

# 王瓜的微波-超声波联合提取工艺优选及抗氧化活性考察

潘乔丹, 黄元河\*, 董妹灵, 唐海燕, 王柳念, 黄玉亮  
(右江民族医学院, 广西 百色 533000)

**[摘要]** 目的: 优选王瓜的微波-超声波联合提取工艺并考察其抗氧化活性。方法: 以总三萜质量分数为指标, 通过单因素试验和正交试验考察乙醇体积分数、提取时间、料液比、微波功率对王瓜提取工艺的影响; 采用 DPPH 法、水杨酸法、ABTS 法和 FRAP 法测定提取物的抗氧化能力。结果: 最佳提取工艺条件为加 50 倍量 90% 乙醇于 500 W 微波-超声波联合提取 6 min; 王瓜提取物清除 DPPH·、清除 ABTS<sup>+</sup>·和 Fe<sup>3+</sup>还原/抗氧化能力大于茶多酚但小于抗坏血酸, 清除 OH·能力均小于二者。结论: 优选的提取工艺简便、快速, 王瓜提取物具有一定的抗氧化性能。

**[关键词]** 王瓜; 总三萜; 提取工艺; 抗氧化活性; 微波-超声波联合提取

**[中图分类号]** R283.6; R284.2; R943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0030-03

**[doi]** 10.11653/syfy2013180030

## Optimization of Ultrasonic-Microwave Synergistic Extraction Technology of *Trichosanthes cucumeroides* and Investigation of Its Antioxidant Activity

PAN Qiao-dan, HUANG Yuan-he\*, DONG Mei-ling, TANG Hai-yan, WANG Liu-nian, HUANG Yu-liang  
(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize ultrasonic-microwave synergistic extraction technology of total triterpenes from *Trichosanthes cucumeroides* and investigate its antioxidant activity. **Method:** With the content of total triterpenes as index, single-factor tests and orthogonal test were adopted to investigate effects of extraction time, ethanol concentration, solid-liquid ratio and microwave power on extraction technology. Antioxidant activity of its extract was estimated by DPPH assay, salicylic acid assay, ABTS assay and FRAP assay. **Result:** The best extraction conditions for total triterpenes from *T. cucumeroides* were as follows: extracted 6 min with 50 times the amount of 90% ethanol, microwave power 500 W. Scavenging DPPH·, scavenging ABTS<sup>+</sup>· and reducing Fe<sup>3+</sup> of extract from *T. cucumeroides* were higher than tea polyphenol and lower than Vc, but scavenging OH· was lower than theirs. **Conclusion:** This optimized technology was simple and rapid, extract of *T. cucumeroides* showed certain antioxidant activity.

**[Key words]** *Trichosanthes cucumeroides*; total triterpenes; extraction technology; antioxidant activity; ultrasonic-microwave synergistic extraction

王瓜种子具有润肺化痰、润肠通便的作用, 种子

提取物还具有显著的血细胞凝集活性。曾从王瓜果实和种子中分离得到三萜类物质, 探讨该类物质的提取工艺具有较大的实用价值<sup>[1-2]</sup>。本实验以王瓜总三萜含量为指标, 通过单因素试验和正交试验优选王瓜的提取工艺, 采用 DPPH 法、水杨酸法、ABTS 法和 FRAP 法对提取物的抗氧化性能进行考察, 为王瓜药物制剂和保健食品的研制提供参考。

### 1 材料

FA1104 型电子天平 (上海良平仪器仪表有限

**[收稿日期]** 20130302(012)

**[基金项目]** 中医药公共卫生专项国家基本药物所需中药原料资源调查和监测项目(财社[2011]76号); 中医药行业科研专项(20127002)

**[第一作者]** 潘乔丹, 讲师, 硕士, 从事天然产物化学研究, Tel: 0776-2849498, E-mail: panqiao112@163.com

**[通讯作者]** \* 黄元河, 讲师, 硕士, 从事药用植物学研究, Tel: 0776-2849489, E-mail: gxhyuanhe@163.com

公司),TU-1800型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),XH-300A型微波超声波组合合成萃取仪(北京祥鹤科技发展有限公司)。齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号110709-200505),1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH,上海楷洋生物技术有限公司),三吡啶三吡嗪(TPTZ,Aladdin公司),2,2'-联氨-(3-乙基苯并噻唑林-6-磺酸)二氨盐(ABTS,生工生物公司),奎诺二甲基丙烯酸酯(Trolox,Sigma公司),抗坏血酸(天津博迪化工股份有限公司),茶多酚(广州食品添加剂公司),其他试剂均为分析纯。王瓜采于广西百色,经本院生物教研室黄元河讲师鉴定为葫芦科植物王瓜 *Trichosanthes cucumeroides* (Ser.) Maxim. 的果实。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备** 称取王瓜干燥粉末0.5 g,按一定条件进行提取(固定超声波功率500 W,温度70 ℃),浓缩蒸干后得浸膏,用80%乙醇定容至25 mL量瓶中,即得供试品溶液。含量测定前,采用试管预试法<sup>[3]</sup>和TLC检验,结果均显阳性,表明王瓜中含有三萜类化合物。

**2.2 总三萜的含量测定** 采用香草醛-高氯酸显色法<sup>[4-5]</sup>。称取齐墩果酸对照品适量,配制不同质量浓度的对照品溶液,于300~900 nm进行全波长扫描,确定最大吸收波长549 nm,以吸光度(A)为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 73.543C - 0.0156$  ( $r = 0.9998$ ),线性范围2.33~11.67 mg·L<sup>-1</sup>。精密量取供试样品溶液150 μL,水浴挥发至干,测定A,计算总三萜含量。

### 2.3 单因素试验考察

**2.3.1 乙醇体积分数** 固定微波功率400 W,料液比1:30,提取时间3 min,分别考察体积分数为50%,60%,70%,80%,90%的乙醇对提取效果的影响,结果乙醇体积分数约80%时总三萜提取率最高。

**2.3.2 提取时间** 分别加30倍量80%乙醇于400 W提取1,2,3,4,5,6,7 min对提取效果的影响,结果总三萜提取率在6 min后变化不大。

**2.3.3 微波功率** 固定乙醇体积分数80%,料液比1:30,提取时间5 min的条件下,考察微波功率分别为200,300,400,500,600,700,800 W对提取效果的影响,结果微波功率约600 W时总三萜提取率最高。

**2.3.4 料液比** 在乙醇体积分数80%,微波功率

600 W,提取时间5 min的条件下,考察不同料液比对提取效果的影响,结果总三萜提取率在料液比达1:50后变化不大。

**2.4 正交试验** 在单因素试验基础上,选取乙醇体积分数、提取时间、料液比、微波功率为考察因素,以总三萜提取率为指标,按L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表安排试验,试验安排及结果见表1,方差分析见表2。

表1 王瓜微波-超声波联合提取工艺优选正交试验安排

No.	A 乙醇 体积分数 /%	B 提取时间 /min	C 料液比 /g·mL <sup>-1</sup>	D 微波功率 /W	总三萜 提取率 /%
1	70	4	1:30	500	1.185
2	70	5	1:40	600	1.117
3	70	6	1:50	700	1.253
4	80	4	1:40	700	1.195
5	80	5	1:50	500	1.269
6	80	6	1:30	600	1.152
7	90	4	1:50	600	1.568
8	90	5	1:30	700	1.359
9	90	6	1:40	500	1.609
K <sub>1</sub>	1.185	1.316	1.232	1.354	
K <sub>2</sub>	1.205	1.248	1.307	1.279	
K <sub>3</sub>	1.512	1.338	1.363	1.269	
R	0.327	0.090	0.131	0.085	

表2 提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.201	2	0.101	15.424	>0.05
B	0.013	2	0.007	1.004	>0.05
C	0.026	2	0.013	1.995	>0.05
D(误差)	0.013	2	0.007	1.000	

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,各因素中对王瓜总三萜提取率的影响顺序为乙醇体积分数>料液比>提取时间>微波功率。以极值最小的D因素为误差项进行方差分析,结果发现A,B,C因素均对总三萜提取率无显著性影响,确定最佳提取条件为A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>,即加50倍量90%乙醇于500 W提取6 min。按最佳提取工艺进行3次验证试验,结果王瓜总三萜提取率1.671%,RSD 1.01%。

**2.5 抗氧化活性测定** 按最佳提取工艺制备供试品溶液,蒸干,用80%乙醇配成0.005,0.010,0.015,0.020,0.025 g·L<sup>-1</sup>的受试溶液。

**2.5.1 清除DPPH·作用(DPPH法)**<sup>[6]</sup> 分别移取不同质量浓度的受试溶液各3.0 mL,加0.04 g·L<sup>-1</sup>的DPPH无水乙醇溶液3.0 mL,混合摇匀后室温避光静置30 min,于515 nm处测定吸光度(A),平行操作3次,结果表明王瓜提取物具有一定的清除

DPPH·能力,  $IC_{50} = 0.174 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $IC_{50}$ 与清除能力大小呈负相关), 清除 DPPH·能力的顺序依次为抗坏血酸 ( $IC_{50} = 0.118 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) > 王瓜提取物 > 茶多酚 ( $IC_{50} = 1.22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = (A_0 - (A_1 - A_1')) / A_0 \times 100\%$$

式中  $A_0$  为以溶剂代替样品液的吸光度,  $A_1$  为样品组的吸光度,  $A_1'$  为无水乙醇代替 DPPH 的空白对照组吸光度。

**2.5.2 清除 OH·作用(水杨酸法)** 采用 Fenton 反应法<sup>[7-8]</sup>。移取受试溶液各 2.0 mL 于试管中, 各加入  $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ FeSO}_4$  1.0 mL,  $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  水杨酸-乙醇溶液 2.0 mL, 加 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  2.0 mL 启动反应, 于室温下反应 1 h, 在 510 nm 处测定  $A$  ( $n=3$ ), 计算  $IC_{50} = 0.104 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 清除 OH·能力依次为茶多酚 ( $IC_{50} = 0.032 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) > 抗坏血酸 ( $IC_{50} = 0.044 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) > 王瓜提取物。

$$\text{OH} \cdot \text{清除率} = (A_0 - (A_1 - A_1')) / A_0 \times 100\%$$

式中  $A_0$  为溶剂代替样品液的吸光度,  $A_1$  为样品组的吸光度,  $A_1'$  为水代替  $\text{H}_2\text{O}_2$  的空白对照组吸光度。

**2.5.3 清除 ABTS<sup>+</sup>·作用(ABTS 法)**<sup>[9-10]</sup> 移取各受试溶液 30  $\mu\text{L}$  于试管中, 加 ABTS<sup>+</sup>·测定液 3.0 mL, 准确振荡 30 s, 于 734 nm 处测定  $A$  ( $n=3$ ), 计算  $IC_{50} = 0.222 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 表明对 ABTS<sup>+</sup>·的清除能力顺序为抗坏血酸 ( $IC_{50} = 0.037 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) > 王瓜提取物 > 茶多酚 ( $IC_{50} = 0.416 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

$$\text{ABTS}^+ \cdot \text{清除率} = (A_{\text{测定液}} - A_{\text{样品}}) / A_0 \times 100\%$$

**2.5.4 总抗氧化能力的测定(FRAP 法)**<sup>[11]</sup> 移取受试溶液各 1.0 mL, 加入 TPTZ 工作液 2.0 mL, 混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h 后于 593 nm 处测定  $A$  ( $n=3$ ), 计算清除率, 以 Trolox 当量 (即每克样品的自由基清除能力相当于 Trolox 的自由基清除能力的毫摩尔数) 表示。当 Trolox 摩尔浓度为 0.15 ~ 0.9  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 与自由基清除率呈良好的线性关系,  $Y = 0.3354X + 0.0426$  ( $r = 0.9956$ ), 表明王瓜提取物的  $\text{Fe}^{3+}$  还原/抗氧化能力 (FRAP 9.18  $\text{mmolTE} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 弱于抗坏血酸 (FRAP 92.37  $\text{mmolTE} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 但强于茶多酚 (FRAP 3.74  $\text{mmolTE} \cdot \text{g}^{-1}$ )。

### 3 讨论

微波-超声波法克服了常规超声波和微波萃取之不足, 具有速度快、耗能小、溶剂用量小、回收率高等优点<sup>[12]</sup>。研究表明自由基和人类多种疾病密切相关, 当机体内自由基产生过多或机体清除自由基

能力下降时, 这些自由基会对 DNA、蛋白质和脂质等生物大分子产生氧化损伤作用, 引起机体组织器官发生各种病变, 因此增强机体清除自由基的能力可预防和治疗与自由基相关的疾病<sup>[12]</sup>。与抗坏血酸和茶多酚相比, 王瓜提取物清除 DPPH·、清除 ABTS<sup>+</sup>·和  $\text{Fe}^{3+}$  还原/抗氧化能力均比抗坏血酸弱但强于茶多酚, 清除 OH·能力均比二者低, 说明王瓜提取物具有较强的抗氧化能力。

### [参考文献]

- [1] 胡柳伯. 王瓜栝楼不能混 分别入药乃属真[J]. 中药饮片, 1992, 2(1): 30.
- [2] CHAO Z M, Shibusawa Y, Yanagida A. Two new triterpenes from the seeds of *Trichosanthes cucumeroides* [J]. Nat Prod Res, 2005, 19(3): 211.
- [3] 北京医学院. 中草药成分化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 289.
- [4] 蒙瑞波, 汤庆发, 曾永长, 等. 白花蛇舌草中总三萜酸的提取纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 65.
- [5] 李晔, 朱忠敏, 姚肖溪, 等. 灵芝三萜类化合物的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 165.
- [6] 曹燕, 庞庆宾, 徐磊, 等. 金鸡菊提取物体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 144.
- [7] ZHENG W, WANG S Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, Cranberries, chokeberries, and lingonberries[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(2): 502.
- [8] 周向军, 高义霞, 袁毅君, 等. 乌龙茶茶褐素提取工艺的优化及抗氧化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 36.
- [9] 霍丽妮, 廖艳芳, 陈睿, 等. 狐狸尾不同极性溶剂提取物体外抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 155.
- [10] RE R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Biol Med, 1999, 26(9/10): 1231.
- [11] Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay[J]. Anal Biochem, 1996, 239(3): 70.
- [12] 杨胜丹, 付大友. 超声波、微波萃取及其联用技术在中药有效成分提取中的应用[J]. 广东化工, 2010, 37(2): 120.
- [13] 罗超, 刘霁明, 邢惟青, 等. 石参总黄酮抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 198.

[责任编辑 全燕]