

文章编号:1674-2869(2015)12-0006-04

正交试验优选虎杖总黄酮的提取工艺

陈林莉^{1,2}, 方继德^{1,2}, 黎 莉^{1,2*}

1. 武汉工程大学化工与制药学院, 湖北 武汉 430074;

2. 绿色化工过程教育部重点实验室(武汉工程大学), 湖北 武汉 430074

摘 要: 为了比较虎杖总黄酮的超声法和冷浸法的提取效果, 考察了乙醇质量分数、料液比、提取时间对虎杖总黄酮的影响, 采用正交试验, 分别对超声提取和冷浸提取虎杖总黄酮的工艺参数进行了优化. 运用 spss 19.0 软件, 对正交试验的数据进行了分析. 结果表明, 对虎杖总黄酮提取率影响最大的为料液比, 乙醇质量分数和提取时间对其也有一定影响. 虎杖中总黄酮最佳的提取工艺为乙醇质量分数 80%, 料液比 1:50, 超声提取 10 min. 在该条件下, 总黄酮提取率为 19.31%. 与冷浸法比较, 超声法提取虎杖中总黄酮具有较高的提取率, 对进一步开发利用虎杖中总黄酮具有一定的指导作用.

关键词: 虎杖; 总黄酮; 正交试验; 超声法

中图分类号: TB35

文献标识码: A

doi: 10. 3969/j. issn. 1674-2869. 2015. 12. 002

0 引 言

虎杖为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根. 我国大部分地区均产, 主产于江苏、江西、山东、四川等地^[1]. 虎杖具有泻下、祛痰止咳、降压、止血、镇痛等药理作用, 它的主要成分包括虎杖苷、黄酮类、大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、多糖. 据文献报道, 黄酮类化合物具有抗氧化、调节心血管系统、镇痛、利胆保肝、调节内分泌系统等作用^[2-3]. 现代研究表明, 黄酮类化合物具有良好的抗病毒作用^[4-5]. 本研究采用正交试验法, 分别对超声法和冷浸法提取虎杖总黄酮的工艺参数进行了优化, 同时对两种提取方法的效果作了比较, 为虎杖总黄酮的进一步开发利用奠定了一定的实验基础.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); KQ-250 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DZF-6090 真空干燥箱(上海琅环实验设备有限公司); 高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司). 虎杖购于武汉市传奇春天大药房, 产地四川, 经武汉工程大学黎莉教

授鉴定为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根; 芦丁对照品(供 UV 法测定, 质量分数为 92.6%, 中国食品药品检定研究院, 批号: 100080-201409); 其余试剂均为分析纯.

1.2 正交试验设计

通过预实验, 选定乙醇质量分数(A)、料液比(B)、提取时间(C)为考察因素, 虎杖总黄酮含量为考察指标, 按照 $L_9(3^3)$ 正交表设计, 超声提取因素水平表见表 1, 冷浸提取因素水平表见表 2.

表 1 超声提取因素水平表

Table 1 Factors and levels of ultrasonic extraction

水平	因素		
	乙醇的质量分数/%	料液比/倍	提取时间/min
1	40	10	20
2	60	30	30
3	80	50	40

表 2 冷浸提取因素水平

Table 2 Factors and levels of cold soak extraction

水平	因素		
	乙醇的质量分数/%	料液比/倍	提取时间/h
1	40	10	12
2	60	30	24
3	80	50	36

收稿日期: 2015-11-02

基金项目: 武汉工程大学研究生教育创新基金(CX2014022)

作者简介: 陈林莉(1991-), 女, 湖北黄冈人, 硕士研究生. 研究方向: 中药活性成分及制剂.* 通信联系人

1.3 总黄酮含量测定

1.3.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 21.6 mg,加少量质量分数60%乙醇溶解后置于 100 mL 容量瓶中并定容,摇匀,即得芦丁对照品溶液的质量浓度为 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.3.2 测定吸收波长的确定 精密量取上述芦丁对照品溶液 1 mL,置于 25 mL 容量瓶中,加蒸馏水至 6 mL,加质量分数 5% NaNO_2 溶液 1 mL,充分摇匀后静置 6 min;加质量分数为 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1 mL,摇匀,静置 6 min;加质量分数 4% NaOH 溶液 10 mL,再加蒸馏水定容至刻度,摇匀后静置 15 min,以未加芦丁对照品试液作空白对照,于 400~800 nm 波长范围内进行光谱扫描,结果显示在 500 nm 处有最大吸收峰,故选择 500 nm 为测定波长。

1.3.3 标准曲线的绘制 精密量取芦丁对照品溶液 0、1、2、3、4、5、6 mL,按照“1.3.2”步骤操作,以未加芦丁对照品的试液作空白对照,在 500 nm 处测吸光度,纵坐标为吸光度 A,横坐标为芦丁质量浓度,绘制标准曲线,通过拟合得线性回归方程为: $A=12.282C-0.0201$, $R^2=0.9996$ 。结果表明芦丁对照品在 $0.008\sim 0.048 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内与吸光度线性关系良好。

1.3.4 供试品溶液的制备 准确称取干燥过孔径 0.425 mm 筛虎杖约 1.00 g,按正交试验表中条件提取,提取液过滤后定容至 100 mL 容量瓶中,即得供试品溶液。

1.3.5 样品含量测定 精密量取上述供试品溶液 0.5 mL,按“1.3.3”项下方法测定吸光度,根据回归方程可计算总黄酮含量。

1.4 方法学考察

1.4.1 精密密度试验 精密量取同一供试品溶液 6 份,每份 0.5 mL,分别置于 25 mL 容量瓶中,按“1.2.3”项下方法测定吸光度.结果, $RSD=1.456\%$,表明该方法有较好的精密密度。

1.4.2 稳定性试验 精密量取供试品溶液 0.5 mL,置于 25 mL 容量瓶中,按“1.3.3”项下方法每隔 5 min 测定一次吸光度,共测 6 次.结果, $RSD=1.185\%$,表明样品的稳定性良好。

1.4.3 重复性试验 平行制备 6 份供试品溶液,按“1.3.3”项下方法测定吸光度.结果, $RSD=1.857\%$,表明该方法重复性较好。

1.4.4 加样回收率试验 精密量取已知含量的供试品溶液 6 份,每份 0.25 mL,分别精密加入一定量的芦丁对照品溶液,按“1.3.3”项下方法测定吸光度.结果,平均回收率为 99.208%, $RSD=0.988\%$,表明该方法回收率高。

2 结果与讨论

2.1 正交试验结果及分析

正交试验结果见表 3,方差分析结果见表 4。

由表 3 和表 4 得出,超声法中 $R_B>R_A>R_C$,表明影响总黄酮提取率的因素顺序为料液比>乙醇质量分数>提取时间.可知对总黄酮提取率的影响较大的是料液比、乙醇质量分数,提取时间对总黄酮提取率的影响较小,但由于试验次数较少,均未见显著性差异.因此,超声法最佳提取工艺为 $A_3B_3C_1$,即乙醇质量分数 80%,料液比 1:50,提取时间 10 min。

冷浸法中 $R_B>R_A>R_C$,表明影响总黄酮提取率的因素顺序为料液比>乙醇质量分数>提取时间.可知对总黄酮提取率的影响较大的因素为乙醇质量分数、料液比,提取时间对总黄酮提取率的影响较小,但由于试验次数较少,均未见显著性差异.因此,冷浸法最佳提取工艺为 $A_3B_3C_2$,即乙醇质量分数 80%,料液比 1:50,提取时间 24 h。

由上述实验结果可知,超声法和冷浸法对总黄酮提取率的影响因素相似.但超声法提取效果优于冷浸法,且超声提取时间较短,故虎杖总黄酮的最佳提取工艺为:乙醇质量分数 80%、料液比为 1:50、超声提取 10 min。

2.2 验证试验

准确称取干燥虎杖(过孔径 0.425 mm 筛)约 1.00 g,按超声法最佳提取工艺 $A_3B_3C_1$ 平行操作 3 次,其总黄酮平均提取率为 19.31%, $RSD=1.16\%$.验证试验结果与正交试验结果基本一致,表明该提取工艺稳定可行。

表 3 正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	超声法总黄酮提取率/%	冷浸法总黄酮提取率/%
1	1	1	1	12.339	11.484
2	1	2	2	13.723	11.932
3	1	3	3	16.166	13.276
4	2	1	2	14.700	12.217
5	2	2	3	16.858	14.415
6	2	3	1	17.876	16.532
7	3	1	3	15.026	13.153
8	3	2	1	18.812	14.008
9	3	3	2	19.260	18.120
K_1	42.228	42.065	49.027		
K_2	49.434	49.393	47.683		
K_3	53.098	53.302	48.050		
超	k_1	14.076	14.022	16.342	
声	k_2	16.478	16.464	15.894	
法	k_3	17.699	17.767	16.017	
	R	3.623	3.745	0.448	
	K_1	36.692	36.854	42.024	
	K_2	43.164	40.355	42.269	
冷	K_3	45.281	47.928	40.844	
浸	k_1	12.231	12.285	14.008	
法	k_2	14.388	13.452	14.090	
	k_3	15.094	15.976	13.615	
	R	2.863	3.691	0.475	

表 4 方差分析结果

Table 4 Results of variance analysis

方差来源	离差平方和		自由度	方差		F		P	
	超声	冷浸		超声	冷浸	超声	冷浸	超声	冷浸
A	20.390	13.349	2	10.195	6.674	12.952	3.919	0.072	0.203
B	21.694	21.360	2	10.847	10.680	13.781	6.270	0.068	0.138
C	0.322	0.387	2	0.161	0.194	0.204	0.114	0.830	0.898
误差	1.574	3.407	2	0.787	1.703				

注: $F_{0.1}(2,2)=9$; $F_{0.05}(2,2)=19$.

3 结 语

本实验通过正交试验分别考察了虎杖总黄酮的超声法和冷浸法提取工艺, 比较两种总黄酮提取的工艺可以看出, 超声法提取效果优于冷浸法, 并获得虎杖总黄酮的最佳提取工艺为: 乙醇质量分数 80%、料液比 1:50、超声提取 10 min. 在该条件下, 总黄酮提取率为 19.31%. 本实验优选的虎杖中总黄酮的提取工艺操作简单、提取率高, 并为虎杖中总黄酮的后续开发研究提供了一定的实验基础.

参考文献:

- [1] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007. GAO Xue-min. Chinese medicine [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2007. (in Chinese)
- [2] 朱丹, 袁芳, 孟坤, 等. 黄酮类化合物的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(6): 387-388. ZHU Dan, YUAN Fang, MENG Kun, et al. Research progress of flavonoids [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2007, 22 (6): 387-388. (in Chinese)

- [3] 黄河胜,马传庚,陈志武. 黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2000,25(10):589-590.
HUANG He-sheng, MA Chuan-geng, CHEN Zhi-wu. A progress in pharmacological research of flavonoids [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2000, 25(10): 589-590.(in Chinese)
- [4] TAITA S, SALVATIA A L, DESIDERIB N. Antiviral activity of substituted homoisoflavonoids on enteroviruses[J].Antiviral Research,2006,72(3):252-225
- [5] KIATA T S, PIPPENB R, YUSOF R, et al. Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivativsand flavonoids of fingerroot, Boesenbergiarotunda (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,2006,16(12):3337-3340.

Optimizing extraction technology of total flavonoids from *Polygonum cuspidatum* by orthogonal experiment

CHEN Lin-li^{1,2}, FANG Ji-de^{1,2}, LI Li^{1,2}

1.School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China;

2.Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China

Abstract: To compare the extraction rates between the ultrasonic method and the cold soak method of total flavonoids from *Polygonum cuspidatum*, the effects of ethanol concentration, solid-liquid ratio and extraction time on the extraction rates were explored. And the technological parameters of the ultrasonic method and the cold soak method were optimized by orthogonal experiment. Using software spss 19.0, the data of the orthogonal experiment were analyzed. The results show that the effect of solid-liquid ratio on the extraction rates of total flavonoids from *Polygonum cuspidatum* is the biggest, followed by the ethanol concentration and the extraction time. The optimal extraction conditions are ethanol concentration of 80%, solid-liquid ratio of 1:50 and ultrasonic extraction of 10 min. Under the condition, the extraction rate of total flavonoids is 19.31%. Compared with the cold soak method, the ultrasonic method has a higher extraction rate, which is helpful to the further development and use of total flavonoids in *Polygonum cuspidatum*.

Keywords: *Polygonum cuspidatum*; total flavonoids; orthogonal experiment; ultrasonic method

本文编辑:张 瑞