

[制 剂]

β-环糊精对决明子的辅助提取作用

孙立丽, 任晓亮*, 王 萌, 刘亚男, 邓雁如
(天津中医药大学, 天津 300193)

摘要: 目的 考察 β-环糊精对决明子的辅助提取作用。方法 UPLC 法和主成分分析分别测定和分析水提物、β-环糊精提取物中的化学成分, 再建立 6 种方法 (对肝脏自发性, CCl₄、H₂O₂、FeSO₄-维生素 C 诱导脂质过氧化损伤的保护作用, 对 DPPH、羟基自由基的清除作用) 评价提取物的抗氧化活性。**结果** 与水提物相比, β-环糊精提取物中成分含量、抗氧化活性分别增加了 10.476%、80.88%。**结论** β-环糊精可有效提高决明子的成分提取率和抗氧化活性。**关键词:** 决明子; β-环糊精; 辅助提取; 化学成分; 抗氧化活性; UPLC; 主成分分析

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)04-0821-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.04.010

Effect of β-cyclodextrin-assisted extraction on *Cassiae Semen*

SUN Li-li, REN Xiao-liang*, WANG Meng, LIU Ya-nan, DENG Yan-ru
(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effect of β-cyclodextrin-assisted extraction on *Cassiae Semen*. **METHODS** The chemical constituents in aqueous extract and β-cyclodextrin extract determined and analyzed by UPLC and principal component analysis had their antioxidant activities tested by six methods (protective effects on lipid peroxidation injuries induced by spontaneous liver, CCl₄, H₂O₂, FeSO₄-vitamin C, and scavenging effects on DPPH, hydroxyl free radicals). **RESULTS** Compared with aqueous extract, the component content and antioxidant activity of β-cyclodextrin extract were increased by 10.476% and 80.88%, respectively. **CONCLUSION** β-Cyclodextrin can effectively enhance the component extraction rate and antioxidant activity of *Cassiae Semen*.

KEY WORDS: *Cassia Semen*; β-cyclodextrin; associated extraction; chemical constituents; antioxidant activity; UPLC; principal component analysis

决明子来源于豆科植物决明 *Cassia obtusifolia* L. 或小决明 *Cassia tora* L. 的干燥成熟种子, 具有清热明目、润肠通便等功效, 临床可用于目赤涩痛、羞明多泪、头痛眩晕、目暗不明、大便燥结等病症, 是常见药食同源中药之一^[1-2]。环糊精是一种淀粉经过酶解后形成的具有环状结构的淀粉衍生物, 由 D-(+)-吡喃葡萄糖通过 α-(1, 4) 苷键连接而成, 具有简单易得、廉价、应用广泛、生物毒性低、水溶性好等特点, 可与多种药物分子包合形成复合物, 增加药物的溶解性和稳定性, 减少不良反应, 提高提取效率, 还可以作为载体材料制

备缓控释制剂^[3-6]。目前, 越来越多的研究将环糊精作为辅助提取剂直接用于中药提取中, 从而实现提取与包合过程一步完成, 相比传统的中药提取过程具有很多优势^[7-9]。

课题组前期研究发现, β-环糊精对君药为决明子的复方——血脂宁的活性成分和抗氧化活性均具有辅助提取作用^[10-11]。本实验以决明子为研究对象, 采用 UPLC 法对所含成分进行测定, 并测定决明子水提物及 β-环糊精提取物对大鼠肝脏自发性、CCl₄、H₂O₂、FeSO₄-维生素 C 诱导脂质过氧化损伤的保护作用, 以及对 DPPH、羟基自由基的清除作

收稿日期: 2017-06-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81473543)

作者简介: 孙立丽 (1989—), 女, 博士生, 研究方向为中药药物分析。Tel: 18322050489, E-mail: 18322050489@163.com

* 通信作者: 任晓亮 (1980—), 男, 副教授, 研究方向为中药学及药物分析。Tel: (022) 59596221, E-mail: xiaoliang_ren@sina.com

用,初步探讨 β -环糊精对决明子成分的辅助提取作用,为相关研究与应用提供新的思路与方法。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);BT125D 电子天平(十万分之一,赛多利斯科学仪器北京有限公司);TG16-WS 高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);KH3200B 超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);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);HH-S8 数显恒温水浴锅(金坛市盛蓝仪器制造有限公司)。

1.2 试药 决明子(产地越南)购于安国市长安中药材有限公司,经天津中医药大学李天祥教授鉴定为豆科植物决明 *Cassia obtusifolia* L. 的干燥成熟种子。1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)(分析纯,生产批号 BJ1200455213A)、维生素 C、叔丁基对苯二酚(TBHQ),购于美国 Sigma 公司;2-硫代巴比妥酸(TBA),购于 Solarbio 公司;三氯乙酸为分析纯,生产批号 20131012),购于天津市光复精细化工研究所;水杨酸为分析纯(生产批号 20130919),购于天津市化学试剂批发公司;硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)(生产批号 20131120)、30% 过氧化氢(生产批号 20130821)均为分析纯,购于天津市化学试剂供销公司;氯化钠注射液(0.9% NaCl),购于辰欣药业股份有限公司。甲醇为色谱纯(美国 Sigma 公司);甲酸为色谱纯(天津市元立化工有限公司);其余均为分析纯。1 mol/L NaOH 溶液、1% H_2O_2 溶液、0.03% H_2O_2 溶液、10% 三氯乙酸溶液、0.67% TBA 溶液、0.04 mg/mL DPPH 溶液、0.98 mmol/L FeSO_4 溶液、1.8 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液均为实验室自制。

1.3 动物 SPF 级健康 SD 大鼠,雌雄兼有,体质量(200 ± 20) g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2009-0004。基础饲料适应性喂养 1 周,环境温度 $20 \sim 24$ °C,光照时间 8:00 ~ 18:00。

2 方法与结果

2.1 提取物制备

2.1.1 水提物 称取药材 9 g,加 25 倍量蒸馏水冷浸 1 h,加热煮沸后回流 2 h,倾出滤液,同法提取 3 次,提取液过滤合并,即得,回收溶剂后低温真空干燥,得到浸膏。

2.1.2 β -环糊精提取物 加入含有 0.45 g β -环糊

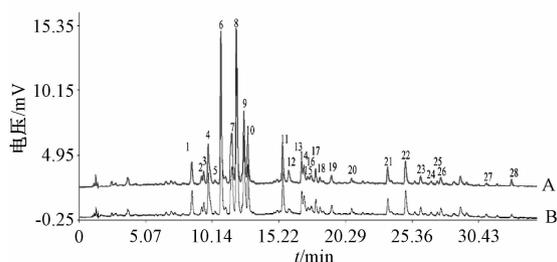
精(0.05 倍量)的 25 倍量蒸馏水,其他操作同“2.1.1”项。

2.1.3 供试品溶液制备 精密量取 1 mL 提取液,置于 10 mL 棕色量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,超声 30 min,10 000 r/min 离心 10 min,上清液经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,收集续滤液,即得。

2.2 肝匀浆制备 大鼠禁食 12 h 后脱颈椎处死,迅速取出肝脏,置 4 °C 生理盐水中反复漂洗,洗净表面残血并剔除脂肪及结缔组织,滤纸吸干,称重,冰水浴条件下用玻璃匀浆器匀浆后,3 000 r/min 离心 15 min,取上清液制成 5% 肝匀浆生理盐水液(1:18),置于 -20 °C 冰箱中保存备用。

2.3 辅助提取作用考察

2.3.1 色谱条件与分析 Acquity UPLC BEH shield RP_{18} 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, $1.7 \mu\text{m}$);流动相 甲醇(A)-水(含 0.1% 甲酸,B),梯度洗脱(0~2 min, 10%~25% A; 2~9 min, 25%~35% A; 9~12 min, 35%~40% A; 12~40 min, 40%~90% A);体积流量 0.2 mL/min;柱温 45 °C;检测波长 280 nm;进样量 3 μL 。色谱图见图 1。将 28 种成分的峰面积作为指标,发现经过 β -环糊精辅助提取后,决明子整体成分含有量显著提高,与水提物相比, β -环糊精提取物中成分 1、7、10、11 显著增加($P < 0.05$),2、3、5、6、9、13~15、18、19、21、27、28 极显著增加($P < 0.01$)。



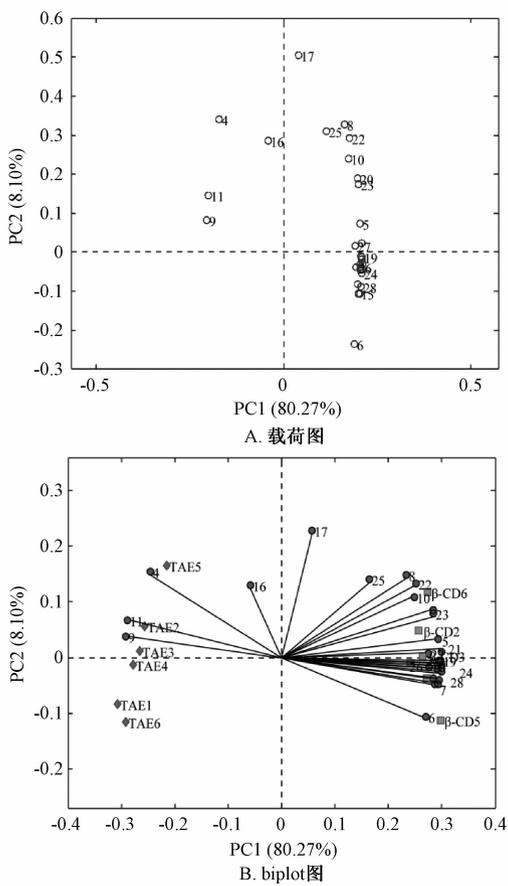
A. β -环糊精提取物 B. 水提物

A. β -cyclodextrin extract B. aqueous extract

图 1 提取物 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatogram of extracts

2.3.2 主成分分析^[12] 应用 PLS-Toolbox 7.9 软件,得到提取物 PCA 载荷图、得分图、双标图,具体见图 2。由图可知,水提物与 β -环糊精提取物各自聚为一类,而且分类界限明显;变量 4、9、11 分布在水提物区域,其他变量大多数分布在 β -环糊精提取物区域,表明不同提取方法对各成分提取率的影响有所差异,并且 β -环糊精提取物可提高决明子大多数化学成分的提取率。



注：○/●为载荷变量，◆为水提取物，■为β-环糊精提取物
图2 提取物主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis of extracts

2.4 抗氧化活性评价^[11]

2.4.1 脂质过氧化抑制 以样品抑制率为纵坐标 (Y)，提取物干膏制备的样品溶液质量浓度为横坐标 (X) 进行回归，结果见表1。由表可知，与水提相比，β-环糊精辅助提取可不同程度提高提取物对4种脂质过氧化的抑制作用。

2.4.2 自由基清除 以样品清除率为纵坐标 (Y)，提取物干膏制备的样品溶液质量浓度为横坐标 (X) 进行回归，结果见表2。由表可知。与水提物相比，β-环糊精提取物清除 DPPH、羟基自由基的作用显著提高 ($P < 0.05$)。

2.4.3 综合抗氧化能力 取“2.4.1”、“2.4.2”项下 IC_{50} 值的最小值 (即抗氧化活性最强, $IC_{50 \min}$)，评分为1分，其余根据其 IC_{50} 值与 $IC_{50 \min}$ 比例的倒数进行评分，绘制雷达图，其面积越大，代表提取物综合抗氧化能力越强，结果见图3。由图可知，β-环糊精提取物的综合抗氧化能力明显强于水提取物，表明β-环糊精对决明子抗氧化活性也有辅助增强作用。

2.5 相关性分析 将决明子2种提取物中峰面积平均值较大者评为1分，另外1种根据与前者的比例进行评分，对评分结果进行加合，并计算总分 (F)，F 越高，表明含有量越高。依据式 (1) 计算经β-环糊精辅助提取后的含有量增长率，其中 $F_{\beta\text{-环糊精}}$ 和 $F_{\text{水}}$ 分别代表β-环糊精提取物与水提取物含

表1 提取物对脂质过氧化的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 1 Inhibition effects of extracts on lipid peroxidation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

脂质过氧化途径	提取方法	回归方程	线性范围/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r	IC_{50} /($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
肝脏自发性	β-环糊精	$Y = 80.179X + 18.399$	0.009 77 ~ 0.625	0.965 3	638.24 ± 20.18
	水	$Y = 99.470X + 18.253$	0.009 77 ~ 0.625	0.966 7	$1\ 176.58 \pm 46.98^{**}$
CCl_4 诱导	β-环糊精	$Y = 100.440X + 22.795$	0.019 53 ~ 0.625	0.968 9	425.44 ± 2.10
	水	$Y = 150.430X + 32.359$	0.019 53 ~ 0.312 5	0.934 3	$439.16 \pm 5.91^*$
H_2O_2 诱导	β-环糊精	$Y = 95.402X + 18.705$	0.039 06 ~ 0.625	0.992 3	512.51 ± 4.91
	水	$Y = 162.920X + 26.630$	0.009 76 ~ 0.312 5	0.992 5	$537.69 \pm 5.78^{**}$
FeSO_4 -维生素 C 诱导	β-环糊精	$Y = 14.538X + 6.369$	1.25 ~ 5.00	0.988 5	$4\ 724.64 \pm 32.64$
	水	$Y = 17.772X + 2.816$	1.25 ~ 5.00	0.980 3	$9\ 889.55 \pm 63.16^{**}$

注： IC_{50} 按原药材计，即 $IC_{50} = [\text{从量效曲线上读出的半数清除率}/(\text{膏重}/\text{原药材量})] \times 100\%$ 。与同一途径下β-环糊精提取物比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

表2 提取物对自由基的清除作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 2 Scavenging effects of extracts on free radicals ($\bar{x} \pm s, n=3$)

自由基	提取方法	回归方程	线性范围/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r	IC_{50} /($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
DPPH	β-环糊精	$Y = 0.083\ 4X + 5.716\ 9$	31.25 ~ 1\ 000	0.988 6	835.55 ± 0.71
	水	$Y = 0.146\ 3X + 11.215$	15.625 ~ 500	0.980 6	$982.79 \pm 0.30^{**}$
羟基	β-环糊精	$Y = 0.012\ 9X + 2.873\ 9$	156.31 ~ 5\ 002	0.996 7	5.56 ± 0.17
	水	$Y = 0.025\ 1X + 6.888\ 7$	312.38 ~ 2\ 499	0.988 5	$6.96 \pm 0.37^{**}$

注： IC_{50} 按原药材计，即 $IC_{50} = [\text{从量效曲线上读出的半数清除率}/(\text{膏重}/\text{原药材量})] \times 100\%$ 。与同一自由基下β-环糊精提取物比较，** $P < 0.01$

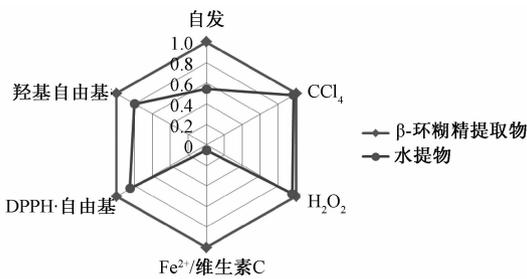


图3 抗氧化活性雷达图

Fig. 3 Radar chart for antioxidant activity

有量总分，结果测得增长率为 10.476%；依据式(2)计算 β-环糊精提取物抗氧化活性增强度，其中 $S_{\text{环糊精}}$ 和 $S_{\text{水}}$ 分别代表 β-环糊精提取物与水提取物抗氧化活性的雷达图面积，结果测得增强度为 80.88%。

$$\text{含有量增长率} = (F_{\text{环糊精}} - F_{\text{水}}) / F_{\text{水}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{抗氧化活性增强度} = (S_{\text{环糊精}} - S_{\text{水}}) / S_{\text{水}} \times 100\% \quad (2)$$

3 讨论

决明子始载于《神农本草经》，被列为上品，在医药和食品领域中应用广泛，其化学成分包括蒽醌、黄酮、多糖等，具有降血脂、明目、抗氧化、保肝、降压、抑菌等多种药理活性^[13]。本实验以该药材为对象，并基于 β-环糊精的分子选择性作用，以其为载体开展对成分含有量及抗氧化活性的辅助提取作用研究。考虑到 β-环糊精本身可能会对抗氧化活性实验有影响，本研究先取用量相同的该辅料进行测定，发现其无抗氧化活性。

实验结果显示，经 β-环糊精辅助提取后，决明子成分含有量与抗氧化活性均有提高，并且成分含有量增长率与抗氧化活性增强度基本呈正相关，表明后者提高主要由前者引起。然而，前者增长率显著低于后者，表明 β-环糊精的选择性提取作用明显，可能对抗氧化活性较强但含有量较低的成分提取的影响比较突出，具体有待于进一步定性研究确定。

综上所述，本实验通过结合 UPLC 法与 6 种抗氧化活性测试，建立了 β-环糊精对决明子辅助提取作用的评价方法，并采用主成分分析作进一步考察。该方法从整体化学成分的提取和抗氧化活性两方面验证了 β-环糊精对决明子的辅助提取作用，具有综合性强、数据准确可靠的优点，而且符合中药成分复杂性的研究特点，可为 β-环糊精及其衍

生物在中药领域中的应用提供分析手段和实验依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 145.
- [2] 骆宜, 张乐, 王卫华, 等. 高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱鉴定决明子化学成分 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(8): 1408-1416.
- [3] 刘本国, 张瑞婷, 吴晓楠, 等. 橙皮苷/羟丙基-β-环糊精包合物的理化性质研究 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(10): 2349-2352, 2394.
- [4] Mangolim C S, Moriwaki C, Nogueira A C, et al. Curcumin-β-cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application [J]. *Food Chem*, 2014, 153: 361-370.
- [5] 潘娅, 张燕君, 谢昭胸, 等. 马钱子碱-β-环糊精包合物的制备及表征 [J]. 中成药, 2013, 35(8): 1805-1808.
- [6] Chen Q S, Wu J, Li W, et al. Extraction of oleanolic acid from leaves of *Chaenomeles speciosa* and processing techniques of its HP-β-cyclodextrin inclusion compound [J]. *Chin Med Mat*, 2010, 33(5): 804-807.
- [7] 崔明磊, 任晓亮, 刘亚男, 等. 多指标综合评价法优选制何首乌的 β-环糊精辅助提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 18-21.
- [8] 周春晖, 李俊. β-环糊精辅助提取金银花中总黄酮的工艺研究 [J]. 中成药, 2010, 32(10): 1796-1798.
- [9] 谷福根, 韩磊, 孟根达来, 等. β-环糊精选择性提取广枣总黄酮的工艺研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(1): 110-114.
- [10] Zhang H J, Liu Y N, Wang M, et al. One-pot β-cyclodextrin-assisted extraction of active ingredients from Xue-Zhi-Ning basing its encapsulated ability [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 132: 437-443.
- [11] Sun L L, Yang J W, Wang M, et al. Combination of counter-propagation artificial neural networks and antioxidant activities for comprehensive evaluation of associated-extraction efficiency of various cyclodextrins in the traditional Chinese formula Xue-Zhi-Ning [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 115: 580-586.
- [12] Ni Y, Mei M, Kokot S. One- and two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography-diode-array detector fingerprints of complex substances: A comparison of classification performance of similar, complex *Rhizoma Curcumae* samples with the aid of chemometrics [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 712(7-8): 37-44.
- [13] 孔祥锋, 臧恒昌. 决明子化学成分及药理活性研究进展 [J]. 药学研究, 2013, 32(11): 660-662.