

[制 剂]

复方苳蓉颗粒总黄酮提取工艺优化及其体外抗氧化活性

高建德， 宋开蓉， 朱晓玉， 刘 雄*， 陈 晖
(甘肃中医药大学，甘肃 兰州 730000)

摘要：目的 优化复方苳蓉颗粒总黄酮提取工艺，并评价其体外抗氧化活性。**方法** 在单因素试验基础上，以乙醇体积分数、料液比、提取时间为影响因素，总黄酮提取率为评价指标，响应面法优化提取工艺。然后，测定总黄酮对 DPPH·、·OH 自由基的清除作用。**结果** 最佳条件为乙醇体积分数 65%，料液比 1：10，提取时间 2.5 h，总黄酮提取率 20.93%。总黄酮对 2 种自由基有明显的清除作用，并呈量效关系。**结论** 该方法稳定可靠，可用于提取具有显著体外抗氧化活性的复方苳蓉颗粒总黄酮。

关键词：复方苳蓉颗粒；总黄酮；提取；体外抗氧化活性；响应面法

中图分类号：R284.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2018)07-1496-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.07.010

Extraction optimization for total flavonoids from Compound Congrong Granules and the *in vitro* antioxidant activity

GAO Jian-de, SONG Kai-rong, ZHU Xiao-yu, LIU Xiong*, CHEN Hui
(Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the extraction for total flavonoids from Compound Congrong Granules and to evaluate the *in vitro* antioxidant activity. **METHODS** With ethanol concentration, solid-liquid ratio and extraction time as influencing factors, extraction rate of total flavonoids as an evaluation index, response surface method was applied to optimizing the extraction on the basis of single factor test. And the scavenging effects of total flavonoids on DPPH·, ·OH free radicals were determined. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 65% for ethanol concentration, 1:10 for solid-liquid ratio, and 2.5 h for extraction time, total flavonoids demonstrated the extraction rate of 20.93%. The total flavonoids exhibited obvious scavenging effects on two free radicals in a dose-dependent manner. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the extraction for total flavonoids with significant *in vitro* antioxidant activity from Compound Congrong Granules.

KEY WORDS: Compound Congrong Granules; total flavonoids; extraction; *in vitro* antioxidant activity; response surface method

复方苳蓉颗粒是经《养老奉亲书》中经典方苳蓉丸改制而成，主治老年肝肾亏虚、视力减退，由肉苳蓉、巴戟天、枸杞、菊花 4 味药材组成，但其传统上以原药材粉末入药，存在服用量大、溶散崩解困难等问题，而颗粒剂具有剂量小，服用、携带、贮藏、运输方便，久置不易变质，稳定性理想

等优点。因此，课题组前期对其进行改制。

药理研究表明，黄酮类化合物具有抗血栓、抗衰老、抗动脉硬化、抗心率失常等作用，广泛应用于食品、医药、化妆品等行业，开发应用前景较广^[1]，其中菊花中该成分具有抗过敏、抗肿瘤、抗氧化、抗诱变等药理作用^[2-3]；枸杞中该成分有

收稿日期：2017-06-01

基金项目：甘肃省中医药管理局科研项目（GZK-2015-27）；甘肃省中医药挖掘与创新转化重点实验室开放基金项目（ZYFYZH-KJ-2015-002）；甘肃省科技计划项目（1308RJZA207）

作者简介：高建德（1981—），男，博士，副教授，从事中药有效成分与质量标准研究。E-mail: namegaojiande_2005@163.com

* 通信作者：刘 雄（1964—），男，教授，硕士生导师，从事中药有效成分与质量标准研究。Tel:（0931）8765391, E-mail: lx@gzsy.edu.cn

1496

着扩张冠状动脉、增强心脏收缩、减少心脏搏动数、清除自由基等作用^[4]；肉苁蓉中该成分作为功能性原料，可开发成多种形式的特殊营养品、保健品等，具有很高的经济价值。

目前，在中药提取工艺优化方法中，尽管正交设计和均匀设计操作简便，试验次数少，但精密度不佳^[5]；响应面法是采用多元二次回归方法作为函数估计的工具，具有回归方程精度高、试验周期短等优点，广泛应用于食品、农业、化工、中药等领域^[6-7]。因此，本实验采用响应面法优化复方苁蓉颗粒总黄酮提取工艺，并评价其体外抗氧化活性，以期为该制剂开发利用提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Labtech 紫外分光光度仪（北京莱伯泰科技有限公司）；CS101-1 鼓风干燥箱、MH-1000 电热套（北京科伟永兴仪器有限公司）；HH-4 水浴锅（国华电器有限公司）；AL104 电子天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司）；电热恒温水浴锅（浙江省余姚市检测仪表厂）；AKRYUP-1816 超纯水机（成都唐氏康宁科技发展有限公司）。

1.2 试剂 肉苁蓉、巴戟天、枸杞、菊花均购自兰州复兴厚药材有限责任公司，经甘肃中医药大学中药鉴定教研室杨扶德教授鉴定为正品。芦丁对照品（中国食品药品检定研究院，批号 100080-200306，含量 > 98%）。所用试剂均为分析纯；水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定^[8]

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取芦丁对照品 4 mg，置于 10 mL 量瓶中，75% 乙醇溶解并定容至刻度，摇匀，即得（0.4 mg/mL）。

2.1.2 供试品溶液制备 精密称取处方药材 5 份（肉苁蓉 10 g、枸杞 5 g、巴戟天 5 g、菊花 5 g），60 ℃ 乙醇回流提取，浓缩干燥得浸膏，置于 250 mL 量瓶中，75% 乙醇定容至刻度，摇匀，即得。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，精密加入 5% 亚硝酸钠试液 0.4 mL，摇匀，静置 6 min 后，精密加入 10% 硝酸铝溶液 0.4 mL，摇匀，放置 6 min，再精密加入 4% 氢氧化钠试液 4 mL，75% 乙醇定容至刻度，摇匀，放置 15 min，以相应试剂为空白对照，在 510 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标

（A），质量浓度为横坐标（X）进行回归，得回归方程为 $A = 0.523X - 0.0109$ （ $R^2 = 0.9997$ ），在 0.016 ~ 0.08 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.1.4 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下供试品溶液 0.2 mL，置于 10 mL 量瓶中，按“2.1.3”项下方法显色后平行测定 6 次吸光度，测得其 RSD 为 1.6%，表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 精密吸取“2.1.2”项下供试品溶液 0.2 mL，置于 10 mL 量瓶中，按“2.1.3”项下方法显色后，于 0、0.5、1、1.5、2、3、5、8 h 测定吸光度，测得其 RSD 为 1.8%，表明溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 精密吸取“2.1.2”项下供试品溶液 6 份，每份 0.2 mL，按“2.1.3”项下方法显色后测定吸光度，测得其 RSD 为 1.9%，表明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密吸取 6 份总黄酮含量已知的供试品溶液 1.0 mL，加入“2.1.1”项下对照品溶液适量，按“2.1.3”项下方法显色后测定吸光度，测得其平均加样回收率为 98.73%，RSD 为 1.3%。

2.1.8 总黄酮得率测定 取 1 mL 供试品溶液，按“2.1.3”项下方法显色后测定吸光度，测得 1 mL 供试品溶液中的总黄酮含量，计算提取率 X，公式为 $X = CV/M$ ，其中 C 表示提取后供试品溶液中总黄酮含量，V 表示提取液总体积，M 表示药材处方质量。

2.2 单因素试验

2.2.1 乙醇体积分数 按处方配比称取药材 125 g，分成 5 组，乙醇体积分数分别为 45%、55%、65%、75%、85%，料液比 1 : 10，提取 2 次，每次 1 h，结果见图 1。由图可知，随着乙醇体积分数升高，总黄酮得率增加；在 65% 时，得率最大；再继续升高时，得率反而降低，故选择乙醇体积分数为 55% ~ 75%。

2.2.2 料液比 按处方配比称取药材 125 g，分成 5 组，料液比分别为 1 : 6、1 : 8、1 : 10、1 : 12、1 : 15，65% 乙醇提取 2 次，每次 1 h，结果见图 2。由图可知，当料液比小于 1 : 8 时，总黄酮得率上升较缓慢；在 1 : 10 时，得率最大；超过 1 : 10 时，得率反而降低，故选择料液比为 1 : 8 ~ 1 : 12。

2.2.3 提取时间 按处方配比称取药材 125 g，分成 5 组，提取时间分别为 1、1.5、2、2.5、3 h，65% 乙醇以料液比 1 : 10 提取 2 次，每次 1 h，结

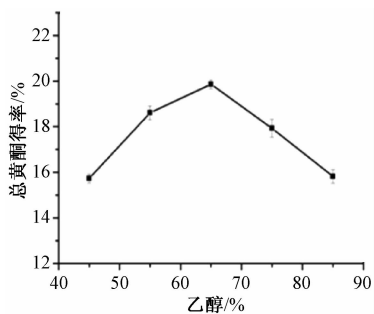


图 1 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on total flavonoids yield

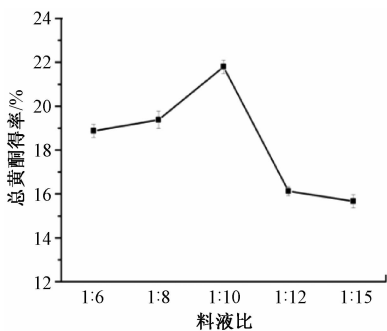


图 2 料液比对总黄酮得率的影响

Fig. 2 Effect of solid-liquid ratio on total flavonoids yield

果见图 3。由图可知，总黄酮得率随着提取时间延长而逐渐增加；在 2.5 h 时，得率最大；再继续延长时，得率反而降低，故选择提取时间为 2.0 ~ 3.0 h。

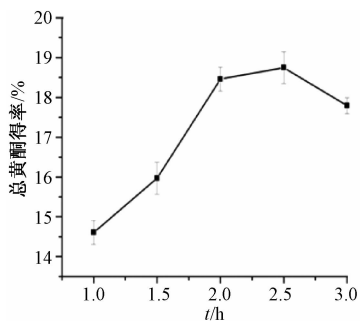


图 3 提取时间对总黄酮得率的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on total flavonoids yield

2.3 响应面法 在单因素试验基础上，以总黄酮得率（Y）为评价指标，乙醇体积分数（A）、料液比（B）、提取时间（C）为影响因素，因素水平见表 1，结果见表 2，方差分析见表 3。再通过 Design-Expert 8.05 软件进行多元回归分析，得到回归方程为 $Y = 21.27 + 0.22A + 0.42B + 0.17C - 0.46AB - 0.14AC - 0.89BC - 2.06A^2 - 1.86B^2 - 1.73C^2$ 。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 乙醇/%	B 料液比	C 提取时间/h
-1.682	48.18	1 : 7	1.66
-1	55	1 : 8	2
0	65	1 : 10	2.5
1	75	1 : 12	3
1.682	81.82	1 : 14	3.34

表 2 试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	A	B	C	总黄酮得率/%
1	-1	-1	-1	17.43
2	1	-1	-1	16.73
3	-1	1	-1	17.22
4	1	1	-1	17.04
5	-1	-1	1	17.36
6	1	-1	1	17.44
7	-1	1	1	14.94
8	1	1	1	14.82
9	-1.682	0	0	14.78
10	1.682	0	0	14.74
11	0	-1.682	0	13.35
12	0	1.682	0	17.29
13	0	0	-1.682	14.46
14	0	0	1.682	16.94
15	0	0	0	21.31
16	0	0	0	21.31
17	0	0	0	21.31
18	0	0	0	21.31
19	0	0	0	21.31
20	0	0	0	21.31

表 3 方差分析

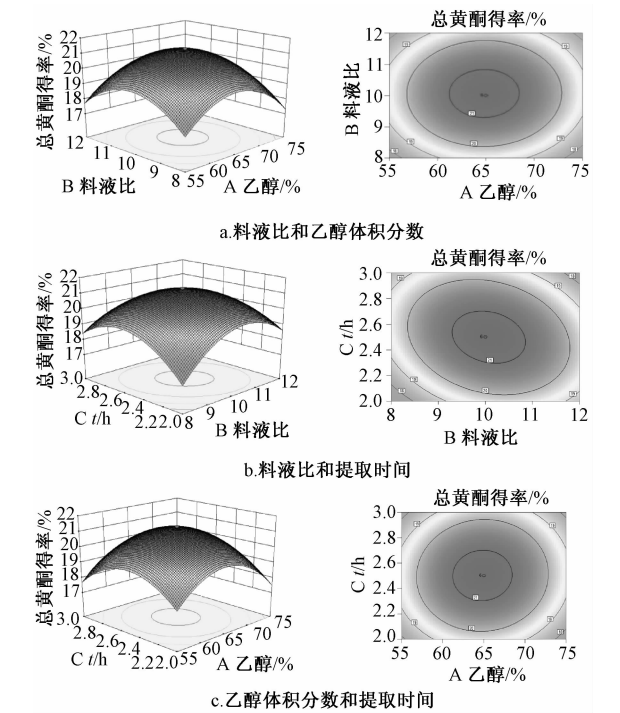
Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	F 值	P 值
模型	140.21	9	11.00	<0.01
A	0.67	1	2.44	<0.05
B	1.37	1	5.74	<0.05
C	0.38	1	0.27	>0.05
AB	0.79	1	7.21	<0.05
AC	0.17	1	0.12	>0.05
BC	6.39	1	4.51	>0.05
A ²	61.02	1	43.08	<0.01
B ²	49.84	1	35.19	<0.01
C ²	42.92	1	30.30	<0.01
残差	14.16	10	—	—
失拟项	2.16	5	0.62	>0.05
纯误差	0.000	5	—	—
总离差	154.37	19	—	—

由表 3 可知，相关系数 R^2 为 0.908 2，表明模型相关性较好，实验误差小，能准确预测实际情况； R^2_{adj} 为 0.825 7，表明实验可信度较高；失拟项 $P > 0.05$ ，表明模型失拟不显著。同时，各因素对

提取率的影响程度依次为 B > A > C, 即乙醇体积分数 > 料液比 > 提取时间。

响应面分析见图 4。由此确定, 最优工艺为乙醇体积分数 65%, 料液比 1 : 10, 提取时间 2.5 h。



注: 左图为响应面图, 右图为等高线图

图 4 各因素响应面图

Fig. 4 Response surface plots for various factors

2.4 验证试验 提取药材 3 份, 每份 25 g, 根据最优工艺进行 3 批验证试验, 结果见表 4, 表明模型拟合效果良好, 可信度高。

表 4 验证试验结果 (n = 3)

Tab. 4 Results of verification tests (n = 3)		
试验号	得率/%	平均值/%
1	20.65	20.93
2	21.31	
3	20.81	

2.5 体外抗氧化活性

2.5.1 DPPH · 自由基清除作用^[9-10] 精密称取 DPPH · 4.4 mg, 无水乙醇溶解并定容至 100 mL 棕色量瓶中, 避光保存。精密量取最优工艺下总黄酮溶液 2.0 mL (质量浓度分别为 1.28、2.56、3.84、5.12、6.40 mg/mL), 与 2.0 mL DPPH · 溶液混合摇匀, 室温 (暗处) 下反应后静置 30 min, 在 517 nm 波长处测定吸光度。空白组为 2.0 mL 无水乙醇和 2.0 mL 总黄酮溶液, 对照组为 2.0 mL 无水乙醇和 2.0 mL DPPH · 溶液, 计算清除率 E, 公式为 $E = \{ [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \} \times 100\%$ (A_1

为总黄酮溶液吸光度, A_2 为空白组吸光度, A_0 为对照组吸光度), 结果见图 5A。由图可知, 在 1.28 ~ 6.4 mg/mL 范围内, 对 DPPH · 自由基的清除率随着总黄酮溶液质量浓度增大而提高, 两者呈正相关关系。

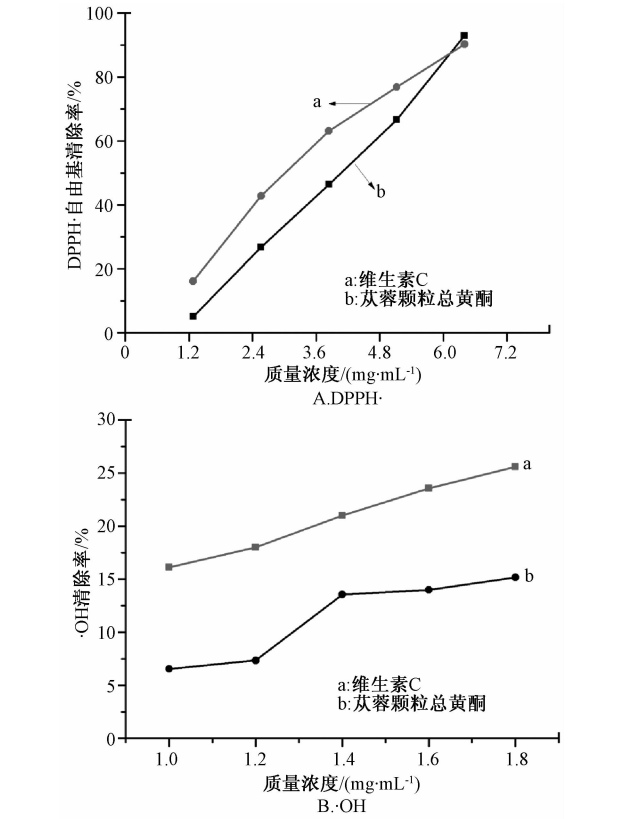


图 5 总黄酮体外抗氧化活性测定结果

Fig. 5 Results of *in vitro* antioxidant activity determination of total flavonoids

2.5.2 ·OH 自由基清除作用^[11] 取 5 支 25 mL 比色管, 加入 6.0 mmol/L FeSO₄、水杨酸各 2.0 mL, 再加入 2.0 mL 总黄酮溶液 (质量浓度分别为 1.28、2.56、3.84、5.12、6.40 mg/mL) 于试管中, 混匀后静置 10 min, 再加入 6.0 mmol/L H₂O₂ 2 mL, 混匀, 室温下反应 1 h, 在 517 nm 波长处测定样品吸光度 (A_1)、蒸馏水代替总黄酮溶液的吸光度 (A_2)、蒸馏水代替水杨酸的吸光度 (A_0), 按“2.5.1”项下方法计算清除率, 结果见图 5B。由图可知, 随着总黄酮溶液质量浓度增加, 对 ·OH 自由基的清除率不断升高^[12]。

3 讨论

单因素试验结果表明, 乙醇体积分数在低于 65% 时, 组织细胞内外浓度差较大, 有利于总黄酮溶出; 在高于 65% 时, 醇溶性色素、亲脂性成分的溶出量增加, 并且这些成分会与乙醇-水分子结

合，导致总黄酮与后者结合的可能性下降，提取率呈现降低趋势^[13]。

在提取的初始阶段，由于原料、提取液体系间存在浓度差，总黄酮得率将随提取时间延长而增加；再继续延长时，大量水溶性杂质（如多糖）溶出，提取液变得黏稠，从而对总黄酮产生吸附作用，导致其得率反而降低^[14]。

参考文献：

[1] 孙 萍，李 艳，杨秀菊. 肉苁蓉总黄酮的微波提取及含量测定[J]. 现代中药研究与实践，2003，17(2)：28-29.

[2] 王 岩，谢媛媛，孙嘉鸿，等. 菊花提取物中总黄酮与总有机酸的含量测定[J]. 沈阳药科大学学报，2011，28(2)：124-129.

[3] 王婷婷，王少康，黄桂玲，等. 菊花主要活性成分含量及其抗氧化活性测定[J]. 食品科学，2013，34(15)：95-99.

[4] 张自萍，黄文波. 枸杞总黄酮和多糖的超声提取及含量测定[J]. 农业科学研究，2006，27(1)：22-24.

[5] 余小翠，刘高峰. 响应面分析法在中药提取和制备工艺中的应用[J]. 中药材，2010，33(10)：1651-1655.

[6] 栾庆祥，赵 杨，周 欣，等. 单因素试验结合响应面分析法优化杜仲最佳提取工艺[J]. 药物分析杂志，2013，33(5)：859-865.

[7] 刘敦华，董文江，陈正行. 响应面法优化超声波提取枸杞黄酮的工艺研究[J]. 粮油加工，2010(3)：99-103.

[8] 李艳茸，杨立新，冯伟红，等. 甘青乌头总黄酮提取精制工艺研究[J]. 中药材，2014，37(4)：670-674.

[9] 方 敏，宫智勇，王耀峰. 玉米须乙醇提取物体外抗氧化活性研究[J]. 中国食物与营养，2008(4)：45-47.

[10] 董红敏，李 路，沈丽雯，等. 川明参中蛋白与多糖的同步提取及抗氧化性测定[J]. 中成药，2016，38(1)：207-212.

[11] 陈 佳，徐怀德，米林峰，等. 洋葱皮总黄酮纤维素酶法提取及抗氧化研究[J]. 食品科学，2011，32(4)：37-41.

[12] 张唐伟，杨 乐，柳青海，等. 地木耳多糖的抗氧化性与抑菌作用[J]. 食品与生物技术学报，2011，30(6)：868-873.

[13] 朱 珠，冷进松. 响应面分析法优化仙人掌黄酮提取工艺[J]. 食品科学，2010，31(22)：185-189.

[14] 肖卫华，韩鲁佳，杨增玲，等. 响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究[J]. 中国农业大学学报，2007，12(5)：52-56.

豨桐凝胶膏剂基质处方的优化及其体外释放度

滕希峰¹， 梁颖欣¹， 陈远云¹， 许晓华²， 余秋杏¹， 何 琳^{2*}

(1. 广东药科大学中药学院，国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点研究室，广东 广州 510006；
2. 广东药科大学医药化工学院，广东省化妆品工程技术研究中心，广东 中山 528458)

摘要：目的 优化豨桐凝胶膏剂基质处方，并考察其体外释放度。**方法** 以聚丙烯酸钠、明胶、聚乙烯醇、甘油用量为影响因素，综合评分（初黏力、膜残留量、膏体性状、涂展性、渗出度、皮肤追随性）为评价指标，Box-Behnken 响应面法优化基质处方。以奇任醇为指标成分，Franz 扩散池法进行体外释放度试验，计算累积释放率。**结果** 最佳基质处方为聚丙烯酸钠用量 5.0 g，明胶用量 5.0 g，聚乙烯醇用量 2.0 g，甘油用量 2.0 g，柠檬酸用量 0.2 g，甘羟铝用量 0.1 g，综合评分 94.667。奇任醇在 12 h 内的累积释放率为 76.74%，释放过程符合 Weibull 方程。**结论** 该方法稳定可靠，优化后豨桐凝胶膏剂基质处方的体外释放度较高。

关键词：豨桐凝胶膏剂；基质处方；体外释放度；Box-Behnken 响应面法；Franz 扩散池法

中图分类号：R944 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2018)07-1500-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.07.011

收稿日期：2018-02-26

基金项目：广东药学院“创新强校工程”医药化工省级实验教学示范中心资助项目（2015）；广东药学院 2015 国家级大学生创新创业训练计划项目（201510573004）。

作者简介：滕希峰（1977—），男，讲师，从事新药资源研究与开发。Tel：(020) 39352176，E-mail：xfteng78@163.com

* 通信作者：何 琳（1980—），女，讲师，从事新药剂型研究与开发。Tel：(0760) 88207977，E-mail：helin721@163.com