

响应面法优选知母须根总黄酮提取工艺及其解热作用研究

黄琪^{1,2}, 李丽丽¹, 吴德玲^{1,2*}, 金传山^{1,2}, 许凤清^{1,2}

¹安徽中医药大学药学院; ²安徽省现代中药重点实验室, 合肥 230012

摘要:为了研究知母须根总黄酮(TF)最佳超声提取工艺及其解热作用。在单因素实验基础上,采用响应面法研究乙醇浓度、提取时间、提取次数、料液比等四个因素对总黄酮提取量的影响,根据拟合的数学模型确定最佳提取工艺。以干酵母致热大鼠为动物模型,通过测定大鼠血清中 TNF- α 、PGE-2、IL-6、AVP 的含量研究其解热作用。知母须根总黄酮最佳提取工艺为:乙醇浓度为 70%,提取时间 40 min,液料比为 50 mL/g,提取次数 2 次。解热实验表明知母须根总黄酮提取物可显著降低发热大鼠模型体温及血清、下丘脑中 TNF- α 、PGE-2、IL-6 的含量,升高发热大鼠模型血清及下丘脑中 AVP 的含量。本研究表明知母须根总黄酮具有一定的解热作用,本文为知母须根开发利用提供参考依据。

关键词:知母须根;总黄酮;提取工艺;解热作用

中图分类号:R284.2;R91

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.12.020

Optimization of Extraction Technology by Response Surface Methodology and Antipyretic Effect of Total Flavonoids from the Fibrous Root of *Anemarrhena rhizome*

HUANG Qi^{1,2}, LI Li-li¹, WU De-ling^{1,2*}, JIN Chuan-shan^{1,2}, XU Feng-qing^{1,2}

¹College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine;

²Anhui Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Hefei 230012, China

Abstract: In order to research the optimal ultrasonic extraction process and antipyretic effect of total flavonoids (TF) extracted from the fibrous root of *Anemarrhena asphodeloides*. Four main factors including ethanol concentration, ultrasonic extraction time, extraction times and ratio of material liquid were studied by using single factor experiment and response surface method. According to the mathematical model established by taking the four main factors into consideration, the best extraction technology was set as follows. The ethanol concentration was 70%, extraction time was 40 min, liquid to material ratio was 50 mL/g and the extraction times were 2 times. Yeast induced rat model was used to study the antipyretic effect of the total flavone extract and the contents of TNF- α , PGE-2, IL-6 and AVP in serum was determined to study the antipyretic mechanism. Compared with the model group, the body temperature of rats with fever decreased significantly, the content of TNF- α , PGE-2, IL-6 in serum and hypothalamus decreased significantly and the content of AVP in serum and hypothalamus increased significantly. It can be indicated that the total flavonoids from the fibrous root of *Anemarrhena asphodeloides* have antipyretic efficacy. Our conclusion could provide a useful reference for the comprehensive development and utilization of fibrous roots of *Anemarrhena asphodeloides*.

Key words: fibrous root of *Anemarrhena asphodeloides*; total flavonoids; extraction process; antipyretic effect

知母为百合科植物知母(*Anemarrhena asphodeloide* Bunge.)的干燥根茎,具有清热解毒、泻火滋阴

等功效^[1]。其须根是知母产地加工过程中产生的废弃物,总量占根茎采收总量的 30% 左右,知母须根的废弃不用造成了一定程度的环境污染和资源浪费。课题组前期研究表明知母须根中主要含有黄酮类、甾体皂苷、多糖等化学成分^[2,3]。

天然植物中的黄酮类成分大多具有较好的解热、抗炎的药理活性^[4,5],且有文献研究表明知母须根和主根具有相近的化学成分组成^[6]。为更好的

收稿日期:2018-06-06 接受日期:2018-09-13

基金项目:2018 年度安徽高校自然科学重大项目(KJ2018ZD030);2018 年度安徽高校自然科学重点研究项目(KJ2018A0298);安徽省高校科研创新平台团队建设项目(2015TD035);国家中药标准化建设项目(ZYBZH-Y-AH-02)

* 通信作者 E-mail:dlwu7375@sina.com

利用知母须根这一资源,本研究以知母须根为研究对象,以响应面法优选知母须根总黄酮提取工艺,以干酵母致热大鼠模型研究其解热作用,以探讨其解热的作用机制,为知母须根深度开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司,中国,UV1600),酶标仪(赛默飞世尔科技公司,美国)。肿瘤坏死因子- α 、白介素-6、前列腺素 E-2、精氨酸升压素等试剂盒均购于上海谷研实业有限公司,芒果苷对照品(成都领航者生物科技有限公司,中国,批号:4773-96-0)。阿司匹林肠溶片(南京白敬宇制药有限公司,中国,批号:国药准字 H32026500)。

安琪高活性干酵母(安琪酵母股份有限公司,中国,批号:GB/T20886)。

1.2 药材与实验动物

1.2.1 药材

知母须根 2017 年 11 月份收集于安徽广印堂中药饮片股份有限公司知母种植基地,经安徽中医药大学金传山教授鉴定为百合科植物知母(*Anemarrhena asphodeloide* Bunge.)的须根。

1.2.2 实验动物

实验用 SPF 级 SD 大鼠(周龄 8 周,雌雄各半,180~220 g)购于安徽医科大学实验动物中心(许可证号:sexk(皖)2017-001),实验前适应性喂养 3 天。

1.3 标准曲线的绘制

精密称定一定量的芒果苷对照品,溶解并稀释,分别制成 0.83、1.00、1.16、1.33、1.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液,加入 1 mL 5% NaNO_2 ,摇匀,静置 6 min,加入 1 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3^{[7]}$,摇匀,静置 6 min,加入 10 mL 4% NaOH ,摇匀,静置 15 min,用 70% 乙醇定容至 25 mL,于 258 nm 下测定吸光度,以吸光度和芒果苷质量浓度绘制标准曲线。

1.4 知母须根总黄酮提取工艺及提取量的测定

精密称定知母须根粉末 1 g 于具塞锥形瓶中,加入适量溶剂进行超声提取,分别考察不同的乙醇浓度、料液比、提取时间和提取次数对知母须根总黄酮提取量的影响,根据 1.3 项下的线性方程测定总黄酮含量并计算总黄酮的提取量。总黄酮提取量(mg/g) = 提取液中总黄酮含量/药材重 $\times 100\%$ 。

1.4.1 单因素实验

1.4.1.1 乙醇浓度对知母须根总黄酮提取量的影响

固定超声时间为 30 min,料液比为 1:40,提取次数为 1 次,考察乙醇浓度分别为 10%、30%、50%、70%、90% 等五个水平对知母须根总黄酮提取量的影响,每个因素平行实验 5 次。实验结果见图 1。

1.4.1.2 提取时间对知母须根总黄酮提取量的影响

固定乙醇浓度为 70%,料液比为 1:40,提取次数为 1 次,考察超声提取时间为 20、30、40、50、60 min 等五个水平对知母须根总黄酮提取量的影响,每个因素平行实验 5 次。实验结果见图 2。

1.4.1.3 料液比对知母须根总黄酮提取量的影响

固定乙醇浓度为 70%,提取次数为 1 次,超声提取时间为 40 min,考察料液比为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70 等七个水平对知母须根总黄酮提取量的影响,每个因素平行实验 5 次。实验结果见图 3。

1.4.1.4 提取次数对知母须根总黄酮提取量的影响

固定乙醇浓度为 70%,超声提取时间为 40 min,料液比为 1:50,分别考察提取次数为 1、2、3、4、5 等对知母须根总黄酮提取量的影响,每个因素平行实验 5 次。实验结果见图 4。

1.4.2 响应面法优选知母须根总黄酮提取工艺

在单因素实验基础上,选取 1.4.1 项下影响总黄酮提取量的四个因素进行 Box-Behnken 试验设计,以总黄酮提取量为指标,优选最佳提取条件,因素水平见表 1。

1.5 总黄酮提取物的解热作用研究

1.5.1 发热动物模型建立、动物分组及给药

1.5.1.1 干酵母混悬液配制

取干酵母 15 g 于研钵中,缓慢加入蒸馏水 90 mL 并研磨至均匀的混悬液,将混悬液倒入烧杯中,然后取 10 mL 蒸馏水洗涤研钵内壁,最终制备成 15% 的干酵母混悬液。

1.5.1.2 发热动物模型建立

发热模型建立:将大鼠适应性喂养 3 天,外部保持环境不变,每日用电子体温计测量肛温 2~3 次,使其适应电子体温计,取体温于 37.0~38.0 $^{\circ}\text{C}$ 且体温变化小于 0.3 $^{\circ}\text{C}$ 的大鼠供实验造模用。随机取大鼠若干,每只进行背部皮下注射 15% 的干酵母混悬

表 1 Box-Behnken 试验设计因素水平表

Table 1 Factor levels used in Box-Behnken design

因素水平 Factors	乙醇浓度 Ethanol Concentration (%)	提取时间 Ultrasonic Extraction Time (min)	料液比 Ratio of Material Liquid	提取次数 Extraction Times
-1	50	30	1:40	1
0	70	40	1:50	2
1	90	50	1:60	3

液(10 mL/kg),每隔1 h测定一次肛温,以基础体温上升1℃(5 h后)以上的为发热鼠,视为造模成功。

1.5.1.3 动物分组及给药

将已测定肛温的实验大鼠随机分5组(正常组、模型组、阿司匹林(阳性药)组、知母须根总黄酮提取物组),每组10只。前期研究表明,知母须根总黄酮提取物在剂量为4 g/kg时即可发挥解热作用。实验用阳性药为阿司匹林,给药剂量为0.1 g/kg,给药方式为灌胃给药。

给药组先用知母须根总黄酮提取物组连续灌胃给药三天,第四天造模,造模后再灌胃知母须根总黄酮提取物一次,分别于造模前、造模后、末次给药0.5、1、2、3、4、5 h测量各组大鼠肛温。

1.5.2 大鼠血清及下丘脑中细胞因子的测定

待大鼠体温测定后,腹腔注射15%的水合氯醛溶液1 mL/100 g麻醉大鼠,分别进行腹主动脉取血及分离大鼠下丘脑。全血以3000 rpm离心15 min,取上清液;下丘脑样本称定重量后用生理盐水研磨成10%的下丘脑匀浆;按照试剂盒的要求测定血清及下丘脑中TNF- α 、IL-6、AVP、PGE-2水平。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

由实验结果可知,芒果苷在0.83~1.49 $\mu\text{g/mL}$ 之间质量浓度与吸光度呈现良好的线性关系,线性方程为 $y = 0.3867x + 0.0772$ ($r = 0.9995$)。结果见图1。

2.2 各因素对总黄酮提取量的影响

由实验结果(图2)可知,不同乙醇浓度、提取时间、料液比、提取次数对知母须根总黄酮提取量均有影响。单因素实验结果显示,以70%乙醇作为最佳提取溶剂,最佳料液比为1:50,最佳提取时间为40 min,最佳提取次数为2次。

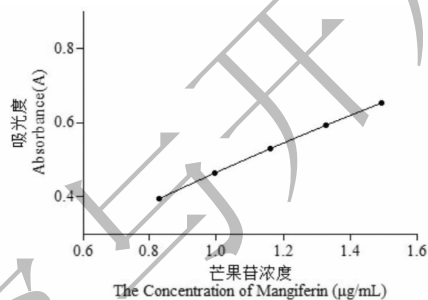


图 1 芒果苷对照品线性关系

Fig. 1 Linear relationship of Mangiferin

2.3 响应面试验数据分析

根据“2.2”项下单因素实验优选出的最佳因素水平,选取乙醇浓度,提取时间,料液比,提取次数等四个因素,采用Box-Behnken进行试验设计,实验共29组,每组实验共平行三份,探讨各因素水平对超声提取知母须根总黄酮提取量的影响,结果见表2。本设计方案中A、B、C、D为三维空间的顶点,构成析因点,析因设计实验共12组;区域中心点为零点,零点实验编号为3、11、13、17、19共5组,作为中心设计实验,可对实验误差进行估算。最终拟合的总黄酮提取量(Y)的二次多项式方程为:

$$Y = 53.62 - 3.98A - 0.022B + 0.18C + 5.39D - 0.73AB - 0.46AC + 6.71AD - 0.090BC - 1.22BD - 0.075CD - 16.89A^2 - 3.48B^2 - 3.12C^2 - 4.92D^2$$

本模型的一次项、二次项等项方差分析结果及模型的决定系数能够反映该分析模型是否可靠,结果见表3。该模型的 $P < 0.05$,有一定的著性,另外该模型的校正决定性系数 $RA_{\text{adj}}^2 = 0.5049$,说明该模型对知母须根总黄酮成分超声提取实验的拟合程度好,可靠性较高,能够对实验数据进行解释分析。由A、B、C、D各因素的F值可知,影响知母须根总黄酮提取量的因素从高至低依次是提取次数(D)、乙醇浓度(A)、提取时间(B)、液料比(C)。

由响应面图与等高线图结果显示,固定液料比

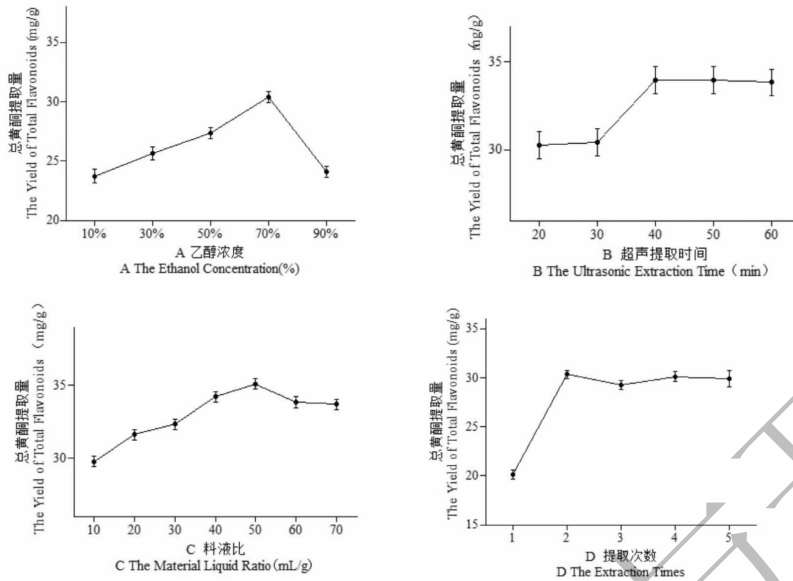


图2 不同因素对知母须根总黄酮提取量 (mg/g) 的影响

Fig. 2 Effects of different factors on Total Flavonoids (mg/g) Extracted from the fibrous root of *Anemarrhena asphodeloides*

注: A:乙醇浓度; B:超声提取时间; C:料液比; D:提取次数

Note: A: the ethanol concentration; B: the extraction time; C: the material liquid ratio; D: the extraction times

表2 响应面实验结果

Table 2 The Results of Response Surface Experiment

编号 No.	A 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	B 提取时间 Extraction time (min)	C 料液比 Material-liquid ratio (mL/g)	D 提取次数 Extraction times	总黄酮提取量 Content of total flavonoids (mg/g)
1	70	30	50	1	34.54
2	70	40	60	3	54.36
3	70	40	50	2	53.14
4	90	50	50	2	30.50
5	90	40	50	1	23.23
6	70	40	40	1	32.26
7	90	40	60	2	29.87
8	70	40	60	1	32.47
9	90	40	50	3	30.27
10	70	30	50	3	53.65
11	70	40	50	2	53.98
12	70	30	40	2	51.38
13	70	40	50	2	53.87
14	50	50	50	2	34.43
15	70	50	50	3	55.26
16	50	40	50	1	25.53
17	70	40	50	2	53.86
18	50	40	40	2	32.33
19	70	40	50	2	53.26

续表 2(Continued Tab. 2)

编号 No.	A 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	B 提取时间 Extraction time (min)	C 料液比 Material-liquid ratio (mL/g)	D 提取次数 Extraction times	总黄酮提取量 Contet of total flavonoids (mg/g)
20	90	30	50	2	29.16
21	50	40	60	2	33.62
22	50	30	50	2	30.17
23	50	40	50	3	35.44
24	70	50	50	1	35.13
25	70	50	60	2	50.97
26	70	50	40	2	50.48
27	70	30	60	2	52.23
28	90	40	40	2	30.43
29	70	40	40	3	54.45

表 3 方差分析结果

Table 3 The results of variance analysis

方差来源 Source	离均差平方和 Square sum of deviations	自由度 df	均方 Mean quare	F	P
模型 Model	259 9.36	14	185.67	3.04	0.023
A	190.32	1	190.32	3.12	0.099 3
B	5.63E-03	1	5.63E-03	9.22E-05	0.992 5
C	0.4	1	0.4	6.54E-03	0.936 7
D	348.19	1	348.19	5.7	0.031 6
AB	2.13	1	2.13	0.035	0.854 5
AC	0.86	1	0.86	0.014	0.907 5
AD	180.36	1	180.36	2.95	0.107 8
BC	0.032	1	0.032	5.30E-04	0.982
BD	5.95	1	5.95	0.097	0.759 5
CD	0.023	1	0.023	3.68E-04	0.985
A ²	185 0.08	1	185 0.08	30.29	< 0.000 1
B ²	78.43	1	78.43	1.28	0.276 2
C ²	63.18	1	63.18	1.03	0.326 4
D ²	157.32	1	157.32	2.58	0.130 8
残差 Residual error	855.16	14	61.08	560.66	< 0.000 1
失拟项 Lack of fit	854.55	10	85.46		
纯误差 Pure error	0.61	4	0.15		
总离均差 Cor total	345 4.52	28	0		

与提取次数,总黄酮提取量随着乙醇浓度和提取时间的同时增加呈现先升高后下降的趋势,由等高线图可看出,乙醇浓度所呈现的等高线分布较为密集,说明乙醇浓度在总黄酮提取量上较提取时间的影响大,由等高线椭圆的规则程度可以判断,乙醇浓度和

提取时间有较为显著的交互作用,另外当乙醇浓度不变时,随着提取时间的增加总黄酮提取量呈现下降趋势,可能原因为部分黄酮类成分在超声过程中结构受到了破坏或发生了转变,故提取时间不宜过长。由此可得即当乙醇浓度为 58% ~ 77% 时,提取

时间为 40 min 时,知母须根总黄酮响应值最高。固定提取时间与提取次数,随着乙醇浓度和液料比的同时增加总黄酮提取量呈现先升高后下降的趋势,根据分析,当乙醇浓度为 58% ~ 77% 时,液料比为 45 ~ 55 mL/g 时,知母须根总黄酮响应值最高。分析比较并模拟出最佳提取工艺:乙醇浓度为 70%,提取时间 40 min,液料比为 50 mL/g,提取次数 2

次。在此条件下,知母须根总黄酮成分含量的预测值为 53.62 mg/g。

2.4 验证试验结果

根据所拟合的最佳提取条件进行验证试验,共平行 3 次,所得知母须根总黄酮含量为 53.79 mg/g,与模型预测值 53.62 mg/g 接近,表明该模型重现性良好。

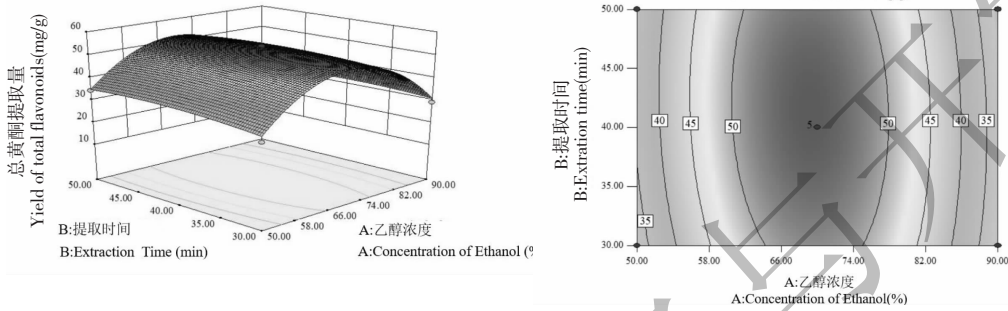


图 3 乙醇浓度和提取时间对知母总黄酮提取量影响的响应面图和等高线图

Fig. 3 The effects of ethanol concentration and extraction time on the extraction of total flavonoids from the fibrous root of *Anemarrhena* by response surface methodology and contour map

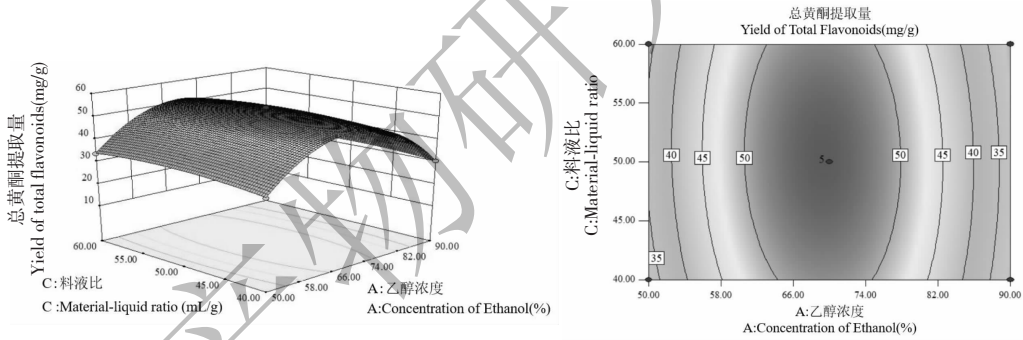


图 4 乙醇浓度和液料比对知母总黄酮提取量影响的响应面图和等高线图

Fig. 4 The effects of ethanol concentration and liquid to material ratio on the extraction of total flavonoids from the fibrous root of *Anemarrhena* by response surface methodology and contour map

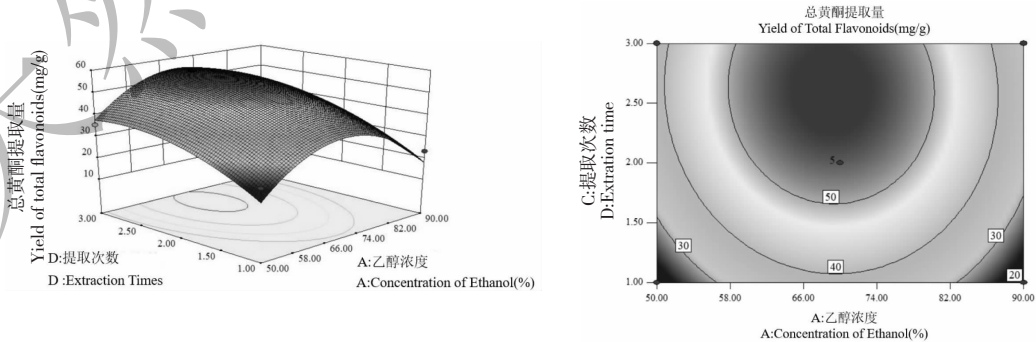


图 5 乙醇浓度和提取次数对知母总黄酮提取量影响的响应面图和等高线图

Fig. 5 The effects of ethanol concentration and extraction times on the extraction of total flavonoids from the fibrous root of *Anemarrhena* by response surface methodology and contour map

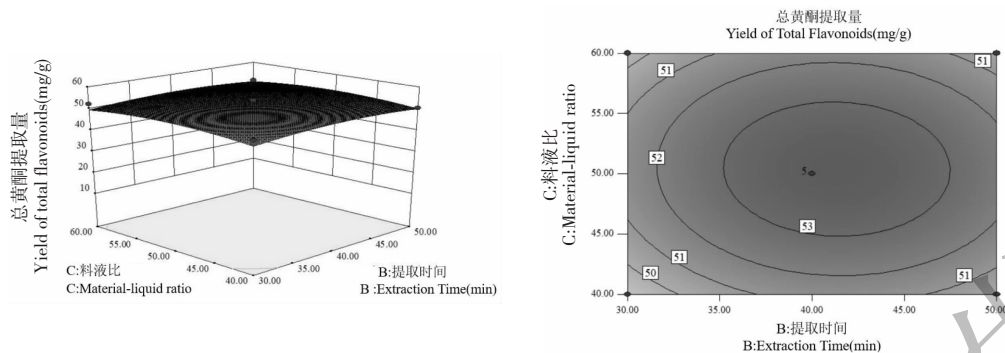


图 6 提取时间和液料比对知母总黄酮提取量影响的响应面图和等高线图

Fig. 6 The effects of extraction times and on the extraction of total flavonoids from the fibrous root of *Anemarrhena* by response surface methodology and contour map

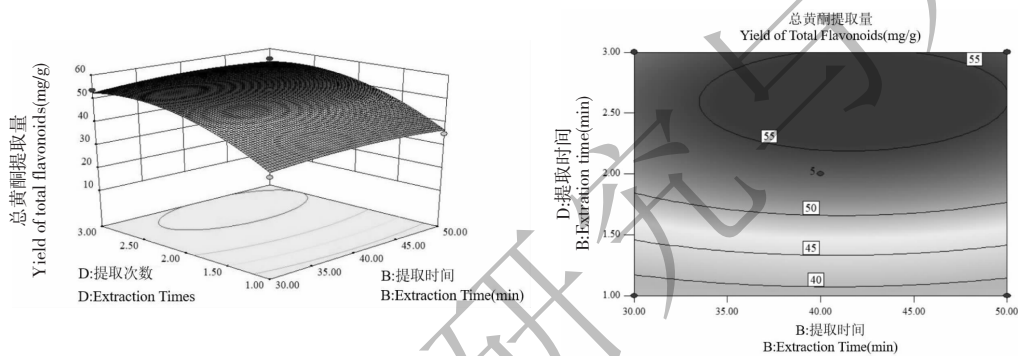


图 7 提取时间和提取次数对知母总黄酮提取量影响的响应面图和等高线图

Fig. 7 The effects of extraction duration and liquid to material ratio on the extraction of total flavonoids from the fibrous root of *Anemarrhena* by response surface methodology and contour map

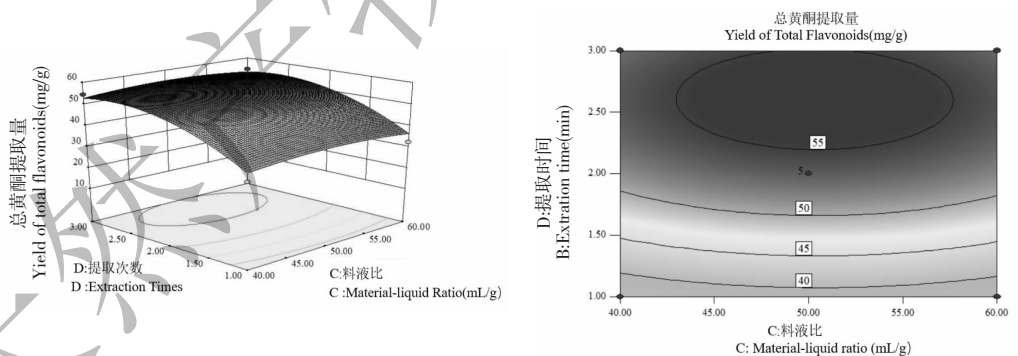


图 8 液料比和提取次数对知母总黄酮提取量影响的响应面图和等高线图

Fig. 8 The effects of extraction liquid to material and ratio times on the extraction of total flavonoids from the fibrous root of *Anemarrhena* by response surface methodology and contour map

2.5 大鼠体温测定结果

实验结果(见表 4)显示造模后 5 h 内,与正常组相比,模型组大鼠体温显著升高($P < 0.01$),表明

造模成功。知母须根总黄酮提取物在末次给药 5 h 后与模型组相比体温显著下降($P < 0.05$),表明知母须根总黄酮提取物有一定的解热作用。

表4 知母须根总黄酮提取物对干酵母致热大鼠体温的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)Table 4 The effects of total flavonoids extracted from fibrous root of *Anemarrhena Rhizoma* on body temperature in rats induced by yeast($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	造模前 Before modeling	造模后 After modeling	给药后体温 Body temperature after administration ($^{\circ}\text{C}$)					
				0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
				正常组 Control	-	37.61 \pm 0.24	37.52 \pm 0.18	37.61 \pm 0.13	37.65 \pm 0.19
模型组 Model	-	37.80 \pm 0.26	39.43 \pm 0.28 ^{##}	39.62 \pm 0.25 ^{##}	39.40 \pm 0.29 ^{##}	39.41 \pm 0.19 ^{##}	39.27 \pm 0.17 ^{##}	39.15 \pm 0.18 ^{##}	39.22 \pm 0.19 ^{##}
阿司匹林组 Aspirin	0.1	37.92 \pm 0.22	39.41 \pm 0.18	38.84 \pm 0.15	38.33 \pm 0.19 [*]	37.92 \pm 0.19 ^{**}	37.91 \pm 0.15 ^{**}	37.64 \pm 0.28 ^{**}	37.73 \pm 0.28 ^{**}
总黄酮提取物 TF	4.0	37.84 \pm 0.16	39.37 \pm 0.29	39.44 \pm 0.21	39.17 \pm 0.24	39.17 \pm 0.23	39.13 \pm 0.21	39.03 \pm 0.23	38.38 \pm 0.29 [*]

注:与正常组相比^{##} $P < 0.01$,与模型组相比^{*} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。Note:^{##} $P < 0.01$ vs control group, ^{*} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ vs model group.

2.5 血清中相关细胞因子的测定

血清中相关因子测定结果显示,与正常组相比,模型组大鼠血清中 TNF- α 、PGE-2、IL-6、AVP 含量显

著升高。与模型组相比,知母须根总黄酮提取物可降低血清中 TNF- α 、PGE-2 ($P < 0.05$) 及 IL-6 ($P < 0.001$) 的含量,升高血清 AVP ($P < 0.05$) 的含量。

表5 知母须根总黄酮提取物对干酵母致热大鼠血清中 TNF- α 、PGE-2、IL-6、AVP 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)Table 5 The effects of total flavonoids extract from fibrous root of *Anemarrhena rhizome* on TNF-, PGE-2, IL-6 and AVP contents in serum of rats induced by yeast($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别 Group	TNF- α (ng/L)	PGE-2 (ng/L)	IL-6 (ng/mL)	AVP (ng/L)
正常组 Control	613.22 \pm 56.29	314.77 \pm 62.33	92.87 \pm 5.99	34.39 \pm 4.50
模型组 Model	751.97 \pm 121.4 [#]	578.34 \pm 58.71 ^{###}	165.65 \pm 13.32 ^{###}	57.65 \pm 9.19 ^{###}
阿司匹林组 Aspirin	563.49 \pm 60.53 ^{**}	371.65 \pm 97.41 ^{***}	101.93 \pm 16.72 ^{***}	75.58 \pm 3.07 ^{***}
总黄酮提取物组 TF	634.03 \pm 78.09 [*]	449.71 \pm 111.99 [*]	136.5 \pm 12.11 ^{***}	66.01 \pm 12.11 [*]

注:与正常组相比[#] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.001$;与模型组相比^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$ 。Note:[#] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

2.6 大鼠下丘脑中相关细胞因子的测定

下丘脑中相关因子测定结果显示,与模型组相比,知母须根总黄酮提取物可降低大鼠下丘脑中

TNF- α ($P < 0.05$)、IL-6、PGE-2 ($P < 0.01$) 的含量,升高下丘脑中 AVP ($P < 0.05$) 的含量。结果见表 6。

表6 知母须根总黄酮提取物对干酵母致热大鼠下丘脑中 TNF- α 、PGE-2、IL-6、AVP 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)Table 6 The effects of total flavonoids extracted from fibrous root of *Anemarrhena rhizome* on TNF-, PGE-2, IL-6 and AVP contents in hypothalamus of rats induced by yeast($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别 Group	TNF- α (pg/mg)	IL-6 (pg/mg)	PGE-2 (pg/mg)	AVP (pg/mg)
正常组 Control	594.8 \pm 59.3	128.3 \pm 33.1	398.9 \pm 117.8	33.9 \pm 7.7
模型组 Model	726.7 \pm 107.2 ^{##}	201.0 \pm 41.6 ^{##}	748.5 \pm 110.9 ^{##}	43.9 \pm 5.9 ^{##}
阿司匹林组 Aspirin	604.5 \pm 51.8 ^{**}	116.3 \pm 18.4 ^{**}	512.8 \pm 67.9 ^{**}	65.4 \pm 6.6 ^{**}
总黄酮提取物组 TF	620.6 \pm 76.2 [*]	126.9 \pm 19.1 ^{**}	568.5 \pm 71.7 ^{**}	50.3 \pm 5.1 [*]

注:与正常组相比[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$ 。Note:[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

3 结论

本文采用了 Box-Behnken 方法优选出知母须根

总黄酮最佳提取工艺为乙醇浓度 70%,提取时间 40 min,液料比 50 mL/g,提取次数 2 次。解热实验研究表明,知母须根总黄酮提取物具有一定的解热作

用,其解热机制可能是通过降低发热大鼠模型血清中 TNF- α 、PGE-2、IL-6 的含量、升高发热大鼠模型血清中 AVP 的含量而发挥作用的。

芒果苷是知母须根中成分含量较高的一种黄酮苷类成分,且知母须根中各主要黄酮苷类成分在 258 nm 下均有较强紫外吸收^[8],因此选择芒果苷为对照品具有合理性。超声提取法具有操作简便,提取时间短,提取效率高等优势,因此本文优选出的最佳工艺具有较强的可操作性。

TNF- α 是一种内源性致热原,是发热疾病过程中的一个中间环节,模型组的大鼠血清 TNF- α 显著升高,因此导致大鼠发热^[9,10],PGE-2 是体温调节最主要的物质,尤其是在感染性发热中其含量会显著升高,PGE-2 与受体结合后影响体温调节点水平,从而引起机体体温的变化^[11],IL-6 是各种发热的中间物质,其生物学效应呈现多样性,在发热机制中具有举足轻重的作用^[12]。AVP 是内源性的解热物质,在机体发热时机体会通过分泌 AVP 来保护机体^[13]。本文研究结果表明知母须根总黄酮提取物可以显著降低发热大鼠血清及下丘脑中 TNF- α 、PGE-2、IL-6 的含量,升高 AVP 的含量,表明知母须根总黄酮提取物具有一定的解热作用。

知母须根是知母生长发育过程中的非药用部位,其与知母主根从同一组织生长分化而来。知母药性寒凉、具有清热解毒之功,本文研究结果表明,知母须根总黄酮提取物也同样具有一定的解热作用,可为知母须根的综合开发利用提供一定的依据。然而天然药物中化学成分较多,其发挥药效作用的机制复杂,知母须根总黄酮的解热作用和化学成分尚需进一步研究。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:212.
- Xiao XC(肖曦晨), Jia PH(贾鹏晖), Huang Q(黄琪), et al. Preliminary test for chemical components of fibrous of *Anemarrhena asphodeloides* [J]. *Guangzhou Chem Ind*(广州化工), 2016, 44(22):42-43.
- Huang Q(黄琪), Xiao XC(肖曦晨), Jin CS(金传山), et al. Chemical constituents of the fibrous root of *Anemarrhena asphodeloides* [J]. *J Anhui Univ Chin Med*(安徽中医药大学学报), 2018, 37(2):81-84.
- Ma P(马萍), Guo ZW(郭增旺), Zhang LY(张丽媛), et al. Ultrasonic-microwave synergistic extraction and anti-inflammatory activity of total flavones from Millet Bran[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29:1966-1975.
- Liu P(刘平), Hu N(胡楠), Chen GH(陈光辉), et al. Antipyretic effect of flavonoids from *Trollius ledebourii* reichb on endotoxin-induced fever and levels of TNF- α , IL-1 β and PGE-2 in rabbits [J]. *Chin J Exp Trad Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2014, 20:189-191.
- Wang FX, Yuan JC, Kang LP, et al. An efficient approach to identify different chemical markers between fibrous root and rhizome of *Anemarrhena asphodeloides* by ultrahigh-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry with multivariate statistical analysis [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2016, 6:105-116.
- Wen YJ(闻永举), Neng LQ(能力强), Shen XL(申秀丽). Study on extraction technology of total flavonoids of *Anemarrhena* [J]. *LiSHIZHEN Mat Med Res*(时珍国医国药), 2008, 19:2497-2498.
- Jia PH(贾鹏晖), Huang Q(黄琪), Xu FQ(许凤清), et al. Content determination of three xanthones in the fibrous root of *Anemarrhena asphodeloides* from different producing areas [J]. *J Anhui Univ Chin Med*(安徽中医药大学学报), 2018, 37(2):90-92.
- Liu LD(刘利丹), Li Y(李妍), Wu XL(吴晓岚), et al. Effects of heat stress on TNF- α -induced fever and the content of cAMP in rat hypothalamus [J]. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报), 2005, 21:1054-1057.
- Wan YX(万宇翔), Zheng ZA(郑子安), Bai C(白辰), et al. Effect of Yinlai decoction on IL-1 β , TNF- α , IL-6 levels in serum of fever rats [J]. *J Hunan Univ Chin Med*(湖南中医药大学学报), 2017, 37:1184-1187.
- Dang J(党珏), Yuan A(袁岸), Luo L(罗林), et al. Antipyretic effect of forsythia suspense extract and forsythia oil on yeast-induced fever rats and its mechanism [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29:1542-1545.
- Pang SW(庞淑婉), Li H(李宏), Mu T(穆轶), et al. Preliminary study on the antipyretic effect of Qingrexiayao particles and its influence on TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE2 in serum [J]. *J Tianjin Med Univ*(天津医科大学学报), 2015, 21:488-490.
- Liu J(刘静), Ma L(马莉), Lu H(陆浩), et al. Study on mechanism for antipyretic effects of Shufeng Jiedu Capsule [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2016, 47:2040-2043.