

文章编号:1673-1689(2009)02-0201-05

白芷活性提取物清除自由基与抗氧化作用

储 鸿, 程 珊, 倪忠斌, 陈明清*

(江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要:研究了香辛料白芷中活性物的提取工艺,试验结果表明:以体积分数 75%乙醇为溶剂,白芷粉碎度为 20 目,固液比保持 1 g:10 mL,回流萃取 1h,提取 2 次,能有效提取出白芷中活性成分。用邻苯三酚自氧化法和亚硝基 R 盐-Co³⁺褪色法对白芷提取物进行了自由基清除、抗氧化性能的研究。发现白芷提取物能有效清除自由基,当质量浓度为 1.0×10⁻³g/mL 时,提取物对过氧阴离子自由基(O₂⁻·)和羟基自由基(·OH)的清除率分别为 23.40%和 69.35%,可作为一种性能良好的新型天然清除自由基、抗氧化剂,应用于食品和药品中。

关键词:白芷;天然抗氧化剂;清除自由基

中图分类号:R 28

文献标识码:A

Study on Scavenging Free Radical and Antioxidation Effects of Extracts from *Angelica dahuica*

HONG Chu, SHAN Cheng, NI Zhong-bin, CHEN Ming-qing*

(School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract:In this study, the extraction of natural antioxidant from the root of *Angelica dahuica* was carefully investigated. The effects of those extract on oxygen free radical scavenging were determined by pyrogallol autoxidation system and H₂O₂ oxidative system. It was found that the scavenging percentage of O₂⁻· and ·OH free radical can reach at 23.40% and 69.35%, respectively. The results presented here suggested that the extracts of *Angelica dahuica* maybe as a potential multifunctional antioxidant in foods and drugs.

Key words: *Angelica dahuica*, natural antioxidant, free radical scavenging

随着生活水平的提高以及对天然健康食品需求的增加,食品中添加抗自由基、抗氧化剂的应用越来越普及。然而近年来合成抗氧化剂如 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、叔丁基羟基茴香醚(BHA)和叔丁基对苯二酚(TBHQ)的安全性问题引起了人们的高度关注,许多研究表明天然抗氧化剂的毒

性远低于人工合成的抗氧化剂,因此,从自然界寻求天然抗氧化剂已成为迫切的研究课题^[1]。

我国药典记载,白芷,属次香辛料,为伞形科植物白芷的干燥根,白芷的质量因产地而异,以四川遂宁出产的川白芷品质最佳^[2]。近年来研究人员陆续从白芷中发现了新结构的香豆素类化合

收稿日期:2007-10-07

基金项目:江苏高等学校优秀科技创新团队(苏教科[2007]5号)资助项目。

作者简介:储鸿(1971-),女,江苏,工学硕士,讲师。

*通讯作者:陈明清(1962-),男,江苏,工学博士,教授,博士生导师,主要从事功能材料的研究。Email:mqchen@

jiangnan.edu.cn

物^[3-4],药理实验表明白芷提取物具有平喘、降压、抗菌、解痉、光敏、活化交感神经等多种药理作用^[5]。但迄今为止,在国内尚未见到白芷清除自由基、抗氧化作用的研究报道。作者以自由基清除作用为指标,研究了提取溶剂种类、提取时间、提取次数和提取溶剂量对白芷有效成分含量的影响,并从自由基生物学角度研究白芷的抗氧化能力。

1 材料与方 法

1.1 药品与仪器

川白芷干燥根:产自四川遂宁;石油醚(沸程60~90℃)、无水乙醚、乙酸乙酯、无水乙醇、95%乙醇、浓盐酸、邻苯三酚、碳酸氢钠、无水碳酸钠、亚硝基红盐(Nit-R)、六水硝酸钴[Co(NO₃)₂·6H₂O]、30%双氧水(H₂O₂):分析纯;三羟甲基氨基甲烷(Tris);生化试剂国药集团化学试剂有限公司;2,6-二叔丁基对甲酚(BHT):化学纯,上海试剂一厂产品。

R-201 旋转蒸发器:上海申顺生物科技有限公司生产;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 白芷有效成分的提取 使用植物粉碎机将白芷干燥根粉碎至粒度为20目,准确称取20g粉末装入250 mL三口烧瓶中,加入溶剂,浸泡24 h,在恒温水浴中搅拌回流提取后进行真空抽滤,在真空条件下滤液用旋转蒸发器将溶剂蒸出后得到提取产品。

1.2.2 白芷提取物抗氧化活性的测定

1) 邻苯三酚自氧化法测定提取物对超氧阴离子自由基(O₂⁻·)的清除作用 准确移取5 mL(pH=8.2)的Tris-HCl缓冲液,0.3 mL抗氧化剂溶液在10 mL具塞比色管中,于37℃恒温水浴中放置20 min后,加入0.3 mL浓度为7.5 mmol/L的邻苯三酚溶液,迅速混匀,置于1 cm石英比色皿中,以试剂空白作参比,于37℃恒温水浴中,每隔30 s,在320 nm处测定溶液的吸光度,对O₂⁻·的清除率S按下式计算:

$$S(O_2^{\cdot-}) = [(F_0 - F_t) / F_0] \times 100\%$$

其中F₀、F_t分别表示空白溶液和药品溶液的吸光度随时间的变化率。

2) 亚硝基R盐-Co³⁺褪色法测定提取物对羟自由基(·OH)的清除作用 准确移取2 mL(pH=9.2)的Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲溶液,1 mL浓度为0.5 mmol/L Co(NO₃)₂溶液,1 mL浓度为1.56 mmol/L的Nit-R溶液,1 mL体积分数0.1% H₂

O₂,依次加入10 mL具塞比色管中,摇匀后用蒸馏水稀释至刻度。于37℃水浴中恒温反应45 min后,在412 nm处测定吸光度A_t,同时测定不加H₂O₂的体系的吸光度A₀。表观羟基自由基产生量可用ΔA=A₀-A_t表示。在体系中加入H₂O₂之前加入提取物溶液,以测量吸光度A_t,羟基自由基清除率由下式计算:

$$S(\cdot OH) = (A_t - A_0) / (A_0 - A_0) \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 白芷提取工艺的优化

2.1.1 提取溶剂的选择 参考文献[6]的提取方法,首先考察了以石油醚(60~90℃)、无水乙醚(36℃)、乙酸乙酯(80℃)和无水乙醇(80℃)为溶剂时的提取效率,结果发现以无水乙醇为提取溶剂时的得率最高,且提取物清除自由基作用最显著(见表1)。4种溶剂的提取物清除自由基作用大小依次为:无水乙醇>无水乙醚>石油醚>乙酸乙酯。白芷中含有的多种化学成分极性分布各异,因此溶剂的极性对提取物的抗氧化性有较大的影响。乙醇作为一种极性较强的溶剂,不仅能有效的提取出极性强的化学成分,对极性较弱的成分也有比较好的溶出效果。根据试验结果确定乙醇为提取溶剂。

表1 溶剂对白芷提取效率的影响

Tab.1 Influence of different solvents on *Angelica dahurica* extracts

提取溶剂	产品得率η/%	S(O ₂ ⁻ ·)/%	S(·OH)/%
石油醚	0.78	8.16	14.05
无水乙醚	1.78	10.20	17.21
乙酸乙酯	2.17	2.04	3.59
无水乙醇	14.28	14.28	24.50

2.1.2 正交试验结果与极差分析 正交试验结果见表2。根据极差分析,提取时间和提取次数对得率以及提取物清除自由基能力具有显著影响。

直观分析(见图1)也显示:增加提取次数,溶剂与原料充分接触,搅拌过程有利于细胞壁的破碎,使活性成分能更好的溶出,提取物的得率明显上升,但是经过一定的时间,物料内部和溶剂中溶质达到了平衡后,继续提取不能再增加提取得率。提取物对过氧阴离子自由基和羟基自由基的清除率随提取次数增加呈现先上升后下降的趋势,这是因为随着提取次数的增加,物料受热时间长,白芷所含的还原性物质在较高温度下易氧化、降解而损失,使清除自由基能力下降,此外提取时的温度最好不要超过80℃^[7]。

表 2 白芷提取正交试验结果与极差分析结果(质浓度 $1.0 \times 10^{-3} \text{g/mL}$)

Tab. 2 Results of orthogonal test and variance analysis

试验号	因素				产品得率 $\eta/\%$	$S(\text{O}_2^{\cdot -})/\%$	$S(\cdot\text{OH})/\%$
	乙醇体积分数 A(%)	乙醇用量 B(倍)	提取时间 C(h)	提取次数 D(次)			
1	70	8	1	1	18.00	15.22	60.15
2	70	10	2	2	24.06	17.39	55.60
3	70	12	3	3	26.15	13.04	63.85
4	75	8	2	3	22.68	10.87	63.74
5	75	10	3	1	17.34	21.74	64.80
6	75	12	1	2	23.26	21.74	57.40
7	80	8	3	2	19.78	17.39	60.46
8	80	10	1	3	23.59	10.87	55.50
9	80	12	2	1	18.69	10.87	55.71
η	K_1	68.22	60.46	64.86	54.04		
	K_2	63.29	65.00	65.44	67.10		
	K_3	62.09	68.11	63.27	72.42		
	R	2.053	2.55	0.72	6.13		
$S(\text{O}_2^{\cdot -})$	K_1	45.65	43.48	47.83	47.83		
	K_2	54.35	50.00	52.17	56.52		
	K_3	39.13	45.65	39.13	34.78		
	R	5.07	2.17	4.35	7.25		
$S(\cdot\text{OH})$	K_1	179.60	184.35	173.05	180.66		
	K_2	185.94	175.90	189.11	183.09		
	K_3	171.67	176.96	175.05	173.46		
	R	4.76	2.82	5.36	3.21		

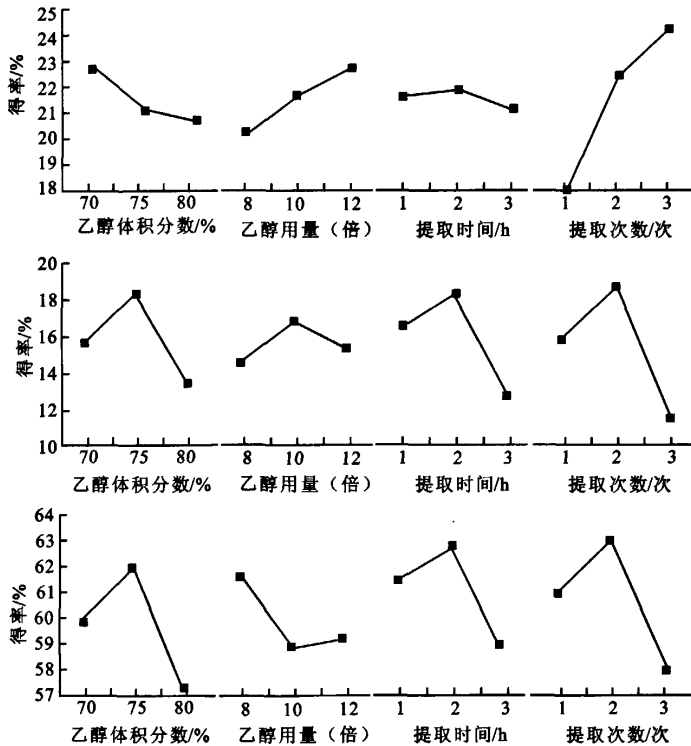


图 1 正交实验直观分析图

Fig. 1 Intuitionistic analysis of orthogonal test

增加乙醇用量,增加了白芷中溶质与溶剂间的浓度差,即增加了传质推动力,缩短平衡时间,使得率有所提高。综合考虑各种因素,采用 A₁B₂C₁D₂ 的提取工艺不仅提取效率高,而且提取步骤也较为简便。按上述条件进行验证试验,乙醇体积分数 70%,乙醇用量 10 倍,提取时间 1h,提取次数 2 次时,白芷提取物的得率为 22.91%;提取物对超氧阴离子自由基和羟自由基的清除率分别为 23.40% 和 69.35%。

2.2 白芷提取物与 BHT 抗氧化性的比较

BHT 是目前最广泛应用的合成食品抗氧化剂,价格低,稳定性高,抗氧化效果好,但因其毒性受到应用限制。对不同浓度的白芷提取物和 BHT 清除过氧阴离子自由基和羟基自由基的性能进行检测,结果发现白芷提取物对邻苯三酚自氧化体系产生的 O₂^{-·} 的清除作用呈显著的量效关系,如图 2 所示。当质量浓度为 1.0×10⁻³ g/mL 时,清除率达到 23.40%,是同浓度 BHT 的 2.4 倍。图 3 表明,随浓度增大,白芷提取物对 H₂O₂ 氧化体系产生的 ·OH 的清除率显著上升,当质量浓度为 1.0×10⁻³ g/mL 时,清除率为 69.35%,清除效果略优于 BHT。不同实验条件及测试方法得到的自由基清除率不同,可能是由于自由基种类和清除机理的差异所造成的。

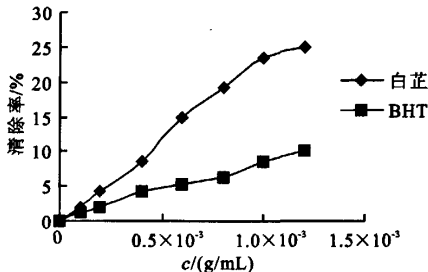


图 2 白芷提取物与 BHT 对清除 O₂^{-·} 活性

Fig. 2 Scavenging activity of *Angelica dahurica* extracts and BHT on O₂^{-·}

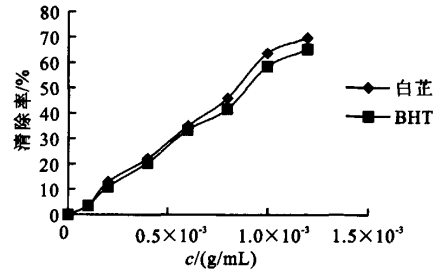


图 3 白芷提取物与 BHT 清除 ·OH 活性

Fig. 3 Scavenging activity of *Angelica dahurica* extracts and BHT on ·OH

3 结 语

机体内,各种抗氧化酶和抗氧化剂维持着低水平的自由基代谢平衡。一旦这种平衡打破,产生过量的自由基,便会致细胞乃至机体病变或衰老^[8-9]。其中, O₂^{-·} 最早产生,是各种自由基的源头, ·OH 化学性质最活泼,毒性最强。本研究表明,白芷的提取物能有效地清除 O₂^{-·} 和 ·OH,既能堵住自由基产生的源头 O₂^{-·},又能清除氧化作用最强的 ·OH,从一个侧面揭示了白芷提取物有效抗氧化的机制。

白芷的提取物含有多种组分,其中主要有效成分香豆素类 (coumarins) 的含量为 0.211% ~ 1.221%^[10],且均为线型呋喃香豆素,其化学结构如图 4 所示^[11]。大量的研究证明,芳香环上的羟基是有效的自由基吸收剂,能迅速将一个氢原子提供给自由基从而中止自动氧化反应。所以,香豆素化合物别异欧前胡素 (alloisioimperatorin)、花椒毒酚 (xanthotoxol) (图 4 中结构式 7 与 8) 应该是白芷清除自由基和抗氧化作用的物质基础。除此之外,白芷中还含有生物碱和微量元素,各组分清除自由基和抗氧化作用的贡献大小还有待进一步实验分析。

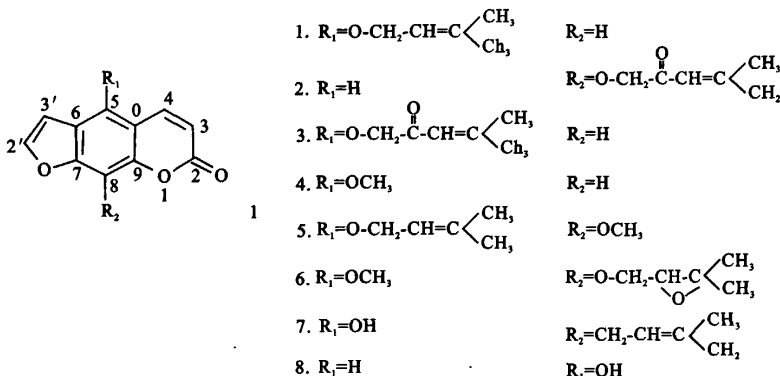


图 4 白芷中香豆素类化合物结构示意图

Fig. 4 Structures of coumarins isolated from the root of *Angelicae dahuricae*

随着工业的快速发展,人们安全意识的增强,天然抗氧化剂新品种的开发提供了一定的理论依据。抗氧化剂将逐步取代合成抗氧化剂,本研究为天然

参考文献(References):

- [1] 尤新. 食品抗氧化剂与人体健康[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(2): 1-7.
YOU Xin. Food Anti-Oxidants and their influence to human health[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(2): 1-7. (in Chinese)
- [2] 张庆芝, 王开疆. 中药白芷的品种论述[J]. 云南中医学院学报, 2000, 23(2): 22-23.
ZHANG Qing-zhi, WANG Kai-jiang. Variety of angelicae dahuricae[J]. *Journal of Yunnan College of Traditional Chinese Medicine*, 2000, 23(2): 22-23. (in Chinese)
- [3] 张富强, 聂红, 韦艺, 等. 白芷的化学与药理研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2002, 18(3): 190-192.
ZHANG Fu-qiang, NIE Hong, WEI Yi, et al. Advancement in chemical and pharmacological research on radix angelicae dahuricae[J]. *Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine*, 2002, 18(3): 190-192. (in Chinese)
- [4] 王梦月, 贾敏如. 白芷的化学成分研究进展[J]. 中成药, 2002, 25(6): 446-448.
WANG Men-yue, JIA Min-ru. Advancement in chemical components research on angelicae dahuricae[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2002, 25(6): 446-448. (in Chinese)
- [5] 王梦月, 贾敏如, 马逾英, 等. 白芷总香豆素的药理作用研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(10): 954-956.
WANG Men-yue, JIA Min-ru, MA Yu-yin, et al. Pharmacological effect of the total coumarins in radix amgelicae dahuricae[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2005, 16(10): 954-956. (in Chinese)
- [6] 陈贤春, 王玉蓉, 陆世鹏. 白芷提取工艺的研究[J]. 中成药, 2005, 27(2): 145-147.
CHEN Xian-chun, WANG Yu-rong, LU Shi-peng. Study on extraction of angelicae dahurica[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2005, 27(2): 145-147. (in Chinese)
- [7] 梁明金, 杨广德, 贺浪冲. 白芷中欧前胡素的提取方法研究[J]. 中成药, 2000, 22(12): 829-831.
LIANG Ming-jin, YANG Guang-de, HE Lang-chong. Solvent extraction methods of imperatorin in radix angelicae dahurica[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2000, 22(12): 829-831. (in Chinese)
- [8] Cayuela M M. Oxygen free radicals and human disease[J]. *Biochimie*, 1995, 77: 147-161.
- [9] Marnett L J. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage[J]. *Toxicology*, 2002, (2): 181-182.
- [10] 王立人, 李宏宇, 谢成科. 白芷中香豆精类成分的反相高效液相色谱测定[J]. 药学学报, 1990, 25(2): 131-133.
WANG Li-ren, LI Hong-yu, XIE Cheng-ke. Reverse-phase HPLC determination of coumarins in the traditional Chinese drug BAI-ZHI (Angelica Dahurica Forma BAI-ZHI)[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1990, 25(2): 131-133. (in Chinese)
- [11] 杨涓, 邓赞, 周在德, 等. 中药川白芷化学成分的研究[J]. 化学研究与应用, 2002, 14(2): 227-229.
YANG Juan, DENG Yun, ZHOU Zai-de, et al. Chemical constituents of angelica dahurica[J]. *Chemical Research and Application*, 2002, 14(2): 227-229. (in Chinese)

(责任编辑:杨萌)