

鸡血藤原花青素的提取工艺和体外抗氧化活性*

董攀, 罗泽欣, 王冬梅

(中山大学药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 在单因素试验的基础上, 运用响应面法优化鸡血藤 *Spatholobus suberectus* Dunn 原花青素的超声波辅助提取工艺。以料液比、丙酮体积分数、提取时间为考察因素, 以原花青素的提取率为响应因子, 进行 Box-behnken 中心组合试验, 得到最佳提取工艺参数为: 室温下, 超声功率 500 W, 提取时间 30 min, 料液比 1:45 (m/V), 丙酮体积分数 70%, 提取 1 次。在此条件下, 鸡血藤原花青素提取得率为 25.59%。制得的原花青素对 DPPH·、ABTS· 的 IC₅₀ 分别为 8.42, 10.55 μg/mL。

关键词: 鸡血藤 *Spatholobus suberectus* Dunn; 原花青素; 响应面法; 抗氧化活性

中图分类号: R962 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2017) 01-0008-06

Extraction and antioxidant activity of Proanthocyanidins from *Spatholobus suberectus* Dunn

DONG Pan, LUO Zexin, WANG Dongmei

(School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Ultrasonic-assisted extraction (UAE) was used to extract proanthocyanidins (PC) from *Spatholobus suberectus* Dunn. Response surface methodology (RSM), based on a three-factor, three-level Box-Behnken central composite design (BBD), was employed to obtain the optimal extraction parameters, in which the extraction yields of PC was maximum. Three important factors, including extraction time, solid-liquid ratio and acetone concentration, were selected by single-factor tests. Optimized extraction conditions for PC were a ratio of liquid to solid of 1:45 mL/g, 25 °C, 30 min, and acetone concentration as 70%, one-time extraction, 500 W ultrasonic power. Under these conditions, the extraction yield of PC was 25.58%. In DPPH· and ABTS· scavenging assays, the IC₅₀ of PC from *S. suberectus* were 8.42 μg/mL and 10.55 μg/mL, respectively.

Key words: *Spatholobus suberectus* Dunn; proanthocyanidins; response surface methodology; antioxidant activity

原花青素 (proanthocyanidins, PC) 是由不同数量的儿茶素和表儿茶素结合而成的一大类多酚类化合物, 其基本组成单位是黄烷-3-醇和黄烷-3,4-二醇, 其具有广泛的药理作用, 是一种极佳的氧自由基清除剂, 具有抗炎^[1]、抗氧化应激^[2]、抗肿瘤^[3]、改善记忆力^[4]和防治肝损伤^[5]等功能,

且毒性很低^[6], 目前在食品、保健品、药品、化妆品等领域已有广泛应用^[7]。

鸡血藤为豆科植物密花豆属密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎。鸡血藤又名大血藤、血藤、血风藤、三叶鸡血藤, 是补血活血的传统中药。研究表明, 鸡血藤乙醇提取物对 MCF-7 和结

* 收稿日期: 2016-08-15

基金项目: 广东省自然科学基金 (2016A030313855); 广东省省部产学研合作专项资金 (2013B090500100)

作者简介: 董攀 (1992年生), 男; 研究方向: 天然产物活性成分; E-mail: 448415288@qq.com

通信作者: 王冬梅 (1968年生), 女; 研究方向: 中药药效物质与质量控制; E-mail: lsswdm@mail.sysu.edu.cn

肠癌 HT-29 细胞增殖表现出不同抑制活性，其中富含原花青素的正丁醇萃取物活性最强，故认为其中的原花青素成分在抗肿瘤过程中发挥了重要作用^[8]；鸡血藤中的原花青素 B4 可抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖^[9]。同时，鸡血藤对于乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 细胞移植的裸鼠有抑制作用，其中儿茶素、表儿茶素没食子儿茶素和表没食子儿茶素等多酚化合物为重要的药效物质^[10]。

鸡血藤原花青素含量很高，其 $\varphi = 60\%$ 乙醇提取浸膏中原花青素的含量可达 51%^[8]。而目前无人对鸡血藤原花青素的提取工艺进行相关研究，因此，本文拟研究超声波辅助提取鸡血藤原花青素的工艺，对于主要提取工艺参数进行响应面法优化，采用本课题组前期已建立的香草醛-硫酸法^[11]测定提取液中原花青素的含量并计算原花青素提取得率。本论文研究建立的提取工艺、以及采用 DPPH 法、ABTS 法考察鸡血藤原花青素的体外抗氧化活性，可为鸡血藤原花青素的广泛开发利用提供重要参考。

1 材料与方 法

1.1 材料、仪器与试剂

鸡血藤药材，产地广西，于 2015 年购于广州市清平药材市场，经中山大学药学院生药学与天然药化实验室杨得坡教授鉴定为豆科密花豆属植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的藤茎；儿茶素对照品，购于广东省食品药品检验所；1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 与 2, 2-氨基-二(3-乙基-苯并噻唑啉磺酸-6) 铵盐 (ABTS) 购自美国 sigma 公司；香草醛 (分析纯)，天津科密欧化学试剂有限公司；甲醇、硫酸、丙酮、乙醇均为分析纯，天津大茂化学试剂厂

Millipore 超纯水系统；多功能酶标仪工作站，美国 Moleculardevices 公司；超声波清洗机，宁波新芝生物科技股份有限公司

1.2 方 法

1.2.1 材料制备 将鸡血藤药材粉碎后过 60 目药筛，放入冰箱保存。

1.2.2 提取液中原花青素含量的测定

1) 对照品溶液的制备

精密称取儿茶素 20 mg，用少量甲醇溶解后置 20 mL 容量瓶中，并用甲醇稀释至刻度，摇匀作为对照品溶液 (1 mg/mL)。

2) 标准曲线的绘制

精密量取上述对照品溶液 1.0、2.0、3.0、

4.0、5.0 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，精密量取 5.0 mL 各浓度儿茶素对照品溶液、3 mL $\varphi = 3\%$ 香草醛甲醇溶液和 3 mL $\varphi = 30\%$ 硫酸甲醇溶液置包有锡箔的试管中，摇匀，25 °C 避光显色 20 min 后，取 100 μ L 于 96 孔板上，在 500 nm 处测定吸光度 A_{500} ，得到回归方程为

$$y = 1.5988x + 0.0328, R = 0.9990$$

线性范围为 0.1 ~ 0.5 mg/mL。

3) 原花青素的提取及在提取液中的含量测定

准确称取 200 mg 鸡血藤粉末，加入 $\varphi = 70\%$ 丙酮 8 mL，500 W 超声提取 30 min，抽滤，定容至 100 mL 容量瓶，摇匀，得原花青素提取液。取 5 mL 提取液按上述测定方法进行比色，再以所得的曲线回归方程计算原花青素提取得率。

1.2.3 实验设计方法 通过单因素考察，筛选出料液比 ($[m(\text{药材原料})/\text{g}]:[V(\text{提取溶剂})/\text{mL}]$)、提取时间、提取溶剂体积分数等对鸡血藤原花青素提取得率影响较大的三个因素，进行接下来的 Box-behnken 中心组合试验设计 (见表 1)。

表 1 Box-behnken 设计因素与水平

Table 1 Factors and levels in Box-behnken design

水平	因素		
	(X_1)	(X_2)	(X_3)
	$[m(\text{药材原料})/\text{g}]:$ $[V(\text{提取剂})/\text{mL}]$	$\varphi(\text{提取剂})/$ %	提取时间/ min
-1	1:30	60	20
0	1:40	70	30
1	1:50	80	40

1.2.4 DPPH·清除率的测定 测定方法参考文献 [12]，精密称取 DPPH，用无水乙醇溶液溶解并定容于棕色容量瓶中，配制浓度为 20 μ mol/L，避光保存。将原花青素提取物冷冻干燥后，精密称取，用无水乙醇配制成 5 种不同质量浓度 (1, 2, 4, 8, 16 μ g/mL) 的样品溶液。分别加入 1.0 mL DPPH 溶液，2.0 mL 样品溶液，混合避光反应 30 min，517 nm 处测定各样品的吸光度值 A_1 。无水乙醇代替 DPPH 乙醇溶液作为样品本底组，吸光度记为 A_2 ，无水乙醇代替样品溶液作为空白组，吸光度记为 A_{01} ，VC 为阳性对照，清除率计算公式：

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = \frac{1 - (A_1 - A_2)}{A_{01}} \times 100\%$$

1.2.5 ABTS·清除率的测定 测定方法在文献 [13] 基础上稍作修改，将浓度为 7 mmol/L ABTS 无水乙醇溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾等量混合，

避光放置 15 h, 加入无水乙醇, 以期于 734 nm 获得 0.70 ± 0.02 的吸收值。将原花青素提取物冷冻干燥后, 精密称取, 用无水乙醇配制成 5 种不同质量浓度 (1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的样品溶液。分别加入 2.0 mL ABTS 溶液, 1.0 mL 样品溶液, 混合避光反应 10 min, 732 nm 处测定各样品的吸光度值 A_3 。无水乙醇代替 ABTS 乙醇溶液作为样品本底组, 吸光度记为 A_4 , 无水乙醇代替样品溶液作为空白组, 吸光度记为 A_{02} , VC 为阳性对照, 清除率计算公式:

$$\text{ABTS} \cdot \text{清除率} = \frac{1 - (A_3 - A_4)}{A_{02}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果与分析

2.1.1 不同体积分数溶剂对原花青素提取率的影响 以不同体积分数的乙醇、甲醇、丙酮作为提取溶剂, 其他参数同 1.2.2, 2), 结果见图 1 (a)。从图中可以看出, $\varphi = 70\%$ 丙酮对鸡血藤原花青素的提取率最高, 因此选择 $\varphi = 70\%$ 丙酮作为提取溶剂。

2.1.2 料液比对鸡血藤原花青素提取率的影响 设置不同的料液比, 其他参数同 1.2.2, 2), 结果见图 1 (b)。在料液比为 1:40 时, 原花青素提取率达到峰值, 而后略微减少, 故选定料液比为 1:40。

2.1.3 提取时间对原花青素提取率的影响 设置不同的提取时间, 其他参数同 1.2.2, 2), 结果见图 1 (c)。鸡血藤的原花青素的提取率在 30 min 左右达到峰值, 而后逐渐减少, 可能与提取时间过长后原花青素被氧化有关。因此, 选择超声辅助提取时间 30 min。

2.1.4 超声功率对原花青素提取率的影响 设置不同的超声提取功率, 其他参数同 1.2.2, 2)。结果见图 1 (d)。原花青素提取率随超声功率增大而增加, 故选定 500 W 进行其他单因素试验。

2.1.5 提取次数对原花青素提取率的影响 设置不同的提取次数, 其他参数同 1.2.2, 2)。结果见图 1 (e)。原花青素的提取率随提取次数的增加有一定提高, 提取 2 次的提取率是提取 1 次的 1.1 倍, 提取 2 次后得率的变化不显著, 考虑到提取成本, 选定提取次数为 1 次。

2.2 响应面法设计及结果

2.2.1 提取工艺参数的单因素考察 以 $\varphi = 70\%$ 丙酮, 料液比 [m (药材原料)/g] : [V (提取溶剂)]

为 1:40, 超声辅助提取 30 min 时鸡血藤原花青素有较大的提取率。鸡血藤原花青素提取的响应面试验设计方案与结果见表 2, 基于 Box-Behnken 中心组

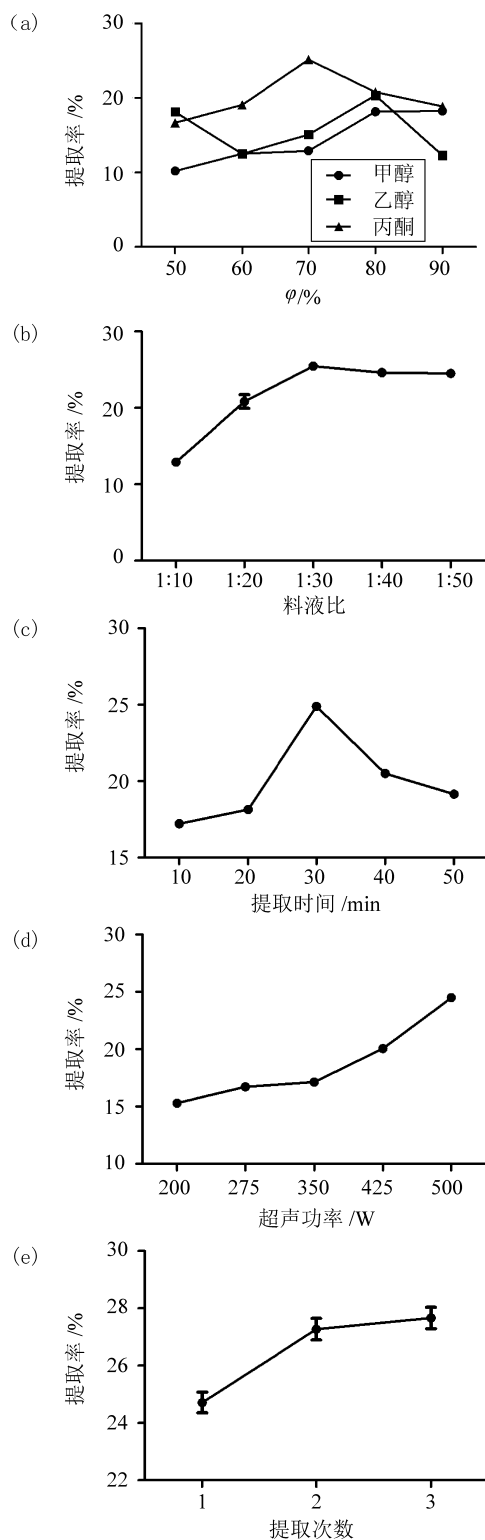


图 1 溶剂体积分数 (a)、料液比 (b)、提取时间 (c)、超声功率 (d)、提取次数 (e) 对鸡血藤原花青素提取率的影响
Fig. 1 Effects of solvent concentration (a), solid liquid ratio (b), extraction time (c), ultrasonic power (d) and extraction times (e) on the extraction yield of PC

合实验设计原理，根据表 1 结果对丙酮体积分数、料液比、提取时间作变换，将原花青素提取率作为响应值 (Y)，设置 17 个试验点。

表 2 原花青素提取率试验设计及结果

Table 2 Design and results of response surface analysis for the optimization of extraction conditions of PC

No.	因素			原花青素得率 $Y/\%$
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	0	20.58
2	1	1	0	23.58
3	-1	1	0	21.95
4	1	1	0	24.15
5	-1	0	-1	18.89
6	1	0	-1	22.87
7	-1	0	1	22.35
8	1	0	1	23.58
9	0	-1	-1	19.92
10	0	1	-1	22.11
11	0	-1	1	22.08
12	0	1	1	23.02
13	0	0	0	25.35
14	0	0	0	24.95
15	0	0	0	25.43
16	0	0	0	25.08
17	0	0	0	25.17

将所得鸡血藤原花青素提取率数据通过 Design Expert 8.06 软件进行回归拟合分析，得到回归方程如下：

$$Y = -113.642 + 1.473 X_1 + 2.177 X_2 + 1.801 X_3 - 2 \times 10^{-3} X_1 X_2 - 6.875 \times 10^{-3} X_1 X_3 - 3.125 \times 10^{-3} X_2 X_3 - 1.245 \times 10^{-2} X_1^2 - 1.386 \times 10^{-2} X_2^2 - 2.028 \times 10^{-2} X_3^2$$

2.2.2 模型的显著性检验 根据表 3 方差分析结果，可以看出该试验模型极显著 ($P < 0.0001$)，失拟项不显著 $0.1682 > 0.05$ ，校正决定系数 $R_{Adj}^2 = 0.9822$ ，相关系数 $R^2 = 0.9983$ ，模型合适，可以解释 98.22% 响应值的变化，拟合程度良好，说明可以使用该模型来分析和预测鸡血藤原花青素的提取率。

2.2.3 响应面交互作用分析 根据模型的响应面与等高线图 (图 2)，可以看出各因素对响应值的影响，由图可知，提取时间对提取率的影响较大，图 b1、c1 表现为较陡的曲面。其中料液比与提取时间，提取时间与料液比交互作用较为明显，等高线因而呈椭圆形。

2.2.4 最优提取工艺参数 使用 Design Expert 8.06 软件求解回归方程，得到最佳提取工艺参数如下：料液比 1:44.72，提取溶剂为 $\varphi = 71.19\%$ 丙酮，提取时间 31.29 min，鸡血藤原花青素在该条件下的理论提取率为 25.62%。

表 3 方差分析结果

Table 3 ANOVA of regression analysis

Source	Sum of squares	df	Mean square	F Value	P Value (Prob > F)
Model	61.19	9	6.80	98.87	< 0.0001
X_1	13.55	1	13.55	196.97	< 0.0001
X_2	3.21	1	3.21	46.72	0.0002
X_3	6.55	1	6.55	95.28	< 0.0001
$X_1 X_2$	0.16	1	0.16	2.33	0.1710
$X_1 X_3$	1.89	1	1.89	27.49	0.0012
$X_2 X_3$	0.39	1	0.39	5.68	0.0486
$X^2 1$	6.53	1	6.53	94.98	< 0.0001
$X^2 2$	8.08	1	8.08	117.53	< 0.0001
$X^2 3$	17.32	1	17.32	251.81	< 0.0001
Residual	0.48	7	0.07		
Lack of fit	0.33	3	0.11	2.86	0.1682
Pure error	0.15	4	0.04		
Cor total	61.68	16			

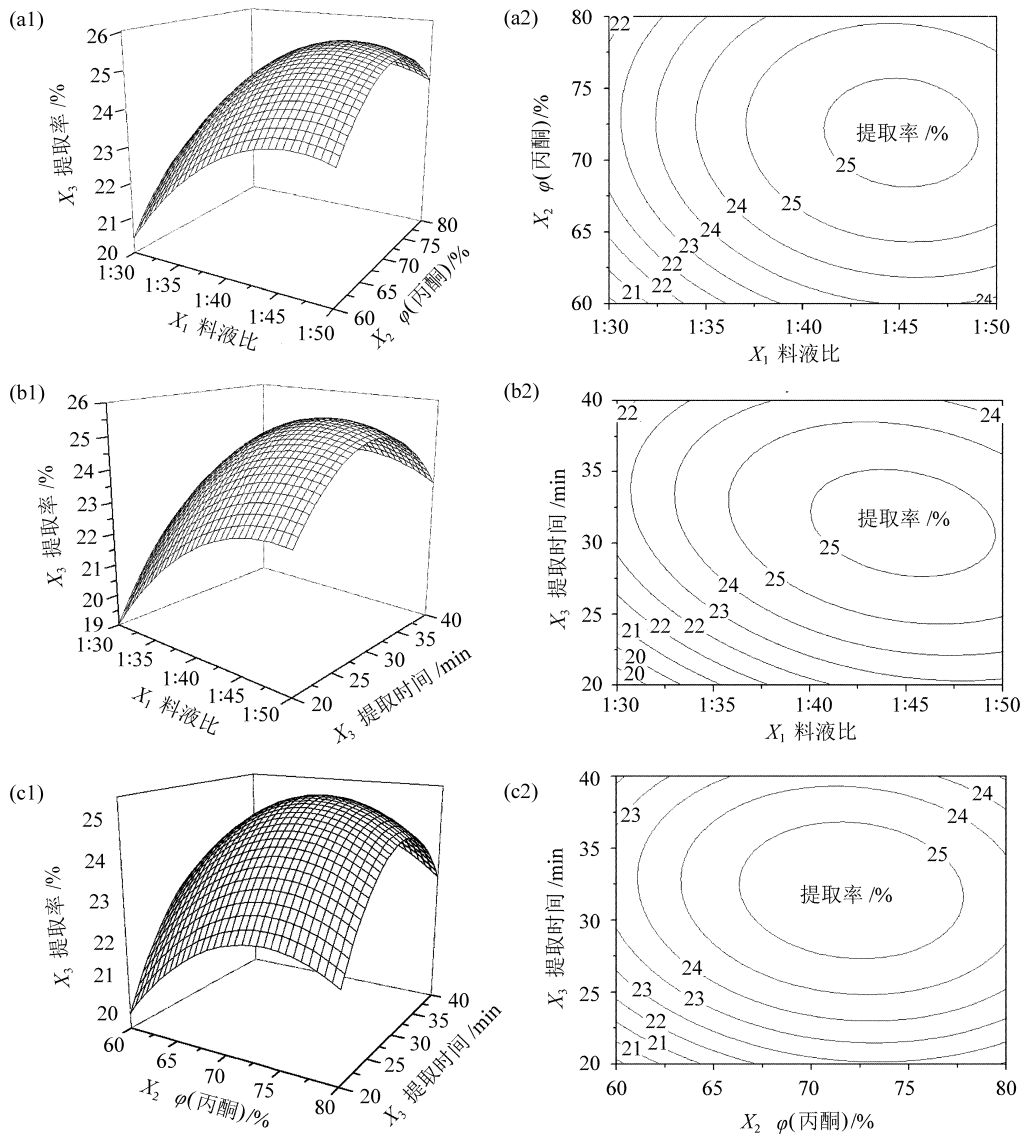


图2 料液比 (X_1) 与丙酮体积分数 (X_2)、料液比 (X_1) 与提取时间 (X_3) 以及丙酮体积分数 (X_2) 与提取时间 (X_3) 交互作用响应面图 (a1、b1、c1) 与等高线图 (a2、b2、c2)

Fig. 2 Responsive surface plots (a1、b1、c1) and contour plots (a2、b2、c2) showing the mutual effects of ratio of solid liquid (X_1) and acetone concentration (X_2), ratio of solid liquid (X_1) and extraction time (X_3), acetone concentration (X_2) and extraction time (X_3) on the yield of PC

2.2.5 试验模型的验证和比较 对模型得出的最优提取工艺参数进行试验验证。考虑到实际操作的可性,对工艺参数进行了微调,料液比 1:45, $\varphi = 70\%$ 丙酮,室温提取 30 min,在该条件下进行了 3 批提取试验,鸡血藤原花青素实际提取得率分别为 25.57%, 25.58%, 25.62%, 符合理论提取得率数据,也证明了该模型用于预测与分析原花青素提取工艺参数的可靠性

2.3 DPPH·/ABTS·清除率测定结果

由图 3、图 4 可知,鸡血藤原花青素抗氧化能力与浓度呈现较好的量效关系,其清除 DPPH· 的

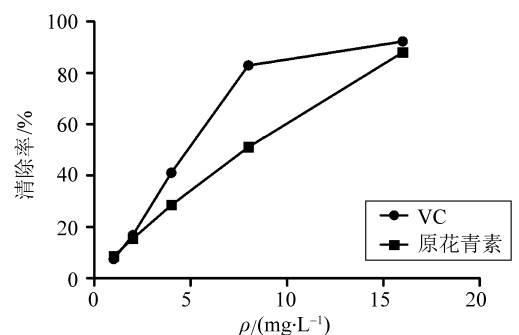


图3 鸡血藤原花青素及 VC 对 DPPH· 的清除作用
Fig. 3 Scavenging effects of PC on DPPH·

IC₅₀ 为 8.42 μg/mL, 阳性对照 VC 为 4.91 μg/mL; 清除 ABTS· 的 IC₅₀ 约为 10.55 μg/mL, 阳性对照 VC 为 8.42 μg/mL, 鸡血藤原花青素粗提物抗氧化效果与 VC 接近。

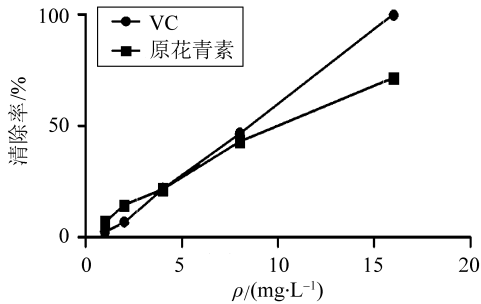


图 4 鸡血藤原花青素及 VC 对 ABTS· 的清除作用

Fig. 4 Scavenging effects of PC on ABTS·

3 结 论

采用超声波辅助提取技术对鸡血藤原花青素进行提取, 通过单因素试验和 Box-behnken 试验设计以及响应面分析对超声波提取工艺进行优化, 得出较优工艺条件为室温条件下, 超声功率 500 W、超声时间 30 min、料液比 1:45、 $\varphi = 70\%$ 丙酮, 室温下提取 1 次, 在此工艺下, 原花青素提取率为 25.59%, 并得到原花青素总提取率与超声波处理各因素变量的二次方程模型, 该模型回归极显著, 对试验拟合良好。提取得到的鸡血藤原花青素对 DPPH·、ABTS· 清除率的 IC₅₀ 分别为 8.42 和 10.55 μg/mL, 抗氧化活性接近于 VC。该研究可对鸡血藤原花青素的工业化生产与应用提供科学依据。

参考文献:

- [1] GENTILE C, ALLEGRA M, ANGILERI F, et al. Polymeric proanthocyanidins from Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L.) nut extract inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells[J]. European Journal of Nutrition, 2012, 51(3):353–363.
- [2] AL-MALKI A L, SAYED A A, EL RABEY H A. Proanthocyanidin attenuation of oxidative stress and NF- κ B protects apoli-poprotein E-deficient mice against diabetic nephropathy[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013:1–8.
- [3] ENGELBRECHT A M, MATTHEYSE M, ELLIS B, et al. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line[J]. Cancer Letters, 2007, 258(1):144–153.
- [4] XU J Q, RONG S, XIE B J, et al. Rejuvenation of antioxidant and cholinergic system contributes to the effect of procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorating memory impairment in cognitively impaired aged rats[J]. European Neuropsychopharmacology, 2009, 19:851–860.
- [5] HIN M O, YOON S, MOON J O. The proanthocyanidins inhibit dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats[J]. Archives of Pharmacal Research, 2010, 33:167–173.
- [6] YAMAKOSHI J, SAITO M, KATAOKA S, et al. Safety evaluation of proanthocyanidinrich extract from grape seeds[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 40(5):599–607.
- [7] BAGCHI D, BAGCHI M, STOHS S, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidins extract: important in human health and diseaseprevention[J]. Toxicology, 2008, 148(2/3):187–197.
- [8] 程悦, 符影, 王冬梅, 等. 鸡血藤提取物中缩合鞣质的含量测定及其抗肿瘤活性初步研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2011, 50(2):75–80.
CHENG Y, FU Y, WANG D M, et al. Determination on the contents of condensed tannins in *Spatholobus suberectus* Dunn extracts and primary study on their anti-tumor activities[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2011, 50(2):75–80.
- [9] LI W T, YANG D P, WANG D M, et al. Chemical characterization of procyanidins from *Spatholobus suberectus* and their antioxidative and anticancer activities[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 12:468–477.
- [10] WANG Z Y, WANG D M, HAN S W, et al. Bioactivity-guided identification and cell signaling technology to delineate the lactate dehydrogenase inhibition effects of *Spatholobus suberectus* on breast cancer[J]. Plos One, 2013, 8(2):e56631.
- [11] 林慧贞, 刘浩文, 王冬梅, 等. 鸡血藤药材及其不同部位缩合鞣质的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24):70–74.
LIN H Z, LIU H W, WANG D M, et al. Determination of condensed tannins in *Spatholobi caulis* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(24):70–74.
- [12] ZHAO Z, XU X, YE Q, et al. Ultrasound extraction optimization of *Acanthopanax senticosus* polysaccharides and its antioxidant activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 59(12):290–294.
- [13] STÉPHANIE D, XAVIER V, PHILIPPE C, et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2009, 57(5):1768–1774.