

正交试验优选野菊花中总黄酮的提取工艺

孔燕芳^{1*},周艳梅²,闫艳仓²,段晓颖^{2#}(1.深圳健安医药有限公司,广东深圳 518027;2.河南中医学院第一附属医院,郑州 450000)

中图分类号 R284.2;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4068-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.12

摘要 目的:优选野菊花中总黄酮的提取工艺。方法:以乙醇质量分数、加醇倍数、提取时间为考察因素,以野菊花总黄酮含量为评价指标,采用正交试验优选提取工艺。结果:最佳提取工艺为加12倍量50%乙醇,回流2次,每次1 h。结论:所选工艺合理、可行,可用于野菊花中总黄酮的提取。

关键词 野菊花;总黄酮;正交试验;紫外-可见分光光度法

Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoids from *Chrysanthemum indicum*

KONG Yan-fang¹, ZHOU Yan-mei², YAN Yan-cang², DUAN Xiao-ying²(1. Shenzhen Jianan Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518027, China; 2. The First Affiliated Hospital of Henan College of TCM, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of total flavonoids from *Chrysanthemum indicum*. METHODS: The extraction technology was optimized by orthogonal experiment with ethanol concentration, amount of ethanol, extraction time as factors using the content of total flavonoids from *C. indicum* as index. RESULTS: The optimal condition was as follows: adding 12 folds of 50% ethanol, reflux-extracting for 2 times, 1 h each time. CONCLUSIONS: The selected technology is reasonable and practicable, and it can be used for the extraction of total flavonoids from *C. indicum*.

KEY WORDS *Chrysanthemum indicum*; Total flavonoids; Orthogonal experiment; UV-Visible spectrophotometry

野菊花是菊科植物野菊(*Chrysanthemum indicum*)的头状花序,主要药效成分是黄酮类化合物,包括蒙花苷、木犀草素、木犀草-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草-7-O-β-D-吡喃葡萄糖醛酸苷、芹菜素、大波斯菊苷、刺槐素、矢车菊苷等^[1-3],具有疏风清热、抗菌消炎、消肿解毒的作用^[4-8]。笔者采用正交试验对野菊花中总黄酮的提取工艺进行优选,以为野菊花中总黄酮的工业化提取提供参考。

1 材料

1.1 仪器

TU-1800PC紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);CP225D电子天平(德国赛多利斯公司);LXJ-II B离心机(上海安亭科学仪器厂);HK250科导台式超声波清洗机(上海汉克科学仪器有限公司);KDM型连续可控温电热套(山东甄城新华仪器厂)。

1.2 试剂

芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-200707);甲醇(色谱级,天津市四友精细化学品有限公司,批号:20091112);其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

野菊花药材(产地:安徽金寨县,经河南中医学院第一附属医院陈天朝主任药师鉴定为菊科植物野菊*C. indicum*的干燥头状花序;经河南中医学院第一附属医院药检室测定每1 g

药材含总黄酮为52.1 mg)。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量的测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品10.0 mg,置50 ml量瓶中,加甲醇约30 ml,置水浴上微热使溶解,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得每1 ml含0.2 mg芦丁的对照品溶液,备用。

2.1.2 最大吸收波长的选择 精密吸取野菊花提取液3.0 ml和对照品溶液2.0 ml,分别置25 ml量瓶中,各加水至6.0 ml,加入5%亚硝酸钠溶液1.0 ml,混匀,放置6 min,再加入10%硝酸铝溶液1.0 ml,摇匀,放置6 min,加氢氧化钠溶液10.0 ml,再加水至刻度,摇匀,放置15 min。按紫外-可见分光光度法^[9]试验,以相应的试剂为空白,在400~700 nm波长范围内扫描。结果,野菊花提取液和对照品溶液均在510 nm波长处有最大吸收,故确定最大吸收波长为510 nm。光谱见图1。

2.1.3 标准曲线的制备 精密吸取对照品溶液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 ml,分别置25 ml具塞试管中,各管加水至6.0 ml,加5%亚硝酸钠溶液1.0 ml,摇匀,放置6 min,再加入10%硝酸铝溶液1.0 ml,摇匀,放置6 min,加氢氧化钠溶液10.0 ml,加水至刻度,摇匀,放置15 min,在510 nm波长处测定吸光度(A)。以A为纵坐标,质量浓度(c)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $A=1.07 \times 10^{-2} + 1.10 \times 10^{-2}c$ ($r=0.9991, n=6$)。结果表明,芦丁质量浓度在8~48 μg/ml范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.2 提取溶剂的选择

称取野菊花药材2份,每份20 g,置烧瓶中,每份分别用12

* 讲师,硕士。研究方向:临床药理。电话:0755-82101886-363。Email:kay24680@163.com

通信作者:主任药师,硕士研究生导师。研究方向:中药新技术。电话:0371-66233639。E-mail:dxy137@sina.com

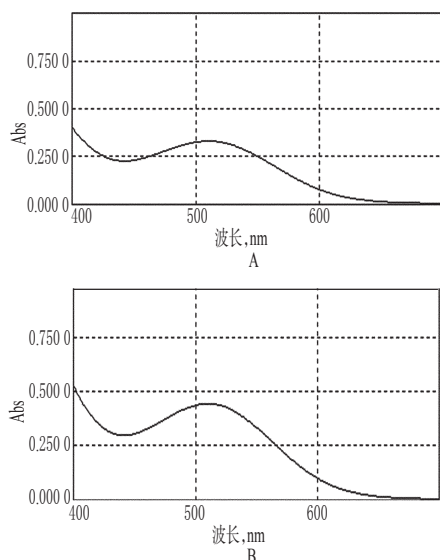


图1 紫外吸收光谱图

Fig 1 UV absorption spectrum

A. 对照品; B. 野菊花提取液

A. control; B. *C. indicum* extract

倍量的水、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇回流提取3次,每次1.5 h,滤过,将不同提取溶剂的滤液分别合并,备用。分别量取各溶液5.0 ml,按“2.1.3”项下方法测定总黄酮含量,并按下式计算总黄酮转移率:总黄酮转移率=提取液中总黄酮含量/药材中总黄酮含量×100%。提取方法考察结果见表1。

表1 提取方法考察结果

Tab 1 Results of extraction methods

溶剂	总黄酮质量分数, %		总黄酮转移率, %	
	前2次提取	第3次提取	前2次提取	第3次提取
水	19.2	5.4	36.8	10.3
30%乙醇	36.8	5.7	70.5	10.9
50%乙醇	41.7	5.8	79.9	11.1
70%乙醇	44.2	6.3	84.7	12.1

由表1可知,提取2次和提取3次,总黄酮质量分数和转移率均没有显著差异,故选择提取2次。以水为溶剂,总黄酮质量分数和转移率均较低;以乙醇为溶剂,总黄酮质量分数和转移率均显著提高。乙醇质量分数从30%提高到50%,总黄酮质量分数增加4.9%,转移率提高9.4%,而从50%提高到70%,总黄酮质量分数仅增加2.5%,转移率仅提高4.8%。从节约乙醇用量、降低生产成本的角度考虑,选择乙醇质量分数在30%~50%范围内。

2.3 正交试验优选最佳提取工艺

2.3.1 试验设计 根据预试验结果和笔者经验,选取乙醇质量分数(A)、加醇倍数(B)、提取时间(C)为考察因素,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。因素与水平见表2。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素		
	A, %	B, 倍	C, h
1	30	12	1.0
2	40	14	1.5
3	50	16	2.0

2.3.2 试验结果与分析 取野菊花药材适量,按表2安排试验,将提取液照“2.1.3”项下方法测定总黄酮含量。正交试验结果见表3;方差分析结果见表4。

表3 正交试验结果

Tab 3 Results of orthogonal experiment

试验号	因素				每1g药材含总黄酮质量,mg
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	40.1
2	1	2	2	2	42.4
3	1	3	3	3	42.4
4	2	1	2	3	41.4
5	2	2	3	1	42.1
6	2	3	1	2	42.2
7	3	1	3	2	43.0
8	3	2	1	3	45.5
9	3	3	2	1	46.0
I	124.90	124.50	127.80	128.20	G=385.1
II	125.70	130.00	129.80	127.60	CT=16 478.0
III	134.50	130.60	127.50	129.30	
SS _j	18.92	7.54	1.04	0.50	

表4 方差分析结果

Tab 4 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	18.92	2	9.46	38.17	<0.05
B	7.54	2	3.77	15.21	
C	1.04	2	0.52	2.10	
D	0.50	2	0.25		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

由表3、表4可知,各因素对总黄酮含量的影响顺序为A>B>C>D。其中,因素A有显著性影响($P<0.05$),选择水平3;而B、C因素各水平间差异不大,从提高效率方面考虑,均选择水平1。故最佳工艺为 $A_3B_1C_1$,即加12倍量的50%乙醇,回流2次,每次1 h。

2.4 工艺验证试验

按上述优选的工艺,称取野菊花药材3份,每份500 g,加12倍量50%乙醇,回流2次,每次1 h,并按“2.1.3”项下方法测定总黄酮含量。结果,每1 g野菊花中总黄酮量分别为43.2、42.9、42.2 mg,转移率分别为82.9%、82.3%、80.9%,与正交试验最高值相当,表明该提取工艺合理、可行。

3 讨论

$\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法是《中国药典》收载^[9]的常见总黄酮测定方法,其原理是在碱性条件下,利用其与黄酮物质生成红色铝螯合物为特征,在510 nm波长处有最大吸光度,以芦丁为对照,从而得到待测物质总黄酮的含量。因野菊花中各黄酮成分相对分子质量与芦丁相对分子质量相差不多,因此选择芦丁为对照品,使测定结果与总黄酮实际含量较为接近,以达到准确定量的目的。

本试验通过正交设计,考察了乙醇质量分数、加醇倍数、提取时间对提取工艺的影响,发现乙醇质量分数对提取工艺的影响较为显著,优选的最佳提取工艺对野菊花总黄酮的转移率在80%以上,表明工艺合理、可行。

参考文献

[1] Yerushalmi N, Margalit R. Bioadhesive-collagen-modifi-