

· 中药工业 ·

响应面法优化夏至草总黄酮的提取工艺[△]

段建荣*

(张家口市沙岭子医院 药剂科, 河北 张家口 07500)

[摘要] 目的: 优化夏至草总黄酮的超声提取工艺, 建立夏至草总黄酮的含量测定方法。方法: 在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 设计结合响应面分析法, 以夏至草总黄酮的提取率为评价指标, 采用分光光度法, 测定夏至草总黄酮的含量, 采用 Design-Expert v8.0.6 软件对试验结果进行拟合和建模, 确定夏至草总黄酮超声提取的最佳工艺。结果: 超声法提取夏至草总黄酮的最佳工艺为乙醇浓度 60%, 液料比 40:1, 温度 60℃, 在此条件下, 夏至草总黄酮提取率为 1.592 4% (RSD = 1.007 7%, $n = 6$)。结论: 该方法操作简便、准确、灵敏、重现性好, 可作为夏至草总黄酮的提取及含量测定方法。

[关键词] 夏至草; 总黄酮; 超声提取; 含量测定; 响应面法

Optimization for Extraction Process of Total flavonoids from *Lagopsis supina* by Response Surface Methodology

DUAN Jian-jong*

(Pharmacy of The Shalingzi Hospital of Zhangjiakou, Zhangjiakou 75000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction of total flavonoids of *Lagopsis supina* and establish a method for determination of the total flavonoids content. **Methods:** Using the extraction yield of total saponins as index, spectrophotometric method was used to determine the content of total flavonoids in *L. supina*. On the basis of single factor experiments, Box-Behnken design and response surface were used to optimize the extraction of total flavonoids. And the extraction yield of the total flavonoids was analyzed using quadratic regression model by the software of Design-Expert v8.0.6. **Results:** The optimum extraction conditions were ethanol concentration 60%, liquid to material ratio 40:1, temperature 65℃. Under these conditions, the yield of extracted total flavonoids could reached to 1.592 4% (RSD = 1.007 7%, $n = 6$). **Conclusion:** The method is simple, accurate, sensitive and reproducible, and can be used for content determination of total flavonoids from *L. supina*.

[Keywords] *Lagopsis supina*; total flavonoids; Ultrasonic-assisted Extraction; content determination; response surface methodology

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20171112001

夏至草为唇形科夏至草属植物夏至草的全草, 又名小益母草、白花益母草、白花夏枯草等, 广泛分布于华北、东北、西南、西北等地区。《本草纲目》中记载的茺蔚白花者应是夏至草, 可活血去瘀、调经、降气逆、平肝潜阳, 用于月经不调、半身不遂、血滞经闭、贫血性头昏等疾病。现代研究表明, 夏至草醇提物能明显减轻 Dextran 500 所致 AMD 大鼠肠系膜血液及淋巴微循环障碍^[1]; 能明显降低 dextran 500 致 AMD 大鼠的血小板聚集与粘附功能、减少血栓形成^[2]; 能通过降低 NO 的生成和释放,

减轻大鼠重症失血性休克后器官损伤^[3]; 可改善血瘀大鼠的血液流变性异常, 提高器官血液灌流, 具有良好的活血化瘀作用^[4]; 能明显降低 Dextran 500 致 AMD 大鼠的全血粘度和血浆粘度, 提高红细胞变形能力^[5]; 能明显减轻 Dextran 500 致急性微循环障碍大鼠各器官功能障碍与组织学损伤^[6]。有文献报道夏至草中含有多种黄酮类物质^[7], 但未见有对夏至草总黄酮含量测定的研究。本文采用响应面法对夏至草总黄酮的提取工艺进行研究, 为进一步研究开发夏至草提供实验基础。

[△] [基金项目] 河北省中医药管理局项目(2015172)

* [通信作者] 段建荣, 副主任药师, 研究方向: 中药新药研究; Tel: 15369336856, E-mail: 2557190082@qq.com

1 材料与仪器

1.1 材料

夏至草采自河北省张家口市万全区,由张家口学院韩博副教授鉴定为夏至草 *Lagopsis supina* 正品;芦丁对照品(北京盛世康普化工技术研究院 FWYP-153-18-4);其他试剂均为国产分析纯;实验用水为去离子水。

1.2 仪器

T6 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Sartorius 万分之一精密电子天平(德国赛多利斯天平公司)。

2 方法与结果

2.1 夏至草总黄酮的提取

将干燥的夏至草粉碎后过 20 目筛,60 ℃ 干燥至恒重。精密称取夏至草粉末 10 g,选用不同浓度的乙醇溶液为提取溶剂,在单因素分析的基础上,采用 Box-Behnken 设计方案,选用不同浓度的乙醇溶液为提取溶剂,选取以乙醇浓度、料液比、提取温度为考察因素,超声辅助提取 10 min,过滤,定容至 100 mL。在提取工艺研究中改变相应参数。

2.2 检测波长的确定

精密称取芦丁标准品 0.005 0 g,用 60% 的乙醇溶液溶解并定容至 50 mL 的棕色容量瓶中,配成 0.1 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。吸取对照品溶液适量,按照 2.3 项下方法显色,并于 400 ~ 700 nm 进行扫描,测定吸光度,结果显示,对照品溶液在 510 nm 处均有最大吸收,确定检测波长为 510 nm。扫描图见图 1。

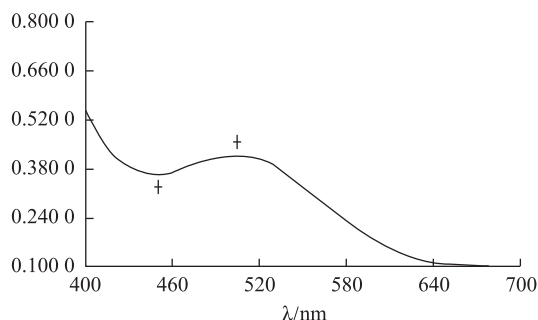


图1 芦丁溶液吸收光谱

2.3 夏至草总黄酮的含量测定

精密吸取 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 mL 的芦丁对照品溶液,分别置于 10 mL 容量瓶中,分别加 60% 的乙醇溶液适量至 3 mL,各加入浓度为 5% 的亚硝酸钠水溶液 1 mL,摇匀,静置 6 min。分别加入 10% 的硝酸铝水溶液 0.3 mL 摇匀,静置 6 min。分别加入浓度为 4% 的氢氧化钠溶液 4 mL,摇匀,最后用 30% 的乙醇定容至 10 mL,摇匀,静置 14 min,于 510 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标(Y),以浓度为横坐标(X),绘制标准曲线^[8-10]。得到线性方程 $Y = 0.9171X - 0.0046$ ($r = 0.9994$)。表明在浓度为 0.05 ~ 0.3 mg·mL⁻¹ 范围内浓度与吸光度呈良好线性关系。根据标准曲线求得 Box-Behnken 设计方案中各供试液中总黄酮浓度,按下式计算总黄酮得率。

总黄酮得率 = 供试液浓度(mg·mL⁻¹) × 稀释倍数 × 体积(mL) / 称取样品干质量(g) × 1000 (1)

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验 取夏至草总黄酮提取液适量,按照 2.3 项下方法显色,并于 0、15、30、45、60 min 测定吸光度,计算相对标准偏差。结果 RSD = 4.15%,表明样品在室温下 60 min 内稳定。

2.4.2 精密度实验 精密吸取芦丁对照品溶液 1 mL,按照 2.3 项下方法显色,连续测量 6 次,计算相对标准偏差。结果吸光度的 RSD 为 1.22%,试验结果表明该方法仪器精密度良好。

2.4.3 重复性实验 取同一批样品 5 份,每份 10 g,以优化的条件提取,按照 2.3 项下方法显色并测定吸光度,计算相对标准偏差。结果 RSD 为 3.31%,表明该方法重复性好。

2.4.4 加样回收实验 精密吸取已知浓度的供试品溶液 1 mL 共 5 份,分别加入 1 mL 的芦丁标准品溶液,按照 2.3 项下方法显色并测定吸光度,计算平均回收率及相对标准偏差。结果平均回收率为 82.6%,RSD = 5.11%,表明方法的加样回收率符合要求。

2.5 单因素试验设计

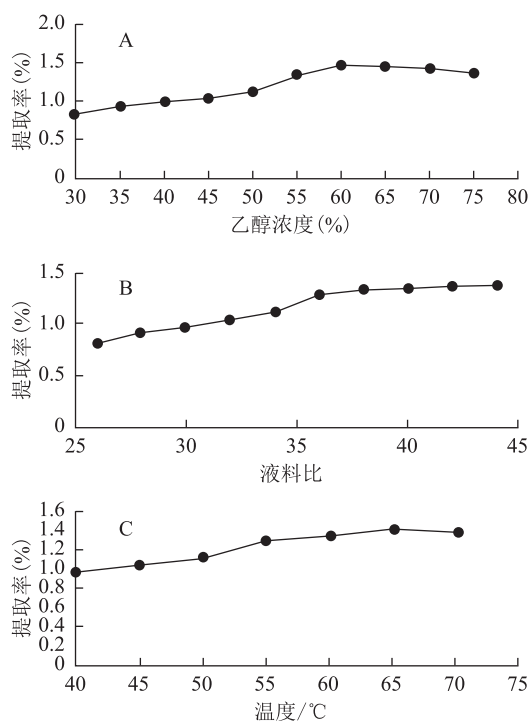
以黄酮提取率为考察指标,按照上述总黄酮提取工艺,固定其他条件,分别考察不同乙醇浓度、液料比、提取温度对夏至草总黄酮提取率的影响。

由图 2(A)可知,随着乙醇浓度的增加,夏至草总黄酮的提取率不断增加,当乙醇浓度达到 60%

时,总黄酮提取率达到最大,继续增加乙醇浓度,总黄酮提取率明显下降,因此乙醇浓度选择在50%~70%进行优化。

由图2(B)可知,随着液料比的增大,夏至草总黄酮的提取率增加,但当液料比超过40:1后,总黄酮提取率变化不明显,为节约溶剂,因此液料比选择在30:1~40:1进行优化。

由图2(C)可知,随着提取温度的提高,夏至草总黄酮的提取率不断增加,当提取温度达到65℃时,总黄酮提取率达到最大,继续提高温度,总黄酮提取率略有下降,因此提取温度选择在60~70℃进行优化。



注: A. 乙醇浓度对提取率的影响; B. 液料比对提取率的影响; C. 提取温度对提取率的影响。

图2 夏至草总黄酮提取的单因素试验

2.6 Box-Behnken 试验设计及响应面分析

在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 设计方案^[11-13],以乙醇浓度 A、液料比 B、提取温度 C 为考察因素,以夏至草总黄酮提取率为响应值,利用 Design-Expert v8.0.6 软件优化夏至草总黄酮提取工艺。试验因素、水平编码见表1。设计方案及结果见表2,拟合二次多项式模型的方差分析见表3。对表2中的数据进行多元回归拟合,获得夏至草总黄酮提取率对自变量乙醇浓度 A、液料比 B、提取温度 C 的二次多项回归方程为: $Y = -23.77 +$

$$0.17A - 0.29B + 0.78C + 1.5 \times 10^{-4} AC - 1.495 \times 10^{-3} A^2 + 4.32 \times 10^{-3} B^2 - 6.08 \times 10^{-3} C^2$$

表1 实验因素与水平

因素	水平		
	-1	0	1
A 乙醇浓度 (%)	50	60	70
B 液料比	30:1	35:1	40:1
C 提取温度/℃	60	65	70

表2 Box-Behnken 试验设计方案与结果

标准序	运行序	A:醇浓度 (%)	B:液料比	C:温度/℃	R1 (%)
6	1	70.00	35:1	60.00	1.08
12	2	60.00	40:1	70.00	1.41
11	3	60.00	30:1	70.00	1.32
2	4	70.00	30:1	65.00	1.32
5	5	50.00	35:1	60.00	1.19
14	6	50.00	35:1	65.00	1.48
7	7	70.00	35:1	70.00	1.19
8	8	70.00	35:1	70.00	1.11
4	9	70.00	4:1	65.00	1.46
10	10	60.00	40:1	60.00	1.47
16	11	60.00	35:1	65.00	1.45
13	12	60.00	35:1	65.00	1.36
9	13	60.00	30:1	60.00	1.40
3	14	50.00	40:1	65.00	1.48
17	15	60.00	35:1	65.00	1.47
1	16	50.00	30:1	65.00	1.35
15	17	60.00	35:1	65.00	1.46

注: 实验1~12为析因实验,13~17为中心实验。

由表3可知, $P_{\text{模型}} < 0.01$, 说明模型高度显著; 模型的相关系数 $r = 0.9698$, 校正决定系数 $\text{RADj}^2 = 0.8943$, 二者相近, 说明模型实际值与预测值拟合较好; 模型失拟项是表示模型理论值与实际值不相拟合的概率, $P_{\text{失拟}} = 0.6739 > 0.05$, 模型的失拟度不显著, 表明该回归模型的拟合情况良好, 回归方程代表性较好, 能准确预测实际情况, 使用该方程代替真实的实验点进行分析是可行的。

由表3中的 P 值可以知道, 方程中 A、B、C、 A^2 、 B^2 、 C^2 对 Y 值的影响均高度显著, 表明实验因子对响应值不是简单的线性关系。由回归方程可知乙醇浓度 A 与提取温度 C 有交互作用。A、C 两因素回归方程响应面及等高线见图3, 两个交互因素的响应面存在最高点, 即在所选的范围内存在极值, 说明各因素考察范围较为适当。

表3 拟合二次多项式模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	0.27	7	0.038	20.35	<0.000 1	**
A-醇浓度	0.036	1	0.036	19.18	0.001 8	**
B-液料比	0.046	1	0.046	24.09	0.000 8	**
C-温度	0.089	1	0.089	47.24	<0.000 1	**
AC	2.250×10^{-4}	1	2.250×10^{-4}	0.12	0.738 1	
A ²	0.094	1	0.094	49.76	<0.000 1	**
B ²	0.049	1	0.049	25.97	0.000 6	**
C ²	0.097	1	0.097	51.44	<0.000 1	**
残差	0.017	9	1.891×10^{-3}			
失拟项	7.700×10^{-3}	5	1.540×10^{-3}	0.66	0.673 9	
纯误差	9.320×10^{-3}	4	2.230×10^{-3}			
总和	0.29	16				

$$r = 0.969\ 8 \quad R_{\text{Adj}}^2 = 0.894\ 3$$

注: **. $P < 0.01$ 为极显著水平; *. $P < 0.05$ 为显著水平。

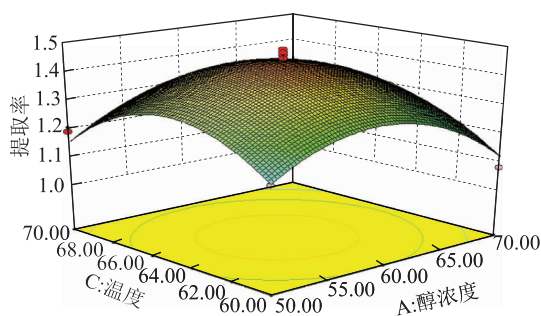


图3 提取温度与提取溶剂浓度对夏至草总黄酮提取率的响应面图

通过软件分析得到最佳提取工艺为乙醇体积分数为58.98%、液料比为40:1,提取温度为64.76℃,在此条件下夏至草总黄酮的提取率为1.6076%。为使试验操作简便,最终确定提取工艺为:乙醇体积分数为60%、液料比为40:1、提取温度为65℃。

2.7 验证试验

精密称取夏至草6份,每份20g,按2.1项下方法以最佳的提取工艺提取总黄酮,按2.2项下方法显色,510nm处测定吸光度,总黄酮含量分别为1.6111%、1.5943%、1.5648%、1.6001%、1.5844%、1.5994%,平均含量为1.5924%,RSD为1.0077%,与软件分析所得的提取率相近,表明本研究确定的试验条件可行。

3 讨论

本文在单因素试验的基础上,将响应面法应用于优化夏至草活性成分总黄酮的提取。实验结果表明,乙醇浓度、提取温度、液料比及的乙醇浓度、

提取温度、液料比平方项对夏至草总黄酮提取率的影响显著,并且,乙醇浓度与提取温度具有交互作用。说明乙醇浓度、提取温度、液料比对夏至草总黄酮提取率的影响不是简单的线性关系。

在前期研究中发现,超声功率及超声时间对夏至草总黄酮的提取率影响不大,所以在本实验中未考虑二者的影响,本实验采用超声($\text{Hz} = 120\ \text{W}$)辅助提取10min。回归分析和验证实验结果表明,此方法合理可行。得到夏至草总黄酮提取的最佳条件为:乙醇体积分数为60%、液料比40:1、超声温度65℃,夏至草总黄酮提取率为1.5924%。

该方法简便易行,灵敏度高,精密度高,重现性好,稳定可靠,可作为夏至草总黄酮的提取及含量测定方法;为以后夏至草总黄酮的提取和含量测定提供了方法与理论依据,为新药开发和工业化生产提供了实验基础。

参考文献

- [1] 边永玲,刘正泉,牛春雨,等.夏至草醇提物对大鼠急性微循环障碍的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(6):338-341.
- [2] 李延伟,雷慧,刘正泉,等.夏至草醇提物对急性微循环障碍大鼠血小板功能的影响[J].中国微循环,2009,13(3):179-182.
- [3] 侯亚利,赵自刚,牛春雨,等.夏至草醇提物对失血性休克大鼠器官一氧化氮及其合酶的影响[J].中国微循环,2008,12(1):5-7.
- [4] 王伟平,李俊杰,张利民.夏至草提取物对血瘀大鼠器官血流量和血液流变学指标的影响[J].四川中医,2006,24(9):17-18.

(下转第747页)

为便于操作,对上述提取工艺稍作调整,进行验证试验。在固定提取次数为2次的基础上,设定提取温度为95℃、水料比为45:1,提取时间为1.5 h,进行3组平行试验,得到平均提取率为19.16%,与理论值19.39%相近,说明该模型可以很好的预测试验的实际表达情况。

4 结论与展望

本文在单因素试验基础上结合响应面法,重点研究了提取时间、水料比、提取温度三个因素对柴胡多糖提取率的影响。经优化后提到柴胡多糖的最佳提取工艺参数为:提取温度为95℃、水料比为45:1、提取时间为1.5 h,重复提取2次。

植物多糖因其具有多种生理活性,近年来成为植物成分提取方面研究的热点。但因植物多糖中含有较多脂质、蛋白质、色素、盐类等其它物质^[15],对其分离纯化工艺要求较高。在今后的研究中,我们将对柴胡多糖的纯化工艺做进一步研究,以期柴胡多糖的开发利用奠定一定的基础。

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:化学工业出版社,2015:280-281.
- [2] 叶方,杨光义,王刚,等. 柴胡多糖的研究进展[J]. 医药导报,2012,31(8):1042-1045.
- [3] 关皎,朱鹤云,刘洋,等. 紫外分光光度法测定柴胡中多

糖含量[J]. 吉林医学院学报,2016,37(6):413-415.

- [4] 杜柯. 柴胡多糖的结构分析和抗氧化活性的研究[D]. 西安:陕西师范大学,2011.
- [5] 赵香妍,刘长利. 中药柴胡的研究概况与发展趋势[J]. 时珍国医国药,2015,26(4):963-966.
- [6] 潘莹. 冬枣多糖水提醇沉工艺研究[J]. 食品工业,2015,36(1):124-125.
- [7] 陈丽叶,网林冲,吴皓,等. 正交试验优化文蛤水溶性多糖的水提醇沉工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(5):241-242.
- [8] 李小宁,于欢,龚千锋,等. 柴胡总多糖提取工艺优化及其不同炮制品中总多糖的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(14):27-31.
- [9] 黄新仁. 响应面法在生物过程优化中的应用[D]. 长沙:湖南大学,2011.
- [10] 王明艳,张小杰,王涛,等. 响应面法优化香椿叶多糖的提取条件[J]. 食品科学,2010,31(4):106-108.
- [11] 陈炼红,杨丽珠,索化夷,等. 响应面法优化松茸多糖酶法提取工艺及其体外抗氧化分析[J]. 食品科学,2014,35(16):23-25.
- [12] 杨玉娜. 响应面法优化β-环糊精微球固化香精工艺的研究[D]. 西安:陕西科技大学,2013.
- [13] 张艳,李永哲. 响应面法及其在药学领域中的应用[J]. 吉林化工学院学报,2012,29(7):20-24.
- [14] 侯学敏,李林霞,张直峰,等. 响应面法优化薄荷叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品科学,2013,34(06):26-37.
- [15] 邓寒霜. 穿山龙多糖提取、纯化工艺及其体外抗氧化活性研究[D]. 西安:西北大学,2015.

(收稿日期 2017-12-15)

(上接第741页)

- [5] 张健,赵自刚,牛春雨,等. 夏至草醇提物对急性微循环障碍大鼠血液流变性异常的干预作用[J]. 中国血液流变学杂志,2008,18(4):461-464.
- [6] 晁怀宇,万向军,马文波,等. 夏至草醇提物对急性微循环障碍大鼠器官损伤的干预作用[J]. 微循环学杂志,2008,18(2):19-21.
- [7] 张静,庞道然,黄正,等. 夏至草的黄酮类成分研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(16):3224-3228.
- [8] 刘海鸥,虎春艳,赵声兰,等. 滇黄芩总黄酮酶解超声提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国酿造,2016,35(1):110-114.
- [9] 吕丹,王海波,邸学,等. 桑叶药材中总黄酮含量的测

定[J]. 中国药房,2016,27(6):844-845.

- [10] 王飞,樊金拴,冯慧英,等. 青扞针叶总黄酮超声提取及抗氧化活性[J]. 西北林学院学报,2016,31(1):243-249.
- [11] 张黎明,李瑞超,郝利民,等. 响应面优化玛咖叶总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技,2014,30(4):233-239.
- [12] 林建原,李丽红. 响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺[J]. 中国食品学报,2013,13(2):83-90.
- [13] 侯学敏,李林霞,张直峰,等. 响应面法优化薄荷叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品科学,2013,34(6):124-128.

(收稿日期 2017-11-12)