

[科研报道]

补骨脂总黄酮提取工艺的优化

鲁宪坤¹, 翟鑫源¹, 李方红¹, 王 萧¹, 张富坤¹, 张珊珊², 赵 盼¹, 赵东升^{1*}
(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东中医药大学实验中心, 山东 济南 250355)

摘要: **目的** 优化补骨脂总黄酮提取工艺。**方法** 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、液料比、提取温度为影响因素, 总黄酮提取率、DPPH 清除率为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。**结果** 最佳条件为乙醇体积分数 93%, 液料比 42:1, 提取温度 41℃, 总黄酮提取率、DPPH 清除率分别为 (88.56±0.09)%、(34.52±0.15)%。**结论** 该方法稳定可行, 可为后续深入开发利用补骨脂总黄酮提供理论基础。
关键词: 补骨脂; 总黄酮; 提取工艺; Box-Behnken 响应面法
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)01-0193-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.01.036

随着机体的衰老, 一些内源性抗氧化酶的活力逐渐降低, 使得小分子活性氧自由基在体内蓄积过多, 细胞膜中的不饱和脂肪酸被过多的活性氧自由基损害, 引起脂质过氧化反应^[1-2], 这类反应会对细胞器的结构和功能产生损害, 并且引起细胞受损甚至死亡, 导致心血管疾病、神经退行性疾病和癌症等疾病^[3-6]。为了降低脂质过氧化对机体造成的损伤, 研发抗氧化剂已成为热点, 而中药作为优良的自然抗氧化剂, 正获得了人们青睐。

补骨脂为豆科补骨脂属植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实, 已广泛应用于医疗、食品、化妆品等多个领域, 具有多种生物作用, 如抗氧化、抗菌、雌激素样、抗抑郁、抗肿瘤、抗骨质疏松等^[7-9], 主要含有黄酮、苯并呋喃、单萜酚、香豆素、拟雌内酯等活性成分^[7-8,10], 现已从中分离出黄酮、二氢黄酮、异黄酮、查尔酮等五十余种黄酮^[7-8]。目前, 对补骨脂黄酮的研究大多为补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮甲醚等单一成分, 或醇提黄酮的药理活性或构-效关系^[9,11-13], 鲜有涉及总黄酮提取工艺。

中药所含成分复杂, 仅凭借个别化合物含量高低来评价其提取工艺的优劣具有一定局限性, 若能采用提取率与生物活性相整合的方法, 则可更综合全面地进行评价^[14-16]。因此, 本实验在整合“成分-抗氧化活性”的模式下, 以提取率、体外抗氧化活性为指标, 采用双响应面法优化补骨脂总黄酮提取工艺, 以期为该成分的深入研发利用提供理论依据。

1 材料

1.1 试剂与药物 芦丁对照品 (纯度大于 98%, 上海源叶生物科技有限公司)。1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH, 纯度≥97%) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限

公司。补骨脂 (产地四川) 购自安徽亳州中药材批发市场, 经山东中医药大学孙稚颖教授鉴定为豆科补骨脂属植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实。亚硝酸钠 (分析纯, 中国医药集团上海化学试剂公司); 硝酸铝 (分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 氢氧化钠 (分析纯, 天津市汇杭化工科技有限公司); 无水乙醇 (分析纯, 天津富宇精细化工有限公司)。

1.2 仪器 X-5 紫外可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司); ST 16R 高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技有限公司); KQ-500GVDV 双频恒温数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 精密称取 0.5 g 药材粉末, 置于 50 mL 离心管中, 超声提取后 13 000 r/min 离心 25 min, 取上清液, 即得。

2.2 总黄酮含量测定

2.2.1 方法学考察

2.2.1.1 线性关系考察 采用 NaNO₂-Al (NO₃)₃-NaOH 显色法^[17], 分别精密吸取 0.2 mg/mL 芦丁对照品溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加水至 2.5 mL, 加入 0.4 mL 5% NaNO₂ 溶液, 摇匀, 反应 6 min; 0.4 mL 10% Al (NO₃)₃ 溶液, 摇匀, 反应 6 min; 6.0 mL 4% NaOH 溶液, 无水乙醇定容至刻度, 摇匀, 室温静置 15 min, 在 510 nm 波长处测定吸光度, 平行 3 次, 取平均值, 以吸光度为纵坐标 (A), 芦丁质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程为 $A = 11.936X - 0.0034$ ($r = 0.9992$), 在 0~0.05 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.2.1.2 精密度试验 精密吸取 0.2 mg/mL 芦丁对照品溶

收稿日期: 2021-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81903780); 山东省中医药科技发展计划项目 (2019-0030); 山东省大学生创新创业训练计划项目 (S202010441051); 山东中医药大学中药资源保护与质量评价青创团队支持项目 (2021)

作者简介: 鲁宪坤 (1999—), 男, 从事中药新药研究与开发工作。E-mail: 1538619012@qq.com

* **通信作者:** 赵东升 (1983—), 男, 博士, 讲师, 从事中药质量控制和安全性评价研究。E-mail: dongshengpw2008@163.com

液 0.5 mL, 按“2.2.1.1”项下方法测定吸光度 6 次, 测得其 RSD 为 1.23%, 表明仪器精密度良好。

2.2.1.3 稳定性试验 取“2.1”项下供试品溶液 0.2 mL, 于 0、2、4、8、24、48 h 按“2.2.1.1”项下方法测定吸光度, 测得其 RSD 为 1.53%, 表明溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.1.4 重复性试验 精密称取 0.5 g 药材粉末, 平行 6 份, 按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1.1”项下方法测定吸光度, 测得其 RSD 为 0.74%, 表明该方法重复性良好。

2.2.1.5 加样回收率试验 精密称取总黄酮含量已知的药材粉末 0.5 g, 平行 12 份, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 其中 3 份为空白, 其他 9 份每 3 份分别加入高、中、低质量浓度芦丁对照品溶液, 按“2.2.1.1”项下方法测定吸光度, 计算回收率。结果, 芦丁平均加样回收率为 101.35%, RSD 为 1.13%。

2.2 抗氧化活性研究 参考文献 [18] 报道的方法并稍作修改, 计算公式为 $\text{DPPH 清除率} = (1 - \frac{A_i A_j}{A_0}) \times 100\%$, 其中 A_0 为 DPPH 在 517 nm 波长处的吸光度, A_i 为提取液与 DPPH 作用后在 517 nm 波长处的吸光度, A_j 为提取液在 517 nm 波长处的吸光度。

2.3 单因素试验 精密称取 0.5 g 药材粉末, 分别设定乙醇体积分数为 60%、70%、80%、90%、100%, 液料比为 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1, 提取温度为 30、40、50、60、70 ℃, 提取时间为 20、30、40、50、60 min, 提取功率为 250、300、350、400、450 W。

2.3.1 乙醇体积分数 由图 1 可知, 乙醇体积分数在 70%~90% 范围内时, 总黄酮提取率明显升高 ($P<0.05$), 在 90% 时达到最大值, 但在 100% 时略有降低; DPPH 清除率随乙醇体积分数的变化趋势与总黄酮提取率呈现较好的一致性。因此, 选择 80%~100% 作进一步优化。

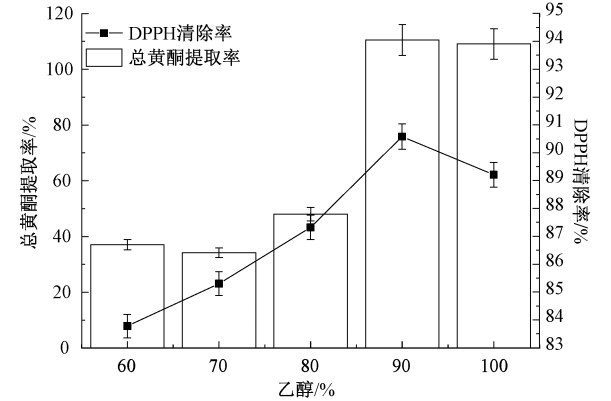


图 1 乙醇体积分数对总黄酮提取率、DPPH 清除率的影响

2.3.2 液料比 由图 2 可知, 随着液料比升高, 总黄酮提取率、DPPH 清除率均大体呈先升后降的趋势, 在 40:1 时均达到最大值。因此, 选择 30:1~50:1 作进一步优化。

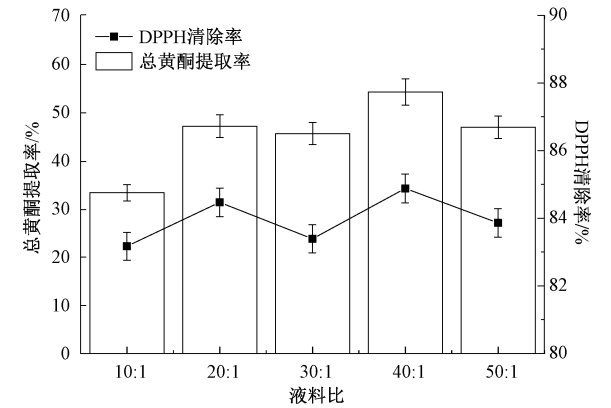


图 2 液料比对总黄酮提取率、DPPH 清除率的影响

2.3.3 提取温度 由图 3 可知, 随着提取温度升高, 总黄酮提取率、DPPH 清除率均呈先升后降的趋势, 在 30~50 ℃ 时两者一致性良好; 在 50 ℃ 后 DPPH 清除率急剧下降, 总黄酮与提取率一致性较差, 这可能是由于过高的温度在很大程度上破坏了具有体外抗氧化活性成分的结构, 从而使其清除率显著降低。因此, 选择 30~50 ℃ 作进一步优化。

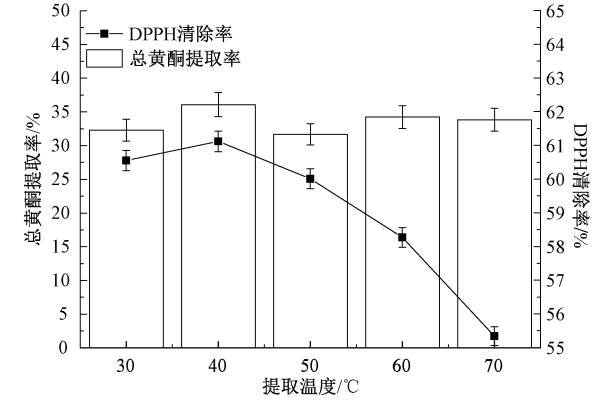


图 3 提取温度对总黄酮提取率、DPPH 清除率的影响

2.3.4 提取时间 由图 4 可知, 提取时间对总黄酮提取率无明显影响。从节约成本、DPPH 清除率角度考虑, 选择 30 min 并不再作进一步优化。

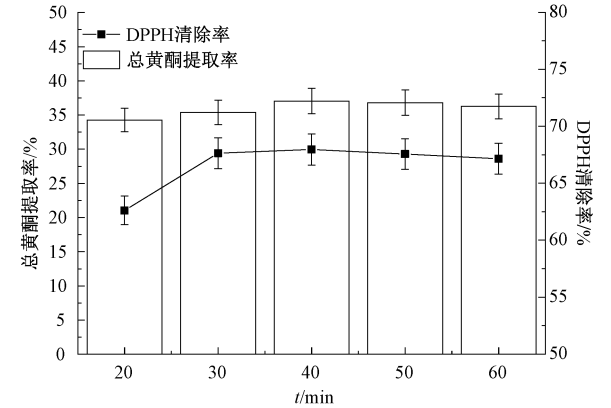


图 4 提取时间对总黄酮提取率、DPPH 清除率的影响

2.3.5 提取功率 由图 5 可知,提取功率对总黄酮提取率无明显影响。从节约成本、DPPH 清除率角度考虑,选择 350 W 并不再作进一步优化。

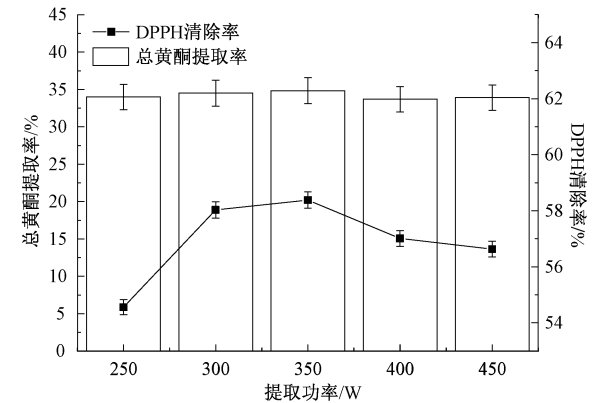


图 5 提取功率对总黄酮提取率、DPPH 清除率的影响

2.4 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验基础上,选择乙醇体积分数(A)、液料比(B)、提取温度(C)作为影响因素,总黄酮提取率(Y_1)、DPPH 清除率(Y_2)作为评价指标,采用 Design-Expert 8.0.6 软件安排试验,因素水平见表 1,结果见表 2。

表 1 因素水平			
水平	因素		
	A 乙醇/%	B 液料比	C 提取温度/℃
-1	80	30 : 1	30
0	90	40 : 1	40
1	100	50 : 1	50

表 2 试验设计与结果					
试验号	A	B	C	总黄酮提取率/ (mg·g ⁻¹)	DPPH 清除 率/%
1	-1	-1	0	45.17	28.64
2	1	-1	0	79.79	28.20
3	-1	1	0	49.10	28.36
4	1	1	0	83.01	31.02
5	-1	0	-1	44.56	29.04
6	1	0	-1	81.86	29.09
7	-1	0	1	45.74	29.80
8	1	0	1	88.66	29.75
9	0	-1	-1	74.47	28.47
10	0	1	-1	81.99	31.42
11	0	-1	1	81.18	29.83
12	0	1	1	87.28	30.65
13	0	0	0	85.21	35.12
14	0	0	0	83.21	34.25
15	0	0	0	84.56	34.62
16	0	0	0	83.26	34.56
17	0	0	0	82.15	35.01

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 数据进行多元回归和二项式分析,得方程分别为 $Y_1 = 83.68 + 18.59A + 2.60B + 2.50C - 0.1775AB + 1.40AC - 0.3550BC - 17.72A^2 - 1.69B^2 - 0.7553C^2$ 、 $Y_2 = 34.71 + 0.2775A + 0.7888B + 0.2512C +$

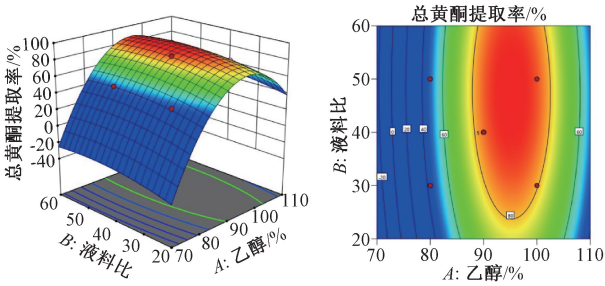
$0.7750AB - 0.0250AC - 0.5325BC - 3.16A^2 - 2.49B^2 - 2.13C^2$, 方差分析见表 3~4。由此可知,2 个模型显著性均很强 ($P < 0.01$),但失拟项均不显著 ($P > 0.05$),表明其拟合度较好^[19]; Y_1 、 Y_2 相关系数 r 分别为 0.992 9、0.987 2,表明自变量分别可反映 99.29%、98.72% 响应值的变化^[20];以 Y_1 为响应值时,因素 A、B、C、 A^2 具有显著性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),说明 A 对其影响不仅是简单的线性关系^[21],而以 Y_2 为响应值时,因素 B、 A^2 、 B^2 、 C^2 、AB、BC 具有显著性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);各因素对 Y_1 的影响程度依次为 $A > B > C$,对 Y_2 的影响程度依次为 $B > A > C$ 。

表 3 总黄酮提取率方差分析					
来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	4 243.27	9	471.47	109.33	<0.000 1
A	2 765.82	1	2 765.82	641.34	<0.000 1
B	53.92	1	53.92	12.50	0.009 5
C	49.90	1	49.90	11.57	0.011 4
AB	0.126 0	1	0.126 0	0.029 2	0.869 1
AC	7.90	1	7.90	1.83	0.218 1
BC	0.504 1	1	0.504 1	0.116 9	0.742 5
A^2	1 321.76	1	1 321.76	306.49	<0.000 1
B^2	12.06	1	12.06	2.80	0.138 3
C^2	2.40	1	2.40	0.556 9	0.479 8
残差	30.19	7	4.31	—	—
失拟性	24.33	3	8.11	5.54	0.065 8
纯误差	5.85	4	1.46	—	—
总误差	4 273.46	16	—	—	—

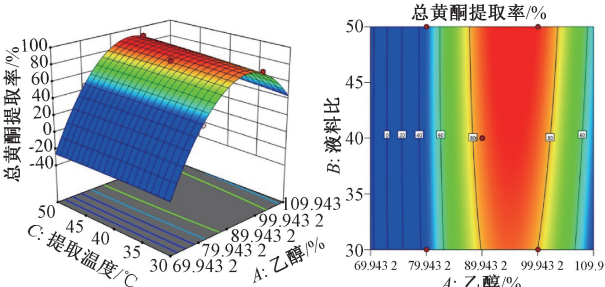
表 4 DPPH 清除率方差分析					
来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	106.90	9	11.88	59.75	<0.000 1
A	0.616 1	1	0.616 1	3.10	0.121 7
B	4.98	1	4.98	25.04	0.001 6
C	0.505 0	1	0.505 0	2.54	0.155 0
AB	2.40	1	2.40	12.09	0.010 3
AC	0.002 5	1	0.002 5	0.012 6	0.913 9
BC	1.13	1	1.13	5.71	0.048 3
A^2	42.17	1	42.17	212.14	<0.000 1
B^2	26.15	1	26.15	131.56	<0.000 1
C^2	19.05	1	19.05	95.85	<0.000 1
残差	1.39	7	0.198 8	—	—
失拟性	0.891 3	3	0.297 1	2.38	0.211 0
纯误差	0.500 3	4	0.125 1	—	—
总误差	108.29	16	—	—	—

采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面分析,见图 6~7。由此可知,乙醇体积分数与液料比、液料比与提取温度对 DPPH 清除率的交互影响较显著^[22];响应值均随着自变量的变化先升后降,但在各因素最高、最低水平之间等高线稀疏,响应曲面较缓和,故其所对应两因素之间的交互作用并不显著,与方差分析结果一致。

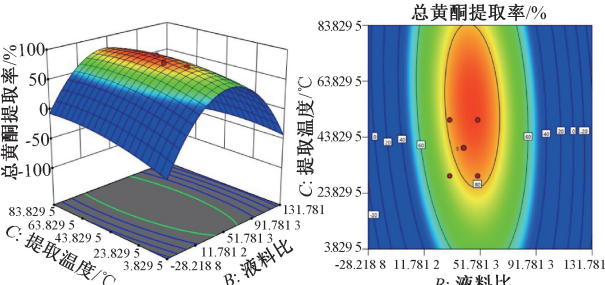
2.5 验证试验 采用 Design-Expert 8.0.6 软件得到最优提取工艺为乙醇体积分数 92.78%,液料比 42.39 : 1,提取温度 41.18 ℃,总黄酮提取率为 88.31%,DPPH 清除率为 34.63%,结合实际操作,将其修正为乙醇体积分数 93%,



a. 乙醇体积分数与液料比



b. 乙醇体积分数与提取温度



c. 液料比与提取温度

注：左图为三维曲面图，右图为等高线图。

图 6 各因素响应面图（总黄酮提取率）

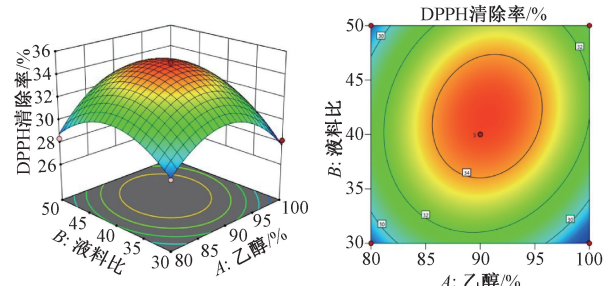
液料比 42 : 1，提取温度 41 ℃。按上述优化工艺进行 3 批验证试验，测得平均总黄酮提取率为 (88.56±0.09) %，DPPH 清除率为 (34.52±0.15) %，与预测值 88.31 %、34.63 % 接近，表明该工艺稳定可行。

3 讨论

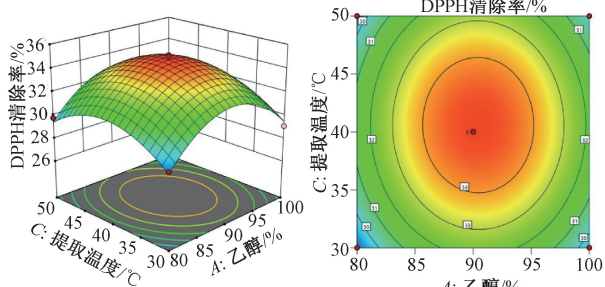
鉴于“成分反映活性，活性指向功能”的中药质量控制新模式，中药提取工艺的研究不应仅以其所含成分提取率为唯一评价指标，还应综合考虑其他相关因素，如活性、毒性等。同时，在中医药研究所需动物模型不完善的情况下，若采用活性成分提取率和体外活性整合的双指标评价方法，则可更综合全面地控制和优化中药提取工艺。因此，本实验以提取率与抗氧化活性为指标，通过双响应面法优化补骨脂总黄酮提取工艺，所得最优工艺参数稳定可行，不仅有利于该成分作为天然抗氧化剂，在食品、药品、化妆品、功能性食品、保健品等领域中的推广应用，也为其他中药提取工艺的研究提供了创新思路和方法。

参考文献：

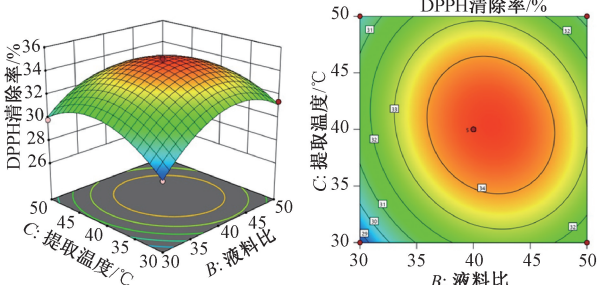
[1] 李萌茹, 周玉枝, 杜冠华, 等. 中药黄酮类化合物抗衰老作用及其机制研究进展 [J]. 药学报, 2019, 54 (8) :



a. 乙醇体积分数与液料比



b. 乙醇体积分数与提取温度



c. 液料比与提取温度

注：左图为三维曲面图，右图为等高线图。

图 7 各因素响应面图（DPPH 清除率）

1382-1391.

[2] Ademowo O S, Dias H K I, Burton D G A, et al. Lipid (per) oxidation in mitochondria: an emerging target in the ageing process? [J]. Biogerontology, 2017, 18 (6) : 859-879.

[3] Incalza M A, D' Oria R, Natalicchio A, et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases [J]. Vascu Pharmacol, 2018, 100: 1-19.

[4] Chandrasekaran A, Idelchik M D P S, Melendez J A. Redox control of senescence and age-related disease [J]. Redox Biol, 2017, 11: 91-102.

[5] Moloney J N, Cotter T G. ROS signalling in the biology of cancer [J]. Semin Cell Dev Biol, 2018, 80: 50-64.

[6] Simunkova M, Alwasel S H, Alhazza I M, et al. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer' s disease [J]. Arch Toxicol, 2019, 93 (9) : 2491-2513.

[7] 鲁亚奇, 张 晓, 王金金, 等. 补骨脂化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (3) : 180-189.

[8] Alam F, Khan G N, Asad M H H B. Psoralea corylifolia L: Ethnobotanical, biological, and chemical aspects: A review

[J]. *Phytother Res*, 2018, 32(4): 597-615.

[9] Liu B J, Liu X X, Ning Q, *et al.* Evaluation of toxicity and anti-osteoporosis effect in rats treated with the flavonoids of *Psoraleae Fructus*[J]. *J Funct Foods*, 2020, 75: 104262.

[10] 谭 鹏, 许 莉, 牛 明, 等. 一测多评法同时测定补骨脂中 16 种化学成分的含量[J]. 中草药, 2019, 50(16): 3937-3946.

[11] 李啸群, 徐凯航, 纪 方. 补骨脂异黄酮抑制破骨细胞分化缓解小鼠去卵巢骨质疏松[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(2): 186-190.

[12] 季宇彬, 王 敏, 王 姗, 等. 补骨脂二氢黄酮甲醚诱导 HepaRG 细胞损伤机制探讨[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(4): 544-550.

[13] 高倩倩, 翁泽斌, 颜翠萍, 等. 补骨脂中 9 种黄酮类化合物的构效关系及对绝经后妇女成骨细胞的增殖、分化活性研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(16): 1397-1401.

[14] 李寒冰, 吴宿慧, 牛 明, 等. 中药品质生物评价的历史与发展[J]. 中草药, 2017, 48(14): 2809-2816.

[15] 江振作, 王跃飞. 基于“药材基原-物质基础-质量标志物-质控方法”层级递进的中药质量标准模式研究[J]. 中草药, 2016, 47(23): 4127-4133.

[16] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.

[17] 岳慧英, 秦亚莉, 李 鹏, 等. 黄芩不同部位黄酮含量及抗氧化活性比较研究[J]. 中药材, 2020, 43(12): 2901-2904.

[18] 张 姣, 德 吉, 付爱玲, 等. 密枝圆柏的化学成分及其抗补体、抗氧化活性[J]. 中草药, 2019, 50(13): 3008-3016.

[19] Gopal L C, Govindarajan M, Kavipriya M R, *et al.* Optimization strategies for improved biogas production by recycling of waste through response surface methodology and artificial neural network: Sustainable energy perspective research[J]. *J King Saud Univ Sci*, 2021, 33(1): 101241.

[20] Berkani F, Dahmoune F, Achat S, *et al.* Response surface methodology optimization of microwave-assisted polysaccharide extraction from Algerian jujube (*Zizyphus lotus* L.) pulp and peel[J]. *J Pharm Innov*, 2020. doi: 10.1007/s12247-020-09475-9.

[21] 于 森, 王 冰, 付叶珊, 等. 响应面法优化刺五加根废弃物多糖提取工艺的研究[J]. 中草药, 2019, 50(7): 1610-1613.

[22] Tsegay Z T. Total titratable acidity and organic acids of wines produced from cactus pear (*Opuntia-ficus-indica*) fruit and *Lantana camara* (*L. camara*) fruit blended fermentation process employed response surface optimization[J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(8): 4449-4462.

赶黄草中大环多酚大孔树脂纯化工艺的优化

史鹏杰, 黄豆豆, 徐艾娜, 程嘉希, 董志颖, 孙连娜*
(上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

摘要: **目的** 优化赶黄草中大环多酚大孔树脂纯化工艺。**方法** 采用静态吸附、解吸附实验对 17 种大孔树脂进行筛选, 并对上样液体积流量、上样液质量浓度、径高比、上样体积、洗脱溶剂体积分数、洗脱液体积进行考察, HPLC 法测定大环多酚含量及其转移率。**结果** 最佳条件为 HPD-400 型大孔树脂, 大环多酚质量浓度 1.60~2.20 mg/mL, 以 2~2.5 BV/h 体积流量通入径高比 1:4 的树脂柱中, 上样 9 BV, 14 BV 40%乙醇洗脱除杂, 收集 10 BV 50%乙醇洗脱部位, 减压浓缩至干, 大环多酚含量可达 65% 以上, 转移率在 50% 以上, 得率为 6.56%。**结论** 该工艺稳定可行, 可用于大孔树脂纯化赶黄草中大环多酚。

关键词: 赶黄草; 大环多酚; 大孔树脂; 纯化工艺

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)01-0197-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.01.037

收稿日期: 2020-02-06

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1711000); 上海市自然科学基金项目 (13401900106)

作者简介: 史鹏杰 (1995—), 男, 硕士生, 研究方向为中药质量标准。Tel: 18961556366, E-mail: spj950406@163.com

* 通信作者: 孙连娜 (1973—), 女, 副教授, 研究方向为中药品质评价。Tel: (021) 51322211, E-mail: sssnmr@163.com