

槐花中清除自由基活性物质的提取工艺研究

宋彦 董银卯 王友升*, 李莉 沙享敏 (北京工商大学植物资源研究开发北京市重点实验室, 北京 100037)

摘要 [目的] 研究槐花中清除自由基活性物质的提取工艺。[方法] 通过正交试验确定了槐花清除 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子的活性物质的最佳提取工艺。[结果] 结果表明, 槐花中清除 DPPH 自由基的活性物质的最佳提取工艺为: 以 50% 乙醇为提取溶剂, 预处理时间 12 h, 提取时间 1 h; 清除羟自由基的活性物质的最佳提取工艺为: 以 30% 乙醇为提取溶剂, 预处理时间 12 h, 提取时间 2 h; 清除超氧阴离子的活性物质的最佳提取工艺为: 以 50% 乙醇为提取溶剂, 预处理时间 0 h, 提取时间 1 h。提取液浓度是影响槐花中清除 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子的活性物质的最主要因素。[结论] 为槐花提取物应用于抗衰老食品提供理论依据。

关键词 槐花; 自由基清除能力; 正交试验

中图分类号 S794.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)05-02049-02

Study on the Extraction Technique for Free Radical Scavenging Substance from Pogadatre Hower(*Sophora japonica* L.)

SONG Yan et al (Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037)

Abstract [Objective] The research aimed to study the extraction technique for free radical scavenging substance from Pogadatre flower(*Sophora japonica* L.). [Method] The best extraction technique for scavenging DPPH radical, hydroxyl radical and superoxide from *Sophora japonica* L. were determined by orthogonal experiment. [Result] The results showed that the best extraction technique for scavenging DPPH radical was: 50% ethanol as solvent, pretreatment time of 12 h and extraction time of 1 h. The best extraction technique for scavenging hydroxyl radical was: 30% ethanol as solvent, pretreatment time of 12 h and extraction time of 2 h. The best extraction technique for scavenging superoxide was: 50% ethanol as solvent, pretreatment time of 0 h and extraction time of 1 h. The extraction solvent concentration was the main factor of influencing to scavenge the DPPH radical, hydroxyl radical and superoxide from *Sophora japonica* L.. [Conclusion] The study provided the theoretical basis for applying the extracts from *Sophora japonica* L. in anti-aging food.

Key words *Sophora japonica* L.; Free radical scavenging ability; Orthogonal experiment

随着我国社会逐渐步入老龄化, 抗衰老活性物质的研究与开发越来越受到人们的重视。目前, 抗衰老活性物质的研究多数是参考现有的某个衰老学说, 以及随着增龄人体内一些物质如激素、酶和自由基等的变化规律而设计出来的^[1]。其中, D. Harman 提出的自由基衰老学说最为人们广泛接受。该学说认为衰老与体内抗氧化机能减弱及自由基增多有关, 自由基能从多方面对机体造成损伤, 加速机体衰老^[2-3]。同时, 由于自由基的种类繁多而且代谢过程非常复杂, 单一自由基清除剂所发挥的作用比较有限^[4-5]。因此, 如何筛选一些能清除不同种类自由基的高效、安全、稳定的活性成分作为功效添加剂, 已成为抗衰老食品的研究热点和难点。

槐花(*Sophora japonica* L.) 是豆科植物槐的干燥花及花蕾, 我国大部分地区均有生长。槐花味苦, 微寒, 归肝, 大肠经, 具有清热、凉血止血之功。研究表明, 槐花中含有丰富的活性物质, 且有多种保健功能^[6]。因此, 作为一种潜在的食品功能基料, 具有很好的开发价值。对于槐花中黄色素、黄酮等活性物质的提取已有相关报道^[7-8]。但是关于槐花能够清除的自由基种类, 以及不同提取条件对槐花活性成分清除自由基能力的机制, 目前未见有相关报道。为此, 笔者主要就影响槐花提取物清除不同种类自由基的提取工艺进行优化, 旨在为槐花提取物应用于抗衰老食品提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 植物材料: 槐花(*Sophora japonica* L.), 购于北京同仁堂药店, 自然风干后粉碎备用。

试剂: DPPH, 购自 Sigma Aldrich; 其余试剂均为分析纯, 购自北京化学试剂公司。

仪器: 紫外-可见分光光度计, 岛津 2450; 分析天平, BP3100S; 干燥箱, DHG9246A 型; 全温空气浴摇床, THZ-G1; 粉

碎机等。

1.2 方法 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化槐花中生物活性成分提取的工艺条件。槐花粉碎过 20 目筛后, 以 1:20 料液比, 分别用不同浓度乙醇浸泡 相应时间, 55℃ 恒温。以表 1 所设计的不同时间进行提取, 滤渣反复提取 2 次, 合并滤液作为样品提取物, 进行相关指标的测定。

表 1 槐花中生物活性成分提取工艺优化的正交试验 $L_9(3^4)$ 设计

Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal experiment design for the extraction technology optimization of bioactive components from *Sophora japonica* L.

| 水平 | 乙醇浓度 % | 预处理时间 h | 提取时间 h |
|-------|-----------------------|-------------------|-----------------|
| Level | Ethanol concentration | Pretreatment time | Extraction time |
| 1 | 30 | 12 | 2 |
| 2 | 50 | 6 | 1 |
| 3 | 70 | 0 | 3 |

1.2.1 清除 DPPH 自由基能力的测定。 参照 Brand-Williams 等的方法进行^[9]。将对 DPPH 自由基 50% 清除率定义为 1 个活性单位 (U), DPPH 自由基清除能力以每克干重的槐花提取液样品中含有的活性单位来表示 (U/g DW)。

1.2.2 清除羟自由基能力的测定。 参照刘骏的方法进行^[10]。将对羟自由基 50% 清除率定义为 1 个活性单位 (U), 羟自由基清除能力以每克干重的槐花提取液样品中含有的活性单位来表示 (U/g DW)。

1.2.3 清除超氧阴离子能力的测定。 参照 Constantine & Sarley 的方法^[11]。将对超氧阴离子 50% 清除率定义为 1 个活性单位 (U), 超氧阴离子清除能力以每克干重的槐花提取液样品中含有的活性单位来表示 (U/g DW)。

1.3 数据统计与分析 通过正交试验得到的试验数据采用一般正交分析方法进行分析^[12]。

2 结果与分析

2.1 槐花中清除 DPPH 的活性物质的提取条件优化 根据表 2 极差 R 的大小, 可以得到各因素对槐花提取物清除 DPPH

基金项目 北京市科技新星项目(2007B011)。

作者简介 宋彦(1984-), 男, 湖北随州人, 硕士研究生, 研究方向: 应用化学。* 通讯作者, 博士, E-mail: wangys@th.btbu.edu.cn。

收稿日期 2008-11-25

自由基能力的影响次序为:乙醇浓度>提取时间>预处理时间。这表明影响槐花提取物清除DPPH能力的关键因素是提取液浓度。

从表3的方差分析结果可以看出,预处理时间及提取时间对槐花提取物清除DPPH自由基能力的影响达到显著水平($P < 0.05$),提取液浓度对槐花提取物清除DPPH自由基能力的影响达到极显著水平($P < 0.01$)。通过对各因素不同水平之间的均值进行分析,可以确定槐花提取物清除DPPH的最佳提取工艺为:以50%乙醇为溶剂提取液,预处理时间12 h,提取时间1 h。正交试验的第4个处理为最佳提取条件。

表2 槐花提取物清除DPPH自由基能力的正交试验结果

Table 2 The orthogonal experiment results of the scavenging capacity of *S. japonica* extracts to DPPH radicals

| 试验号 Test No. | 乙醇浓度 % Ethanol concentration | 预处理时间 h Pretreatment time | 提取时间 h Extraction time | DPPH 清除能力 U g DW DPPH scavenging capacity |
|-----------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------|--|
| 1 | 30 | 12 | 2 | 3 713.4 |
| 2 | 30 | 6 | 1 | 3 764.7 |
| 3 | 30 | 0 | 3 | 3 418.5 |
| 4 | 50 | 12 | 1 | 4 251.5 |
| 5 | 50 | 6 | 3 | 4 098.1 |
| 6 | 50 | 0 | 2 | 4 040.2 |
| 7 | 70 | 12 | 3 | 3 919.7 |
| 8 | 70 | 6 | 2 | 4 019.5 |
| 9 | 70 | 0 | 1 | 3 981.7 |
| 极差 R | 497.73 | 148.07 | 187.20 | |

表3 槐花提取物清除DPPH自由基能力的正交试验方差分析结果

Table 3 The variance analysis results of the orthogonal experiment for the scavenging capacity of *S. japonica* extracts to DPPH radicals

| 因素 Factors | 偏差平方和 Square sum of departure | 自由度 Freedom degree | F 比 F ratio | 显著性 Significance |
|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------|---------------------|
| 乙醇浓度 Ethanol concentration | 388 744.88 | 2 | 209.61 | ** |
| 预处理时间 Pretreatment time | 43 621.62 | 2 | 23.52 | * |
| 提取时间 Extraction time | 53 262.65 | 2 | 28.72 | * |
| 误差 Error | 1 854.63 | 2 | | |

注: $F_{0.05}$ 临界值 = 19; $F_{0.01}$ 临界值 = 99。*、** 分别表示达显著、极显著水平。表5同。

Note: $F_{0.05}$ critical value = 19 and $F_{0.01}$ critical value = 99. * and ** stand for significant level and extremely significant level resp. The same as Table 5.

2.2 槐花中清除羟自由基的活性物质的提取条件优化 根据表4极差R的大小,得出各因素对槐花提取物清除羟基自由基能力的影响次序为:乙醇浓度>预处理时间>提取时间。这表明不同提取液浓度对槐花清除羟基自由基能力的影响最大。方差分析结果表明,提取液浓度对槐花中清除羟基自由基的活性物质的提取效率有显著的影响(表5)。对各因素不同水平之间的均值进行分析,可以得到槐花清除羟自由基活性物质的最佳提取工艺为:以30%乙醇为溶剂,预处理时间12 h,提取时间2 h。正交试验的第1个处理满足最佳条件,其羟自由基清除能力也最强。

表4 槐花提取物清除羟自由基能力的正交试验结果

Table 4 The orthogonal experiment results of the scavenging capacity of *S. japonica* extracts to hydroxyl radicals

| 试验号 Test No. | 乙醇浓度 % Ethanol concentration | 预处理时间 h Pretreatment time | 提取时间 h Extraction time | 羟自由基清除能力 U g DW Scavenging capacity to hydroxyl radicals |
|-----------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------|---|
| 1 | 30 | 12 | 2 | 986.4 |
| 2 | 30 | 6 | 1 | 859.3 |
| 3 | 30 | 0 | 3 | 826.0 |
| 4 | 50 | 12 | 1 | 683.8 |
| 5 | 50 | 6 | 3 | 671.7 |
| 6 | 50 | 0 | 2 | 759.5 |
| 7 | 70 | 12 | 3 | 625.6 |
| 8 | 70 | 6 | 2 | 534.5 |
| 9 | 70 | 0 | 1 | 560.9 |
| 极差 R | 316.90 | 76.77 | 58.80 | |

表5 槐花提取物清除羟自由基能力的正交试验方差分析结果

Table 5 The variance analysis results of the orthogonal experiment for the scavenging capacity of *S. japonica* extracts to hydroxyl radicals

| 因素 Factors | 偏差平方和 Square sum of departure | 自由度 Freedom degree | F 比 F ratio | 显著性 Significance |
|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------|---------------------|
| 乙醇浓度 Ethanol concentration | 152 109.04 | 2 | 19.23 | * |
| 预处理时间 Pretreatment time | 9 100.37 | 2 | 1.15 | |
| 提取时间 Extraction time | 6 241.10 | 2 | 0.79 | |
| 误差 Error | 7 911.70 | 2 | | |

2.3 槐花中清除超氧阴离子的活性物质的提取条件优化

根据表6极差R可得,各因素对槐花提取物清除超氧阴离子能力的影响次序为:乙醇浓度>预处理时间>提取时间。这表明对槐花提取物清除超氧阴离子能力影响最大的因素是提取液浓度。但方差分析表明,各因素不同水平之间对槐花提取物清除超氧阴离子能力的影响均无显著性。通过对各因素不同水平之间的均值进行分析,可以确定槐花提取物清除超氧阴离子的最佳提取工艺为:以50%乙醇为提取溶剂,预处理时间0 h,提取时间2 h。

表6 槐花提取物清除超氧阴离子能力的正交试验及直观分析结果

Table 6 The orthogonal experiment and intuitive analysis results of the scavenging capacity of *S. japonica* extracts to superoxide anion

| 试验号 Test No. | 乙醇浓度 % Ethanol concentration | 预处理时间 h Pretreatment time | 提取时间 h Extraction time | 超氧阴离子清除能力 U g DW Scavenging capacity to superoxide anion |
|-----------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------|---|
| 1 | 30 | 12 | 2 | 6 248.1 |
| 2 | 30 | 6 | 1 | 4 792.9 |
| 3 | 30 | 0 | 3 | 5 206.3 |
| 4 | 50 | 12 | 1 | 4 540.3 |
| 5 | 50 | 6 | 3 | 4 832.6 |
| 6 | 50 | 0 | 2 | 6 554.3 |
| 7 | 70 | 12 | 3 | 854.8 |
| 8 | 70 | 6 | 2 | 941.7 |
| 9 | 70 | 0 | 1 | 3 735.2 |
| 极差 R | 3 571.87 | 1 642.87 | 950.13 | |

醇沉试验确定黄芪多糖的最佳醇沉浓度为 70% 乙醇。在该条件下, 所得多糖纯度最大, 且成本较低。

2.4 黄芪中皂甙、黄酮和多糖的最佳利用工艺 根据试验结果, 确定黄芪中皂甙、黄酮和多糖 3 种有效成分综合利用的工艺路线见图 4。

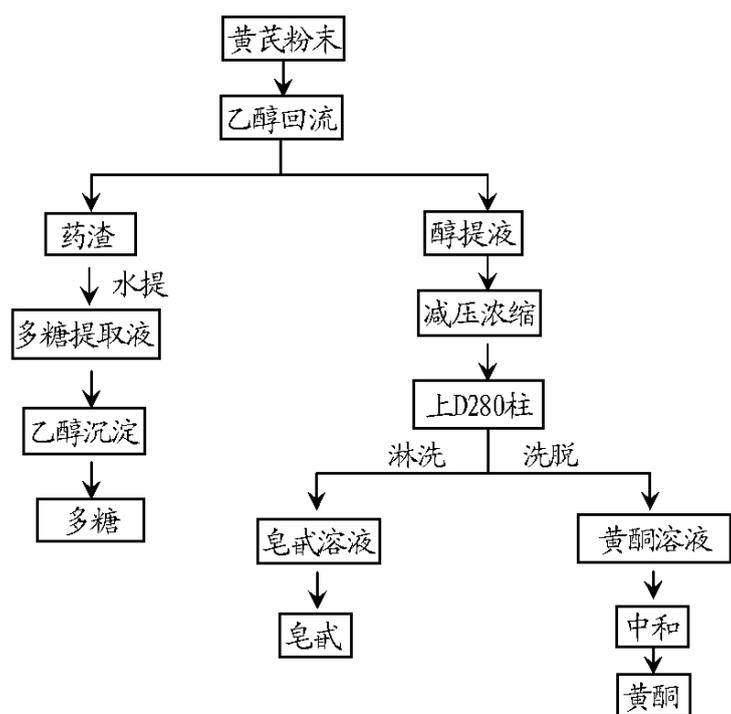


图4 黄芪中皂甙、黄酮和多糖综合利用的工艺路线

Fig.4 The technologic route of the comprehensive utilization of saponins, flavonoids and polysaccharides in *Astragalus membranaceus*

3 结论

(1) 黄芪皂甙的最佳提取条件为: 浓度 70% 乙醇作为溶剂, 采用 7:1 的液固比, 78℃ 提取 3 次, 每次 100 min。

(2) 黄芪黄酮的最佳提取条件为: 浓度 80% 乙醇作为溶剂, 采用 7:1 的液固比, 78℃ 提取 4 次, 每次 80 min。

(3) 黄芪多糖的最佳提取条件为: 以蒸馏水为溶剂, 提取温度 100℃, 液固比 16:1, 提取时间 2 h, 提取 3 次。黄芪多糖的最佳分离条件为: 采用浓度 70% 乙醇对水提液中的多糖进行沉淀。采用上述条件, 所得多糖纯度高, 且成本较低。

(4) 黄芪黄酮和皂甙分离的最佳条件为: 含有黄芪黄酮和皂甙的醇提液减压浓缩, 浓缩液用浓度 1 mol/L 的 NaOH 调 pH 值为 8.0 后过滤, 以 0.5 ml/min 的流速上 D280 阴离子

交换树脂柱。收集流出液和浓度 0.1% NaOH 淋洗液, 其中富含皂甙; 之后用浓度 80% 乙醇和浓度 10% NaOH 80% 乙醇洗脱, 收集液为黄酮。对从 10 g 生药材中所得的醇提液, 用 13 cm 高、直径为 2.5 cm 的 D280 离子交换树脂层析柱, 可使黄芪黄酮和皂甙完全分离。

(5) 在黄芪黄酮的洗脱过程中, 用浓度 80% 乙醇和浓度 10% NaOH 80% 乙醇洗脱出现 2 个洗脱峰, 后一个洗脱峰的产物在 269 nm 有强吸收, 可能是异黄酮类物质。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005:212.
- [2] 段亚丽, 谢梅冬. 黄芪化学成分及其有效成分黄芪甲苷含量测定的研究现状[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(3): 35-38.
- [3] 吴建新, 蒋莹, 严永清. 黄芪、当归及其配伍对大鼠血小板聚集和血小板中 cAMP、cGMP 的影响[J]. 中药药理与临床, 1992, 8(1): 16-18.
- [4] 叶红英, 俞茂华, 颜贻谦, 等. 黄芪多糖对 STZ 糖尿病大鼠物质代谢和心功能的影响[J]. 上海医科大学学报, 2000, 27(5): 357-358.
- [5] 李先荣, 董彦敏, 程林忠, 等. 黄芪多糖冲剂治疗 II 型糖尿病的临床研究[J]. 山西中医, 1995, 11(1): 16-17.
- [6] 马洪喜, 李冬梅. 黄芪皂甙对糖尿病大鼠血清激素水平的影响[J]. 微量元素与健康研究, 2003, 20(4): 5-6.
- [7] 徐先祥, 彭代银, 刘青云. 黄芪皂甙类成分对心血管系统的作用[J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(2): 128-129.
- [8] 石富胜, 杨正国, 狄桂萍, 等. 黄芪皂甙对烧伤患者血管内皮细胞及其功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(10): 750-751.
- [9] 汪德清, 田亚平, 宋淑珍, 等. 黄芪总黄酮抗突变作用实验研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1164-1167.
- [10] 汪德清, 田亚平. 黄芪总黄酮抗肝损伤作用初探[J]. 中国中西医结合杂志, 2005(5): 149-151.
- [11] 汪德清, 沈文梅, 田亚平, 等. 黄芪的三种提取成分对氧自由基作用的影响[J]. 中国药理学通报, 1994(2): 129-132.
- [12] 焦艳, 闻杰, 于晓红, 等. 膜荚黄芪茎叶总黄酮对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(6): 356-358.
- [13] 张峻. 正交实验法优选黄芪水提工艺的实验研究[J]. 基层中药杂志, 1999, 13(3): 13-15.
- [14] 阎巧娟, 韩鲁嘉. 黄芪皂甙的提取分离方法[J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(6): 61-65.
- [15] 李洲, 廖史书, 雷文. 制药工业中溶剂萃取技术的机制和应用发展方法[J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27(2): 89-93.
- [16] 汪正强, 韩鲁嘉, 阎巧娟, 等. 树脂吸附法提取黄芪皂甙[J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(6): 66-68.
- [17] 刘遵峰, 刘雪萍, 梁晓勇, 等. 黄芪总黄酮和总甙的提取与分离[J]. 南开大学学报, 2003, 36(3): 22-25.
- [18] 刘云, 唐玉海. 超临界流体技术在医学工业中的应用[J]. 西北药学杂志, 1999, 14(2): 82-83.
- [19] 鲁建江, 王莉, 刘志勇, 等. 微波技术辅助测定黄芪中总黄酮和多糖的含量[J]. 中成药, 2003, 25(3): 246-248.
- [20] 韩鲁佳, 阎巧娟, 江正强, 等. 黄芪多糖及皂甙提取工艺研究[J]. 农业工程学报, 2000, 16(5): 119-121.

J Gerontol, 1956, 11: 298-300.

(上接第 2050 页)

3 结论与讨论

(1) 乙醇浓度是影响槐花提取物清除 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子的最关键因素, 其中对清除羟自由基和 DPPH 自由基能力的影响分别达到显著和极显著水平。

(2) 槐花中清除 DPPH 自由基的活性物质的最佳提取工艺为: 以 50% 乙醇为提取溶剂, 预处理时间 12 h, 提取时间 1 h。

(3) 槐花中清除羟自由基活性物质的最佳提取工艺为: 以 30% 乙醇为提取溶剂, 预处理时间 12 h, 提取时间 2 h。

(4) 槐花中清除超氧阴离子活性物质的最佳提取工艺为: 以 50% 乙醇为提取溶剂, 预处理时间 0 h, 提取时间 2 h。

参考文献

- [1] 熊皓平, 杨伟丽, 张友胜, 等. 天然植物抗氧化剂的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(5): 75-79.
- [2] HARMAND. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry[J]. J Gerontol, 1956, 11: 298-300.
- [3] SOHAL R.S. Oxidative stress hypothesis of aging[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33(5): 573-574.
- [4] MITTLER R, VANDERAUWERA S, COLLERY M, et al. Reactive oxygen gene network of plants[J]. Trends Plant Sci, 2004, 9: 490-498.
- [5] 田云, 卢向阳, 何小解. 天然植物抗氧化剂清除氧自由基特性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(6): 123-125.
- [6] 李姚姚, 原思通, 肖永庆. 中药槐花化学成分、药理作用及炮制研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(6): 77-82.
- [7] 潘英明, 梁英, 朱志仁, 等. 槐花米抗氧化成分的提取及其活性研究[J]. 林产化学与工业, 2007, 27(2): 41-44.
- [8] 丁利君, 吴振辉, 蔡创海. 槐花中黄酮类物质提取工艺的研究[J]. 农业工程学报, 2002, 18(1): 142-144.
- [9] BRAND WILLIAMS W, CUVEIHER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. Technology, 1995, 28: 25-30.
- [10] 刘骏. 结晶紫分光光度法测定 Fenton 反应产生的羟自由基[J]. 武汉工业学院学报, 2005, 24(2): 53-55.
- [11] CONSTANINE N G, STANLEY K R. Superoxide dismutases[J]. Plant Physiology, 1977, 59: 309-314.
- [12] MONAGOMERY D C. Design and analysis of experiments[M]. 4th ed. New York: Wiley, 1996: 627-631.