19.00$), 即乙醇体积分数对黄酮得率有非常显著的影响, 而提取时间、料液比、提取温度对黄酮得率影响不大. 实验中, A, B, C, D 4 个因素对枇杷叶总黄酮得率的影响程度不同, 各因素的影响程度依次为 $A > C > D > B$. 结果显示: 枇杷叶总黄酮最佳提取工艺为 $A_2B_2C_3D_3$, 即乙醇体积分数为 70%, 提取时间为 1.5 h, 提取温度为 80 °C, 料液比为 1 : 60.

表 1 枇杷叶总黄酮的醇提正交实验结果

Tab. 1 Orthogonal experiment results of flavonoids extracted from loquat

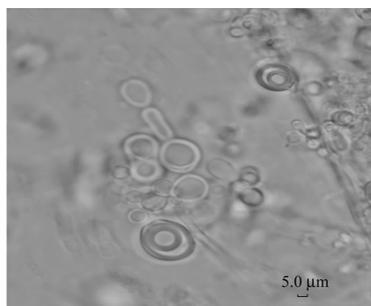
试验号	A ($\varphi/\%$)	B (t/h)	C ($\theta/^\circ\text{C}$)	D (m(g) : V(mL))	D(510)	$\gamma/\%$
1	60	1.0	60	1 : 40	0.745	9.53
2	60	1.5	70	1 : 50	0.783	10.01
3	60	2.0	80	1 : 60	0.801	10.23
4	70	1.0	70	1 : 60	0.787	10.06
5	70	1.5	80	1 : 40	0.784	10.02
6	70	2.0	60	1 : 50	0.776	9.92
7	80	1.0	80	1 : 50	0.723	9.26
8	80	1.5	60	1 : 60	0.708	9.07
9	80	2.0	70	1 : 40	0.692	8.87
K_1	9.923	9.617	9.507	9.473		
K_2	10.000	9.700	9.647	9.730		
K_3	9.067	9.673	9.837	9.787		
R	0.933	0.083	0.330	0.314		

按最优条件进行试验, 验证结果是否与预期指标值接近, 以证明正交实验得出的工艺条件的稳定可靠性. 结果表明: 在正交优化条件下, 乙醇提取试验的黄酮 5 次平均得率为 12.216%, 相对标准偏差值为 5.73%, 重现性较好.

2.2 黄酮脂质体的制备处方优化

2.2.1 脂质体的形态观察

脂质体是由卵磷脂和胆固醇为骨架膜材料制成的, 具有双分子层结构的封闭囊状体, 是因为常见的磷脂分子结构有两条较长的疏水烃链和一个亲水基团, 而中间的囊状体有两条较长的可以包封所需要的药物. 空白脂质体和黄酮脂质体在油镜下的形态, 如图 1 所示. 从图 1 可以看到: 空白脂质体中的磷脂双分子层及中间的空白囊状体, 类似与细胞的双层膜结构, 说明所制备的空白脂质体比较完整; 脂质体中包裹了黄酮分子.



(a) 空白脂质体

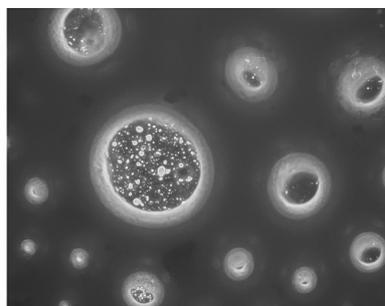
(b) 黄酮脂质体($\times 2000$)

图 1 脂质体在油镜下的形态

Fig. 1 Liposomes under the oil immersion lens

2.2.2 黄酮脂质体的制备处方优化 选取卵磷脂与胆固醇的质量比 ($m_1 : m_2$)、卵磷脂与黄酮的质量比 ($m_1 : m_3$)、磷酸盐缓冲液 pH 值作为考察因素, 依据 $L_9(3^3)$ 做正交实验, 结果如表 3 所示. 采用极差分析法对试验因素进行显著性分析, 结果如表 4 所示.

表 2 枇杷叶总黄酮的醇提正交实验方差分析

Tab. 2 Variance analysis of flavonoids extracted from loquat

因素	SS	DF	MS	F
A	1.610 9	2	0.805 40	146.400
B	0.010 9	2	0.005 45	1.000
C	0.743 7	2	0.371 80	15.000
D	0.167 3	2	0.083 65	15.180

从表4可知:A,B,C3个因素对黄酮脂质体包封率的影响程度不同,各因素的影响程度依次为 $A > C > B$ 。从表3可知:枇杷叶黄酮脂质体的最佳处方为 $A_3B_3C_1$,即卵磷脂与胆固醇的质量比为4:1,卵磷脂与黄酮的质量比为20:1,磷酸盐缓冲液pH值为5.8。

表3 黄酮脂质体制备的正交试验结果

Tab. 3 Orthogonal experiment results of the preparation of flavonoids liposomes

试验号	A (m_1 (g) : m_2 (g))	B (m_1 (g) : m_3 (g))	C (pH)	$\eta/\%$
1	2 : 1	10 : 1	5.8	38.75
2	2 : 1	15 : 1	6.0	24.76
3	2 : 1	20 : 1	7.5	42.67
4	3 : 1	10 : 1	6.0	29.58
5	3 : 1	15 : 1	7.5	43.26
6	3 : 1	20 : 1	5.8	41.16
7	4 : 1	10 : 1	7.5	40.00
8	4 : 1	15 : 1	5.8	48.64
9	4 : 1	20 : 1	6.0	46.62
K_1	35.393	36.110	42.850	
K_2	38.000	38.887	33.653	
K_3	45.087	43.483	41.977	
R	9.694	7.373	9.197	

按最优处方进行黄酮脂质体制备的正交实验验证,结果表明,黄酮脂质体制备试验的5次黄酮包封率平均值为51.45%,相对标准偏差值为1.44%,重现性较好。

2.3 枇杷叶黄酮及其脂质体的抗氧化性能

不同抗氧化剂对猪油的抗氧化性能^[18],如图2所示。从图2可以看出,添加了不同剂量的黄酮及黄酮脂质体组,相对于空白对照组,均呈现不同的抗氧化活性;随着添加剂量的增加,过氧化值减小,显示抗氧化性增强。当黄酮的添加剂量为0.5%时,其抗氧化作用强于添加剂量为0.05%的TBHQ;在质量分数相同的前提下,黄酮脂质体的抗氧化效果明显优于黄酮溶液。此外,质量分数为0.5%黄酮脂质体与质量分数为0.02%的抗坏血酸(Vc)混合物的抗氧化效果最好,表明黄酮脂质体与抗坏血酸(Vc)复配后,对猪油具有较好的抗氧化协同增效作用。

3 结论

实验以总黄酮提取率为指标,考察了4种影响因素,得到枇杷叶黄酮类化合物提取最佳工艺条件:乙醇体积分数为70%,料液比为1:60,提取温度为80℃,提取时间为1.5h。其中,乙醇质量分数对黄酮的提取率有显著性影响。以包封率为衡量指标,对总黄酮脂质体的处方进行优化,得出枇杷叶黄酮脂质体的最佳处方:卵磷脂与胆固醇的质量比为4:1,卵磷脂与黄酮的质量比为20:1,磷酸盐缓冲液pH值为5.8。

抗氧化实验结果显示,不同浓度的黄酮及其脂质体对猪油都具有一定的抗氧化作用,且随着添加剂量的增加抗氧化能力增强。当质量分数相同时,黄酮脂质体的抗氧化效果明显好于黄酮溶液。究其原因可能是,脂质体的制备增加了黄酮的稳定性,减少其在体外的自身氧化作用,使其显示出比黄酮溶液具

表4 黄酮脂质体制备的方差分析

Tab. 4 Variance analysis of the preparation of flavonoids liposomes

因素	SS	DF	MS	F
A	150.976	2	75.488 0	1.699
B	83.205	2	41.602 5	0.936
C	154.619	2	77.309 5	1.740

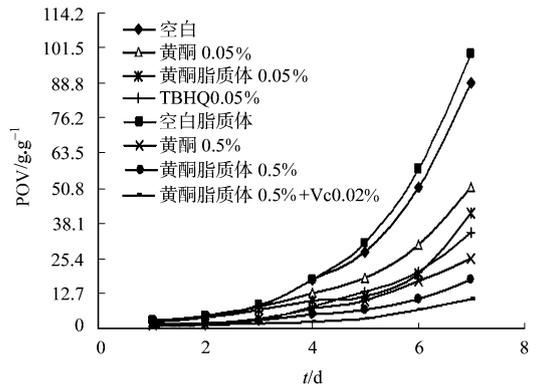


图2 不同抗氧化剂对猪油的抗氧化性能

Fig. 2 Antioxidant effect of different antioxidants on lard oil

有更强的抗氧化效应。

通过正交试验设计, 优选乙醇回流法提取枇杷叶总黄酮的最佳工艺, 为工业提取枇杷叶总黄酮工艺提供依据。对枇杷叶中黄酮类化合物的提取及其脂质体制备工艺的初步探讨, 其结果对提高枇杷叶的综合开发利用具有一定的理论指导意义。

参考文献:

- [1] 刘传安, 邹盛勤, 陈武. 枇杷叶化学成分药理作用及其应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(11): 2117-2118.
- [2] 王丽梅, 余龙江, 崔永明, 等. 桂花黄酮提取纯化及抑菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(2): 717-720.
- [3] 鞠建华, 周亮, 林耕, 等. 枇杷叶中三萜酸类成分及其抗炎、镇咳活性研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(10): 752-757.
- [4] 林启训. 枇杷叶黄酮类化合物的水浸提工艺研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(7): 190-193.
- [5] 周振, 黎中良. 超声波辅助提取枇杷叶中黄酮类化合物的工艺研究[J]. 玉林师范学院学报, 2008, 29(3): 60-64.
- [6] 赵荣生, 严宝霞, 候新朴. 两性霉素 B 脂质体的研制及其质量评价[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(9): 593-595.
- [7] 胡静丽, 陈健初. 杨梅叶黄酮类化合物最佳提取工艺研究[J]. 食品科学, 2003, 24(1): 96-99.
- [8] 夏书芹, 许时婴. 辅酶 Q10 纳米脂质体稳定性的研究[J]. 食品与机械, 2006, 32(3): 28-32.
- [9] 曹宁宁, 姜菲, 刘金鹏. 脂质体的制备方法及其研究进展[J]. 天津理工学院学报, 2003, 19(1): 30-35.
- [10] 赵海霞, 郭兴奎, 孔德亮. 脂质体制备技术[J]. 山东中医杂志, 2000, 19(7): 435-437.
- [11] 王建华, 温浩, 买尔旦, 等. 阿苯达唑脂质体的包封率测定及形态观察[J]. 新疆医学院学报, 1994, 1(17): 17.
- [12] 刘硕, 仵文英, 席枝侠, 等. 黄芩苷脂质体包封率的测定和体外释放度考察[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(5): 342-345.
- [13] 刘书成, 李元瑞. 大蒜精油对食用油脂的抗氧化特性[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 128-131.
- [14] 陈玉香, 周道玮. 茶多酚对豆油及猪油的抗氧化作用[J]. 食品科学, 2001, 22(11): 27-29.
- [15] 李书国, 李雪梅, 陈辉, 等. 油脂复合抗氧化剂抗氧化协同增效作用的研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2004(4): 42-44.
- [16] 刘青, 刘珍伶, 周娟. 金线莲多糖的体外抗氧化活性[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2010, 31(6): 718-720.
- [17] 曹艳萍. 苦荞叶提取物抗氧化性及其协同效应的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(8): 144-148.
- [18] 郭江宁, 翁新楚, 吴侯, 等. 补骨脂对猪油抗氧化作用的研究[J]. 中国油脂, 2004, 29(3): 40-41.

Studies on Flavonoids Extraction from Loquat and Their Liposomes Antioxidant Activity

HUANG Li-yan¹, HAN Lei¹, LIU Qing¹,
LIU Zhen-ling², LI Zhen-zhen¹

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;
2. Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Alcohol reflux was used to extract flavonoid components from loquat leaves and then the flavonoids liposomes were prepared. The antioxidant activity of the liposomes and the influence of various factors on extraction rate were investigated. During these processes, we also optimized the preparation prescription of flavonoids liposomes and then determined their antioxidant activity. The optimum extraction process as follows: 70% ethanol concentration, liquid feed ratio 1 : 60, extraction temperature 80 °C, extraction time 1.5 h. The best prescription for the flavonoids liposomes: lecithin and cholesterol ratio of 4 : 1, lecithin and flavonoids ratio of 20 : 1, phosphate buffer at pH 5.8. Antioxidant results in vitro showed that flavonoids with different mass ratio and their liposomes had some antioxidant effect on lard oil, and the effect increased when the dose increased. If the mass ratio was the same, the antioxidant effect of the flavonoids liposome was better than that of the flavonoids solution, and it had good antioxidant synergy effect when used with ascorbic acid.

Keywords: loquat; flavonoids; liposomes; antioxidant