

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.19.011

响应面法优化夏枯草中总黄酮提取工艺及其抗氧化活性分析

李鑫¹, 赫捷², 赵琳³, 薛阳¹, 周文君¹, 刘佳¹

(1. 辽宁省朝阳市检验检测认证中心, 辽宁 朝阳 122000; 2. 辽宁省朝阳市第二医院, 辽宁 朝阳 122000;
3. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600)

摘要:目的 考察夏枯草中总黄酮提取量的影响因素,并检验其总黄酮的体外抗氧化活性,优选夏枯草中总黄酮提取工艺。方法 采用单因素考察法及响应面法,以乙醇体积分数、液料比、提取时间为考察因素,以总黄酮提取量为评价指标,采用紫外可见分光光度法测定夏枯草中总黄酮的提取量。以 DPPH 自由基法、ABTS⁺· 自由基法测定总黄酮的自由基清除活性。结果 夏枯草中总黄酮最佳提取工艺为乙醇体积分数 55%,提取 5 h,提取物液料比 44:1(V/m);总黄酮的质量浓度在 0.02~0.12 mg/mL 范围内对 DPPH 自由基和 ABTS⁺· 自由基的最大清除率分别为 70%和 82%,分别低于维生素 C 的 84%和 90%。结论 该提取工艺简便可行,可用于工业化大生产。

关键词:夏枯草;总黄酮;响应面法;抗氧化;单因素考察;自由基

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)19-0039-04

Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from *Prunellae Spica* by Response Surface Methodology and Analysis of Its Antioxidant Activity

LI Xin¹, HE Jie², ZHAO Lin³, XUE Yang¹, ZHOU Wenjun¹, LIU Jia¹

(1. Chaoyang Inspection and Testing Certification Center, Chaoyang, Liaoning, China 122000; 2. Chaoyang Second Hospital, Chaoyang, Liaoning, China 122000; 3. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian, Liaoning, China 116600)

Abstract: Objective To investigate the factors affecting the extraction amount of total flavonoids from *Prunellae Spica*, to test the antioxidant activity of total flavonoids *in vitro*, and to optimize the extraction process of total flavonoids from *Prunellae Spica*.

Methods The extraction amount of total flavonoids from *Prunellae Spica* was determined by ultraviolet(UV)-visible(Vis) spectrophotometry with ethanol volume fraction, liquid-solid ratio and extraction time as the investigation factors and with the extraction amount of total flavonoids as the evaluation index. The free radical scavenging activities of total flavonoids were determined by DPPH free radical method and ABTS⁺· free radical method. **Results** The optimum extraction process of total flavonoids from *Prunellae Spica* was as follows: the volume fraction of ethanol was 55%, the extraction time was 5 h, and the liquid-solid ratio was 44:1(V/m). When the mass concentration of total flavonoids was in the range of 0.02-0.12 mg/mL, the maximum scavenging rates of DPPH free radical and ABTS⁺· free radical were 70% and 82%, which were lower than 84% and 90% of vitamin C, respectively. **Conclusion** The extraction process is simple and feasible, which can be used in industrial production

Key words: *Prunellae Spica*; total flavonoids; response surface methodology; antioxidant activity; single factor test; free radical

夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 为唇形科植物,性寒,味辛、苦,具有清泄肝火、散结消肿、清热解毒、祛痰止咳、凉血止血功效,用于治疗淋巴结核、甲状腺肿、乳瘤、急性传染性黄疸型肝炎、细菌性痢疾等症^[1]。现代药理学研究表明,夏枯草有较好的降血压作用^[2],主要成分为黄酮类物质^[3]。黄酮类化合物对心血管系统有明显的药理作用,具有抗氧化、降血压、扩张血管、降低血管通透性、减少脆性、降低肝脂肪等作用^[4]。基于中药质量标志物(Q-Marker)的概念^[5],所测成分的药效应与该药的药理作用一致。本研究中拟对夏枯草中总黄酮提取工艺及抗氧化活性进行研究^[6-9]。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UV2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);

CPA225D 型电子天平(精度为十万分之一),BSA224S-CW 型电子天平(精度为万分之一),均购于赛多利斯科学仪器有限公司;9860A 型超声波清洗器(天津市科贝尔光电技术有限公司,功率为 500 W,频率为 40 kHz)。

1.2 试剂

夏枯草药材购于安徽亳州饮片市场,经辽宁省朝阳市检验检测认证中心张秀丽主任中药师鉴定为唇形科植物夏枯草的干燥果穗。芦丁标准品(中国食品药品检定研究院,批号为 100080-20181,纯度为 92.2%),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,批号为 20180615),2,2'-联氮-双(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS,批号为 20180304),均购自北京索莱宝科技有限公司;乙醇(色谱纯,批号为 20190117),维生素 C(批号为 20191202),硝酸铝(分析纯,批号为

20161221), 过硫酸钾(分析纯, 批号为 20160917), 均购于国药集团化学试剂有限公司; 亚硝酸钠(批号为 20170427), 氢氧化钠(批号为 20170329), 均为分析纯, 购于天津市科密欧化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 夏枯草总黄酮含量测定(紫外分光光度法)

对照品溶液制备: 取芦丁标准品适量, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加 50% 乙醇溶液 60 mL, 超声溶解, 加 50% 乙醇稀释至刻度, 混匀, 即得质量浓度为 0.23 mg/mL 的对照品溶液。

标准曲线确定: 取芦丁对照品溶液 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 mL, 分别置 25 mL 容量瓶中, 加入 1 mL 5% 亚硝酸钠溶液, 混匀, 静置 10 min; 再加入 1 mL 10% 硝酸铝溶液, 混匀, 静置 10 min; 加入 5 mL 4% 氢氧化钠溶液, 混匀, 静置 10 min, 用 50% 乙醇溶液稀释至刻度。以空白试剂作为空白对照, 于 510 nm 波长处测定吸光度值, 记录各芦丁含量和吸光度, 计算回归方程, 得 $Y = 0.2066X + 0.0048$ ($r = 0.9996$, $n = 8$)。结果表明, 芦丁含量在 0.23 ~ 3.45 mg 范围内与吸光度线性关系良好。

总黄酮提取量测定: 分别取供试品溶液 1 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 加 60% 乙醇溶液 4 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 混匀, 静置 10 min; 加 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 静置 10 min; 加 4% 氢氧化钠溶液 5 mL, 静置 10 min, 加水定容至刻度, 于 510 nm 波长处测定吸光度值。

2.2 提取影响因素单因素考察

乙醇体积分数: 称取夏枯草药材 20 g, 共 4 份, 分别加入 300 mL 体积分数分别为 30%, 50%, 70%, 90% 的乙醇溶液, 水浴加热提取, 提取 2 次, 每次 1.5 h, 滤出残渣, 分别取滤液 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加 60% 乙醇定容至刻度, 得供试品溶液。依法测定总黄酮含量, 由图 1 A 可知, 乙醇体积分数为 50% 时夏枯草中总黄酮提取量最大。

料液比: 称取夏枯草药材 20 g, 共 4 份, 按液料比为 20:1 (V/m), 30:1 (V/m), 40:1 (V/m), 50:1 (V/m) 分别加入 50% 乙醇溶液, 水浴加热提取, 提取 1 次, 提取 2 h, 滤出残渣, 分别取 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中,

用 60% 乙醇定容至刻度, 得供试品溶液。依法测定总黄酮含量, 由图 1 B 可知, 乙醇体积分数为 50%, 提取时间为 2 h, 液料比为 40:1 (V/m) 时, 夏枯草中总黄酮提取量最高, 继续增大液料比, 提取效果无明显改善。

提取时间: 称取夏枯草药材 20 g, 共 5 份, 分别加入 800 mL 50% 乙醇溶液, 水浴加热提取, 提取 1 次, 分别提取 2, 3, 4, 5, 6 h, 滤出残渣, 取 1 mL 置 10 mL 容量瓶中, 加 60% 乙醇定容, 得供试品溶液。依法测定总黄酮含量, 由图 1 C 可知, 乙醇体积分数为 50%, 液料比为 40:1 (V/m), 提取时间为 5 h 时夏枯草总黄酮的提取量最高, 继续延长提取时间, 提取效果不明显。

单因素考察结果: 确定了各影响因素的最佳水平, 乙醇体积分数为 50%, 提取时间为 5 h, 液料比为 40:1 (V/m), 初步确定了夏枯草中总黄酮的提取工艺。

2.3 提取工艺(响应面法)

试验设计: 在单因素试验结果的基础上, 根据 Box - Behnken 中心组合试验设计原理, 选取乙醇体积分数(因素 A)、液料比(因素 B)和提取时间(因素 C) 3 个因素, 采用三因素三水平的响应面分析方法, 因素水平见表 1。以液料比、乙醇体积分数和提取时间为自变量, 总黄酮提取量为响应值, 在提取 1 次的条件下, 共安排 17 个试验, 其中 12 个为析因试验, 5 个为中心试验, 用以估计误差。试验方案及结果见表 2。

表 1 试验设计因素水平

Tab. 1 Factors and levels of single-factor test

水平	因素 A(%)	因素 B	因素 C(h)
-1	30	30:1	4.0
0	50	40:1	5.0
1	70	50:1	6.0

模型拟合与方差分析: 采用 Design Expert 软件中的 Box - Behnken 试验对响应值(总黄酮提取量)进行二次回归分析, 结果 $R = -7.470 + 0.473A + 0.155B + 2.462C + 0.000500AB + 0.00643AC - 0.00177BC - 0.00571A^2 - 0.00197B^2 - 0.257C^2$ ($R^2 = 0.9984$)。由表 3 可知, 模型项的 $P > F$ 值小于 0.0001, 表明该二次方程回归极显著, 且失拟项 $P > F$ 值为 0.0729, 不

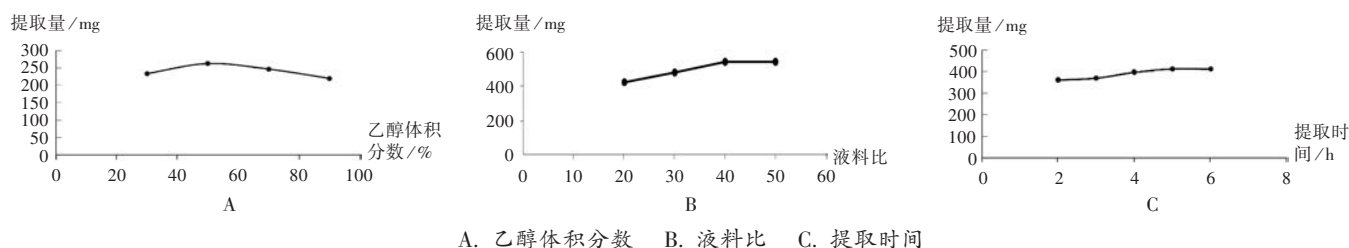


图 1 夏枯草中总黄酮提取影响因素单因素考察

A. Volume fraction of ethanol B. Liquid - solid ratio C. Extraction time

Fig. 1 Single-factor test of the factors affecting the extraction of total flavonoids from Prunellae Spica

表 2 试验设计方案与结果

Tab. 2 Scheme and results of test design

序号	A	B	C	总提取量(mg)	序号	A	B	C	总提取量(mg)
1	1	0	1	97.508	10	0	0	0	174.160
2	-1	0	-1	132.603	11	0	-1	1	160.988
3	1	-1	0	90.218	12	0	0	0	172.429
4	0	1	-1	160.160	13	-1	0	1	130.724
5	0	0	0	171.160	14	0	0	0	170.926
6	0	-1	-1	150.410	15	1	0	-1	89.153
7	0	1	1	169.220	16	-1	1	0	133.514
8	1	1	0	98.069	17	0	0	0	170.461
9	-1	-1	0	133.413					

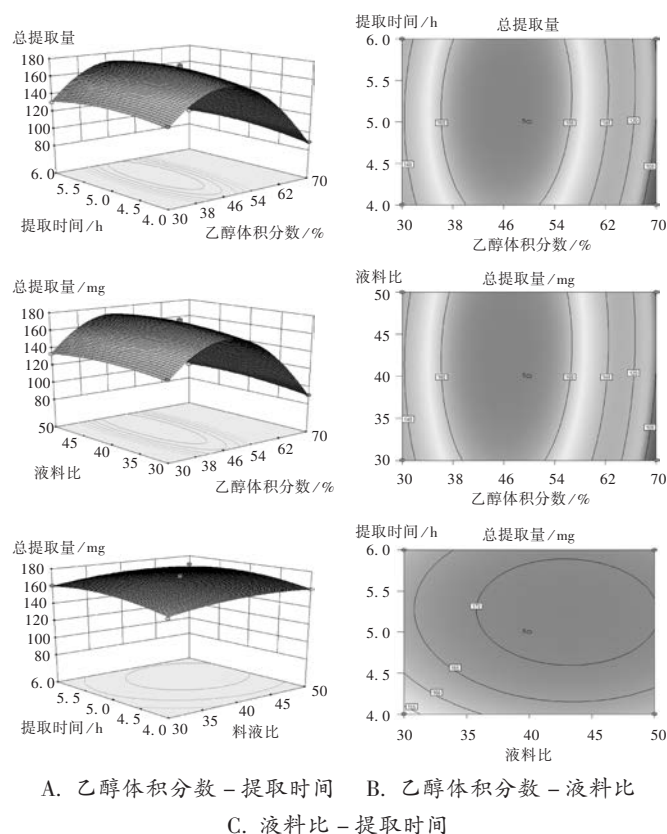
表 3 模型拟合方差分析结果

Tab. 3 Results of ANOVA for model fitting

项目	平方和	自由度	均方	F 值	Pr > F
模型	15 655.80	9	1 739.53	278.99	<0.000 1
A	3 015.02	1	3 015.02	483.56	<0.000 1
B	84.07	1	84.07	13.48	0.007 9
C	85.24	1	85.24	13.67	0.007 7
AB	15.02	1	15.02	2.41	0.164 6
AC	26.18	1	26.18	4.20	0.079 6
BC	0.58	1	0.58	0.092	0.770 0
A ²	11 765.22	1	11 765.22	1 886.93	<0.000 1
B ²	112.24	1	112.24	18.00	0.003 8
C ²	176.24	1	176.24	28.27	0.001 1
残差	43.65	7	6.24		
失拟项	34.72	3	11.57	5.18	0.072 9
净误差	8.93	4	2.23		
总离差	15 699.45	16			

显著,说明该方程对试验拟合较好,可较好地描述各因素与响应值间的真实关系。一次项 A,B,C,二次项 A², B²,C² 对响应值的影响显著 ($P < 0.01$),交互项对响应值的影响均不显著 ($P > 0.05$)。因此,各因素对响应值的影响不是简单的线性关系。根据回归方程系数的估计值可知,各因素对夏枯草中总黄酮提取量的影响大小为乙醇体积分数 > 提取时间 > 液料比。在 $\alpha = 0.05$ 显著水平下剔除不显著项后,可得优化后的回归方程 $R = -7.470 + 0.473A + 0.155B + 2.462C - 0.00571A^2 - 0.00197B^2 - 0.257C^2$ 。

响应面分析:不同因素交互作用的响应面见图 2。由图 2 A 可知,当提取时间为 5 h 时,总黄酮提取量随乙醇体积分数的升高先升后降,提示料液比对提取量的影响较小。由图 2 B 可知,当液料比为 40:1 时,总黄酮提取量随乙醇体积分数的升高先升后降,提示提取时间对其影响较小。由图 2 C 可知,总黄酮提取量随液料比和提取时间的变化影响不大。



A. 乙醇体积分数 - 提取时间 B. 乙醇体积分数 - 液料比
C. 液料比 - 提取时间

图 2 各因素交互作用影响总提取量的响应面和等高线图

A. Volume fraction of ethanol - extraction time B. Volume fraction of ethanol - liquid - solid ratio C. Liquid - solid ratio - extraction time

Fig. 2 Response surface and contour map of the interaction of various factors on the total extraction amount of total flavonoids from *Prunellae Spica*

2.4 提取条件优化及验证

根据回归模型可预测理论,响应值最大时的提取条件为: $A = 55.95$, $B = 44.34$, $C = 5.36$, 即提取量为 181.307 mg,液料比 44.34:1 (V/m),提取时间 5.36 h。考虑到实际操作条件,拟定夏枯草总黄酮最佳提取条件为液料比 44:1 (V/m),提取时间 5 h,乙醇体积分数 55%。以此提取条件检验响应面分析法建立回归模型的正确性,测得总黄酮的提取量为 173.341 mg,与理论预测值相比,差异不显著。提示该回归模型与实际情况拟合很好,响应面法可用于对夏枯草总黄酮提取条件进行回归分析和参数优化。

2.5 抗氧化活性分析

DPPH 自由基清除率测定:取总黄酮提取液和维生素 C,分别配制质量浓度为 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12 mg/mL 的供试品溶液和阳性对照溶液,分别取 1.0 mL,加入 1.0 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液,混匀,室温下充分反应 30 min,于 517 nm 波长处测定吸光度,计算清除率。DPPH 自由基清除率 (%) = $(1 - A_i / A_0) \times 100\%$ 。式中, A_0 表示 DPPH 溶液的吸光度; A_i 表示样品

与 DPPH 混合液的吸收值^[10-11]。

ABTS⁺·自由基清除率测定:取总黄酮提取液和维生素 C, 分别配制成质量浓度为 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12 mg/mL 的供试品溶液和阳性对照溶液, 分别取 0.8 mL, 精密量取稀释后的 ABTS⁺·贮备液 1.2 mL, 混匀, 静置 5 min, 于 734 nm 波长处测定吸光度, 按公式计算自由基清除率。

抗氧化活性分析:结果见图 3。总黄酮质量浓度在 0.02~0.12 mg/mL 范围内, 阳性对照溶液及夏枯草总黄酮提取物质量浓度随着 DPPH 和 ABTS⁺·自由基清除率的增加而增加。在清除 DPPH 自由基试验中, 其半数清除质量浓度 (IC_{50}) 和最大清除率分别为 0.042 mg/mL 和 70%, 维生素 C 分别为 0.085 mg/mL 和 84%; 在清除 ABTS⁺·自由基试验中, 其 IC_{50} 和最大清除率分别为 0.074 mg/mL 和 82%, 维生素 C 分别为 0.048 mg/mL 和 90%。结果显示, 夏枯草总黄酮提取物对 DPPH 和 ABTS⁺·自由基均有良好的清除效果, 但不如维生素 C。

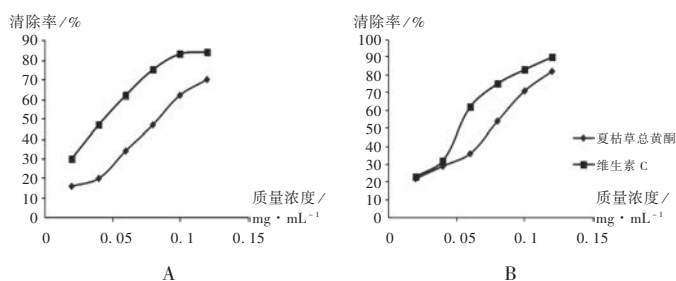


图 3 夏枯草总黄酮提取物对 DPPH 和 ABTS⁺·自由基的清除效果

Fig. 3 Scavenging effect of total flavonoids from *Prunellae Spica* on DPPH and ABTS⁺· free radicals

3 讨论

3.1 统计方法选择

现有文献中关于夏枯草提取总黄酮的条件优化研究多采用的数理统计方法为正交设计法, 其可同时考虑多种因素, 并通过较少的试验次数得到最佳因素水平组合, 但不能在给定的连续区域内找到因素和响应值的对应关系(回归方程)。但响应面分析法试验次数少, 周期短, 求回归方程精度高, 可满足其不足。

3.2 回归方程

在单因素考察结果基础上, 以夏枯草总黄酮提取量为

响应值, 利用试验设计软件 Design-Expert, 采用 Box-Behnken 试验原理建立了乙

醇体积分数(%)、液料比和提取时间(h)与总黄酮提取量间的二次回归模型, 回归模型拟合程度好, 能真实反映各影响因素对响应值的影响。根据回归系数显著性检验结果, 得到各因素对响应值影响的顺序为乙醇体积分数>提取时间>液料比。

3.3 单因素考察和响应面考察优缺点

首先采用单因素考察法确定影响因素变量的大概最优范围, 作为响应面的零水平点, 可减少响应面试验所做的试验数量, 主要选取影响提取时间、液料比和乙醇体积分数影响较大的独立因素进行优化。单因素考察仅单独考察某个因素的影响, 在实际试验中要综合考虑各因素间的干扰影响, 故需要选择较全面的响应面考察法, 优选样品提取的最佳工艺。

3.4 抗氧化活性

在筛选夏枯草中总黄酮最佳提取工艺的基础上, 对夏枯草中总黄酮抗氧化活性进行了初步研究, 发现夏枯草中总黄酮对 DPPH 自由基和 ABTS⁺·自由基均有良好的清除作用, 可为夏枯草的生物活性研究提供理论依据。

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, 2015:166-167.
- [2] 张金华, 邱俊娜, 王 路, 等. 夏枯草化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(14):3432-3440.
- [3] 盖春艳, 孔德云, 王曙光. 夏枯草化学成分研究[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(8):580-582.
- [4] 姚 洋, 李定祥, 张 杰. 夏枯草药理作用与临床应用研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(5):157-160.
- [5] 刘昌孝. 基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设[J]. 中草药, 2017, 48(18):3669-3676.
- [6] 张 华, 郑建东, 马田林, 等. 响应面法优化微波提取夏枯草多糖及其抗氧化活性[J]. 化学研究与应用, 2020, 32(2):264-272.
- [7] 赵 琳, 赵焕君, 包永睿, 等. 败酱总黄酮提取纯化工艺优化及纯化前后体外抗肝肿瘤药效对比研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(3):546-550.
- [8] 金辰光, 陈瑞战, 谭 莉, 等. 响应面优化复合酶提取夏枯草多糖[J]. 长春师范大学学报, 2016, 35(2):49-53.
- [9] 李萌茹, 周玉枝, 杜冠华, 等. 中药黄酮类化合物抗衰老作用及其机制研究进展[J]. 药学学报, 2019, 54(8):1382-1391.
- [10] 王润坤, 石绍奎, 宋玲祥. 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[J]. 中国药业, 2020, 29(15):37-41.
- [11] 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.

(收稿日期:2020-12-09;修回日期:2021-03-19)

本栏目由

重庆药友制药有限责任公司

协办