

赶黄草总黄酮超声提取工艺的响应面法优化 及其体外抗氧化活性分析

徐秀泉*, 虞倩, 徐颖, 许慧敏
(江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

[摘要] 目的: 优化赶黄草总黄酮的超声提取工艺并分析其体外抗氧化活性。方法: 以总黄酮得率为指标, 在单因素试验基础上, 采用响应面设计法对影响总黄酮得率的乙醇体积分数、超声时间及料液比进行优化, 同时考察其体外抗氧化活性。结果: 赶黄草总黄酮超声提取的最佳工艺条件为 26 倍量 60% 乙醇于 50 °C 下超声提取 20 min。在此条件下, 总黄酮得率 4.14%, 试验结果与模型预测值相符。体外抗氧化活性研究表明, 赶黄草总黄酮具有较强的还原力和总抗氧化能力, 同时具有较强的清除羟基自由基和 DPPH 自由基能力。结论: 该优选工艺方便、快捷、高效; 赶黄草总黄酮具有较强的抗氧化活性, 值得深入研究。

[关键词] 赶黄草; 总黄酮; 超声提取; 响应面; 抗氧化活性

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0038-04

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction Technology for Total Flavonoids from *Penthorum chinense* by Response Surface Methodology and Evaluation Its *in vitro* Antioxidant Activity

XU Xiu-quan*, YU Qian, XU Ying, XU Hui-min
(School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ultrasonic-assisted extraction technology of total flavonoids from *Penthorum chinense* and evaluate its *in vitro* antioxidant activity. **Method:** With yield of total flavonoids as index, the concentration of ethanol, extraction time, liquid-material ratio were optimized by response surface methodology based on single-factor tests, and its *in vitro* antioxidant activity were evaluated by multi-test systems. **Result:** Optimal extraction technology conditions were: extracted 20 min with 26 times the amount of 60% ethanol at 50 °C. Under these conditions, yield of total flavonoids reached 4.14%, which was agreed with model predictions. *In vitro* antioxidant activities results showed that total flavonoids from *P. chinense* had good antioxidant activities of scavenging DPPH free radical and hydroxyl free radical, but also had strong reducing power and total antioxidant capability. **Conclusion:** Optimized ultrasonic-assisted extraction technology was simple, rapid and efficient. Total flavonoids from *P. chinense* had good antioxidant activity which was worth of further study.

[Key words] *Penthorum chinense*; total flavonoids; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology; antioxidant activity

赶黄草为苗族传统药物, 民间以其全草入药, 性

温、味甘、无毒, 具有清热、利尿、解毒、活血、平肝、健脾、祛黄疸等功效, 临床用于治疗各种急慢性肝炎、非酒精性肝炎、病毒性肝炎及肝纤维化等疾病^[1], 其中黄酮类化合物是其主要活性成分^[2]。四氯化碳等引起的急慢性肝炎, 酒精及高脂饮食引起的酒精性及非酒精性脂肪肝主要机制是能够诱导肝细胞线粒体损伤, 引起细胞内活性氧(ROS)生成增加, 造

[收稿日期] 20120508(004)

[基金项目] 江苏大学大学生科研项目(11A155)

[通讯作者] * 徐秀泉, 讲师, 博士生, 从事天然活性成分提取分离及活性研究, Tel: 0511-85038403, E-mail: xxq781026@sohu.com

成肝组织氧化损伤,导致疾病的产生^[3]。许多具有抗氧化活性物质的保肝作用已得到证实^[4-5]。赶黄草活性成分黄酮类化合物的保肝活性是否为通过抗氧化机制,有效减轻活性氧造成的肝细胞损伤而发挥作用尚未得知。本试验采用响应面设计法优选其超声提取工艺,同时对赶黄草活性成分黄酮类化合物进行抗氧化活性分析,将有助于研究其保肝作用机制。

1 材料

UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),DHG-9145 型鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司),BS 110 S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100080-200306),其他试剂均为国产分析纯,赶黄草购自江苏镇江九泰医药有限公司,经江苏大学药学院宋晶博士鉴定为扯根菜属植物扯根菜 *Penthorum Chinense* Pursh. 的干燥全草,粉碎过 20 目筛备用。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制

精密称取 105 ℃ 下干燥至恒重的芦丁对照品 12.5 mg,加 70% 乙醇溶解并定容至 50 mL,得 250 mg·L⁻¹ 芦丁对照品溶液,精密量取该溶液 0,1,2,3,4,5,6 mL 置于 25 mL 量瓶,分别加入 5% NaNO₂ 溶液 1 mL,10% AlNO₃ 溶液 1 mL,4% NaOH 溶液 10 mL,每次滴加间隔 5 min,用 70% 乙醇定容至 25 mL,于 510 nm 波长处测定吸光度(A),以样品质量浓度对 A 进行线性回归,得回归方程 $A = 0.0109C - 0.007$ ($R^2 = 0.9993$)。结果表明,在 10.0 ~ 60.0 mg·L⁻¹ 芦丁质量浓度与 A 成良好线性关系。

2.2 响应面优化超声提取条件

在预试验基础上,根据中心组合设计原理,以乙醇体积分数、超声提取时间、料液比 3 个因素为自变量,总黄酮得率为响应值,设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验。因素水平分析选取见表 1,试验方案与结果见表 2,其中 12 个为析因试验,3 个为中心试验。准确称取 1.0 g 赶黄草粉末于 100 mL 锥形烧瓶中,加入一定体积分数乙醇溶液 25 mL 浸泡 30 min 后用封口塞密封,在一

表 2 赶黄草总黄酮超声提取工艺优选响应面试验安排

No.	A	B	C	总黄酮得率/%
1	-1	-1	0	3.70
2	-1	1	0	3.82
3	-1	0	1	3.75
4	-1	0	-1	3.60
5	1	-1	0	3.51
6	1	1	0	3.50
7	1	0	-1	3.40
8	1	0	1	3.58
9	0	1	-1	3.92
10	0	1	1	3.96
11	0	-1	1	3.98
12	0	-1	-1	3.78
13	0	0	0	4.12
14	0	0	0	4.16
15	0	0	0	4.15

定温度超声提取规定时间,离心,取上清液 1 mL 用 60% 乙醇定容至 10 mL,取该溶液 1 mL,按照标准曲线项下测定样品 A,计算总黄酮得率。

应用 Design-Expert 8.0.5 软件对表 2 中数据进行二次多元回归拟合,得到乙醇体积分数、超声时间、料液比与赶黄草总黄酮之间的二次多项回归方程 $Y = 4.14 - 0.11A + 0.029B + 0.071C - 0.032AB + 0.0075AC - 0.040BC - 0.42A^2 - 0.092B^2 - 0.14C^2$ 。对上述回归模型进行显著性检验,结果见表 3。

表 3 赶黄草总黄酮得率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.097	1	0.097	111.48	0.000 1 ³⁾
B	6.61 × 10 ⁻³	1	6.61 × 10 ⁻³	7.62	0.039 9 ¹⁾
C	0.041	1	0.041	46.77	0.001 0 ²⁾
AB	4.23 × 10 ⁻³	1	4.23 × 10 ⁻³	4.87	0.078 5
AC	2.25 × 10 ⁻⁴	1	2.25 × 10 ⁻⁴	0.26	0.632 4
BC	6.40 × 10 ⁻³	1	6.40 × 10 ⁻³	7.37	0.042 0 ¹⁾
A ²	0.65	1	0.65	747.11	<0.000 1 ³⁾
B ²	0.031	1	0.031	35.73	0.001 9 ²⁾
C ²	0.074	1	0.074	85.34	0.000 2 ³⁾
残差	4.34 × 10 ⁻³	5	8.68 × 10 ⁻⁴		
失拟项	3.48 × 10 ⁻³	3	1.16 × 10 ⁻³	2.67	0.283 9
误差	8.67 × 10 ⁻⁴	2	4.33 × 10 ⁻⁴		
总离差	0.86	14			
模型	0.86	9	0.095	109.79	<0.000 1 ³⁾
R ²	0.995 0			0.985 9	

注:1)表示差异显著,2)表示高度显著,3)表示差异极显著。

由表 3 结果可知,一次项中乙醇体积分数对总黄酮得率的线性效应极显著,提取时间对总黄酮得率的线性效应差异显著,料液比对总黄酮得率的线性效应高度显著;二次项乙醇体积分数、料液比对总黄酮提取率的曲面效应极显著,提取时间对总黄酮

表 1 赶黄草总黄酮超声提取工艺优选响应面因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 提取时间/min	C 料液比
-1	50	15	20
0	60	20	25
1	70	25	30

提取率的曲面效应高度显著;比较各因子间交互作用,提取时间和料液比间交互作用差异显著,乙醇体积分数与提取时间、乙醇体积分数与料液比交互作用不显著,各因素交互作用的响应面立体分析图和等高线见图 1~3。在本试验设计范围内,回归方程显著性检测 $P < 0.000 1$,极显著,模型的相关系数 0.995 0,说明该模型能解释 99.50% 响应值的变化,即该模型与实际试验拟合良好,证明应用响应曲面法优化的提取工艺提取赶黄草总黄酮是可行的。

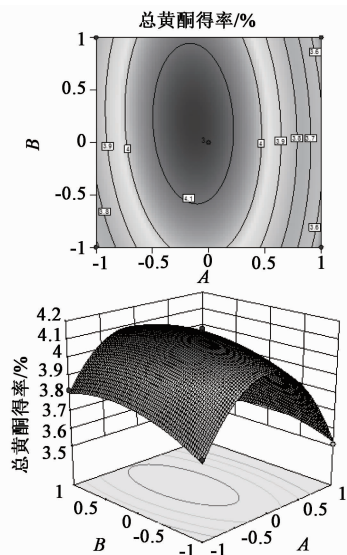


图 1 乙醇体积分数与提取时间响应面法立体分析和等高线

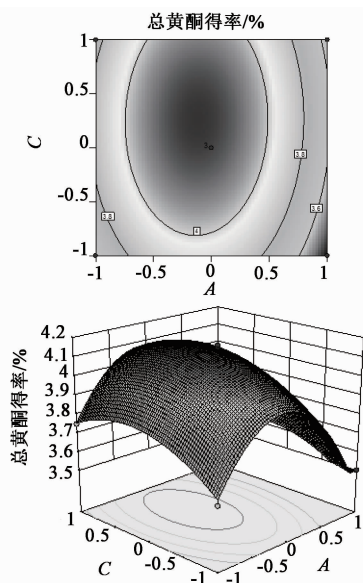


图 2 乙醇体积分数与料液比响应面法立体分析和相应等高线

为确定各因素最佳取值,利用 Design-Expert 软件进行分析后,得出回归模型存在最大值点, A, B, C 的代码值分别为 $-0.13, 0.13, 0.23$ 。与之对应的实测值 $A 58.7\%, B 20.65 \text{ min}, C 26.15$,此时总黄酮得

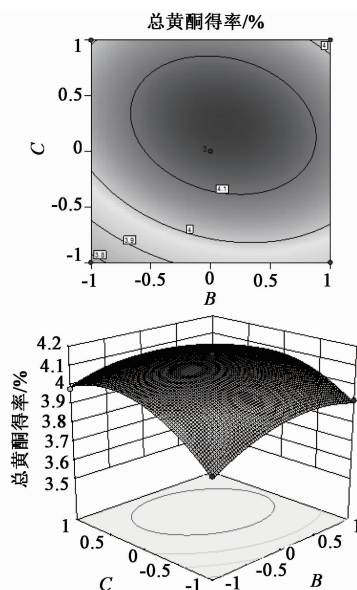


图 3 提取时间与料液比响应面法立体分析和等高线

率的最大估计值 $Y 4.16\%$ 。为实际操作方便,选取乙醇体积分数 60%,提取时间 20 min,料液比 26。按最佳工艺进行 3 次平行验证试验,结果赶黄草总黄酮得率 4.14%,说明试验值与理论值有较好的拟合性。

2.3 抗氧化活性分析

2.3.1 总抗氧化能力测定^[6] 精密移取不同质量浓度的赶黄草总黄酮溶液 1 mL,加 3 mL(含 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸, $0.028 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠, $0.004 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 钼酸铵)混合液,摇匀,于 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加热反应 90 min,以 60% 乙醇做对照,于 695 nm 处测定 A ,所有测定平行进行 3 次,取平均值。

2.3.2 还原力测定^[7] 精密移取不同质量浓度的赶黄草总黄酮溶液 1 mL,加入 pH 6.6 磷酸缓冲液 2.5 mL 和 1% 铁氰化钾溶液 2.5 mL,混合后置于 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中 20 min,加入 10% 三氯乙酸溶液 2.5 mL, $4\ 800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液 2.5 mL,加水 2.5 mL 和 0.1% 氯化铁 2.5 mL,混匀,静置 10 min,以 60% 乙醇做对照,于 700 nm 处测定 A ,取平均值 ($n=3$),计算其 IC_{50} 值 (IC_{50} 是指 $A=0.5$ 时的样品质量浓度)。

2.3.3 DPPH 自由基清除能力测定^[8] 精密移取不同质量浓度的赶黄草总黄酮溶液 1 mL,加入 60% 乙醇溶液 2 mL, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 溶液 1 mL,摇匀,黑暗处静置 30 min,于 517 nm 处测定 A ,以 60% 乙醇做对照,取平均值 ($n=3$)。DPPH 清除率按下式计算,计算其 IC_{50} 值 (IC_{50} 是指清除 50% DPPH 自由基的样品质量浓度)。

$$\text{DPPH 清除率} = [A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}}] \times 100\%$$

其中 $A_{\text{空白}}$ 为 1 mL DPPH 溶液与 3 mL 60% 乙醇在 517 nm 处的 A ; $A_{\text{对照}}$ 为样品溶液 1 mL 与 3 mL 60% 乙醇混合液在 517 nm 处的 A 。

2.3.4 羟基自由基清除能力测定^[9] 精密移取不同质量浓度的赶黄草总黄酮溶液 1 mL, 依次加入 1 mL pH 7.47 Tris-HCl 缓冲液, 75 mmol·L⁻¹ 的邻二氮菲-硫酸亚铁混合液 0.3 mL, 75 mmol·L⁻¹ 过氧化氢溶液 0.2 mL, 于 37 °C 保温 60 min, 在 508 nm 处测定 A , 以 60% 乙醇做对照, 取平均值 ($n = 3$)。羟基自由基清除率按下式计算, 计算其 IC_{50} 值 (IC_{50} 是指清除 50% 羟基自由基的样品质量浓度)。

$$\text{羟基自由基清除率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) \times 100\%$$

其中 $A_{\text{空白}}$ 为 2 mL 60% 乙醇溶液与邻二氮菲-硫酸亚铁混合液在 508 nm 处的 A ; $A_{\text{样品空白}}$ 为样品溶液 1 mL 与 60% 乙醇 2.5 mL 在 508 nm 处的 A 。赶黄草总黄酮的抗氧化活性结果见图 4~5。

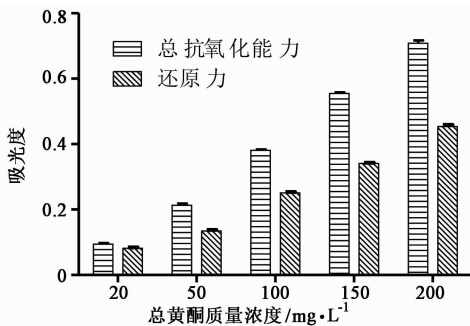


图4 赶黄草总黄酮总抗氧化能力及还原力分析

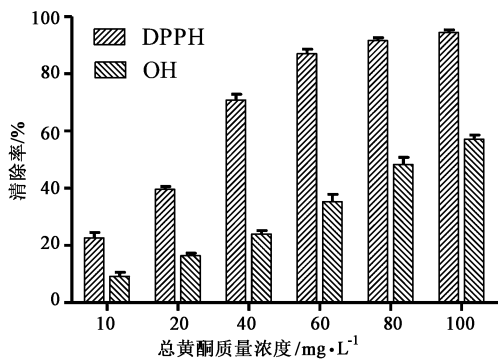


图5 赶黄草总黄酮清除 DPPH、羟基自由基能力分析

由结果可知, 在总抗氧化活性试验中, 赶黄草总黄酮具有较强的浓度依赖性还原 $Mo(VI)$ 生成绿色 $Mo(V)$ 的能力, 表现为 695 nm 波长处 A 的随质量浓度的增加成比例增加; 在还原力测定试验中, 赶黄草总黄酮具有较强还原 Fe^{3+} 形成普鲁士蓝的能力, 其 IC_{50} 285.8 mg·L⁻¹; 在对 DPPH 自由基、羟基自由基的清

除作用试验中, 赶黄草总黄酮能有效抑制 DPPH 及 Fenton 反应中羟基自由基的产生, 其 IC_{50} 分别为 22.15, 97.36 mg·L⁻¹, 表现出较强的抗氧化活性。

3 讨论

超声波具有强大的传质作用和空化作用, 使溶剂分子迅速渗透到组织细胞中, 与溶质充分接触, 可以显著提高有效成分的提取率。响应面法是采用多元二次回归方法作为函数估计的工具, 将多因子实验中因素与指标的相互关系用多项式近似拟合, 依此可对函数的响应面进行分析, 研究因子与响应面之间、因子与因子之间的相互关系。本研究将超声技术与响应面设计法相结合优化了赶黄草总黄酮的提取工艺参数, 建立了其提取的数学模型, 实验结果与模型预测值相符。同时采用多种方法对其总黄酮体外抗氧化活性进行测定, 结果表明赶黄草总黄酮具有较强的抗氧化活性, 赶黄草总黄酮有可能通过减轻活性氧造成的肝细胞损伤而发挥其保肝作用, 为研究其体内抗氧化保肝活性奠定良好的基础。

[参考文献]

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 下册[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 480.
- [2] 袁叶飞, 胡祥宇, 欧贤红. 赶黄草与槲皮素预防酒精性脂肪肝的比较研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(21): 1635.
- [3] Mehta K, Vanthiel D H, Shah N, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis and the role of antioxidants [J]. Nutr Rev, 2002(60): 289.
- [4] 于永军, 刘清新, 张秋雨, 等. 祛脂保肝颗粒对高脂饮食所致脂肪肝大鼠的药效观察及机制初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 166.
- [5] 吴正平. 茶多酚对小鼠高脂血症与脂肪肝的预防作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 94.
- [6] Jessica Tabart, Claire Kevers, Joel Pincemail, et al. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests [J]. Food Chem, 2009, 113(4): 1226.
- [7] Zhang G W, He L, Hu M M. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro [J]. Innov Food Sci Emerg Technol, 2011, 12(1): 18.
- [8] Wei Y, Chen X Q, Jiang X Y. Determination of taxifolin in *Polygonum orientale* and study on its antioxidant activity [J]. J Food Compo Anal, 2009, 22(2): 154.
- [9] Huang W, Xue A, Niu H. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro [J]. Food Chem, 2009, 114(3): 1147.

[责任编辑 全燕]