

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.009

响应面法优化半枝莲总黄酮微波提取工艺及其体外活性研究

王润坤, 石绍奎, 宋玲祥[△]

(江苏省盱眙县人民医院药剂科, 江苏 淮安 211700)

摘要:目的 优化半枝莲总黄酮微波提取工艺,探讨其抗氧化活性及抗乙酰胆碱酯酶活性。方法 以半枝莲为原料,在单因素试验基础上,采用响应面法考察提取次数、乙醇体积分数、料液比、微波提取时间、微波提取功率5个因素对总黄酮提取工艺的影响。同时利用二苯代苦味酰基(DPPH)自由基法、2,2-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)自由基法测定其自由基清除活性,采用改良的Ellman法评价抗乙酰胆碱酯酶活性。结果 微波提取半枝莲总黄酮的条件为乙醇体积分数80%,微波提取功率525 W,料液比1:24(mg/mL),微波提取时间13 min,实际得率为10.89%;半枝莲总黄酮提取物有良好的抗氧化活性及一定的抗乙酰胆碱酯酶活性。结论 该方法稳定可行,可用于分析微波提取半枝莲总黄酮得率。

关键词:半枝莲;总黄酮;微波提取工艺;抗氧化;抗乙酰胆碱酯酶

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)15-0037-05

Optimization of Microwave Extraction Technology of Total Flavonoids by Response Surface Methodology and *in Vitro* Activity Evaluation from *Scutellaria Barbata*

WANG Runkun, SHI Shaokui, SONG Lingxiang

(Xuyi County People's Hospital, Huai'an, Jiangsu, China 211700)

Abstract: Objective To optimize the microwave extraction technology for total flavonoids from *Scutellaria barbata* by response surface methodology and to evaluate their *in vitro* activities. **Methods** Based on the single-factor test results, *Scutellaria barbata* were used as raw material, the effects of five main factors: the extraction times, the ethanol concentration, the solid-liquid, the microwave extraction time and the microwave power on the yield of total flavonoids were investigated. The antioxidant activities of the extract were studied by DPPH method and ABTS method, and the acetylcholinesterase inhibitory of the extract was evaluated by improved Ellman method. **Results** The optimum extraction process of total flavonoids was as follows: the ethanol concentration was 80%, the microwave power was 525 W, the solid-liquid ratio was 1:24(mg/mL), the microwave extraction time was 13 min. Under these conditions, the actual yield of total flavonoids was 10.89%. The total flavonoids from *Scutellaria barbata* exhibited a strong antioxidant activity and certain inhibitory activities on acetylcholinesterase. **Conclusion** This method is reasonable and stable, which can be used for the analysis of total flavonoids from *Scutellaria barbata*.

Key words: *Scutellaria barbata*; total flavonoids; microwave extraction technology; antioxidant activity; acetylcholinesterase inhibitory

半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 为唇形科黄芩属植物,以干燥全草入药,收载于2015年版《中国药典(一部)》^[1],具有清热解毒、化瘀消肿、利尿止血功效。现代药理学表明,半枝莲还具有良好的抗肿瘤活性,临床常用于治疗癌症、水肿、跌打损伤、黄疸等疾病^[2-3]。半枝莲的主要化学成分为黄酮类、生物碱类及甾体类化合物,以黄酮类化合物为主^[4]。黄酮类化合物因具有良好的抗肿瘤、抗炎、抗氧化等活性,已成为现代天然产物研究的热点^[5]。现代药理学研究表明,抗氧化剂能减少活性氧(ROS)自由基失衡所产生的生理、病理紊乱^[6],与化学合成抗氧化剂相比,天然抗氧化剂因具有活性突出、安全性好等特点而成为抗氧化剂领域的研究热点,且部分植物的抗氧化活性部位被证实有较强的抗乙酰胆碱酯酶作用^[7-8],但半枝莲总黄酮的相关研究尚无报道。与传统提取方法相比,微波提取法具有提取时间短、提取步骤

简单、提取物得率高等优点^[9],广泛用于中药活性成分的提取分离。响应面法可通过回归分析,高效地优化试验数据^[10]。目前,对于半枝莲总黄酮提取工艺的研究主要集中在冷凝回流法,分析方法也多为正交试验法^[11]。本研究中采用响应面法探讨提取次数、乙醇体积分数、料液比、微波提取时间、微波提取功率5个主要影响因素对半枝莲总黄酮得率的影响,并用二苯代苦味酰基(DPPH)自由基法、2,2-连氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)自由基法测定其自由基清除活性,利用改良的Ellman法评价抗乙酰胆碱酯酶活性,旨在为半枝莲总黄酮微波提取工艺的优化及体外活性研究提供理论依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

U-3900型紫外可见分光光度计(日本日立公司);

第一作者:王润坤,男,硕士研究生,初级药师,研究方向为天然产物研究与开发,(电子信箱)1013971256@qq.com。

[△]通信作者:宋玲祥,女,大学本科,副主任中药师,研究方向为药事管理与临床药学,(电子信箱)23112095062@qq.com。

Synergy2 型酶标仪(美国博腾仪器公司);RE-3000 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);GHZ 型微波萃取器(北京国环高科自动化技术研究院);FZ-102 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试药

半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 药材由我院中药房提供并由江苏省盱眙县人民医院贡培丽副主任中药师鉴定为正品;芦丁对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号为 wkq16101104);维生素 C(成都麦卡希化工有限公司,批号为 2017041301);DPPH 及 ABTS 均购自梯希爱公司;乙酰胆碱酯酶、碘化硫代乙酰胆碱、二硫代二硝基苯甲酸、加兰他敏,均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;乙醇(国药集团有限公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 芦丁标准曲线绘制

精密吸取 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 芦丁标准品溶液(质量浓度为 0.1 mg/mL),置 10 mL 容量瓶中,参照文献[12]的方法,以芦丁标准溶液的质量浓度(C)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线,得线性回归方程 $A = 11.91C - 0.0029$, $R^2 = 0.9998$ ($n = 6$)。

2.2 半枝莲总黄酮得率测定

取 1 g 粉碎过筛后的半枝莲粉末,精密称定,置 250 mL 圆底烧瓶中,按不同微波提取工艺提取总黄酮。粗提液经抽滤、减压浓缩处理后过 0.45 μm 水膜,定容至 300 mL,按相同步骤提取 2 次,即得供试品溶液。按芦丁回归方程计算不同微波提取工艺条件下得到的半枝莲总黄酮质量浓度,按以下公式计算总黄酮得率。总黄酮得率(%) = $[(C \times 300 \times 10) / M] \times 100\%$ 。式中, C (mg/mL)为样

品提取液根据标准曲线所得黄酮质量浓度,常数项 300 和 10 为样品稀释倍数(体积比), M 为样品的质量(1 g)。

2.3 微波提取工艺优化

2.3.1 单因素试验设计与结果

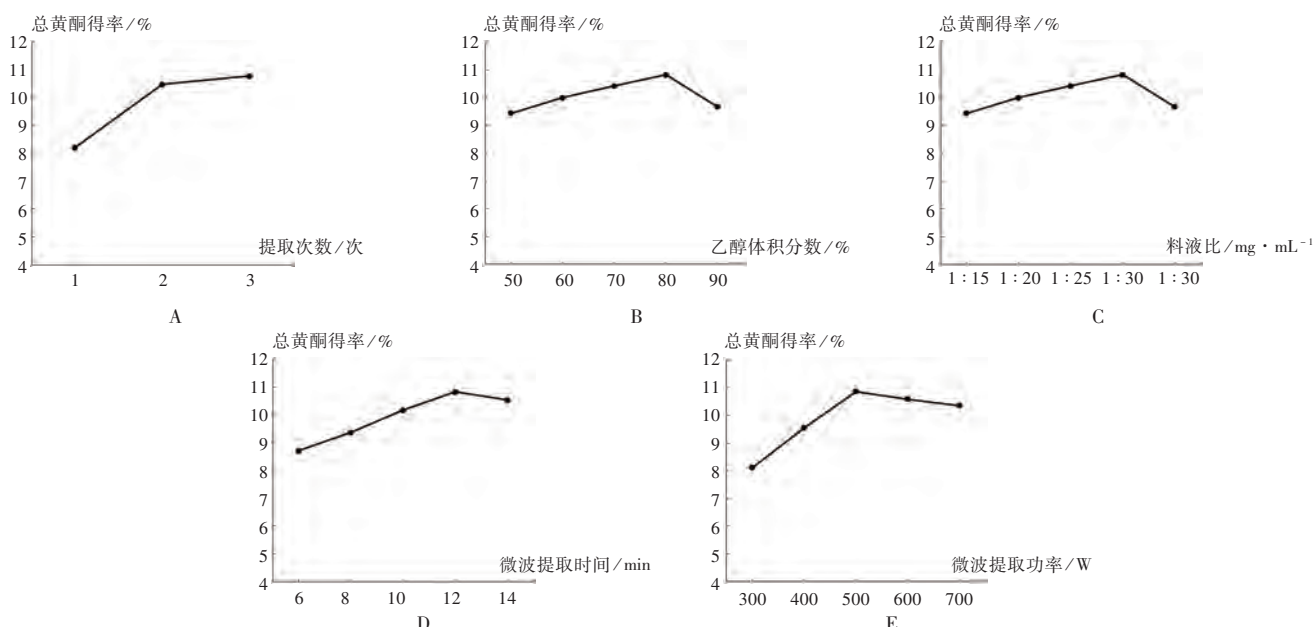
选择微波提取次数(1, 2, 3 次)、乙醇体积分数(50%, 60%, 70%, 80%, 90%)、微波提取功率(300, 400, 500, 600, 700 W)、料液比(1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, mg/mL)、微波提取时间(6, 8, 10, 12, 14 min)进行单因素试验,考察其对半枝莲总黄酮得率的影响。

提取次数:由图 1 A 可见,随着提取次数的增加,得率也增加。随着提取次数的增加,细胞被微波穿透得越完全,总黄酮越易析出。但第 3 次提取的总黄酮明显降低,考虑到生产成本和实际提取效益的影响,将提取次数确定为 2 次,在响应面法中不再讨论。

乙醇体积分数:由图 1 B 可见,随着乙醇体积分数的增加,得率呈增加趋势,且在 80% 时达最高峰,原因可能是 80% 时,提取溶剂极性与总黄酮相似,有利于其最大程度地溶出,当乙醇体积分数大于 80% 时,一些醇溶性杂质溶出增加,且随着溶剂与总黄酮极性差距的增加,活性成分逐渐不易溶出。故 80% 乙醇最合适。

料液比:由图 1 C 可见,随着料液比的不断增加,得率不断增加,在料液比为 1:25(mg/mL)时达最大值,可能是因为随着溶剂体积的增加,溶剂与总黄酮充分接触,溶出速度加快。料液比超过 1:25(mg/mL)时,总黄酮的溶解度已达到饱和,且随着杂质溶出的增多,不利于总黄酮溶出。故料液比为 1:25(mg/mL)最合适。

微波提取时间:由图 1 D 可见,随着时间的延长,得率小幅增加,在 12 min 处达峰值。原因是随着时间的延



A. 提取次数 B. 乙醇体积分数 C. 料液比 D. 微波提取时间 E. 微波提取功率

图1 微波提取因素对半枝莲总黄酮得率的影响

长,溶质充分溶解。但提取 12 min 后,得率开始减少,可能是由于时间太长会造成黄酮结构的破坏。故微波提取 12 min 最合适。

微波提取功率:由图 1 E 可见,随着微波功率的增大,得率大幅增加,500 W 时达最大值。原因是随着微波功率的增加,分子运动剧烈,总黄酮越易析出。当微波功率继续增大,微波产生的强烈作用使黄酮结构遭到破坏,得率下降。故微波提取功率选 500 W 最合适。

2.3.2 响应面试验设计^[12]

利用 Design - Expert 8.0 软件中 Box - Behnken 的中心组合试验设计原理,对单因素试验进行优化,选择乙醇体积分数(因素 A)、料液比(因素 B)、微波提取时间(因素 C)、微波提取功率(因素 D)为因素,设计 4 因素 3 水平的响应面试验(共 29 个试验点)。根据软件得出的结果分析各影响因素的影响强度,并得出最佳提取工艺条件。试验因素水平见表 1,试验设计与结果见表 2。

表 1 试验设计因素水平表

水平	因素 A(%)	因素 B(mg/mL)	因素 C(min)	因素 D(W)
-1	70	1:20	10	400
0	80	1:25	12	500
1	90	1:30	14	600

2.3.3 模型建立与方差分析

利用 Design - Expert 8.0 软件对试验结果进行方差分析与模型拟合,得因素 A,B,C,D 与得率(Y)的二次回归方程: $Y=0.07A-0.4B+0.36C+0.26D-0.093AB+0.24AC+0.16AD+0.077BC+0.46BD+0.28CB-0.39A^2-0.45B^2-0.37C^2-0.6D^2$ 。方差分析结果见表 3,可见,该二次回归模型中 $F=11.43$, $P<0.01$,表明该模型有统计学意义;失拟项 $P=0.2685>0.05$,表明该试验无失拟因素存在,试验因素选取合理;同时,回归模型中的决定系数 $R^2=0.9195$,正决定系数 $R_{Adj}^2=0.8391$,表明该方程预测数据与真实试验数据一致性较好。因此,此模型可对微波提取半枝莲总黄酮得率进行分析和预测。

由表 3 可见,因素 B 对半枝莲总黄酮得率的影响最显著($P<0.01$),其次是因素 D 和因素 C 较显著($P<0.05$),而因素 A 对试验结果的影响较小($P>0.05$)。F 值可分析出各个因素对半枝莲总黄酮得率影响的大小顺序为 $B>C>D>A$ 。根据回归模型中的交互项可知,BD 和 CD 对黄酮得率的影响显著($P<0.05$),表明各因素对于总黄酮得率的影响不仅是简单的线性关系,而是存在交叉相互作用;根据回归模型中的二次项可知, A^2 , B^2 , C^2 , D^2 对黄酮得率的影响显著($P<0.05$),表明各因素对黄酮得率的影响很复杂。

表 2 试验设计及结果

序号	因素 A(%)	因素 B(mg/mL)	因素 C(min)	因素 D(W)	总黄酮得率(Y,%)
1	0	0	0	0	10.86
2	0	0	0	0	10.81
3	0	1	0	1	9.76
4	0	-1	1	0	10.88
5	0	-1	-1	0	10.14
6	0	0	1	-1	9.66
7	-1	0	-1	0	9.38
8	0	-1	0	-1	10.44
9	1	1	0	0	9.92
10	0	1	1	0	10.33
11	-1	0	0	-1	9.87
12	1	-1	0	0	10.53
13	1	0	0	1	10.44
14	1	0	-1	0	9.94
15	-1	-1	0	0	10.05
16	0	0	-1	-1	9.55
17	-1	0	0	1	10.09
18	0	0	0	0	10.84
19	0	0	-1	1	9.59
20	0	0	0	0	10.83
21	-1	1	0	0	9.74
22	0	0	1	1	10.83
23	0	0	0	0	10.82
24	-1	0	1	0	10.38
25	1	0	1	0	10.01
26	0	1	0	-1	8.50
27	0	-1	0	1	9.96
28	1	0	0	-1	9.59
29	0	1	-1	0	9.21

表 3 回归方程方差分析

方差来源	平方和	自由度	均值	F 值	P 值
模型	9.62	14	0.69	11.43	<0.0001
因素 A	0.059	1	0.059	0.98	0.3395
因素 B	1.91	1	1.91	31.80	<0.0001
因素 C	1.58	1	1.58	26.35	0.0002
因素 D	0.84	1	0.84	13.93	0.0022
AB	0.034	1	0.034	0.57	0.4631
AC	0.22	1	0.22	3.67	0.0759
AD	0.099	1	0.099	1.65	0.2198
BC	0.024	1	0.024	0.40	0.5375
BD	0.86	1	0.86	14.23	0.0021
CD	0.32	1	0.32	5.31	0.0371
A ²	0.97	1	0.97	16.19	0.0013
B ²	1.34	1	1.34	22.20	0.0003
C ²	0.91	1	0.91	15.16	0.0016
D ²	2.34	1	2.34	38.99	<0.0001
残差	0.84	14	0.06		
失拟项	0.70	10	0.07	1.97	0.2685
纯误差	0.14	4	0.036		
总离差	10.46	28			

2.3.4 响应面分析

利用 Design-Expert 8.0 软件得到回归模型,作出三维响应面图和等高线图。三维响应面图可直观显示交互因素两两作用的最佳条件,即响应面的最高点^[13-14]。等高线图可反映出各交互因素对总黄酮得率影响的显著性,图形越陡,表明提取条件对总黄酮影响越大。由图2可见,BD(图2E)、CD(图2C)对总黄酮得率的影响显著而其他交互项不显著。

2.3.5 验证试验

分析得最佳提取工艺为乙醇体积分数 80.06%、微波提取功率 525.58 W、料液比 1:23.66(mg/mL)、微波提取时间 13.1 min。在此条件下,的理论得率为 10.94%。考虑实际工艺条件,修改条件为乙醇体积分数 80%、微波提取功率 525 W、料液比 1:24(mg/mL)、微波提取时间 13 min。在此条件下的实际得率为 10.89%, RSD 为 1.04% (n=3),相对偏差较小,与理论得率吻合,表明该工艺条件具有实用价值。

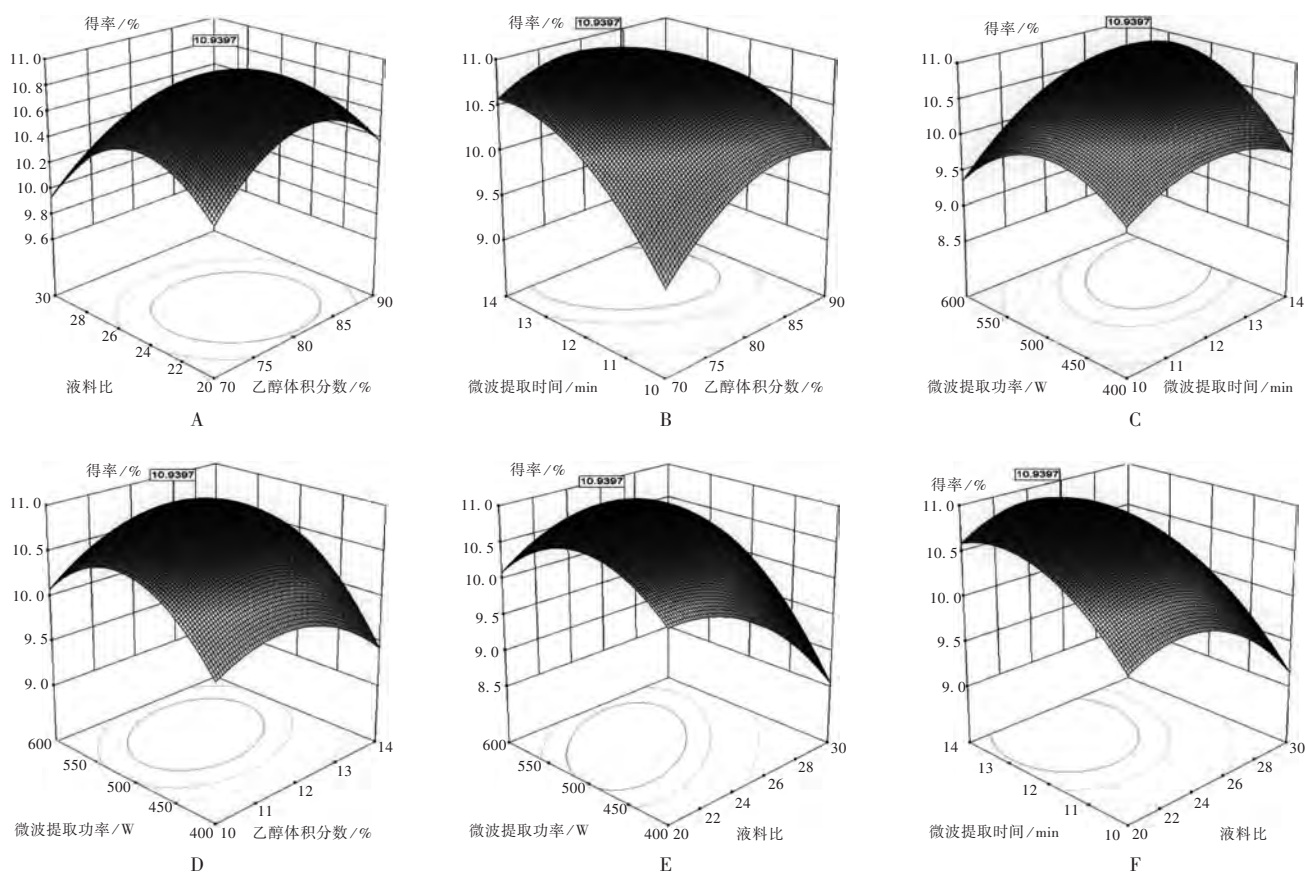
2.4 抗氧化活性研究

DPPH 自由基清除率测定:将微波提取得到的总黄酮提取液及阳性对照维生素 C 分别配制 0.1、0.2、0.3,

0.4、0.5 mg/mL 5 个质量浓度梯度的供试品溶液。分别取 2.0 mL 样品溶液,首先加入 2.5 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH 甲醇溶液,摇匀后在避光条件下充分反应 2 h,在 517 nm 波长处测定吸光度,每组试验重复 3 次,取平均值。以未加入总黄酮提取液的 DPPH 甲醇溶液作为空白对照,按公式计算。DPPH 自由基清除率(%) = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%$ 。式中, A_0 为空白对照吸光度,式中 A_1 为样品对照吸光度。

ABTS⁺自由基清除率测定:参照张鑫等^[13]的试验方案配置 ABTS⁺贮备液。按上述方法将微波提取得到的总黄酮提取液及阳性对照维生素 C 分别配制成样品溶液,分别取 0.6 mL,加入稀释后的 ABTS⁺贮备液 2.4 mL,震荡,摇匀,静置 5 min,用可见分光光度计在 734 nm 波长处测定吸光度,每组试验重复 3 次,取平均值,按公式计算。ABTS⁺自由基清除率(%) = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%$ 。式中, A_0 为空白对照吸光度,式中 A_1 为样品对照吸光度。

结果分析:结果见图3,总黄酮质量浓度在 0.1 ~ 0.5 mg/mL 范围内,随着质量浓度的增加,阳性对照及半枝莲总黄酮提取液对 DPPH 和 ABTS⁺自由基的清除



A. 料液比和乙醇体积分数对黄酮得率的影响 B. 微波提取时间和乙醇体积分数对黄酮得率的影响 C. 微波提取功率和微波提取时间对黄酮得率的影响 D. 微波提取时间和乙醇体积分数对黄酮得率的影响 E. 微波提取功率和料液比对黄酮得率的影响 F. 微波提取时间和料液比对黄酮得率的影响

图2 各因素交互作用对半枝莲总黄酮得率的响应面图

率不断增加。在清除 DPPH 自由基试验中,当质量浓度达到 0.4 mg/mL 时,总黄酮对 DPPH 自由基清除率已与阳性对照持平,其半数清除质量浓度 (IC_{50}) 为 0.32 mg/mL,标准品维生素 C 的 IC_{50} 为 0.26 mg/mL。在清除 ABTS⁺ 自由基试验中,当质量浓度达到 0.4 mg/mL 时,总黄酮对 ABTS⁺ 自由基清除率大幅提高,其 IC_{50} 为 0.32 mg/mL,标准品维生素 C 的 IC_{50} 为 0.30 mg/mL。结果显示,半枝莲总黄酮提取液对于 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基有良好的清除效果。

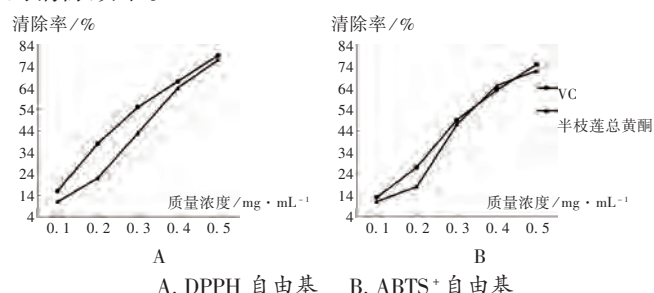


图3 半枝莲总黄酮提取液对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基的清除率
2.5 抗乙酰胆碱酯酶活性

参考文献[14-15],将半枝莲总黄酮提取物配制成 50 μ g/mL 的供试品溶液。用移液枪取 50 μ g/mL 半枝莲总黄酮提取物 10 μ L 和 40 μ L 的乙酰胆碱酯酶,加入 96 孔板中的 3 个复孔中,再加入 110 μ L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH = 8),在 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,用酶标仪在 412 nm 波长处测定吸光度,阳性对照品溶液为终浓度 0.333 μ mol/L 加兰他敏,阴性对照品溶液为终浓度 0.1% DMSO。每组试验重复 3 次,取平均值,根据公式计算。半枝莲总黄酮对乙酰胆碱酯酶抑制率 (%) = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%$ 。式中, A_0 为阴性对照平均吸光度值, A_1 为加入样品或阳性对照的吸光度值。

结果阳性对照品溶液(加兰他敏)和半枝莲总黄酮提取物(50 μ g/mL)对乙酰胆碱酯酶的抑制率分别为 (78.32 $\pm$ 0.7)% 和 (32.72 $\pm$ 0.5)%,表明半枝莲总黄酮提取物具有一定的抗乙酰胆碱酯酶活性作用。

3 讨论

以半枝莲为原料,以微波提取法提取的总黄酮得率为指标,采用响应面法探讨 5 个主要因素对提取工艺的影响。最终得到的最佳提取工艺为乙醇体积分数 80%,微波提取功率 525 W,料液比 1:24 (mg/mL),微波提取时间 13 min,实际得率为 10.89%。与前期研究相比,该方法极大地缩短了时间,且提高了提取率,为充分利用半枝莲总黄酮资源提供了理论依据。

现代药理学研究表明,半枝莲的抗氧化作用是其抗肿瘤、抗感染等的作用机制之一^[16]。因此,采用 DPPH 和 ABTS 法测定其总黄酮提取液的自由基清除活性。本研究结果显示,半枝莲总黄酮有较强的 DPPH, ABTS⁺ 自由基清

除活性,且清除活性在一定浓度下优于维生素 C。抗氧化剂可通过减少自由基的释放产生抗阿尔茨海默病的作用^[10-11]。因此,在半枝莲总黄酮提取液具有一定自由基清除作用基础上,采用改良的 Ellman 法评价其抗乙酰胆碱酯酶活性。本研究结果显示,半枝莲总黄酮对乙酰胆碱酯酶有一定的抑制活性,可为活性化合物的进一步提取分离提供试验依据,为寻找具有开发价值的抗氧化及抗乙酰胆碱酯酶化合物奠定基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 109-110.
- [2] 陶伟. 中药半枝莲的药理及临床应用研究进展[J]. 海军医学杂志, 2008, 29(2): 181-184.
- [3] 王翊豪, 许晓义, 杨斯琪. 半枝莲药理作用及化学成分提取的研究进展[J]. 牡丹江医学院学报, 2017, 38(6): 116-118.
- [4] 陈艳, 张国刚, 毛德双, 等. 半枝莲的化学成分研究(I)[J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(1): 48-50.
- [5] 于晶, 郝再彬, 苍晶, 等. 黄酮类化合物的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(12): 125-130.
- [6] HALLIWELL B, MURCIA HA, CHIRCO S, et al. Free radicals and antioxidants in food an in vivo: what they do and how they work[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1995, 35: 7-20.
- [7] TU YB, HUANG JW, LI YF. Anticholinesterase, antioxidant, and beta-amyloid aggregation inhibitory constituents from Cremastra appendiculata [J]. Medicinal Chemistry Research, 2018, 27: 857-863.
- [8] 张俊霞, 王琳琳, 刘睿. 天然产物防治阿尔茨海默病的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(4): 732-737.
- [9] 邹建国, 刘飞, 刘燕燕, 等. 响应面法优化微波辅助提取枳壳中总黄酮工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 24-28.
- [10] 户宪珍, 杨长花, 杨文娟, 等. 响应面法优化超声辅助提取朱砂根中岩白菜素的提取工艺[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(4): 458-462.
- [11] 白天雅, 高子怡, 赵二芳, 等. 半枝莲中黄酮提取纯化研究进展[J]. 吉林农业, 2018, 21: 68-69.
- [12] 吴迪. 响应面法优化超声波辅助提取半枝莲黄酮工艺[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(6): 92-96.
- [13] 张鑫, 李建宽, 赵玉静, 等. 党参化学成分及其体外抗氧化活性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24): 53-59.
- [14] LI W, CAI CH, GUO ZK, et al. Five new eudesmane-type sesquiterpenoids from Chinese agarwood induced by artificial holing[J]. Fitoterapia, 2015, 100(3): 44-49.
- [15] 兰宁宁, 马青云, 黄圣卓, 等. 大青山灵芝的化学成分研究[J]. 中草药, 2017, 48(3): 437-442.
- [16] Tabart J, Keverts C, Pincemail J, et al. Antioxidant capacity of black currant varies with organ, season, and cultivar[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54: 6271-6276.

(收稿日期: 2020-01-20; 修回日期: 2020-02-04)