

防风总色原酮的超声提取工艺及抗氧化作用研究

王士杰¹, 罗超¹, 韩凤波¹, 赵岩², 张连学²

(1. 吉林农业科技学院 中药学院, 吉林 吉林 132101; 2. 吉林农业大学 中药材学院, 吉林 长春 130118)

摘要:为进一步研究防风提取物的抗氧化活性,采用超声提取法,利用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计优选了防风中总色原酮最佳提取工艺条件,研究了总色原酮提取物对二苯代苦味酰基自由基 DPPH·和超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除能力及防风总色原酮的抗氧化能力。结果表明:防风总色原酮最佳工艺条件为料液比 40:1, 90%乙醇溶液, 50℃下超声提取 30 min,提取频率 90 Hz,平均提取率达 4.05%。防风总色原酮提取物清除 DPPH·的 IC_{50} 值为 117.32 $mg \cdot mL^{-1}$,表明防风总色原酮具有较强的抗氧化活性。

关键词:防风;色原酮;超声提取工艺;抗氧化

中图分类号:R284 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)06-0101-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.06.0101

中药防风为伞形科植物防风 [*Saposhnikovia divaricata*] 未抽花茎植株的干燥根,主产于东北及华北等地,于《神农本草经》列为草部上品,辛、甘、温,主要用于感冒头痛、风湿痹痛、风疹瘙痒、破伤风等^[1-2]。防风主要含有色原酮类、香豆素类、挥发油、多糖类等成分,色原酮类化合物是其主要活性物质,属黄酮类化合物^[3]。现代药理研究表明,防风色原酮类成分具有解热、镇痛、镇静、抗炎、抗肿瘤、抗血小板聚集等多种功效,用于治疗脑震荡、小儿呼吸道感染、过敏性皮炎、面神经炎、牙痛等症^[4-6]。

目前有关黄酮类化合物提取方法报道较多,苏刚^[7]采用热水提取法提取黄酮类化合物,严赞开等^[8]采用碱性水或碱性稀醇提取法提取黄酮类化合物,韩忠明^[9]、兰昌云等^[10]采用超声波提取法提取,高梦祥^[11]、张熊禄^[12]等则采用微波处理法,另外还有超滤法、有机溶剂萃取法、酶水解法、超临界流体萃取法等相关文献报道。其中超声波提取法是一种较新的方法,具有省时、高效、节能等优点,且对浸提溶剂、浸提方法都没有特殊要求,超声波的聚沉作用对提高提取率和缩短提取时间起重要作用。黄酮类化合物在自然界广泛存

在,具有多种生理功能,能够清除导致细胞结构改变和功能破坏的体内过剩自由基,如槲皮素和芦丁,是一类极具开发前景的天然有机抗氧化剂^[13-14]。DPPH·(二苯代苦味酰基自由基)是一种人工合成的稳定自由基,利用其甲醇溶液颜色改变与配对电子数的化学计量关系,采用分光光度法进行定量分析防风总色原酮清除自由基的能力^[15],这种方法在国内外被广泛用于清除自由基物质性质的研究以及天然抗氧化剂的筛选^[16-18]。超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)是基态氧接受一个电子后形成的,机体内某些物质自氧化即可产生。

本文以防风中总色原酮的含量为指标,对其超声提取工艺进行了研究,并考察了防风中总色原酮对 DPPH·(二苯代苦味酰基自由基)和超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除能力,将在提取工艺同主要成分药理活性有机结合方面做出有益尝试。

1 材料与方法

1.1 材料

防风购于内蒙古乌拉尔市,并由吉林农业大学中药材学院张连学教授鉴定为防风。

供试药品与试剂:芦丁(中国药品生物制品检定所提供),二苯代苦味酰基自由基(DPPH·, Sigma 公司),乙醇、甲醇、邻苯三酚、Tris、HCl、 $NaNO_2$ 、 $Al(NO_3)_3$ 、NaOH 均为分析纯(北京北化精细化学品有限公司)。

主要仪器:紫外分光光度计 DU800(美国 Beckman Coulter),旋转蒸发仪(上海亚荣 RE-52AA),真空泵(河南巩义市英峪予华仪器厂 SHZ-CD 型),超声仪(昆山市超声仪器 KQ-

收稿日期:2015-02-21

基金项目:吉林省教育厅资助项目(111022013033);吉林农业科技学院博士启动基金资助项目(119022012009);吉林农业科技学院青年基金资助项目(119012013019);长白山动植物资源利用与保护吉林省高校重点实验室资助项目(2013 S015);吉林省科技厅基础处资助项目(20140101150JC)

第一作者简介:王士杰(1978-),男,吉林省吉林市人,博士,讲师,从事中药材栽培与加工研究。E-mail:jlccs@yeah.net.

250DB),电子天平(余姚红名称重校验设备有限公司),分析天平(SHIMADZU-AUY220),电热恒温鼓风干燥箱(上海精密实验设备有限公司 DHG-9140A 型)。

1.2 方法

1.2.1 总色原酮含量的测定 精密称取芦丁 10 mg(120℃烘至恒重)置 100 mL 容量瓶中,加 30%乙醇定容至刻度(0.1 mg·mL⁻¹),摇匀,备用。准确吸取此标准品 0、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 mL 分别置于 10 mL 具塞试管中,加入 5%亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,再加入 10%硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min;再加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 4.0 mL,分别用 30%乙醇稀释至刻度(所加试剂量见表 1),摇匀,放置 15 min,在 480~540 nm 的波长进行扫描,选择最佳吸收峰波长。测得最大吸收波长 510 nm,在此波长下绘制标准曲线(见图 1)。样品按同一方法显色后,测定吸光度,根据标准曲线计算色原酮含量。回归方程为 $A=10.691\ 5C+0.003\ 8(r=0.999\ 8)$,此方法的回收率为 96.4%~103.4%,相对标准偏差(RSD)为 0.84%。

总色原酮提取率(%)= $C\times$ 测定体积 \times 样品稀释倍数/样品干重 $\times 100$

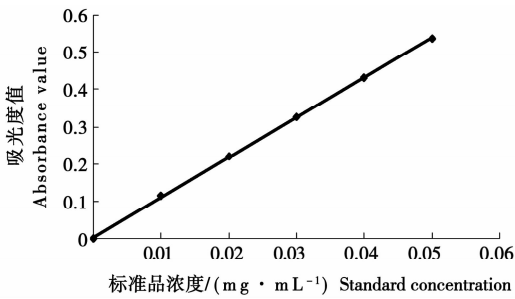


图 1 总色原酮含量测定的标准曲线
Fig. 1 The standard curve of determination of flavonoids content

1.2.2 防风中总色原酮超声提取工艺的研究

1)单因素试验:取干燥至恒重的防风粗粉(过 60 目筛)5 份,每份 5 g,以防风中总色原酮含量为指标,选取对总色原酮提取率有影响的乙醇浓度、温度、液料比、时间、频率 5 个因素,分别进行单因素实验,3 次重复,计算提取率。基准试验条件:乙醇浓度为 80%、温度 50℃、液料比 30:1、时间 30 min、频率 100 Hz。

2)正交试验:选用 L₁₆(4⁵)正交试验设计,研究超声时间、提取次数、液料比、温度、超声频率对提取率的影响,3 次重复(见表 2)。

表 1 超声提取法正交试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment of ultrasonic extraction

水平 Levels	因素 Factors				
	A	B	C	D	E
	乙醇浓度/% Ethyl alcohol concentration	温度/℃ Extraction temperature	液料比 Liquid to solid ratio	提取时间/min Extraction time	频率/Hz Frequency
1	60	50	20:1	20	70
2	70	60	30:1	30	80
3	80	70	40:1	40	90
4	90	80	50:1	50	100

1.2.3 防风中总色原酮对 DPPH·清除活性的测定 称取 0.002 5 g DPPH·,用无水乙醇溶解并定容于 100 mL 容量瓶中,终浓度 0.025 mg·mL⁻¹。取 50 μL 样品甲醇溶液,总色原酮 5 个浓度梯度,即 fh-1(0.35 mg·g⁻¹)、fh-2(0.30 mg·g⁻¹)、fh-3(0.25 mg·g⁻¹)、fh-4(0.20 mg·g⁻¹)和 fh-5(0.15 mg·g⁻¹),加入 2 mL 现配的 0.025 mg·mL⁻¹ DPPH·甲醇溶液,快速混匀,样品稳定时分别测定,每 2 min 记录 517 nm 处吸光度,共计时 46 min。

清除率 SR(%)=(A-B+C/A)×100。其中 A 为 DPPH·甲醇溶液的吸光度值,B 为 DP-PH·甲醇溶液加入样品后稳定的吸光度值,C 为样品本身的吸光度值。采用分光光度法在 517 nm 下测定吸光度值,以样品浓度对清除率作图,求出 IC₅₀ 值。

1.2.4 防风中总色原酮对超氧阴离子的清除作用 在 2.7 mL pH8.2 的 0.05 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液加入不同浓度的样品溶液 0.1 mL,总色原酮分别为 fh-1(0.35 mg·g⁻¹)、fh-2(0.30 mg·g⁻¹)、

fh-3(0.25 mg·g⁻¹)、fh-4(0.20 mg·4 g⁻¹)和 fh-5(0.15 mg·g⁻¹) 5个浓度梯度。恒温水浴 25℃ 10 min,加入 0.2 mL 30 mmol·L⁻¹ 邻苯三酚溶液(25℃预热),迅速混匀,每隔 0.5 min 测定 420 nm处的吸光值,记为 A1,共记录 3 min。同时设样品空白组(不加邻苯三酚)和邻苯三酚自氧化组(不加黄酮样品),空白组光吸收记为 A2,邻苯三酚自氧化产生的光吸收记为 A3。清除率 SR(%)=(A3-A)/A3×100,(A=A1-A2)。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

由图 2 可知,防风总色原酮提取率随乙醇浓度增大呈先增大后减小的趋势,乙醇浓度 90%时提取率最大,故乙醇浓度在 60%~90%有最大提取率。图 3 中随着温度升高,防风总色原酮提取率不断增加,当温度达到 50℃后,提取率增加的幅度减小。图 4 所示,随着提取时间的延长,防风色原酮提取率逐渐增加。当时间超过 30 min 后,提取率增加缓慢。图 5 表明,随着液料比的加大,防风总色原酮提取率不断升高,当液料比达到 40:1以后,提取率增加幅度变缓。由图 6 可知,随着超声频率的升高,总色原酮提取率呈增加趋势,90 Hz以上防风总色原酮提取率增加变缓,考虑能源消耗问题超声频率采用 90 Hz。

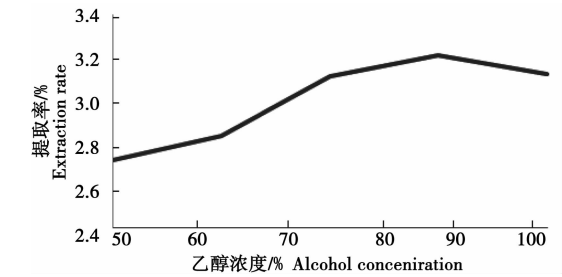


图 2 乙醇浓度对提取率的影响

Fig. 2 Effect of alcohol concentration on extraction rate

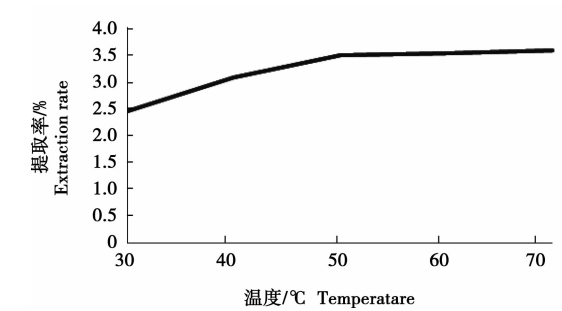


图 3 温度对提取率的影响

Fig. 3 Effect of temperature on extraction rate

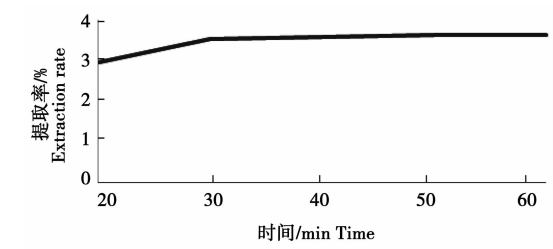


图 4 提取时间对提取率的影响

Fig. 4 Effect of time on extraction rate

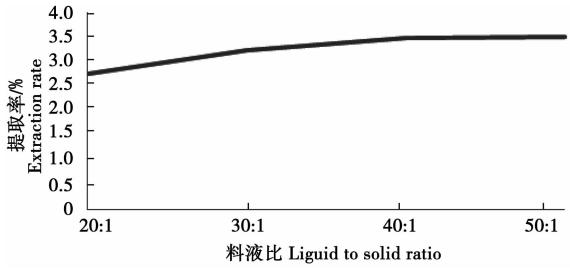


图 5 液料比对提取率的影响

Fig. 5 Effect of liquid to solid ratio on extraction rate

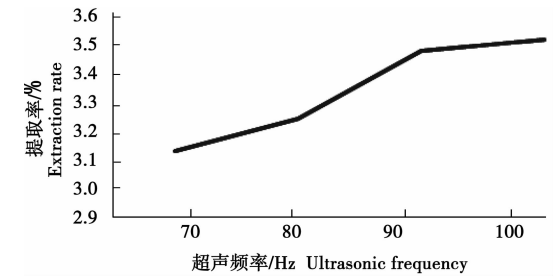


图 6 超声频率对提取率的影响

Fig. 6 Effect of ultrasonic frequency on extraction rate

2.2 总色原酮的超声提取最佳工艺

由表 2 可知,各因素对提取率影响依次为:乙

表 2 超声法提取的正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal experiment of ultrasonic extraction

试验号 No.	A	B	C	D	E	平均提取率/% Average extraction rate
1	1	1	1	1	1	2.33
2	1	2	2	2	2	1.87
3	1	3	3	3	3	2.82
4	1	4	4	4	4	2.28
5	2	1	2	3	4	3.24
6	2	2	1	4	3	2.67
7	2	3	4	1	2	1.65
8	2	4	3	2	1	3.12
9	3	1	3	4	2	3.15
10	3	2	4	3	1	3.32
11	3	3	1	2	4	3.91
12	3	4	2	1	3	2.99

续表 2 Continuing Table 2

试验号 No.	A	B	C	D	E	平均提取率/% Average extraction rate
13	4	1	4	2	3	3.83
14	4	2	3	1	4	3.42
15	4	3	2	4	1	3.33
16	4	4	1	3	2	3.24
K ₁	2.33	4.64	3.04	2.60	3.28	
K ₂	2.67	2.82	3.11	3.93	3.23	
K ₃	4.09	3.18	3.88	3.16	3.83	
K ₄	4.46	2.91	2.35	3.86	3.21	
R	2.13	1.82	0.84	1.33	0.62	
最优工艺	A ₄	B ₁	C ₃	D ₂	E ₃	

醇浓度(A)>温度(B)>时间(D)>液料比(C)>频率(E),最佳组合是 A₄B₁C₃D₂E₃,即乙醇浓度为 90%,温度 50℃,液料比 40:1,超声 30 min,频率 90 Hz。验证试验平均提取率为 4.05%。

2.3 总色原酮对 DPPH·的清除作用

图7表明,防风总色原酮提取物对 DPPH·的清除活性随浓度的增加逐渐增高,fh-1、fh-2、fh-3、fh-4 和 fh-5 五个浓度梯度中,fh-1 最高,并且随着时间延长吸光度下降不明显。fh-5 起始吸光度较其它几组低,并且随着时间延长下降速度较快。其清除率与防风总色原酮提取物浓度呈良好的线性关系,采用 SPSS 软件进行回归,得到回归方程 $y=0.605\ 6x-21.047(R^2=0.999\ 1)$,计算 IC₅₀ 值为 117.32 mg·mL⁻¹。

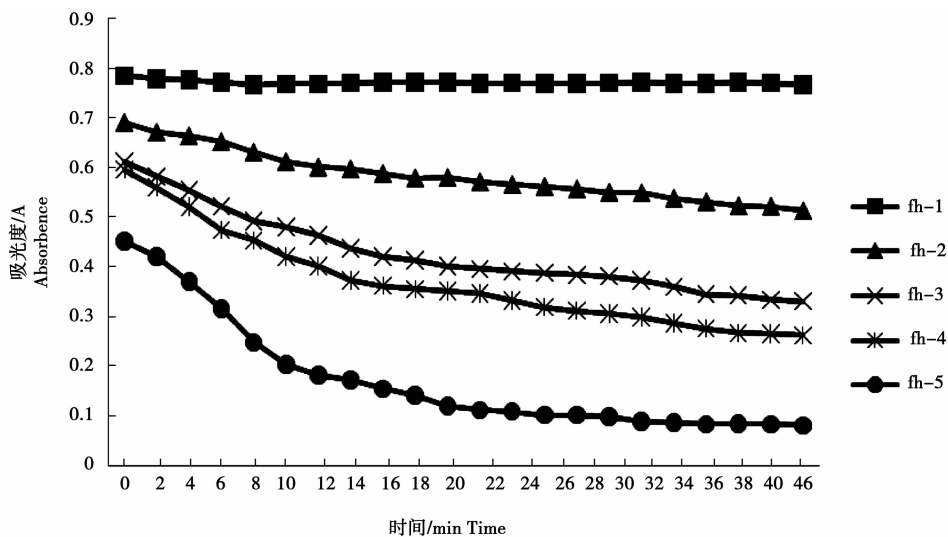


图 7 防风总色原酮对 DPPH·的清除作用

Fig. 7 Effect of scavenging DPPH· with chromone from *Saposhnikovia divaricata*

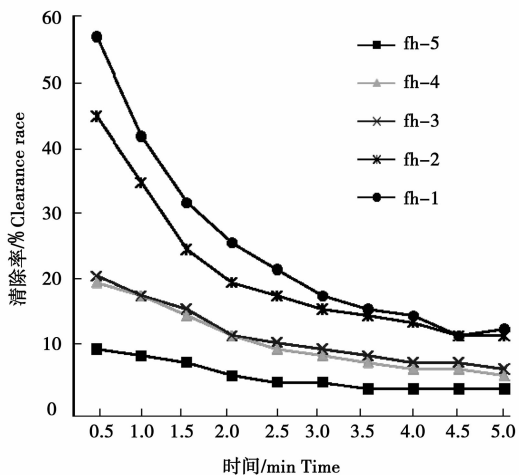


图 8 防风总色原酮对超氧阴离子(O^{2·-})的清除作用

Fig. 8 Effect of scavenging O^{2·-} with chromone from *Saposhnikovia divaricata*

2.4 总色原酮对超氧阴离子的清除作用

如图 8 所示,不同浓度处理的样品对超氧阴离子均有一定的清除作用。防风总色原酮提取物对超氧阴离子(O^{2·-})的清除活性随浓度的增加逐渐增高,fh-1、fh-2、fh-3、fh-4 和 fh-5 五个浓度梯度中,fh-1 活性最强,清除率最高值达到 57.52%,fh-5 活性最低,清除率最高值为 11.24%,其它浓度清除率为 20%~45%,并且各浓度样品均随着时间延长对超氧阴离子(O^{2·-})的清除作用均呈现下降趋势。

3 结论与讨论

人工合成抗氧化剂存在健康风险,怀疑存在致癌作用,而天然抗氧化剂具有多种生理活性,且安全性高,易于被人们接受,得到广泛认同。色原酮类化合物是防风主要活性物质,本文采用正交

试验法研究了超声波法提取防风中总色原酮的最优工艺,最优工艺为超声 30 min、乙醇浓度 90%、液料比 40:1、温度 50℃、频率 90 Hz,平均提取率为 4.05%。

本研究通过防风总色原酮清除 DPPH·自由基和超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的试验,表明防风中黄酮类化学成分对 DPPH·自由基和超氧阴离子自由基清除能力较强,其清除自由基能力大小与提取物浓度之间存在明显的剂量-效应关系,且对 DPPH·自由基的清除效果较显著,重现性较好,这为进一步研究防风中色原酮的药理作用、开发安全的天然抗氧化剂奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 陈桂玉,项东宇. 防风的有效成分及药理学研究进展[J]. 黑龙江医药,2011,24(4):600-601.
- [3] 孙晶波. 防风药材化学成分及其与根际土壤中无机元素含量的相关性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2013.
- [4] 姜艳艳. 防风色原酮部位化学成分及其相关研究[D]. 北京:北京中医药大学,2006.
- [5] 马红. 防风近年研究概述[J]. 中草药,1994,25(8):438-440.
- [6] 肖永庆,李丽,杨滨,等. 防风化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(2):45-47.
- [7] 苏刚. 山楂复合果蔬菜保健饮料[J]. 食品工业,2000(2):

9-11.

- [8] 严赞开,王朝晖,徐小万,等. 桔皮中提取橙皮甙的优化工艺[J]. 食品工业科技,1999,20(6):33-34.
- [9] 韩忠明,杨荣艳,王云贺,等. 超声波提取防风色原酮的研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(12):3035-3037.
- [10] 兰昌云,周崇松,范必威,等. 超声波法提取槐花中黄酮的最佳工艺研究[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(1):55-58.
- [11] 高梦祥,张佳兰,王江明. 微波浸提竹叶黄酮的工艺研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(7):147-150.
- [12] 张熊禄. 微波法从柑桔皮中提取类黄酮[J]. 食品科学,2005,26(3):119-121.
- [13] 李丽,桂语歌,时东方,等. 防风中色原酮类化合物的抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(9):2135-2137.
- [14] 桂语歌. 防风中色原酮化合物提取、分离、分析及抗氧化活性研究[D]. 长春:长春师范学院,2012.
- [15] 韦献雅,殷丽琴,钟成,等. DPPH 法评价抗氧化活性研究进展[J]. 食品科学,2014,35(9):317-322.
- [16] 王晶,李丽,刘春明,等. 不同红药提取物中总酚的测定及抗氧化活性的 DPPH 法评价研究[J]. 辽宁中医杂志,2011,38(3):513-515.
- [17] 叶汉侠,王甫才. 18 种中草药抗氧化活性的比较研究[J]. 浙江万里学院学报,2004,17(5):111-113.
- [18] 曾丹,李旭,高佩,等. DPPH 法评估火棘提取物抗氧化活性体系的建立[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(21):79-83.

Study on Extraction of Chromone from *Saposhnikovia divaricata* by Ultrasonic Wave and Anti-Oxidation

WANG Shi-jie¹, LUO Chao¹, HAN Feng-bo¹, ZHAO Yan², ZHANG Lian-xue²

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin, Jilin 132101; 2. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: In order to further research the antioxidant activity of extraction from *Saposhnikovia divaricata*, optimum extraction condition of chromone from *Saposhnikovia divaricata* with $L_{16}(4^5)$ orthogonal test by ultrasonic wave and its scavenging ability to DPPH· and $O_2^{\cdot-}$ were studied. The results showed that the optimum extraction condition was as follow: liquid-solid ratio was 40:1, 90% ethyl alcohol, extraction temperature 50℃, extraction time was 30 min, extraction frequency was 90 Hz, and the average extraction rate was 4.05%. The extraction total chromone for DPPH· IC_{50} was 117.32 mg·mL⁻¹, which indicated total chromone from *Saposhnikovia divaricata* had strong anti-oxidation activity.

Keywords: *Saposhnikovia divaricata*; chromone; ultrasonic wave extraction process; oxidation resistance