

响应面法优化超声波辅助提取板蓝根中黄酮工艺及其抗氧化活性研究

赵文亭(淄博市临淄区妇幼保健院, 山东 淄博 255400)

摘要: 目的 确定板蓝根黄酮的最佳提取工艺, 并初步评价其抗氧化活性。方法 在单因素实验基础上, 利用响应面法优化板蓝根总黄酮的提取条件; 通过总黄酮对 1, 1-二苯基-2-苦基肼自由基的清除作用来研究其抗氧化活性。结果 板蓝根黄酮最佳提取工艺为料液比 1:24.1、提取时间 29 min 和乙醇浓度 60%, 此条件下黄酮得率为 54.4 mg·g⁻¹; 板蓝根黄酮对 1, 1-二苯基-2-苦基肼自由基具有较好的清除能力。结论 该优化工艺实现了板蓝根中黄酮类化合物的高效提取。

关键词: 板蓝根; 黄酮; 响应面法; 优化; 抗氧化

中图分类号: R284.2; R965

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)03-0313-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.03.013

Optimization of Extracting Flavonoids from Isatidis Radix by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity

ZHAO Wenting(Linzi Maternal and Child Health Hospital of Zibo City, Zibo 255400, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the optimum extraction process of flavonoids from Isatidis Radix and evaluate its antioxidant activity. **METHODS** Based on the single-factor tests, the extraction conditions of total flavonoids from Isatidis Radix were optimized by response surface methodology. Meanwhile, the antioxidant activity of flavonoids was assessed by scavenging assays of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH). **RESULTS** The optimum extraction conditions were as follows: ethanol concentration was 60%, liquid-solid ratio was 1:24.1, and extraction time was 29 min. Under the optimal conditions, the extraction rate of total flavonoids was 54.4 mg·g⁻¹. DPPH radical scavenging capacity of flavonoids was good. **CONCLUSION** The target of extracting flavonoids compound efficiently from Isatidis Radix has been achieved by the optimized technology.

KEY WORDS: Isatidis Radix; flavonoids; response surface analysis; optimization; antioxidant

板蓝根为十字花科植物菘蓝的干燥根, 具有清热解毒、凉血利咽之功效^[1]。近些年, 板蓝根的相关药用成分逐渐引发国内外学者的兴趣, 并对其生物学活性及化学成分进行了研究, 现已分离鉴定了生物碱、木脂素、神经酰胺和黄酮等百余个结构多样的化合物^[2]。植物的抗氧化活性与其主要抗氧化成分(总黄酮、多酚及多糖)的含量有一定的相关性^[3]。研究表明, 板蓝根中的多糖有很强的抗氧化活性^[4]。黄酮类化合物是一类具有广泛开发前景的天然抗氧化剂, 而板蓝根黄酮的提取和抗氧化活性的研究未见报道, 本实验研究板蓝根中黄酮的最佳提取工艺及其抗氧化活性, 以期合理开发利用板蓝根提供理论依据。

溶剂提取法、酶解法、微波辅助提取法以及超声波辅助提取法等是目前常用的提取方法, 其中, 超声波辅助提取法具有提取时间短、效率高、成本低以及降低温度对提取物影响的优点。在提取工艺参数的优化中, 影响因子和响应值之间往

往是高度非线性的关系, 而响应面法采用多元二次回归方程非线性模型来拟合响应值与因素之间关系, 具有精度高、预测性好的特点^[5]。因此, 本实验在单因素试验的基础上, 进一步采用 Design-Expert 设计响应面试验, 对超声波辅助提取板蓝根黄酮的工艺进行优化, 同时通过体外抗氧化活性实验初步评价板蓝根总黄酮的抗氧化活性。

1 仪器与试剂

UV-2600 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); RE-52CS-2 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); ME204 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ2200DB 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); DK-8D 型电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械有限公司); DHG-9240 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技仪器有限公司)。

板蓝根药材购于河北安国市场, 经山东淄博矿业集团公司中心医院吴慧副主任中药师鉴定为

作者简介: 赵文亭, 男, 主管药师

Tel: (0533)7328013

E-mail: qdyyjyk@163.com

十字花科植物菘蓝 *Isatidis indigotica* Fort. 的干燥根；1, 1-二苯基-2-苦基肼(1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)(Sigma 公司, 批号: D9132); 无水乙醇、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠、石油醚、冰乙酸等均为分析纯; 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 10080-200707, 纯度: 98%); 试验用水均为去离子水。

2 方法与结果

2.1 原料预处理

板蓝根药材用去离子水洗净, 自然晾干后置干燥箱内, 45 °C 干燥 12 h, 粉碎, 备用。

2.2 标准曲线制作

精密称取芦丁对照品 10 mg, 60%乙醇溶解, 配制 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的芦丁对照品溶液, 备用。精密量取芦丁对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8 mL, 分别置于 5 个 25 mL 量瓶中; 分别加入 9, 8, 6, 4, 2 mL 60%乙醇, 振摇; 各加 5%亚硝酸钠溶液 0.7 mL, 振摇, 放置 6 min; 各加 10%硝酸铝溶液 0.3 mL, 振摇, 放置 6 min; 各加 1 mol 氢氧化钠溶液 4 mL, 再以 60%乙醇溶液定容, 摇匀; 15 min 后分别在 510 nm 处测定吸光度, 测量 3 次, 取平均值^[6-7]。以芦丁浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标制标准曲线, 得回归方程为: $A=0.012\ 6C-0.000\ 4(R^2=0.999\ 5)$, 线性范围为 4~32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 样品溶液的制备与总黄酮测定

称量一定量的板蓝根样品粉末置圆底烧瓶, 在考察的提取因素条件下(料液比、提取时间和乙醇浓度)加入乙醇水溶液, 超声回流提取, 过滤, 石油醚萃取杂质, 下层溶液旋转蒸发浓缩至黄色黏稠状浓缩液, 用无水乙醇定容至 100 mL, 摇匀, 为样品溶液。取样品溶液 1 mL 移至 25 mL 量瓶中, 按照标准曲线制作方法操作, 测定吸光度, 根据标准曲线计算黄酮浓度, 每组平行 3 次, 取平均值。按照下述公式计算板蓝根中黄酮的得率: 黄酮得率($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)= $(C\times N\times V)/1\ 000M$ 。其中 C 为根据标准曲线计算出的黄酮浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); N 为稀释倍数(为 25); V 为样品溶液体积(为 100 mL); M 为样品质量(g)。

2.4 单因素试验设计及结果

2.4.1 乙醇浓度对板蓝根总黄酮得率的影响 称取 1.0 g 板蓝根样品粉末, 置 100 mL 圆底烧瓶, 固定料液比为 1:20, 分别加入不同浓度(30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%)的乙醇溶液, 超声

提 30 min, 所得提取液按“2.3”项下方法测定吸光度值, 计算黄酮得率, 结果见图 1。可见在料液比和超声时间不变时, 随着乙醇浓度的增大, 黄酮得率先增加后减少, 当乙醇浓度为 60%时, 黄酮得率最高。因此, 本实验选择 60%乙醇溶液。

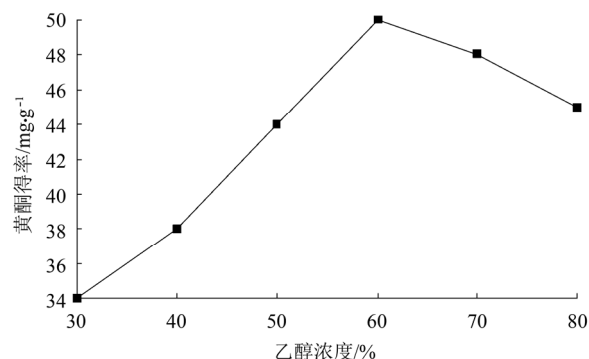


图 1 乙醇浓度对板蓝根总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on flavonoids extraction

2.4.2 料液比对板蓝根总黄酮得率的影响 称取 6 份板蓝根药材粉末, 每份 1.0 g, 置 100 mL 圆底烧瓶, 分别加入 10, 15, 20, 25, 30, 35 mL 60%乙醇溶液, 超声提取 30 min, 提取液按照“2.3”项下方法测定吸光度值, 计算黄酮得率, 结果见图 2。可见料液比在 1:10 和 1:35 之间变化时, 黄酮得率也随之迅速增加, 并在 1:25 后黄酮得率无明显增加变化。因此, 本实验选择的料液比为 1:25。

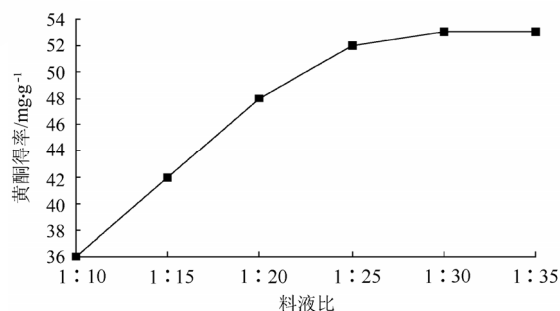


图 2 料液比对板蓝根总黄酮得率的影响

Fig. 2 Effect of material-to-liquid ratio on flavonoids extraction

2.4.3 提取时间对板蓝根总黄酮得率的影响 采用单因素优化后的最佳条件, 即用 25 mL 60%乙醇溶液在 100 mL 圆底烧瓶中浸泡板蓝根药材粉末 1.0 g, 分别超声 15, 20, 25, 30, 35, 40 min, 提取液按“2.3”项下方法测定溶液吸光度值, 计算黄酮得率, 结果见图 3。可见随着超声提取时间

增加, 30 min 以前黄酮得率迅速上升, 在 30 min 后再增加超声时间, 总黄酮得率没有明显增加。因此, 本实验的超声提取时间选择 30 min。

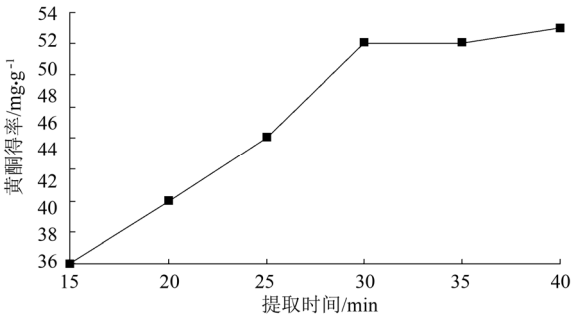


图 3 提取时间对板蓝根总黄酮得率的影响
Fig. 3 Effect of extraction time on flavonoids extraction

2.5 响应面分析

根据单因素试验筛选的料液比、提取时间和乙醇浓度, 采用 Design-Expert 软件设计试验条件, 选用 Box-Behnken 模型, 以料液比(A)、提取时间(B)、乙醇浓度(C)为自变量, 以板蓝根黄酮得率为响应值, 进行响应面分析, 每组平行 3 次, 取平均值, 优化板蓝根黄酮提取工艺。实验因素及水平见表 1, 设计方案与黄酮提取率的响应值见表 2, 方差分析结果见表 3。

表 1 响应面法试验因素水平编码表
Tab. 1 Factors and levels in response surface analysis

料液比(A)	提取时间(B)/min	乙醇浓度(C)/%	水平
1 : 20	25	50	-1
1 : 25	30	60	0
1 : 30	35	70	1

表 2 响应面法试验结果
Tab. 2 Results of response surface methodology

编号	A	B	C	黄酮得率/mg·g ⁻¹
1	1	-1	0	48.1
2	-1	1	0	49.3
3	0	-1	1	49.1
4	0	1	1	48.6
5	0	-1	-1	51.1
6	0	0	0	54.2
7	0	0	0	54.1
8	0	0	0	54.4
9	1	1	0	45.3
10	1	0	-1	49.8
11	1	0	1	42.3
12	0	1	-1	48.3
13	-1	0	1	51.1
14	-1	-1	0	50.7
15	-1	0	-1	46.2
16	0	0	0	54.4
17	0	0	0	54.1

表 3 响应面回归模型方差分析
Tab. 3 Analysis and statistical parameters of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	197.90	9	21.99	285.30	<0.000 1
A-A	17.41	1	17.41	225.83	<0.000 1
B-B	7.03	1	7.03	91.23	<0.000 1
C-C	2.31	1	2.31	29.99	0.000 9
AB	0.49	1	0.49	6.36	0.039 7
AC	38.44	1	38.44	498.76	<0.000 1
BC	1.32	1	1.32	17.16	0.004 3
A ²	64.29	1	64.29	834.14	<0.000 1
B ²	16.55	1	16.55	214.72	<0.000 1
C ²	37.45	1	37.45	485.96	<0.000 1
残差	0.54	7	0.077		
失拟	0.45	3	0.15	6.49	0.051 3
误差	0.092	4	0.023		
总差	198.44	16			

由表 3 可知, 3 个实验因素 $P<0.001$, 表明它们对黄酮得率均有非常显著的影响。其中, 料液比(A)影响最大, 而乙醇浓度(C)的影响则相对最小。经 Design-Expert 软件回归分析, 并进行拟合, 得到 A(料液比)、B(提取时间)、C(乙醇浓度)3 个实验因素对黄酮得率(Y)影响的回归模型方程: $Y=54.24-1.48A-0.94B-0.54C-0.35AB-3.10AC+0.58BC-3.91A^2-1.98B^2-2.98C^2$, 回归模型具有高度的显著性(模型 $<0.000\ 1$), 失拟项不显著; 校正决定系数(R^2_{Adj})为 0.993 8, $R^2=0.997\ 3$, 表明此模型拟合度好, 试验误差小。因此, 该回归方程模型能够反映响应值的变化, 可以利用此模型对提取板蓝根黄酮的工艺参数进行分析和预测。

2.5.1 响应面图分析与优化 通过观察响应曲面的变化情况和等高线的稀疏程度可直观地反映料液比(A)、提取时间(B)和乙醇浓度(C)之间的交互作用对板蓝根黄酮得率的影响。结果见图 4~6。

由图 4~6 可知: ①随着提取时间的延长以及料液比的增大, 总黄酮得率先增加后减少, 但变化程度不明显。提取时间和料液比交互作用显示, 料液比变化曲面比提取时间变化曲面陡峭; 同时, 等高线沿 A 轴(料液比)方向变化相对密集, 明显高于 B 轴(提取时间)方向且呈圆形, 表明料液比对响应值峰值的影响比提取时间大, 二者之间交互作用不显著。②料液比与乙醇浓度交互作用显示, 料液比的变化曲面比乙醇浓度的变化曲面陡峭; 同时, 等高线沿 A 轴(料液比)方向明显比 C 轴(乙

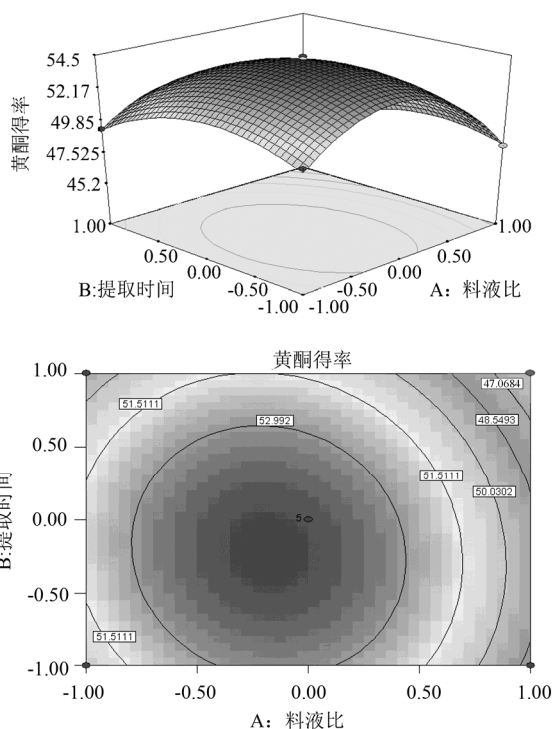


图 4 料液比与提取时间对黄酮得率影响的响应面图和等高线图

Fig. 4 Response surface and contour plots of flavonoids extraction versus material-to-liquid and extraction time

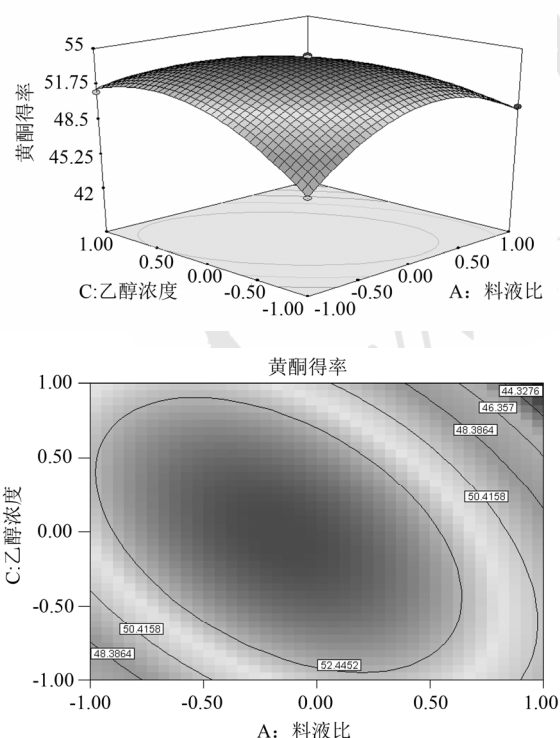


图 5 料液比与乙醇浓度对黄酮得率影响的响应面图和等高线图

Fig. 5 Response surface and contour plots of flavonoids extraction versus material-to-liquid and ethanol concentration

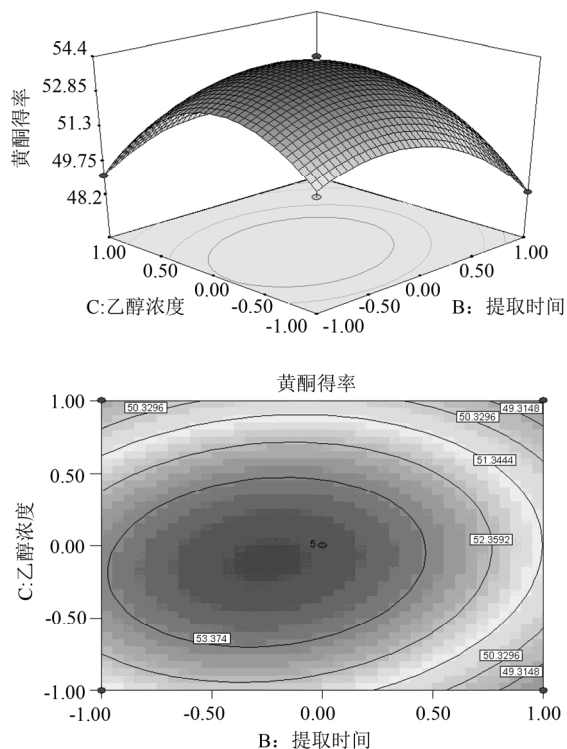


图 6 提取时间与乙醇浓度对黄酮得率影响的响应面图和等高线图

Fig. 6 Response surface and contour plots of flavonoids extraction versus extraction time and ethanol concentration

醇浓度)方向相对密集且呈椭圆形,表明料液比对响应值峰值的影响比乙醇浓度大,二者间相互作用显著。③提取时间与乙醇浓度交互作用显示,乙醇浓度的变化曲面平缓一些;同时,等高线沿 B 轴(提取时间)方向明显比 C 轴(乙醇浓度)方向相对密集且呈椭圆形,表明提取时间对响应值峰值的影响比乙醇浓度大,二者交互作用显著。

2.5.2 优化与验证 根据所得的模型,进一步确定各因素最佳条件,得优化的提取条件:料液比 1:24.15、提取时间 28.85 min、乙醇浓度 59.8%,总黄酮得率达到最大值为 54.5 mg·g⁻¹。为检验试验结果与真实情况的一致性和可靠性,进行验证试验,料液比为 1:24.1、提取时间为 29 min、乙醇浓度为 60%,总黄酮得率为 54.4 mg·g⁻¹。因此,响应面法优化所得的最佳工艺条件可靠,具有实用价值。

2.6 DPPH 法测定抗氧化活性^[8]

精确配制浓度为 0.1 mmol·L⁻¹ 的 DPPH 乙醇溶液,保存于棕色试剂瓶中。向试管中加入 2.0 mL 的 DPPH 乙醇溶液和 2.0 mL 不同浓度的板蓝根黄酮乙醇溶液,充分混合,室温,避光反应 30 min

后测定在 517 nm 处的吸光度 $A_{\text{实验}}$ ；以等体积的无水乙醇代替板蓝根黄酮溶液，同法操作，测定吸光度为 $A_{\text{空白}}$ ；以等体积的无水乙醇代替 DPPH 乙醇溶液，加入不同浓度的板蓝根黄酮溶液，同法操作，测定吸光度为 $A_{\text{对照}}$ 。采用抗坏血酸(vitamin C, VC)作为对照，每组平行测量 3 次，取其平均值。DPPH 自由基清除能力按如下公式计算：清除率(%)=[1-($A_{\text{实验}}-A_{\text{对照}}$)/ $A_{\text{空白}}$] $\times$ 100%。

板蓝根黄酮和 VC 对 DPPH 自由基的清除能力的结果见图 7，采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析。与 VC 对照组比较，板蓝根黄酮对 DPPH 自由基的清除能力在 10~80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 均较显著($P<0.05$)，且清除率随着样液浓度的增加而增强，呈现明显的量效关系，当清除率达到 50%时，所需的总黄酮 IC_{50} <阳性对照 VC。

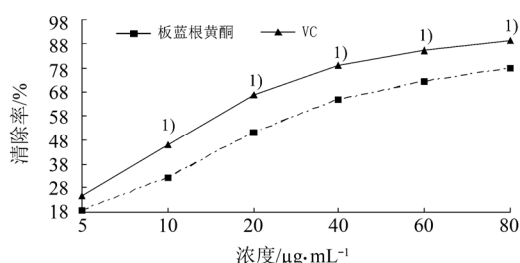


图 7 DPPH 自由基的清除能力($n=3$)
与 VC 对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 7 The scavenging capacity of DPPH free radical($n=3$)
Compared with VC control group, ¹⁾ $P<0.05$.

3 讨论

本研究以常见药材板蓝根为研究对象，经过清洗、烘干和粉碎，超声波辅助提取黄酮。因黄酮类化合物一般易溶于水、乙醇、甲醇溶液等极性溶剂，而采用乙醇提取方法可以有效地避免多糖、鞣质和果胶等杂质对试验结果的干扰^[9]，实验中选择考察了不同浓度的乙醇溶液对板蓝根黄酮得率的影响；超声提取时间的延长，可以提高板蓝根黄酮的提取效率，但随着超声提取时间的延长，会导致板蓝根中其他成分相应溶出，提取黄酮的纯度会降低^[6]；恰当的料液比不仅可以有效地提取黄酮，且不会造成溶剂的浪费。经响应面回归模型方差分析显示，本实验选择的料液比、提取时间和乙醇浓度 3 个考察因素对黄酮得率均有非常显著的影响($P<0.001$)，根据 3 个考察因素进

行 Design-Expert 软件设计试验条件能够比较准确地反映黄酮得率的变化。

DPPH 自由基清除机制是基于 DPPH 自由基有单电子，在 517 nm 处有强吸收，当有自由基清除剂存在时，DPPH 的颜色通过单电子转移反应或氢转移反应清除。抗氧化活性实验表明，板蓝根总黄酮对 DPPH 自由基具有较好的清除作用，但弱于阳性对照，其原因可能是由于空间位阻决定反应的倾向，VC 作为小分子物质比黄酮更易接近自由基而具有相对较高的抗氧化能力^[8]。板蓝根黄酮的抗氧化性为其进一步的开发提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] LI H B, YAN D, WU Y S, et al. Bio-evaluation methods and optimization for Isatidis Radix quality control based on antiviral activity detection [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2011, 42(8): 1560-1565.
- [2] WANG X L, CHEN M H, WANG F, et al. Chemical constituents from root of *Isatis indigotica* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(8): 1172-1182.
- [3] LIU C C, WEI W L, LIAO L L, et al. Contents of main components of antioxidation resistance in six kinds of heat-clearing herbs in Guizhou [J]. Guizhou Agric Sci(贵州农业科学), 2012, 40(2): 41-43.
- [4] XIAO P, CHEN J W, CHEN Y Y, et al. Study on decoloring process of *Isatidis indigotica* with active carbon polysaccharide from and its antioxidant activity [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2014, 26(12): 2041-2045, 2021.
- [5] HUANG H, ZENG L J, MO Y C, et al. Optimization of ultrasonic extraction of total flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt. using response surface methodology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(8): 947-951.
- [6] ZHONG W F, WANG Y H, LIU H Y. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Suaeda salsa* by response surface methodology [J]. J Nucl Agric Sci(核农学报), 2015, 29(6): 1135-1141.
- [7] FAN X L, YAN J Z, ZHANG C, et al. Optimization of technology for supercritical CO_2 extraction of total flavones from *Viola yedoensis* Makino by response surface method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(2): 172-178.
- [8] JIANG H W, YANG T T, LI J Q, et al. Response surface methodology for optimization of microwave-assisted extraction and antioxidant activity of anthocyanins from red rice [J]. J Chin Ins Food Sci Tech(中国食品学报), 2015, 15(5): 74-81.
- [9] PU B, YUE J M, CHEN A J, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction process of polysaccharides from *Truffles* by response surface methodology [J]. J Nucl Agric Sci(核农学报), 2013, 27(7): 996-1002.

收稿日期: 2015-10-19