

调整,分离效果有所改善,达到了基线分离的要求。

3.2 样品提取溶剂与提取方法的选择

本实验比较了超声提取中不同溶剂(甲醇、95%乙醇以及无水乙醇)对4种重楼皂苷总得率的影响,结果表明甲醇提取效果最好,其次为95%乙醇,无水乙醇提取得率最低。

本实验还比较了甲醇超声与甲醇回流对4种重楼总皂苷提取得率的影响,结果表明,甲醇超声3次,每次20 min,4种重楼皂苷总得率与甲醇回流相当,考虑到甲醇回流对身体的伤害,本实验采用甲醇超声。

3.3 浙江七叶一枝花优质种源的筛选

七叶一枝花是中国药典2010年版收载的重楼药材基源植物之一,在浙江多个县市均有分布,各地药用均以野生为主。本实验研究发现来自浙江不同种源地的七叶一枝花的重楼皂苷含量存在较大差异,内在品质参差不齐,这与文献报道的云南、贵州等产野生七叶一枝花内在品质评价结果一致^[5-7],提示若想获得稳定疗效,筛选七叶一枝花优质种源并进行规范化栽培研究显得尤为必要。

中药有效成分的积累是一个非常复杂的过程,既受自身遗传因素的影响,也与气候条件及地理环境密切相关。采自永嘉上桥头村的样品重楼皂苷总含量明显高于其他地区,一方面说明其

本身重楼皂苷的合成能力强,另一方面也说明生长地的气候条件及生态环境有利于重楼中次生代谢物的积累,可以作为优质种源进行家化栽培。从种源的地域分布看,浙南山区的环境条件比较适于七叶一枝花中重楼皂苷的积累,可考虑在这一带建立人工种植基地。

REFERENCES

- [1] 中国药典.一部[S].2010:附录243-244.
- [2] ZHANG S P. Research progress on chemical constituents and pharmacological effect of *Genus paris* [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2007, 19(6): 4-7.
- [3] 浙江植物志编辑委员会. 浙江植物志[M]. 第7卷. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1998: 397-399.
- [4] TIAN F G. Resource investigation and genetic diversity analysis of *Paris polyphylla* var. *chinensis* from Zhejiang province [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2014.
- [5] LIANG Y Y, LIU Z, GAO W Y, et al. Determination of nine steroidal saponins in *Paris polyphylla* from different areas of Guizhou province by HPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(15): 2309-2312.
- [6] LI Y, HE J, ZHAO T Z, et al. Determination of six saponins in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* from different habitats by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2012, 34(1): 113-116.
- [7] YE F, YANG G Y, HUANG Y L, et al. Comparative study on content of saponin of *Paris polyphylla* in northwest area of Hubei province [J]. Her Med(医药导报), 2013, 32(7): 933-935.

收稿日期: 2014-11-11

莲房原花青素提取纯化工艺研究与抗氧化活性评价

栾连军¹, 雷后亮¹, 周芸¹, 刘忠达², 袁宙新², 吴永江^{1*} (1.浙江大学药学院, 杭州 310058; 2.丽水市中医院, 浙江 丽水 323000)

摘要: 目的 优化莲房原花青素提取纯化工艺并评价抗氧化活性。方法 以正交设计 $L_9(3^4)$ 优化莲房原花青素提取工艺参数,用大孔吸附树脂进行纯化,而后通过1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)和羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除率评价其体外抗氧化活性。结果 在最佳提取工艺条件下(8倍量50%乙醇回流提取2次,每次3 h),提取率达91.3%,进一步通过大孔树脂AB-8纯化,最终提取物中原花青素纯度为80.7%。莲房原花青素抗氧化活性与葡萄籽原花青素无显著性差异,均明显优于维生素C。结论 该提取纯化方法简单、高效,可用于莲房原花青素提取物的制备。莲房原花青素具有较强的抗氧化活性,值得进一步开发利用。

关键词: 莲房; 原花青素; 提取; 纯化; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)09-1069-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.010

基金项目: 丽水市科技计划项目(20110411)

作者简介: 栾连军,男,硕士,副教授 Tel: 13758217913

E-mail: lljun@zju.edu.cn

*通信作者: 吴永江,男,博士,教授

Tel:

13515815761 E-mail: yjwu@zju.edu.cn

Extraction and Purification of Proanthocyanidins from Nelumbinis Receptaculum and Evaluation of Its Antioxidant Activity

LUAN Lianjun¹, LEI Houliang¹, ZHOU Yun¹, LIU Zhongda², YUAN Zhouxin², WU Yongjiang^{1*} (1.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2.Lishui Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction and purification conditions of proanthocyanidins from Nelumbinis Receptaculum and to evaluate its antioxidant activity. **METHODS** An orthogonal experiment $L_9(3^4)$ was applied to obtain the best extraction conditions, and macroporous adsorption resin was used to purify the crude extract. Furthermore, the antioxidant activities of proanthocyanidins from Nelumbinis Receptaculum and grape seed were evaluated with two different *in vitro* assays methods: scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and hydroxyl radicals. **RESULTS** The highest extraction yield of 91.3% was obtained when extraction times, ratio of solvents to raw material and concentration of ethanol were 3 h, 8 and 50%, respectively. And the crude extract was purified with macroporous adsorption resin AB-8 to gain the final extract with proanthocyanidins purity of 80.7%. The antioxidant activity of proanthocyanidins extract from Nelumbinis Receptaculum was similar to that from grape seed, which was much better than vitamin C. **CONCLUSION** An extraction and purification process with procedural simplicity, high efficiency is established for the preparation of Nelumbinis Receptaculum proanthocyanidins extract which can be further developed because of its strong antioxidant activity.

KEY WORDS: Nelumbinis Receptaculum; proanthocyanidins; extraction; purification; antioxidant activity

原花青素是一种氧自由基清除剂和脂质过氧化抑制剂,是迄今为止发现的最好的天然抗氧化剂之一,目前,葡萄籽是其最主要来源^[1-3]。研究发现,莲房与葡萄籽类似,含有大量原花青素成分,具有广泛的生物活性和药理作用^[4]。据文献报道^[5-8],莲房原花青素的提取方法主要有微波辅助提取法、超声辅助提取法和酶辅助提取法等,上述方法在传统的浸渍法和煎煮法上结合新的辅助手段可以实现莲房原花青素的有效提取,但设备要求与生产成本较高,且不易于放大生产。本研究采用易于实现工业化的热回流提取方法,结合正交试验设计,对莲房原花青素提取工艺进行优化,且通过大孔吸附树脂法进一步富集纯化,建立简单高效的莲房原花青素提取物制备方法,并在此基础上对其抗氧化活性进行评价,展现其药用价值,希望能促进莲房的进一步开发利用,避免资源的浪费和对环境的污染。

1 仪器与试剂

TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); DK-S24 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司); FA2004 电子天平(上海越平科学仪器有限公司); KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BT100-2J 蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司)。

莲房采自浙江丽水,批号为 20100927,经浙江大学药学院徐娟华副教授鉴定为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥花托;葡萄籽原花

青素提取物(河北宝恩生物科技有限公司,纯度:95%);原花青素对照品(天津尖峰天然产物研究开发公司,批号:20120824,纯度:98%);DPPH(日本和光纯药工业株式会社);维生素C(杭州大方化学试剂厂,批号:120715,纯度:99.7%);香草醛、浓盐酸、双氧水、水杨酸、磷酸二氢钾、铁氰化钾、三氯乙酸、氯化铁均为分析纯,购自杭州禾德化工有限公司;水(娃哈哈有限公司)。

2 方法与结果

2.1 原花青素含量的测定

2.1.1 对照品溶液的制备 取原花青素对照品适量,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,密塞,摇匀,即得浓度为 $1.11 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.1.2 标准曲线的绘制 将原花青素对照品储备液逐级稀释,得到浓度为 333.0, 222.0, 166.5, 111.0, 66.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液,精密吸取各对照品溶液 1 mL 至 10 mL 具塞试管,加入 3% 香草醛-甲醇溶液 3 mL 和浓盐酸 1.5 mL,摇匀,于 30 °C 水浴中避光显色 15 min,取出,以甲醇为空白对照,在 500 nm 处测定吸光度,以浓度(C)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程 $A=0.0024C+0.011$, $r=0.9999$,线性范围为 66.6~333.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.1.3 样品测定 精密吸取供试品溶液,按“2.1.2”项下操作显色,测定吸光度,按回归方程计算供试品溶液中原花青素的含量。

2.2 莲房原花青素的提取工艺

根据预试验, 选择乙醇浓度、溶剂倍量、提取时间 3 个因素进行正交设计试验, 固定提取次数为 2 次, 以原花青素提取转移率为指标, 优选最佳工艺参数。因素水平安排见表 1。正交试验结果及分析见表 2~3。各因素的影响程度依次为乙醇浓度(A)>提取时间(C)>溶剂倍量(B), 其中 A 和 C 对莲房原花青素的提取转移率有显著性影响, 最佳条件为 A₁B₁C₃, 即 8 倍量 50%乙醇回流提取 2 次, 每次 3 h。称取 3 份莲房粉末, 每份 10 g, 按最佳工艺条件平行操作进行验证试验, 测得原花青素平均提取转移率为 91.3%(RSD=1.98%, n=3), 表明通过正交试验优选的最佳工艺稳定、可行。

表 1 正交试验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	乙醇浓度(A)/%	溶剂倍量(B)	提取时间(C)/h
1	50	8	1
2	60	10	2
3	70	12	3

表 2 正交试验结果

Tab. 2 Results of orthogonal test

试验号	因素				原花青素提取转移率/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	87.9
2	1	2	2	2	81.5
3	1	3	3	3	91.2
4	2	1	2	3	81.4
5	2	2	3	1	78.7
6	2	3	1	2	65.1
7	3	1	3	2	76.6
8	3	2	1	3	63.7
9	3	3	2	1	71.4
K ₁	93.5	81.9	72.2	79.3	
K ₂	75.1	79.6	83.1	79.4	
K ₃	70.6	77.6	83.8	80.4	
R	22.9	4.40	11.6	1.10	

表 3 方差分析结果

Tab. 3 Results of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	888.7	2	389.4	P<0.01
B	29.08	2	12.74	不显著
C	253.2	2	110.9	P<0.01
误差	2.280	2		

注: $F(2,2)_{0.1}=9$, $F(2,2)_{0.05}=19$, $F(2,2)_{0.01}=99$ 。

Note: $F(2,2)_{0.1}=9$, $F(2,2)_{0.05}=19$, $F(2,2)_{0.01}=99$ 。

2.3 大孔树脂纯化工艺

2.3.1 大孔树脂的预处理 将新树脂 AB-8 装入吸附柱中, 用 95%乙醇浸泡 24 h, 用蒸馏水以 2 BV·h⁻¹ 的流速通过树脂层, 洗至流出液不呈白色浑浊, 用 2~4 BV 的 5% HCl 浸泡 3~5 h, 用蒸馏水洗至中性, 再用 2~4 BV 的 2% NaOH 溶液浸泡 3~5 h, 用蒸馏水洗至中性备用。

2.3.2 上样条件的选择 取莲房提取液浓缩除醇后加水至 0.1 g·mL⁻¹ (生药浓度), 分别以 1, 2, 4 BV·h⁻¹ 的流速上样, 计算到达泄漏点(流出液的浓度为上样液浓度的 10%时为泄漏点)时原花青素的吸附量, 结果显示, 上样速度对于原花青素的吸附有较大的影响, 上样流速快, 到达泄漏点快, 吸附的原花青素量少, 故选择 1 BV·h⁻¹ 的上样流速, 在该流速下上样, 当流出液体积约为 4.5 BV 时达到泄漏点, 为尽可能保留有效成分, 避免泄漏损失, 上样体积选择 4 BV。最终上样条件: 上样流速 1 BV·h⁻¹, 上样体积 4 BV。结果见表 4。

表 4 上样流速考察

Tab. 4 Effect of flow rate on loading ability

上样流速/BV·h ⁻¹	树脂吸附量/mg·mL ⁻¹	树脂利用率/%
1	27.7	43.5
2	19.9	31.2
4	9.34	14.7

2.3.3 洗脱条件的选择 上样后的树脂分别用 10%, 20%, 30%, 40%乙醇以 1 BV·h⁻¹ 流速洗脱, 分段收集, 测定每份中原花青素浓度, 绘制洗脱曲线, 见图 1。结果表明, 随乙醇浓度增大, 洗脱能力增强, 40%乙醇 1 BV·h⁻¹ 洗脱 6 BV 时, 原花青素回收率高达 97.2%, 基本能将原花青素洗脱下来, 可满足需求。而用 50%乙醇洗脱可能会将更多杂质洗脱下来, 影响原花青素纯度, 故选择 40%乙醇作为洗脱溶剂。上样后的树脂分别用 4 BV 40%乙醇以 1, 2, 4 BV·h⁻¹ 的流速洗脱, 测定洗脱液原花青素含量, 计算回收率分别为 92.9%, 83.5% 和 58.2%, 结果表明洗脱流速越低, 原花青素回收率越高, 故选择 1 BV·h⁻¹ 的洗脱流速。最终洗脱条件: 洗脱溶剂 40%乙醇, 洗脱流速 1 BV·h⁻¹, 洗脱体积 6 BV。

2.4 抗氧化活性的测定

2.4.1 样品溶液的制备 分别精密称取葡萄籽原花青素提取物(纯度: 95%)、维生素 C(纯度: 99.7%)

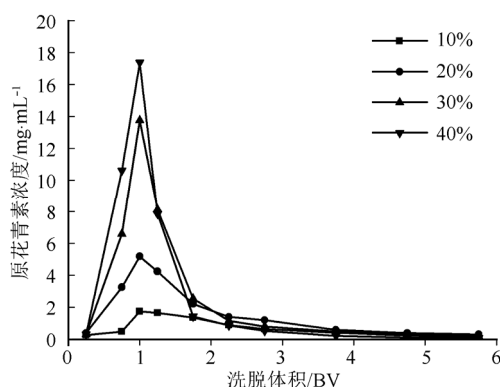


图1 不同乙醇浓度洗脱曲线

Fig. 1 Dynamic desorption curves of different ethanol concentrations

和最佳工艺条件下自制的莲房原花青素提取物(纯度: 80.7%)适量, 用甲醇溶解配制成系列浓度, 备用。

2.4.2 DPPH 自由基清除能力^[9-11] 精密吸取 1 mL 样品溶液于 10 mL 量瓶中, 加入 $70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DPPH 溶液 5 mL, 加甲醇溶解并定容, 密塞, 摇匀, 避光静置 60 min 后, 在 515 nm 处测定吸光度, 计算清除率 $I=(1-A_c/A_0)\times 100\%$, 其中 A_c 为样品溶液吸光度, A_0 为甲醇空白溶液吸光度。以清除率对样品溶液浓度做回归分析, 得到回归方程, 计算清除率为 50% 时的样品溶液浓度(即 IC_{50} 值), 结果表明, 莲房原花青素和葡萄籽原花青素清除 DPPH 的 IC_{50} 值没有显著性差异, 但明显低于维生素 C, 表明莲房原花青素和葡萄籽原花青素具有相似的 DPPH 自由基清除能力且明显强于维生素 C。结果见图 2。

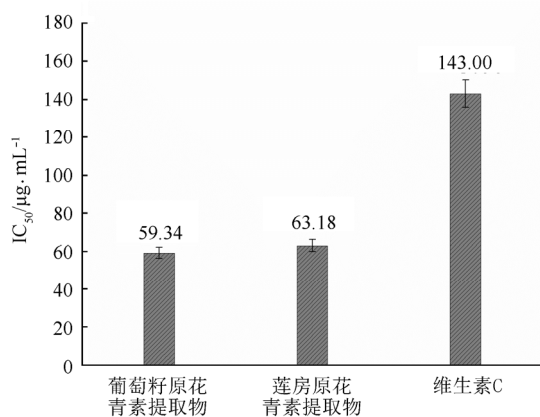


图2 DPPH 自由基清除能力

Fig. 2 DPPH radical scavenging activity

2.4.3 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力^[12] 精密吸取样品溶液 1 mL, 加入 $8.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 1 mL、

$9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{FeSO}_4$ 1 mL、 $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸-乙醇溶液 1 mL, 37°C 反应 30 min, 以蒸馏水为空白, 计算 510 nm 处的清除率 $I=[1-(A_x-A_{x0})/A_0]\times 100\%$, 其中 A_0 为空白溶液吸光度, A_x 为加入样品后吸光度, A_{x0} 为未加水杨酸溶液的吸光度。以清除率对样品溶液浓度做回归分析, 得回归方程, 计算清除率为 50% 时的样品溶液浓度(即 IC_{50} 值), 结果表明, 莲房原花青素和葡萄籽原花青素清除 $\cdot\text{OH}$ 的 IC_{50} 值没有显著性差异, 但明显低于维生素 C, 表明莲房原花青素和葡萄籽原花青素具有相似的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力, 并且明显强于维生素 C。结果见图 3。

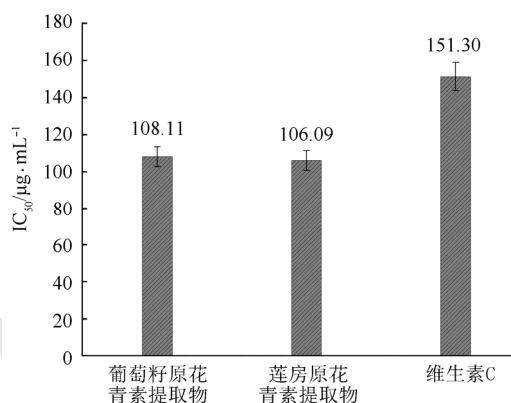


图3 $\cdot\text{OH}$ 清除能力

Fig. 3 $\cdot\text{OH}$ radical scavenging activity

3 讨论

原花青素是最好的天然抗氧化剂之一, 在医药保健品、化妆品、营养补充剂等领域具有广泛应用。目前能够以工业规模生产的原花青素产品主要原料是松树皮和葡萄籽。然而松树皮资源有限, 且其大量使用会对森林植被造成破坏, 而葡萄籽多为酿酒后的废弃物, 其原花青素产品易受葡萄品种与酿造工艺影响, 质量不稳定。近年来, 学者开始将研究方向转向其他植物, 希望能够发掘新的原花青素资源。莲房是睡莲科植物莲的成熟花托, 含有丰富的原花青素, 含量达 7.8%, 且以低聚体原花青素为主, 具有更强的生物活性。但在莲子加工过程中, 人们从莲房中取出莲子后, 莲房常常被大量丢弃, 造成资源的浪费与环境的污染。因此对莲房回收再利用, 从莲房中提取原花青素制备莲房原花青素产品, 能够实现资源的充分利用, 减少对环境的污染。

本研究采用正交试验设计, 对莲房原花青素提取工艺重要参数进行优化, 且通过大孔吸附树脂法进一步富集纯化, 建立了一种莲房原花青素

提取物的制备方法。该方法操作简单、设备要求与生产成本低、易于实现工业化转化。通过该方法制备得到的莲房原花青素提取物中原花青素含量约为 80%，为进一步得到更高纯度的莲房原花青素产品，可以考虑将其他纯化方式如膜分离、萃取等方法和大孔树脂联用，有待在以后的工作中完善。在莲房原花青素提取物制备的基础上，本研究还通过 DPPH 和·OH 清除率试验对莲房原花青素体外抗氧化活性进行评价，结果显示，莲房原花青素的抗氧化活性明显强于维生素 C，与葡萄籽原花青素活性相近，具有重要开发利用价值，有望使莲房成为生产原花青素产品的又一新资源，同时还可以解决农业废弃物的回收再利用问题，具有显著的经济效益和社会效益。本研究只测定了莲房原花青素体外抗氧化活性，关于莲房原花青素体内抗氧化作用及其机制还需进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] LAKO J, TRENNERY V C, WAHLQVIST M, et al. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods [J]. Food Chem, 2007, 101(4): 1727-1741.
- [2] ARNOUS A, MEYER A S. Comparison of methods for compositional characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins [J]. Food Bioprod Process, 2008, 86(C2): 79-86.
- [3] DENG M F, LIAO L N, ZHANG M M, et al. Study on the inhibition of experimental atherosclerosis in rabbits by grape seed proanthocyanidin and its composition [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(12): 1285-1289.
- [4] DUAN Y Q, YAN Y S, ZHANG H H, et al. Microwave-assisted extraction technology for extracting polyphenols from lotus seedpod [J]. Acad J Jiangsu Univ(Nat Sci Ed)(江苏大学学报 自然科学版), 2009, 30(5): 437-440.
- [5] DUAN Y Q, ZHANG H H, LI J F, et al. Technology for extracting polyphenols from lotus seedpod by pulsed ultrasonic assisted method [J]. Trans Chin Soc Agric Eng(农业工程学报), 2009, 25(S1): 193-197.
- [6] YU H J, SUN Z D, XIE B J. Enzyme assistant extraction of procyanidins from seedpod of lotus and the comparison of antioxidant activity [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2010, 22(1): 154-158.
- [7] WANG Z H, SUN Z D, XIE B J. Optimization of the double-enzymatic extraction of procyanidins from lotus seedpods using response surface methodology [J]. Food Sci(食品科学), 2011, 32(4): 64-68.
- [8] DUAN Y, ZHANG H, XIE B, et al. Whole body radioprotective activity of an acetone-water extract from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. seedpod [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(12): 3374-3384.
- [9] CHEN Y, WANG M F, ROSEN R T, et al. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(6): 2226-2228.
- [10] BORNEO R, LEON A E, AGUIRRE A, et al. Antioxidant capacity of medicinal plants from the province of Cordoba (Argentina) and their *in vitro* testing in a model food system [J]. Food Chem, 2009, 112(3): 664-670.
- [11] FALLEH H, KSOURI R, MEDINI F, et al. Antioxidant activity and phenolic composition of the medicinal and edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. [J]. Ind Crop Prod, 2011, 34(1): 1066-1071.
- [12] SMIRNOFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.

收稿日期: 2014-10-18

有效专利中防治呼吸系统疾病的中药复方用药规律探索

程江雪¹, 肖诗鹰^{1,2*}, 刘铜华^{1*} (1.北京中医药大学, 北京 100102; 2.中国生物技术发展中心, 北京 100036)

摘要: 目的 探索防治呼吸系统疾病的中药复方有效专利的用药规律, 为新药研制提供参考, 为其专利保护提供战略依据。**方法** 以维持时间为 5 年的防治呼吸系统疾病的中药复方专利为研究对象, 通过频数分析法对其核心药物的组成、分类、功效、归经及药对配伍进行统计分析。**结果** 防治呼吸系统疾病的中药复方有效专利中高频中药包括金银花、甘草、黄芩等 22 味, 按照功效分类多属于清热药、化痰止咳平喘药和补虚药等, 主要归肺、心经, 高频药对配伍多来自于古(经)方。**结论** 上述用药规律探索体现了防治呼吸系统疾病中药复方的组方特点, 为新的中药复方研发及专利保护策略提供了新思路。

作者简介: 程江雪, 女, 博士生 Tel: 13161035896
博导 Tel: (010)88225125 E-mail: xshy@cncbd.org.cn
thliu@vip.163.com

E-mail: xueling_jiaojiao@126.com *通信作者: 肖诗鹰, 男, 博士, 研究员,
刘铜华, 男, 博士, 教授, 主任医师, 博导 Tel: (010)64286950 E-mail: