

# 正交试验优选黄蜀葵花中总黄酮的提取工艺

李春花<sup>1\*</sup>, 刘雪丽<sup>2</sup>, 郑文丽<sup>3</sup>, 张华潭<sup>3</sup>, 魏艳婷<sup>3</sup>, 武朝阳<sup>3</sup>(1.河北医科大学中医学院中药药剂教研室, 石家庄 050091; 2.灵寿县医院, 河北 灵寿 050500; 3.河北医科大学研究生学院, 石家庄 050017)

中图分类号 R284.2; R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2535-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.14

**摘要** 目的: 优选黄蜀葵花中总黄酮的提取工艺。方法: 采用正交试验法, 以槲皮素含量为评价指标, 以回流时间、回流温度、酸化液量、酸化液配比(甲醇:25%盐酸)为考察因素, 优选酸化工艺; 以乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数为考察因素, 优选总黄酮提取工艺。结果: 最佳酸化工艺为用25倍量甲醇-25%盐酸(4:1, V/V)酸化液, 70℃水浴回流0.5 h; 最佳提取工艺为用12倍量85%乙醇, 回流提取2次, 每次2.5 h。结论: 优选的工艺合理、可行, 可用于黄蜀葵花中总黄酮的提取。

**关键词** 正交试验; 黄蜀葵花; 总黄酮; 槲皮素; 提取工艺

## Optimization of the Extraction Process for Total Flavonoids from *Abelmoschus manihot* by Orthogonal Test

LI Chun-hua<sup>1</sup>, LIU Xue-li<sup>2</sup>, ZHENG Wen-li<sup>3</sup>, ZHANG Hua-tan<sup>3</sup>, WEI Yan-ting<sup>3</sup>, WU Chao-yang<sup>3</sup>(1. Dept. of TCM, School of TCM, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, China; 2. Lingshou County Hospital, Hebei Lingshou 050500, China; 3. Past-graduate School, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction process of total flavonoids of *Abelmoschus manihot*. METHODS: The acidification technology was optimized by orthogonal experiment with the content of quercetin as index using reflux time, reflux temperature, amount of acid fluid, ratio of acid fluid (ethanol:25% hydrochloric acid) as factors. The extraction technology was optimized using ethanol concentration, ethanol consumption, extraction time and extraction times as factors. RESULTS: Optimized acidification technology was as follows: 25-folds of ethanol-25% hydrochloric acid (4:1, V/V) as acid fluid, 70℃ water bath for refluxing 0.5 h; optimized extraction technology was as follows: 12-folds of 85% ethanol, extracting 2 times, 2.5 h each time. CONCLUSIONS: Optimized technology is reasonable and feasible, and can be used for the extraction of total flavonoids from *A. manihot*.

**KEY WORDS** Orthogonal experiment; *Abelmoschus manihot*; Total flavonoids; Quercetin; Extraction technology

黄蜀葵为锦葵科植物黄蜀葵 *Abelmoschus manihot* (L.) Medic. 的干燥花冠, 具有清利湿热、消肿解毒之功效<sup>[1]</sup>。现代研究表明, 黄蜀葵中黄酮类成分具有保护脑缺血、心肌缺血、心肌细胞, 改善血液流变学, 抗脂质过氧化等作用<sup>[2-3]</sup>。金丝桃苷、槲皮素、异槲皮苷、槲皮苷等是黄蜀葵的主要有效成分, 且含量较高, 其化学结构均是以槲皮素为母核的黄酮类化合物<sup>[4-5]</sup>。为保证药物疗效, 本试验采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计, 以高效液相色谱(HPLC)法测定黄蜀葵提取液酸化后的槲皮素含量, 并以此为指标, 优选总黄酮的提取工艺, 为实际生产和临

床应用提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-10A 型 HPLC 仪, 包括 SPD-10A VP 紫外检测器、GCsolution 色谱工作站(日本岛津公司); RE-52 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); TG328B 型分析天平(上海精科天平仪器厂)。

### 1.2 药材

黄蜀葵药材购于河北安国药材市场, 经河北医科大学

- [10] 周现军. 黄芩中有效成分的提取工艺探讨[J]. 中外健康文摘, 2009, 8(15): 191.
- [11] 黄昆. 黄芩煎煮工艺及最佳粉碎粒度的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2005.
- [12] 江帆, 安崇惠, 朱亭潘, 等. 地榆药材及地榆升白胶囊中没食子酸的 HPLC 法测定[J]. 中草药, 2008, 39(9): 1 341.

- [13] 孙立立, 江波, 袁振海, 等. HPLC 测定地榆饮片中没食子酸的含量[J]. 中成药, 2006, 28(8): 1 144.
- [14] 刘利军, 李瑞莲. 反相高效液相色谱法测定地榆药材中没食子酸的含量[J]. 中国药师, 2009, 12(7): 979.
- [15] 柯泳伽, 谢仕伟. 地榆配方颗粒质量标准的研究[J]. 中国医药咨询, 2012, 4(2): 38.

\* 教授, 硕士研究生导师, 硕士。研究方向: 中药制剂新技术、新方法。电话: 0311-86265343。E-mail: hbykdxlch@163.com

(收稿日期: 2012-08-29 修回日期: 2013-01-14)

侯芳洁讲师鉴定符合2010年版《中国药典》(一部)相关规定。

### 1.3 试剂

槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:11766-200601);甲醇(色谱纯,批号:A2005-0001)、乙腈(色谱纯,批号:TEN7949768)均购于美国 Grace 公司;双蒸水(笔者自制)。

## 2 方法与结果

### 2.1 槲皮素的含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-乙腈-0.4%磷酸水溶液(10:30:60, V/V/V);检测波长:360 nm;柱温:室温;流速:1.0 ml/min;进样量:20 μl。理论板数按槲皮素峰计算应不低于3 000。色谱见图1。

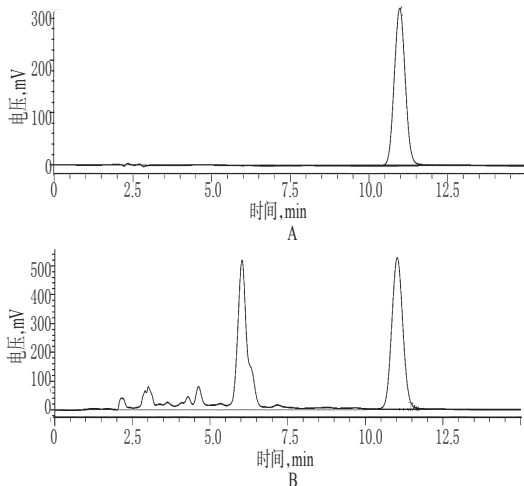


图1 高效液相色谱图

A. 槲皮素对照品; B. 供试品

Fig 1 HPLC chromatograms

A. quercetin control; B. test sample

2.1.2 对照品溶液的制备 取干燥至恒质量的槲皮素对照品10 mg,精密称定,置10 ml量瓶中,甲醇定容,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取干燥的黄蜀葵花药材适量,精密称取15 g,加150 ml 70%乙醇,回流提取2次,每次1 h,将滤液挥干,用70%乙醇溶解并定容于250 ml量瓶中。精密移取提取液25 ml,挥干,加入35 ml 甲醇-25%盐酸(4:1, V/V)溶液<sup>[6]</sup>,于85 ℃水浴回流1 h,置100 ml量瓶中,甲醇定容,摇匀,即得。

2.1.4 标准曲线的制备 取对照品溶液适量,按上述色谱条件分别进样2.5、8、10、12、14、16 μl,记录峰面积。以槲皮素峰面积积分值(y)为纵坐标,进样量(x, μg)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=3\ 324\ 256.322\ 8x+938\ 950.643\ 1$ ( $r=0.999\ 5, n=7$ )。结果表明,槲皮素进样量在2.01~16.08 μg范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 取对照品溶液适量,按上述色谱条件连续进样6次,每次20 μl,记录峰面积。结果, RSD=0.425% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批黄蜀葵花药材6份,每份约15

g,精密称定,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定。结果,平均每1 g黄蜀葵花药材中含槲皮素10.992 5 mg, RSD=2.625% ( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密吸取已知槲皮素质量浓度(0.164 9 mg/ml)的黄蜀葵花供试品溶液适量,共9份,分为3组,每组分别精密加入槲皮素对照品溶液(质量浓度:1.005 mg/ml)1.00、1.25、1.45 ml,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,并计算加样回收率。结果,平均回收率为99.51%, RSD=0.260 8% ( $n=9$ )。

### 2.2 正交试验优选提取液酸化工艺

2.2.1 正交试验设计与结果 根据预试验结果,选定回流时间(A)、回流温度(B)、酸化液量(C)、酸化液配比(D)(甲醇:25%盐酸, V/V)为考察因素,以槲皮素含量为评价指标,采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验表优选工艺。酸化工艺的因素与水平见表1;正交试验结果见表2;方差分析结果见表3。

表1 酸化工艺的因素与水平

Tab 1 Factors and levels of acidification technology

水平	因素			
	A, h	B, ℃	C, 倍	D
1	1.0	90	20	4:1
2	0.5	50	25	3:1
3	1.5	70	15	5:1

表2 酸化工艺的正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal test of acidification technology

试验号	A	B	C	D	槲皮素含量, mg/g
1	1	1	1	1	13.326 7
2	1	2	2	2	11.145 3
3	1	3	3	3	13.587 7
4	2	1	2	3	14.488 7
5	2	2	3	1	12.445 0
6	2	3	1	2	14.081 3
7	3	1	3	2	10.145 3
8	3	2	1	3	11.112 7
9	3	3	2	1	13.763 0
I	12.686 567	12.653 567	12.840 233	13.178 233	
II	13.671 667	11.567 667	13.132 333	11.790 633	
III	11.673 667	13.810 667	12.059 333	13.063 033	
R	1.998 000	2.243 000	1.073 000	1.387 600	

表3 酸化工艺的方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis of acidification technology

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	5.99	2	2.99	1.68	>0.05
B	7.55	2	3.77	2.12	>0.05
C	1.85	2	0.92	0.52	>0.05
D	3.56	2	1.78	1.00	>0.05

注:  $F_{0.05}(2, 2)=19.00$

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

由表2、表3可知,各因素影响酸化工艺的大小顺序为B>A>D>C,最佳酸化工艺为A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>,即用25倍量甲醇-25%盐酸(4:1, V/V)酸化液,70 ℃水浴回流0.5 h。

2.2.2 最佳酸化工艺验证试验 取黄蜀葵花药材适量,共3

份,分别按“2.1.3”项下方法提取药材,照最佳酸化工艺进行验证试验,测定槲皮素的含量。结果,每1g黄蜀葵花药材中含槲皮素分别为14.5380、14.4899、14.5243mg,与正交试验最高值相当,表明优选的酸化工艺稳定、可行。

### 2.3 正交试验优选黄蜀葵花提取工艺<sup>[7]</sup>

2.3.1 正交试验设计与结果 根据单因素试验结果,选定乙醇体积分数(A)、乙醇用量(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为主要影响因素,以槲皮素含量为评价指标,采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验表优选工艺。提取工艺的因素与水平见表4;正交试验结果见表5;方差分析结果见表6。

表4 提取工艺因素与水平

Tab 4 Factors and levels of extraction technology

水平	因素			
	A, %	B, 倍	C, h	D, 次
1	70	8	2.5	3
2	55	12	1.5	1
3	85	10	2.0	2

表5 提取工艺的正交试验结果

Tab 5 Results of orthogonal test of extraction technology

试验号	A	B	C	D	槲皮素含量, mg/g
1	1	1	1	1	13.771 2
2	1	2	2	2	12.246 2
3	1	3	3	3	13.025 9
4	2	1	2	3	12.079 7
5	2	2	3	1	12.132 2
6	2	3	1	2	12.581 2
7	3	1	3	2	12.721 2
8	3	2	1	3	15.356 6
9	3	3	2	1	14.106 2
I	13.014 467	12.857 400	13.903 033	13.336 567	
II	12.264 383	13.245 017	12.810 733	12.516 250	
III	14.061 367	13.237 800	12.626 450	13.487 400	
R	1.796 984	0.387 617	1.276 583	0.971 150	

表6 提取工艺的方差分析结果

Tab 6 Results of variance analysis of extraction technology

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	4.89	2	2.44	2.98	>0.05
B	0.30	2	0.15	0.18	>0.05
C	2.86	2	1.43	1.74	>0.05
D	1.64	2	0.82	1.00	>0.05

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

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

由表5、表6可知,各因素影响提取工艺的大小顺序为A>C>D>B,最佳提取工艺为A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>,即用12倍量85%乙醇回

流提取2次,每次2.5h。

2.3.2 最佳提取工艺验证试验 取黄蜀葵花药材适量,共3份,分别按最佳提取工艺进行验证试验,并照“2.2”项下最佳酸化工艺对提取液进行酸化处理,测定槲皮素的含量。结果,每1g黄蜀葵花药材中含槲皮素分别为15.5366、15.4213、15.4656mg,与正交试验中最高值相当,表明优选的提取工艺合理、可行。

## 3 讨论

黄蜀葵花中黄酮类成分金丝桃苷、槲皮素、异槲皮苷、槲皮苷等是其主要有效成分,且含量较高,分析其结构发现,它们都是由槲皮素和糖形成的苷类物质。苷在酸性条件下可以水解成苷元,笔者通过比对黄蜀葵花色谱图、酸化水解后黄蜀葵花色谱图和槲皮素对照品色谱图发现,以上苷类物质都转化为同一种物质,即槲皮素,因此采用酸化处理提取液的方法使黄蜀葵花中的黄酮类物质都转化为槲皮素,再通过测定酸化后槲皮素的含量,既可以较全面地反映黄酮类成分提取的程度,同时也简化了试验过程。

目前,通过酸化黄蜀葵花提取液测定总黄酮的研究报道尚不多见。本试验系统研究了温浸法、温浸+回流法、超声法及直接回流法对酸化结果的影响,发现直接回流法酸化效果较好,并得到了相关参数和试验条件,这为进一步深化研究黄蜀葵花总黄酮奠定了基础。

## 参考文献

- [1] 李时珍.本草纲目:校点本[M].北京:人民卫生出版社,1977:1045.
- [2] 刘爽,江蔚新,吴斌.黄蜀葵花化学成分及药理活性研究进展[J].中国现代中药,2010,12(8):5.
- [3] 郝吉莉,周兰兰,司力,等.黄蜀葵花总黄酮抗脑卒中后抑郁作用的研究[J].中国药房,2007,18(12):885.
- [4] 高雷,张平,程钢.黄蜀葵花的研究进展[J].安徽医药,2008,12(3):198.
- [5] 李春梅,王涛,张祎,等.中药黄蜀葵花化学成分的分离与鉴定:II[J].沈阳药科大学学报,2010,27(10):803.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:296.
- [7] 李春花,王永泽,李瑞平,等.鼻渊灵颗粒剂提取工艺研究[J].时珍国医国药,2009,20(3):540.

(收稿日期:2012-07-26 修回日期:2013-02-26)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅