

# 正交设计研究山牡荆总黄酮提取工艺

代现平, 班翠红, 韩景田 (滨州医学院药学院, 山东烟台 264003)

**摘要** [目的]建立山牡荆总黄酮的合理提取工艺,为山牡荆的开发及利用提供理论依据。[方法]以乙醇用量、乙醇浓度、提取时间和提取次数等为考察因素,以山牡荆总黄酮含量作为指标,应用正交试验对提取工艺进行优化。[结果]山牡荆中总黄酮的最佳提取工艺为乙醇用量12倍量、乙醇浓度70%乙醇、提取次数3次、每次1h。[结论]该提取工艺简单、高效,适用于山牡荆的总黄酮提取。

**关键词** 山牡荆;总黄酮;正交试验;提取工艺

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)23-07748-02

## Extraction Technique for Total Flavonoids from *Vitex quinata* by Orthogonal Test

DAI Xian-ping et al (School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003)

**Abstract** [Objective] To establish a method of extraction technology of total flavonoids to offer a basis for development and utilization of *Vitex quinata*. [Method] The extraction technology of total flavonoids was optimized by orthogonal experiment with the content of total flavonoids as index and with ethanol concentration, ethanol dosage, extracting frequency and extracting time as factors. [Result] The optimal extraction technology was that 12-fold and 70% ethanol, 1 hour of reflux, and 3 times of extraction. [Conclusion] The extraction technology is simple and rapid for the extraction of total flavonoids from *Vitex quinata*.

**Key words** *Vitex quinata*; Total flavonoids; Orthogonal experiment; Extraction technology

牡荆属植物 *Vitex* 是马鞭草科乔木或灌木,全世界大约有250余种,主要分布在热带及温带地区。在我国有14种,主要分布于长江以南,在东北、西北、华北等地也有少量分布<sup>[1]</sup>。山牡荆(*Vitex quinata*)一般以其树干心材和干燥根入药,具有止咳定喘、清热解毒及镇静退热等功效,常用于痈肿疮疡、温病发热、风湿热痹、关节红肿热痛及热毒血痢等病症<sup>[2]</sup>。研究显示,山牡荆及牡荆属植物主要含有黄酮类、苯丙素类、甾类、环烯醚萜类、三萜类、二萜类、倍半萜类等化学成分<sup>[3-8]</sup>。其中黄酮类化合物,因其广泛的生物活性已成为研究的热点。现代药理研究证实,山牡荆的黄酮类成分具有如抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎、增强机体免疫力、止咳祛痰等多种药理作用<sup>[3-8]</sup>。因此,研究山牡荆中总黄酮的提取工艺具有重要意义。笔者以山牡荆总黄酮作为考察指标,采用正交设计试验进行提取工艺的优化,对影响提取的各种条件及因素进行了深入探讨,为山牡荆总黄酮提取工艺的研究及山牡荆总黄酮开发利用提供依据。

## 1 材料与方

**1.1 材料与试剂** 山牡荆(烟台绿叶制药,经滨州医学院药学院天然药物实验室鉴定为真品);对照品芦丁(中国药品生物制品检定所);其他试剂为分析纯试剂。

**1.2 仪器** JA5003B电子天平(上海精密仪器仪表有限公司);SHZ-III循环水式多用真空泵(巩义市瑞德仪器设备有限公司);TU-190紫外可见分光光度计(北京普析通用);HH-6型恒温水浴锅(上海乔跃电子有限公司);DHG-9053型真空干燥箱(上海精密仪器仪表有限公司);RE-301旋转蒸发器(巩义市瑞德仪器设备有限公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 供试品溶液制备方法。**准确称取山牡荆粗粉30g,

于1000ml烧瓶中,按要求加入提取溶剂,加热回流提取一定时间,过滤,减压回收溶剂,干燥,称重,得山牡荆干膏。精密称取在不同提取条件下所得山牡荆干膏10mg,于10ml容量瓶中,用60%乙醇溶解,定容后备用。

**1.3.2 标准品溶液制备方法。**精密称取于120℃干燥至恒重芦丁对照品10mg,于100ml容量瓶中,加60%乙醇30ml,水浴微热使溶,放冷,60%乙醇定容至100ml,制成0.100mg/ml芦丁对照品溶液。

**1.3.3 标准曲线制备。**分别精密吸取芦丁对照品溶液0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00ml,分别于25ml容量瓶中,各加0.75ml亚硝酸钠溶液(50mg/ml),摇匀,静置7min;再加0.75ml硝酸铝溶液(100mg/ml),摇匀,静置7min;再加10ml氢氧化钠溶液(40mg/ml),60%乙醇定容,摇匀,静置8min。于510nm波长处测吸光度,以吸光度A为纵坐标、芦丁浓度C为横坐标,进行线性回归,计算回归方程。

**1.3.4 精密度试验。**精密吸取2.0ml芦丁对照液于25ml容量瓶中,按“1.3.3”方法,重复操作5次。

**1.3.5 稳定性试验。**取适量供试品溶液,按“1.3.3”方法,于0、2、4、6、8h分别测定吸光度。

**1.3.6 重复性试验。**取同一批药材,按照“1.3.1”方法制备供试品溶液,并按“1.3.3”所述方法测定吸光度,重复5次。

**1.3.7 回收率试验。**精密移取6份已知含量供试品溶液各0.5ml,均精密加入芦丁标准品溶液,按“1.3.3”方法测定其吸光度,计算山牡荆总黄酮含量。

**1.3.8 供试品总黄酮含量测定。**精密移取5ml供试品溶液,于25ml容量瓶中,按“1.3.3”方法测吸光度,并代入回归方程,计算总黄酮的含量。

**1.3.9 正交试验。**应用正交试验设计,选择了乙醇浓度(A)、乙醇用量(B)、提取次数(C)和提取时间(D)作为考察因素,每个因素选择了3个水平(表1),以总黄酮含量作为考核指标,按照 $L_9(3^4)$ 正交设计方案进行试验。

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目(31170320)。

**作者简介** 代现平(1970-),男,河南鹤壁人,副教授,博士,从事天然活性成分研究。

**收稿日期** 2014-07-02

表 1 正交试验因素水平

水平	因素			
	A 乙醇浓度//%	B 乙醇用量//倍	C 提取次数//次	D 提取时间//h
1	70	8	1	1
2	80	12	2	2
3	90	16	3	3

## 2 结果与分析

**2.1 山牡荆中总黄酮的含量测定** 经计算,以吸光度  $A$  为纵坐标、芦丁浓度  $C$  为横坐标的标准曲线的回归方程为  $A = 12.473C + 0.0019$  ( $r = 0.9996$ ),表明芦丁在  $0.005 \sim 0.049$  mg/ml 浓度范围与其吸光度呈良好线性关系。精密度试验结果显示,5 次吸光度值的相对标准偏差 ( $RSD$ ) 为  $0.53\%$ ,表明该方法有良好精密度。稳定性试验发现,5 次吸光度值的  $RSD$  为  $1.36\%$ ,表明在  $8$  h 内测定供试品基本稳定。重复性试验中 5 次吸光度值的  $RSD$  为  $1.73\%$ ;回收率试验得出平均回收率  $97.59\%$ , $RSD = 1.55\%$ ,表明该方法有良好重现性。

### 2.2 山牡荆总黄酮提取工艺优化

**2.2.1 正交试验。**极差分析表明(表 2),影响山牡荆总黄酮的提取主次因素依次为  $B > A > C > D$ ,即乙醇用量  $>$  乙醇浓度  $>$  提取次数  $>$  提取时间;方差分析(表 3)显示,乙醇浓度、乙醇用量对结果影响具有极显著性的意义,提取次数对试验结果影响有显著意义。正交设计结果(表 2)显示,提取工艺  $A_1B_2C_3D_2$  为最佳,但  $D$  因素影响小,且 3 个水平相差不大,为了节省能源,选用  $D_1$ 。因此,最佳工艺确定为  $70\%$  乙醇  $12$  倍量加热回流提取  $3$  次,每次  $1$  h。

表 2 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	总黄酮含量
					mg/g
1	1	1	1	1	24.12
2	1	2	2	2	37.26
3	1	3	3	3	41.06
4	2	1	2	3	19.09
5	2	2	3	1	36.04
6	2	3	1	2	31.67
7	3	1	3	2	19.10
8	3	2	1	3	25.96
9	3	3	2	1	25.03
$K_1$	103.05	62.31	81.75	85.20	
$K_2$	86.79	99.27	81.39	88.05	
$K_3$	70.11	102.75	96.81	86.70	
$R$	32.94	40.44	15.42	2.85	

表 3 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	方差	$F$	$P$
A	180.270	2	90.140	232.020	$<0.01$
B	589.412	2	294.712	758.581	$<0.01$
C	51.061	2	25.531	65.710	$<0.05$
D	0.777	2	0.388	1.000	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ ;  $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

**2.2.2 工艺验证试验。**采用筛选后得到的最佳工艺,即  $A_1B_2C_3D_1$  提取  $3$  次,进行了验证试验,按“1.3.3”方法测吸光度,计算总黄酮的含量。结果发现,3 批山牡荆总黄酮的含量分别为  $40.32$ 、 $39.02$ 、 $39.56$  mg/g,相对标准偏差  $RSD = 1.65\%$  ( $n = 3$ ),表明该工艺路线是稳定可靠的。

## 3 结论

笔者曾进行了山牡荆药材粒度、提取时间、乙醇用量、乙醇浓度、提取次数单因素的筛选试验,结果显示山牡荆粒度对提取效率的影响不大,因此选择对提取效率有较大影响的乙醇浓度、提取时间、提取次数、乙醇用量为考察因素,进行正交试验,优选其最佳提取工艺条件。经正交设计结果分析及方差分析,发现影响山牡荆总黄酮提取主次因素依次为乙醇用量  $>$  乙醇浓度  $>$  提取次数  $>$  提取时间,经综合各种因素后,选定  $A_1B_2C_3D_1$  为山牡荆总黄酮的最佳提取方案,即  $70\%$  浓度  $12$  倍量乙醇经加热回流提取  $3$  次,每次  $1$  h,按此条件提取,总黄酮含量较高。并按照最佳提取条件进行了验证试验,结果表明该提取工艺方法简单、高效、稳定。

## 参考文献

- [1] 李春正,苏艳芳,靳先军. 牡荆属植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 中草药,2005,36(6):930-938.
- [2] 江级武,靳朝东. 药用植物辞典[K]. 天津:天津科学技术出版社,2005:855.
- [3] LING T J, LING W W, CHEN Y J. Antiseptic activity and phenolic constituents of the aerial parts of *Vitex negundo* var. *cannabifolia*[J]. Molecules, 2010,15(11):8469-8477.
- [4] ZHENG C J, HUANG B K, WANG Y. Anti-inflammatory diterpenes from the seeds of *Vitex negundo*[J]. Bioorg Med Chem, 2010,18(1):175-181.
- [5] CABRAL C, GONÇALVES M J, CAVALEIRO C. Composition and antifungal activity of the essential oil from Cameroonian *Vitex rivularis* Gürke[J]. Nat Prod Res, 2009,23(16):1478-1484.
- [6] LUECHA P, UMEHARA K, MIYASE T, et al. Antiestrogenic constituents of the Thai medicinal plants *Capparis flavicans* and *Vitex glabrata*[J]. J Nat Prod, 2009,72(11):1954-1959.
- [7] GUHA G, RAJKUMAR V, ASHOK R, et al. Polyphenolic constituents of methanolic and aqueous extracts of *Vitex negundo* render protection to Hep3B cells against oxidative cytotoxicity[J]. Food Chem Toxicol, 2010,48(8/9):2133-2138.
- [8] ATA A, MBONG N, IVERSON C D, et al. Minor chemical constituents of *Vitex pinnata*[J]. Nat Prod Commun, 2009,4(1):1-4.