

半枝莲醇提工艺的优化及体外抗氧化活性评价的研究

薛海萍, 朱春贇, 芮欣忆, 张婷*
(上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] 目的: 用正交试验法对半枝莲的乙醇提取工艺进行优化研究, 通过体外试验对提取物的抗氧化活性进行评价。方法: 以浸膏得率、总黄酮和野黄芩苷从生药中的提取率为评价指标, 选择乙醇体积分数(%)、乙醇用量(倍)、提取时间(h)和提取次数(次)为考察因素, 利用正交试验 $L_9(3^4)$ 确定半枝莲的最佳醇提工艺。基于氧化还原反应原理的 FRAP 法用于总抗氧化能力的评估, DPPH 法用于评价自由基清除能力。结果: 最佳工艺条件为用药材 10 倍量的 75% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 1 h。半枝莲提取物以浓度依赖关系发挥着很好的抗氧化作用, 对 DPPH 自由基具有较强的清除和抑制作用。结论: 该提取工艺具有较佳的重复性和可行性。半枝莲醇提物显示了较好的抗氧化活性, 值得进一步开发研究。

[关键词] 半枝莲; 正交试验; 总黄酮; 野黄芩苷; 抗氧化; FRAP; DPPH

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0012-05

Studies on Optimum Ethanol Extraction Process and Antioxidant Activities *in vitro* of *Scutellaria barbata*

XUE Hai-ping, ZHU Chun-yun, RUI Xin-yi, ZHANG Ting*

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the optimum ethanol extraction process and antioxidant activities *in vitro* of *Scutellaria barbata* D. Don. **Method:** The optimum ethanol extraction process was established with the orthogonal design. The extraction rate of extractum, total flavonoids and scutellarin from crude material were chosen as the assessment guideline. Antioxidant activities *in vitro* of the extract were evaluated by FRAP assay and DPPH assay compared with Trolox. **Result:** The optimum ethanol extraction process conditions were as follows: 10 fold of 75% ethanol was added, to be extracted 3 times by reflux and 1 h per time. The extract of *S. barbata* exerted antioxidant role with dose-dependent relation in the two systems through oxidation-reduction reaction and inhibition of free radical. **Conclusion:** Validation studies proved that the ethanol extraction process had good reproducibility and feasibility. The ethanol extract of *S. barbata* exhibited a strong antioxidant activity *in vitro*, which is worthy of further studies.

[Key words] *Scutellaria barbata*; orthogonal design; total flavonoids; scutellarin; antioxidant activities; FRAP assay; DPPH assay

[收稿日期] 20100617(006)

[基金项目] 上海市教育委员会科研创新项目(自然科学类)一半枝莲总黄酮提取物的制备工艺及质量标准研究(09YZ126)

[第一作者] 薛海萍, 助理实验师, 主要从事中药活性成分及质量标准研究, Tel: 021-51323018, E-mail: xuehaiping198410@163.com

[通讯作者] * 张婷, 博士, 副研究员, 主要从事中药活性成分及质量标准研究, Tel: 021-51322534, E-mail: zhtepu@163.com, zhtepu@hotmail.com

半枝莲别名并头草、狭叶韩信草、牙刷草, 为唇形科黄芩属植物半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 的干燥全草。性味辛、苦、寒, 归肺、肝、肾经, 具有清热解毒、化痰利尿的功效, 临床上用于治疗癌症、肝炎、前列腺病和毒蛇咬伤等, 疗效确切^[1,2]。其化学成分主要有黄酮类、二萜及二萜内酯类、甾体类、多糖等。目前, 已经从半枝莲中分离出 27 个黄酮类化合物, 结构类型丰富, 含量较高, 如黄芩苷(baicalin)、野黄

芩苈 (scutellarin)、黄芩素 (baicalein)、野黄芩素 (scutellarein)、木犀草素 (luteolin) 等^[3]。现代药理研究表明黄酮类成分是半枝莲发挥抗肿瘤、解热、抗炎、保肝作用的主要有效成分^[4-8]。由此可见,半枝莲总黄酮提取效率的高低与其疗效有密切的相关性,有效的开发和利用半枝莲中的黄酮类成分具有重要意义。

目前,中药提取物因其部分有效成分的已知性和可量化性,已作为传统草药的通行形式在全球被广泛接受和认可,它可以把质量不稳定不可控的饮片/药材原料,通过现代化的技术手段制备成质量相对稳定可控的提取物原料药。为了探索最佳提取工艺,提高有效成分的提取效率,本研究综合选择醇浸膏得率、总黄酮和野黄芩苷从生药中的提取率为评价指标,利用正交试验设计优化半枝莲的最佳提取工艺条件。

现代医学研究已证实诸多疾病的发生和发展与自由基导致的机体细胞氧化损伤密切相关^[9-10],因此从天然产物中寻找安全有效的抗氧化剂成为近年来的研究热点之一。半枝莲中含有丰富的黄酮类化合物,该类化合物具有还原性酚羟基,能够直接清除自由基,抑制脂质过氧化。本研究利用基于氧化还原反应的 FRAP 法和清除自由基的 DPPH 法对得到的半枝莲提取物进行体外抗氧化活性评价。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(配备四元泵、自动进样器、柱温箱和 VWD 检测器); UV-7504 单光束紫外-可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司); Spectra MAX-190 连续波长酶标仪(Molecular Devices 公司), XS 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

半枝莲药材(产地浙江,批号 081205)购自上海康桥中药饮片有限公司,经上海中医药大学张婷副研究员鉴定为唇形科植物半枝莲 *S. barbata* D. Don 的干燥全草;野黄芩苷(110842-200605,中国药品生物制品检定所);2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ,2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine,Fluka 公司);Trolox(6-hydroxy-2,5,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid,Sigma 公司);二苯基苦味酰基苯肼(DPPH,2,2(-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical,Fluka 公司);甲醇(HPLC 级,Honeywell 公司);乙醇、冰醋酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);Milli-Q 超纯水。

2 方法与结果

2.1 提取工艺的优化

2.1.1 因素水平的选择 考虑工业生产的需要,以乙醇作为提取溶剂。选择乙醇体积分数(A)、乙醇用量(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为考察因素,每个因素设立 3 个水平。见表 1。

表 1 提取工艺正交试验的因素与水平

水平	A	B	C	D
1	50	6	0.5	1
2	75	8	1	2
3	95	10	1.5	3

2.1.2 正交试验方法及数据 精密称取半枝莲药材 25 g,用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验(表 2),采用热回流提取的方式。将提取液合并后过滤,滤液 60 °C 减压浓缩,放至室温后用相同浓度的乙醇定容至 50 mL。以醇浸膏得率、总黄酮和野黄芩苷从生药中的提取率为考察指标,综合评价和筛选半枝莲乙醇提取物的提取工艺。

以醇浸膏得率和总黄酮提取率为考察指标,由表 2 中极差 R 值大小显示,各因素作用主次为 $A > D > C > B$,对提取效率影响最小者为 B 项,因此把 B 项作为误差相处理进行方差分析;以野黄芩苷提取率为考察指标,由表 2 中极差 R 值大小显示,各因素作用主次为 $A > D > B > C$,对提取效率影响最小者为 C 项,因此把 C 项作为误差相处理进行方差估算见表 3。

由表 3 结果表明,以醇浸膏得率为考察指标,A 因素和 D 因素的 P 值小于 0.05,因此 A 因素和 D 因素的影响具有显著性意义,以 $A_2D_3C_2B_2$ 为佳;以总黄酮提取率为考察指标,A 因素和 D 因素的 P 值小于 0.05,因此 A 因素和 D 因素的影响具有显著性意义,以 $A_2D_3C_2B_3$ 为佳;以野黄芩苷提取率为考察指标,A 因素的 P 值小于 0.05,因此 A 因素的影响具有显著性意义,以 $A_2D_3B_3C_2$ 为佳。综合考虑 3 个指标的结果,确定最佳工艺条件为 $A_2D_3C_2B_3$,即用药材 10 倍量的 75% 乙醇热回流提取 3 次,每次 1 h。

2.2 样品测定

2.2.1 醇浸膏得率的测定 按照 2.1.2 项制备样品,精密吸取经提取并定容至 50 mL 的供试品溶液 20 mL,置 105 °C 已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 °C 干燥 5 h,置干燥器中冷却 1 h,迅速称重,按下式计算醇浸膏得率:

表 2 提取工艺正交试验设计及结果 (n=3)

No	A	B	C	D	醇浸膏 得率/%	总黄酮 提取率 /mg·g ⁻¹	野黄芩苷 提取率 /mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	9.33	15.37	3.38
2	1	2	2	2	19.91	32.24	6.41
3	1	3	3	3	17.62	34.55	6.60
4	2	1	2	3	20.99	42.08	7.81
5	2	2	3	1	12.79	24.55	6.14
6	2	3	1	2	17.43	33.09	7.77
7	3	1	3	2	8.70	13.37	1.26
8	3	2	1	3	10.15	15.45	1.95
9	3	3	2	1	7.12	11.32	1.07
醇浸膏 得率/%	K ₁	46.86	39.02	36.91	29.24		
	K ₂	51.21	42.85	48.02	46.04		
	K ₃	25.97	42.17	39.11	48.76		
	R	25.24	3.83	11.11	19.52		
	S	121.37	2.78	23.07	74.52		
总黄酮 提取率 /mg·g ⁻¹	K ₁	82.16	70.82	63.91	51.24		
	K ₂	99.72	72.24	85.64	78.70		
	K ₃	40.14	78.96	72.47	92.08		
	R	59.58	8.14	21.73	40.84		
	S	624.87	12.60	79.88	289.00		
野黄芩 苷提取率 /mg·g ⁻¹	K ₁	16.39	12.45	13.1	10.59		
	K ₂	21.72	14.5	15.29	15.44		
	K ₃	4.28	15.44	14.00	16.36		
	R	17.44	2.99	2.19	5.77		
	S	53.25	1.56	0.81	6.41		

表 3 提取工艺方差分析

误差来源	SS	f	MS	F	P	
醇浸膏 得率/%	A	121.37	2	60.69	43.60	<0.05
	C	23.07	2	11.54	8.29	>0.10
	D	74.52	2	37.26	26.77	<0.05
	误差(B)	2.78	2	1.39		
总黄酮提 取率/mg·g ⁻¹	A	624.87	2	312.43	49.58	<0.05
	C	79.88	2	39.94	6.34	>0.10
	D	289.00	2	144.50	22.93	<0.05
	误差(B)	12.60	2	6.30		
野黄芩苷 提取率/mg·g ⁻¹	A	53.25	2	26.62	65.91	<0.05
	B	1.56	2	0.78	1.93	>0.10
	D	6.41	2	3.20	7.93	>0.10
	误差(C)	0.81	2	0.40		

注: F_{0.10}(2,2)=9.00; F_{0.05}(2,2)=19.00; F_{0.01}(2,2)=99.00。

$$\text{醇浸膏得率} = \frac{W \times 50}{20 \times M} \times 100\%$$

其中 W 为浸膏质量, M 为药材样品质量。

2.2.2 总黄酮提取率的测定 按照 2.1.2 项制备样品,精密吸取经提取并定容至 50 mL 的供试品溶液 1 mL,用同浓度的乙醇定容于 10 mL 量瓶中。再精密吸取 1 mL,用同浓度的乙醇定容于 50 mL 量瓶中。按照 2005 年版《中国药典》一部规定的方法,以野黄芩苷为对照品,甲醇为空白,在 335 nm 波长处测定吸光度。线性回归方程为 $Y = 61.818X + 0.0088$, $R^2 = 0.9994$ ($n=3$), Y 为吸光度, X 为样品浓度 (mg·mL⁻¹)。计算总黄酮从生药中的提取率,结果见表 2。

2.2.3 野黄芩苷提取率的测定 按照 2.1.2 项制备样品,精密吸取经提取并定容至 50 mL 的供试品溶液 1 mL,旋转蒸发仪上蒸干,加入甲醇溶解,用甲醇定容于 10 mL 量瓶中。按照 2005 年版《中国药典》一部规定的 HPLC 测定野黄芩苷从生药中的提取率。色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水-醋酸 (35:61:4),检测波长 335 nm,柱温 25 °C,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。线性回归方程 $Y = 2675X - 27.29$, $R^2 = 1$ ($n=3$), Y 为峰面积, X 为样品进样量 (μg)。计算野黄芩苷从生药中的提取率,结果见表 2。

2.3 验证试验 根据筛选得到的最佳工艺条件,提取 3 份样品,每份称取半枝莲药材 25 g,用药材 10 倍量的 75% 乙醇热回流提取 3 次,每次 1 h,同 2.1.2 法。测得醇浸膏得率、总黄酮和野黄芩苷的提取率分别为 (21.01 ± 1.75)%, (29.00 ± 0.75) mg·g⁻¹, (7.03 ± 0.10) mg·g⁻¹ ($n=3$)。此结果表明在最佳综合评分工艺条件下,浸膏得率较高,且总黄酮和野黄芩苷提取率较高,重现性好,工艺稳定,满足生产的要求。

2.4 抗氧化活性的测定

2.4.1 FRAP 法 (ferric reduction ability power assay)

按照 2.3 项制备样品,精密吸取经提取并定容至 50 mL 的供试品溶液 1 mL,减压蒸干,加入甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中,用甲醇倍比稀释分别得到 (生药) 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.00313, 0.00156, 0.00078, 0.00039 g·mL⁻¹ 的一系列样品溶液,分别取 5 μL 加入 245 μL FRAP 溶液 (0.3 mol·L⁻¹ 醋酸盐缓冲液 (pH 3.6) 10 mmol·L⁻¹ TPTZ (溶于 40 mmol·L⁻¹ 盐酸溶液中) 和 20 mmol·L⁻¹ FeCl₃

溶液以 10:1:1 混合,临用前现配),并作空白对照(5 μL PBS 溶液加入 245 μL FRAP 溶液)和样品本底对照(5 μL 样品溶液加入 245 μL 水),在酶标仪上振荡混匀,静置 10 min 后,于 593 nm 处测量吸光度。以水溶性维生素 E 类似物 Trolox 作为标准对照物,样品的抗氧化能力以 FRAP 值表示:1 FRAP 单位 = 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Trolox,即样品的抗氧化能力相当于 Trolox 的 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 数。以上试验重复操作 3 次,计算平均值和 SD 。不同浓度样品溶液的 FRAP 测试结果见图 1。结果表明,半枝莲乙醇提取物具有良好的抗氧化活性。

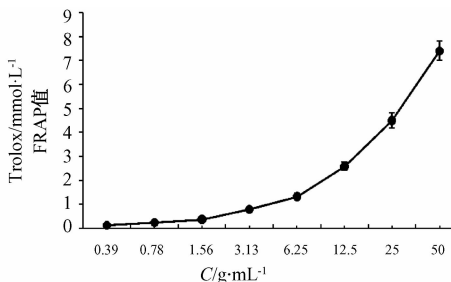


图 1 半枝莲不同质量浓度提取物的 FRAP 活性测试结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.4.2 对 DPPH 自由基的清除作用(2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay) 分别取 5 μL 2.4.1 项下不同质量浓度的样品溶液加入 245 μL 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 甲醇溶液,并作空白对照(5 μL 甲醇加入 245 μL 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 甲醇溶液)和样品本底对照(5 μL 不同浓度的样品溶液加入 245 μL 甲醇),在酶标仪上振荡混匀,静置 30 min 后,于 517 nm 处测量吸光度。以上试验重复操作 3 次,根据下列公式计算每一浓度的样品溶液对 DPPH 自由基的清除率(%):

$$\text{DPPH 清除率} = \frac{A_{\text{blank}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{control}})}{A_{\text{blank}}} \times 100\%$$

A_{blank} :空白对照的吸光度值; A_{sample} :加样品溶液的吸光度值; A_{control} :样品本底对照的吸光度值。以样品溶液的浓度为横坐标,DPPH 自由基的清除率为纵坐标绘制标准曲线,根据回归的线性方程计算 IC_{50} 值,即 DPPH 自由基清除率为 50% 时对应的样品溶液的质量浓度。不同浓度样品溶液的 DPPH 自由基清除率曲线见图 2,标准对照物质 Trolox 的 DPPH 自由基清除率曲线见图 3。半枝莲提取物的 IC_{50} 值为 $(13.38 \pm 0.26) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=3$),结果表明半枝莲乙醇提取物具有较强的清除 DPPH 自由基的活性。

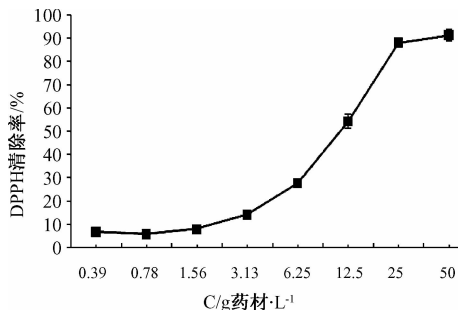


图 2 半枝莲不同浓度提取物的 DPPH 自由基清除率(%)曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)

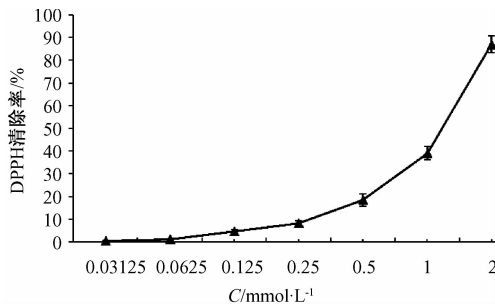


图 3 Trolox 的 DPPH 自由基清除率(%)曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

通过 $L_9(3^4)$ 正交试验,最终确定半枝莲乙醇提取的最佳工艺条件为采用药材 10 倍量的 75% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 1 h,其结果经验证试验确认该条件具有良好的重复性和可行性,对于保证临床疗效的稳定性、安全性以及更加充分、合理的利用中药资源具有重要意义,为复方制剂生产中半枝莲的应用提供有效的原料。

FRAP 法是利用在低 pH 溶液中 Fe^{3+} 与 TPTZ 形成复合物 (Fe^{3+} -TPTZ),抗氧化剂还原 Fe^{3+} -TPTZ 复合物形成蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ 溶液,在 593 nm 处有最大吸光度值,增加的吸光度值与样品的抗氧化能力成正比^[11-12]。其原理明确,操作简便,不需特殊仪器,易于标准化,所测结果反映的不是样品针对某一种自由基的清除活性,而是样品总的还原能力,因此可以作为一种测定物质总抗氧化能力的方法。二苯基苦味酰基苯肼(DPPH)在有机溶剂中是一种稳定的自由基,当加入自由基清除剂时,孤对电子被配对,吸光度值会降低,吸光度值愈低,表明抗氧化剂的供氢能力愈强,可以测定样品的自由基清除能力^[13-14]。为了对半枝莲醇提取物抗氧化活性进行评价,本研究采用了这 2 种体外检测的模型系统。结果表明半枝莲醇提取物均以浓度依赖关系发挥着很好

的抗氧化作用,对 DPPH 自由基具有较强的清除和抑制作用。可为进一步的活性物质追踪提供试验依据,为从中寻找有开发价值的抗氧化活性物质(群)和发掘天然的抗氧化剂奠定基础。

[参考文献]

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005:77.
- [2] 彭伟文,吴惠妃,曾聪彦,等. 半枝莲的药理及临床应用研究概况[J]. 时珍国医国药,2003,14(7):428.
- [3] 邹葳蕾,吴启南. 半枝莲的化学成分及药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2005,16(2):149.
- [4] Sonoda M, Nishiyama T, Matsukwa Y, et al. Cytotoxic activities of flavonoids from two *Scutellaria* plants in Chinese medicine[J]. J Ethnopharmacol, 2004, 91(1): 65.
- [5] Kim D I, Lee T K, Lim I S, et al. Regulation of IGF-I production and proliferation of human leiomyomal smooth muscle cells by *Scutellaria barbata* D. Don *in vitro*: isolation of flavonoids of apigenin and luteolin as acting compounds[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 205(3): 213.
- [6] Chen L G, Hung L Y, Tsai K W, et al. Wogonin, a bioactive flavonoid in herbal tea, inhibits inflammatory cyclooxygenase-2 gene expression in human lung epithelial cancer cells[J]. Mol Nutr Food Res, 2008, 52(11): 1349.
- [7] Lin C C, Shieh D E. *In vivo* hepatoprotective effect of baicalein, baicalin and wogonin from *Scutellaria rivularis* [J]. Phytother Res, 1996, 10(8): 651.
- [8] Lin C C, Shieh D E. The anti-inflammatory activity of *Scutellaria rivularis* extracts and its active components, baicalin, baicalein and wogonin[J]. Am J Chin Med, 1996, 24(1): 31.
- [9] Barouki R. Ageing free radicals and cellular stress[J]. Med Sci, 2006, 22(3): 266.
- [10] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function[J]. Physiol Rev, 2002, 82(1): 47.
- [11] Benzie I F F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. Anal Biochem, 1996, 239: 70.
- [12] Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(8): 3396.
- [13] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. Lebensm-Wiss Technol, 1995, 28(1): 25.
- [14] Duarte-Almeida J M, Dos Santos R J, Genovese M I, et al. Evaluation of the antioxidant activity using the β -carotene/linoleic acid system and the DPPH scavenging method[J]. Cienc Tecnol Aliment, 2006, 26(2): 446.

[责任编辑 全燕]