

山慈菇中总黄酮的提取工艺优化^Δ

王萌萌^{1*}, 谢典¹, 周育芳², 李晓静³, 徐步斌¹, 周斌^{1#} (1. 江西科技师范大学药学院, 南昌 330013; 2. 贵溪市罗河镇人民政府农综站, 江西贵溪 335400; 3. 海军勤务学院, 天津 300450)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1949-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.16

摘要 目的: 建立山慈菇中总黄酮的含量测定方法, 并优化其提取工艺。方法: 采用紫外-可见分光光度法测定山慈菇中总黄酮的含量。以山慈菇中总黄酮含量为考察指标, 以乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数为考察因素, 在单因素试验的基础上, 采用L₉(3⁴)正交设计优化山慈菇中总黄酮的提取工艺。结果: 芦丁检测质量浓度线性范围为8~48 μg/mL ($r=0.9997$); 定量限为0.54 μg/mL, 检测限为0.18 μg/mL; 精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%; 加样回收率为99.61%~102.38% (RSD=1.15%, $n=6$)。最优提取工艺为70%乙醇、料液比1:20(g/mL)、提取时间45 min、提取次数2次。在此条件下, 山慈菇中总黄酮的平均含量为2.74 mg/g。结论: 所建含量测定方法简单、准确; 所得提取工艺稳定、可行。

关键词 山慈菇; 总黄酮; 芦丁; 正交设计; 提取工艺; 紫外-可见分光光度法; 含量测定

Optimization of the Extraction Technology of Total Flavonoids from *Typhonium divaricatum*

WANG Mengmeng¹, XIE Dian¹, ZHOU Yufang², LI Xiaojing³, XU Bubin¹, ZHOU Bin¹ (1. School of Pharmacy, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China; 2. Comprehensive Agriculture Station, Luohe Town People's Government in Guixi City, Jiangxi Guixi 335400, China; 3. Naval Logistics Academy, Tianjin 300450, China)

面积之和计算对应成分总峰面积。

在本研究过程中发现, 采用顶空进样法时, 供试样品的基质效应对回收率试验结果影响较大, 如果不在对照品溶液中加入黄蜀葵花总黄酮提取物, 则所得各待测组分回收率明显偏低。为了消除基质效应的影响, 本课题组采用标准加入法^[12]进行回收率试验, 在对照品溶液中加入与样品溶液相同量的黄蜀葵花总黄酮提取物, 使对照品和供试样品处于相同的基质环境下, 结果显示, 各待测组分回收率均良好, 符合相关规定。

综上所述, 本方法简便、准确、稳定、可靠, 可用于黄蜀葵花总黄酮提取物中9种有机溶剂残留量的测定。

参考文献

[1] 范丽, 董六一, 江勤, 等. 黄蜀葵花总黄酮抗炎解热作用[J]. 安徽医科大学学报, 2003, 38(1): 25-26.
[2] 徐向进, 张家庆, 黄庆玲. 槲皮素对糖尿病大鼠肾脏非酶糖化及氧化的抑制作用[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1998, 14(1): 34-37.
[3] 范丽, 袁丽萍, 陈志武. 黄蜀葵花总黄酮对小鼠急性心肌缺血缺氧损伤的保护作用[J]. 中国药房, 2005, 16(3): 176-177.

[4] 范丽, 袁丽萍, 陈志武. 黄蜀葵花总黄酮药理性预适应对家兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(11): 836-838.
[5] 黎望. 黄蜀葵花黄酮的提取及抗氧化性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
[6] 马茹君, 王莉, 杨华蓉, 等. GC法测定三七三醇皂苷中8种大孔吸附树脂的残留物[J]. 华西药学杂志, 2016, 31(2): 202-205.
[7] 马国萍, 陈丹, 黄群, 等. 玳玳果降脂提取物中大孔吸附树脂有机残留物的顶空气相色谱分析研究[J]. 福建医科大学学报, 2017, 51(6): 375-380.
[8] 许勇, 郑征伟, 钱大公, 等. 顶空气相色谱测定灯盏花素提取物中大孔树脂有机溶剂残留物[J]. 中成药, 2011, 33(8): 1351-1355.
[9] 蔡振华, 金松子, 蒋庆峰. 顶空气相色谱法测定黄芪提取物中大孔树脂有机溶剂残留[J]. 现代仪器与医疗, 2016, 22(1): 81-84.
[10] 付建武, 施之琪, 张茵茵, 等. 顶空气相色谱法同时测定人参总皂苷中10种树脂残留成分[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(9): 1680-1686.
[11] 国家标准化管理委员会. GB/T24396-2009 食品工业用吸附树脂产品测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 63-64, 105-109.

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81560635, 81760701)

* 硕士研究生。研究方向: 药物分析。E-mail: wg_mgm@163.com

通信作者: 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药新药研究。E-mail: tju_zhoubin@163.com

(收稿日期: 2018-12-19 修回日期: 2019-06-11)

(编辑: 段思怡)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of total flavonoids from *Typhonium divaricatum*, and to optimize its extraction technology. METHODS: The content of total flavonoids in *T. divaricatum* was determined by UV spectrophotometry. Using the extraction amount of total flavonoids from *T. divaricatum* as index, the volume fraction of ethanol, the ratio of material to liquid, the extraction time and times as factors, the extraction technology of total flavonoids from *T. divaricatum* was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal design, based on the single factor test. RESULTS: The linear range of rutin were 8-48 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9997$); the quantification limit was 0.54 $\mu\text{g/mL}$, and the detection limit was 0.18 $\mu\text{g/mL}$; RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2%. The recoveries were 99.61%-102.38% (RSD=1.15%, $n=6$). The optimal extraction technology was as follows: ethanol concentration of 70%, solid-liquid ratio of 1:20 (g/mL), extraction time of 45 min, extracting for 2 times. Under this condition, the average content of total flavonoids from *T. divaricatum* was 2.74 mg/g. CONCLUSIONS: Established method is simple and accurate; the extraction process is stable and feasible.

KEYWORDS *Typhonium divaricatum*; Total flavonoids; Rutin; Orthogonal test; Extraction technology; UV spectrophotometry; Content determination

山慈菇系兰科植物杜鹃兰 [*Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino]、独蒜兰 [*Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe] 或云南独蒜兰 (*Pleione yunnanensis* Rolfe) 的干燥假鳞茎,前者习称“毛慈菇”,后者习称“冰球子”,为2015年版《中国药典》(一部)^[1] 收录的常用中药。山慈菇味甘、微辛,性凉,归肝、脾经,具有清热解毒、化痰散结的功效,主要用于治疗痈疽恶疮、蛇虫咬伤、咽喉肿痛等症^[2]。药理研究表明,山慈菇具有抗肿瘤^[3-4]、抗菌^[5]、降压^[6-8]等药理活性。山慈菇主要含有萜类、联苄类、黄酮类、糖及糖苷类等化学成分,而黄酮类成分是其有效成分之一,含量较高,药用价值较大^[9-14]。目前,有研究对山慈菇化学成分的提取分离和粗提物的药效学等方面进行了研究^[15-16]。为更好地开发、利用山慈菇资源,本研究采用超声提取法提取了其总黄酮,采用紫外-可见分光光度法测定了山慈菇总黄酮的含量;以上述含量为指标,通过正交设计试验优化了提取工艺,旨在为其资源的进一步开发利用和质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2550型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司);FW80型粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);KQ-200VDE型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);CP225D型十万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 试剂

芦丁对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:YY90103,纯度: $\geq 98\%$);亚硝酸钠(天津市福晨化学试剂厂)、硝酸铝(天津市风船化学试剂科技有限公司)、氢氧化钠(天津市大茂化学试剂厂)、甲醇、乙醇(西陇化工股份有限公司)均为分析纯,水为纯净水。

1.3 药材

山慈菇药材采自云南省丽江市,经江西中医药大学药学院邓可众副教授鉴定为山慈菇兰科植物杜鹃兰 [*Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino] 的干燥假鳞茎。

2 方法与结果

2.1 山慈菇中总黄酮的含量测定

采用紫外-可见分光光度法测定山慈菇中总黄酮的含量^[17]。

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品10.00 mg,置于25 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度为0.4 mg/mL的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取经粉碎的山慈菇粉末(过30号筛)2.0 g,精密称定,置于100 mL锥形瓶中,加70%乙醇30 mL,超声(功率:100 W,频率:45 kHz)提取2次,每次45 min,合并滤液,摇匀。取5 mL,置于25 mL量瓶中,加50%乙醇定容至刻度,即得供试品溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密量取“2.1.1”项下对照品溶液0.5、1、1.5、2、2.5、3 mL,分别置于25 mL量瓶中,加5%亚硝酸钠溶液1 mL,摇匀,放置5 min,加10%硝酸铝溶液1 mL,摇匀,放置6 min,加4%氢氧化钠溶液10 mL,再加50%乙醇稀释至刻度,摇匀,放置15 min。以70%乙醇为参比溶液,于510 nm波长处测定吸光度。以质量浓度($x, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标进行线性回归,得芦丁回归方程为 $y=0.0127x+0.0250$ ($r=0.9997$),表明芦丁检测质量浓度的线性范围为8~48 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.4 定量限与检测限考察 以70%乙醇为参比溶液,于510 nm波长处连续测定6次吸光度并计算吸光度的标准偏差,以标准偏差与标准曲线线性斜率之比的10倍为定量限,以标准偏差与标准曲线线性斜率之比的3倍为检测限。结果,芦丁的定量限、检测限分别为0.54、0.18 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.5 精密度试验 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液适量,加甲醇稀释后按“2.1.3”项下方法处理,再于510 nm波长处连续测定6次。结果,吸光度的RSD为0.29% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取“2.1.2”项下供试品溶液适量,分别于室温放置0、4、8、12、16、24 h时按“2.1.3”项下方法处理,再于510 nm波长处测定吸光度。结果,吸光度的RSD为1.05% ($n=6$),表明供试品溶液于室温下

放置24 h内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取样品粉末,共6份,每份约2.0 g,精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项下方法处理,再于510 nm波长处测定吸光度并按标准曲线法计算样品中总黄酮的含量。结果,总黄酮的平均含量为2.64 mg/g,RSD为0.89% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取已知含量的样品粉末,共6份,每份约2.0 g,精密称定,分别加入一定量的对照品溶液,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项下方法处理,再于510 nm波长处测定吸光度并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

称取量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
2.000 2	0.322 8	0.415 0	0.736 2	99.61	100.7	1.15
2.000 3	0.320 9	0.420 0	0.740 2	99.83		
2.000 6	0.315 0	0.410 0	0.732 3	101.78		
2.000 1	0.322 8	0.400 0	0.732 3	102.38		
2.000 8	0.311 0	0.430 0	0.740 2	99.81		
2.000 7	0.318 9	0.410 0	0.732 3	100.83		

2.1.9 样品含量测定 取样品粉末约2.0 g,精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项下方法处理,再于510 nm波长处测定吸光度并按标准曲线法计算样品中总黄酮的含量,平行操作3次。结果,总黄酮含量为1.03~2.70 mg/g。

2.2 单因素试验

2.2.1 乙醇体积分数 精密称取山慈菇粉末2.0 g,以“2.1.9”项下方法为手段,在料液比1:20(g/mL)、提取时间45 min、提取2次条件下,考察不同乙醇体积分数(50%、60%、70%、75%、80%)对山慈菇中总黄酮含量的影响,结果见图1A。由图1A可知,随着乙醇体积分数的增加,山慈菇中总黄酮的含量呈先增加后降低的趋势,当乙醇体积分数为70%时,含量最高,故选择乙醇体积分数范围为70%~80%。

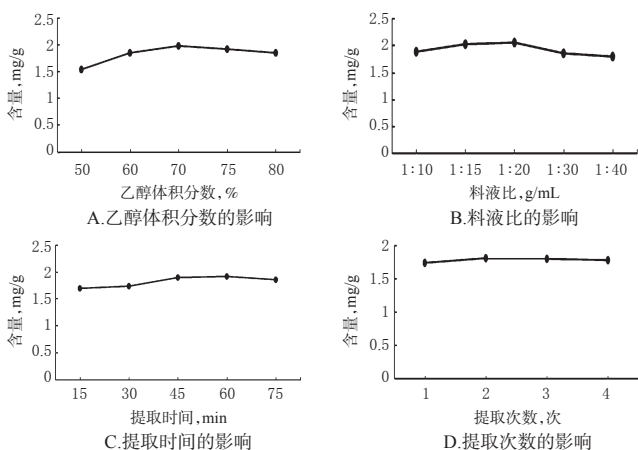


图1 单因素试验考察结果

Fig 1 Results of single factor tests

2.2.2 料液比 精密称取样品粉末2.0 g,以“2.1.9”项下方法为手段,在70%乙醇、提取时间45 min、提取2次条件下,考察不同料液比(1:10、1:15、1:20、1:30、1:40, g/mL)对山慈菇中总黄酮含量的影响,结果见图1B。由图1B可知,随着乙醇用量的增加,山慈菇中总黄酮含量呈先增加后降低的趋势,当料液比为1:20时,含量最高,故选择料液比范围为1:10~1:20(g/mL)。

2.2.3 提取时间 精密称取样品粉末2.0 g,以“2.1.9”项下方法为手段,在70%乙醇、料液比1:20(g/mL)、提取2次条件下,考察不同提取时间(15、30、45、60、75 min)对山慈菇中总黄酮含量的影响,结果见图1C。由图1C可知,随着提取时间的延长,山慈菇中总黄酮含量呈先增加后降低的趋势,当提取时间为45、60 min时,含量最高,为节省时间,故选择提取时间范围为30~60 min。

2.2.4 提取次数 精密称取样品粉末2.0 g,以“2.1.9”项下方法为手段,在70%乙醇、料液比1:20(g/mL)、提取时间45 min条件下,考察不同提取次数(1、2、3、4次)对山慈菇中总黄酮含量的影响,结果见图1D。由图1D可知,随着提取次数的增加,山慈菇中总黄酮含量呈先增加后降低的趋势,但增加、降低幅度均较小,为节省时间和减少溶剂用量,故选择提取次数范围为1~3次。

2.3 山慈菇中总黄酮的提取工艺优化

2.3.1 正交试验 在单因素试验的基础上,以乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为考察因素,总黄酮含量为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计试验对其提取工艺进行优化。因素与水平见表2,试验方案设计与结果见表3,方差分析结果见表4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素			
	A,%	B,g/mL	C,min	D,次
1	70	1:10	30	1
2	75	1:15	45	2
3	80	1:20	60	3

表3 试验方案设计与结果

Tab 3 Design and results of experiment plan

试验号	A	B	C	D	总黄酮含量,mg/g
1	1	1	1	1	1.40
2	1	2	2	2	2.70
3	1	3	3	3	1.98
4	2	1	2	3	1.71
5	2	2	3	1	1.56
6	2	3	1	2	1.87
7	3	1	3	2	1.66
8	3	2	1	3	1.88
9	3	3	2	1	1.03
K_1	2.027	1.590	1.717	1.330	
K_2	1.713	2.047	1.813	2.077	
K_3	1.523	1.627	1.733	1.857	
R	0.504	0.457	0.096	0.747	

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F	P
A	0.388	2	0.928	>0.05
B	0.386	2	0.923	>0.05
C	0.016	2	0.038	>0.05
D	0.883	2	2.111	<0.05
误差	1.67	8		

由表3可知,各因素对山慈菇中总黄酮含量影响大小的顺序为D>A>B>C,即提取次数>乙醇体积分数>料液比>提取时间,其中A₁>A₂>A₃、B₂>B₃>B₁、C₂>C₃>C₁、D₂>D₃>D₁。

由表4可知,提取次数具有显著性影响(P<0.05),而乙醇体积分数、料液比、提取时间均无显著性影响(P>0.05)。

2.3.2 最优提取工艺的确定及验证试验 综合考虑节约资源和成本,最终确定山慈菇中总黄酮的最优提取工艺为A₁B₂C₂D₂,即70%乙醇、料液比1:20(g/mL)、提取时间45 min、提取次数2次。按此工艺条件进行验证试验,平行操作3次,结果见表5。由表5可知,优化所得工艺条件稳定、可行。

表5 验证试验结果(n=3)

Tab 5 Results of validation tests(n=3)

试验号	药材量,g	总黄酮含量,mg/g	平均总黄酮含量,mg/g
1	2.000 3	2.75	
2	2.000 2	2.74	2.74
3	2.000 0	2.72	

3 讨论

笔者在前期预试验中比较了加热回流提取和超声提取的效果。结果显示,超声提取所得总黄酮的含量显著高于加热回流提取,故选择超声提取法提取山慈菇中的总黄酮。该方法可节省溶剂和提取时间,且提取条件相对温和,尤其适用于易氧化、易分解、热不稳定的物质^[18-19]。

本研究在单因素试验的基础上,采用正交试验优化了山慈菇中总黄酮的提取工艺条件。结果显示,影响山慈菇总黄酮含量大小的因素顺序为提取次数>乙醇体积分数>料液比>提取时间;优化提取工艺条件为70%乙醇、料液比1:20(g/mL)、提取时间45 min、提取次数2次,在此条件下山慈菇中总黄酮的平均含量为2.74 mg/g。

黄酮类化合物是山慈菇的有效成分之一,具有保护心血管、抗炎、抗菌、抗病毒等药理作用^[3-8,20-21]。本研究采用紫外-可见分光光度法测定了山慈菇中总黄酮的含量,可为山慈菇中总黄酮的进一步开发利用提供数据支持。

综上所述,本研究所建含量测定方法简单、准确;所

得提取工艺稳定、可行。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:32.
- [2] 肖培根.新编中药志[M].北京:化学工业出版社,2000:100.
- [3] 牛晓雨,王璐,孙放,等.山慈菇水煎剂对乳腺癌MDA-MB-231细胞的影响[J].中成药,2018,40(1):197-200.
- [4] 严玉玲,万琼,周俭珊,等.山慈菇抗肿瘤作用机制的研究进展[J].广东医学,2016,37(22):3468-3469.
- [5] 孙红祥.一些中药及其挥发性成分抗霉菌活性研究[J].中国中药杂志,2001,26(2):99-102.
- [6] 孟海波.山慈菇多糖的抗氧化及降脂作用研究[D].长沙:湖南农业大学,2015.
- [7] 沈瑾秋.山慈菇的临床应用及药理研究概要[J].实用中医内科杂志,2008,22(10):3-4.
- [8] 何玉明,徐鹏,商玲.山慈菇药理作用研究概况[J].黑龙江中医药,2008,37(4):50-51.
- [9] 刘净,于志斌,叶蕴华,等.山慈菇的化学成分[J].药学报,2008,43(2):181-184.
- [10] 林冰,周英.山慈菇化学成分研究: I [J].中国中医药资讯,2011,3(5):183.
- [11] 魏伟.山兰药材的化学成分及其多糖免疫药理活性研究[D].长春:吉林农业大学,2016.
- [12] 袁桥玉,刘新桥.中药毛慈菇的化学成分研究[J].中药材,2018,41(2):346-349.
- [13] 甘甜.山兰化学成分及其体外抗氧化活性研究[D].长春:吉林农业大学,2017.
- [14] 朱毅.杜鹃兰的化学成分研究[D].武汉:湖北中医药大学,2014.
- [15] 原文珂,覃彬华,李小平.山慈菇的化学成分研究[J].中国现代中药,2017,19(5):639-641,669.
- [16] 张尧,黄波,赵致,等.山慈菇乙酸乙酯部位化学成分研究[J].中药材,2011,34(12):1882-1883.
- [17] 朱爱姣.健骨力胶囊中总黄酮的含量测定方法分析[J].基层医学论坛,2014,18(4):527-528.
- [18] 蔡晓琴,顾霞敏,唐小琴,等.合欢花总黄酮含量的测定及其超声提取工艺研究[J].安徽农业科学,2016,44(11):151-153.
- [19] 海力茜·陶尔大洪,古娜娜.对山别克.恰麻古中总黄酮提取工艺[J].医药导报,2014,33(7):935-936.
- [20] 祝寅溟,王帅,李瑶,等.黄酮类化合物药理作用的研究进展[J].吉林医药学院学报,2018,39(3):219-223.
- [21] 郭萌,张晴,闫丽萍,等.黄酮类化合物为主要活性成分的单味药和复方中药及其药理作用[J].沈阳医学院学报,2018,20(6):558-561,564.

(收稿日期:2019-01-23 修回日期:2019-05-20)

(编辑:陈宏)