

· 论著 ·

正交试验优选元宝草中总黄酮的提取工艺

龚颖珍^{1,2}, 郑承剑², 秦路平² (1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108; 2. 第二军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 优选元宝草中总黄酮的提取工艺。方法 在单因素试验的基础上, 考察乙醇浓度、料液比、提取温度等因素对元宝草中总黄酮提取率的影响, 并采用 $L_9(3)^4$ 正交试验优选最佳提取条件。结果 影响元宝草中总黄酮提取率的因素顺序为乙醇浓度>料液比>提取次数>提取温度。元宝草最佳提取工艺条件为 70% 乙醇, 提取温度 60 °C, 乙醇用量 20 倍, 提取次数 3 次。该条件下元宝草中总黄酮平均得率为 2.38%。结论 本实验设计合理、测定方法可行、实验结果可靠, 为大批量从元宝草中提取总黄酮提供了理论依据。

[关键词] 元宝草; 总黄酮; 提取工艺; 正交试验

[中图分类号] R93

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)02-0134-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.02.011

Extraction process on total flavonoids from *Hypericum sampsonii* by orthogonal experiments

GONG Yingzhen^{1,2}, ZHENG Chengjian², QIN Luping² (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the extraction technology of total flavonoids from *Hypericum sampsonii*. **Methods** On the basis of single factor test, solid-liquid ratio, ethanol concentration, extraction time, extraction temperature and extraction times on the extraction rate were studied by taking the content of total flavonoids as indexes. Orthogonal test was conducted to establish the extraction technology of total flavonoids from *Hypericum sampsonii*. **Results** The influence degree of factors on the extraction rate of total flavonoids was in the order of ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction times, and temperature. The optimum extraction condition was confirmed as follows: ethanol concentration of 70%, extraction temperature of 60 °C, and extraction times of 3×1.5 h, solid to liquid ratio of 1:20. Under this condition, the average extraction rate of total flavonoids reached 2.38%. **Conclusion** The test was reasonable in design and credible in findings, and was easily operated, which could provide scientific basis for the batch extraction of total flavonoids from *Hypericum sampsonii*.

[Key words] *Hypericum sampsonii*; total flavonoids; extracting technology; orthogonal test

元宝草 (*Hypericum sampsonii* Hance) 系藤黄科金丝桃属多年生草本植物, 全草入药, 广泛分布于我国长江流域以南各省区^[1]。

近年来研究表明, 元宝草黄酮类成分是其主要的抗抑郁活性成分之一^[2]。研究者从元宝草中分离出很多黄酮类成分, 其中以芒果苷为代表的咕酮类成分较多^[3]。本课题组前期还从元宝草中分离出一些新的咕酮, 如 hypericumxanthone A^[4] 和

sampsonone C^[5]等, 咕酮类化合物经研究表明也具有抗抑郁活性^[6]。文献^[7]曾以芦丁为对照品, 对元宝草总黄酮的提取工艺进行研究。而多数研究表明芒果苷在元宝草中含量较高^[8,9], 笔者认为以芒果苷作为对照品进行元宝草总黄酮提取工艺考察较为合理。因此, 本实验以芒果苷作为对照品, 考察了元宝草全草中总黄酮的提取工艺。

本实验以总黄酮提取率为考察指标, 优选元宝草中总黄酮的最佳提取工艺条件, 进一步明确了元宝草中总黄酮是否具有抗抑郁活性。

1 材料与仪器

1.1 材料 芒果苷对照品购自上海诗丹德生物技术公司, 批号: 05/090507, 纯度 99%; 元宝草全草于

[基金项目] 上海市科委中药现代化专项 (2011DZ1970502)

[作者简介] 龚颖珍, 硕士研究生. Tel: 13611886074; E-mail: gyz0929@163.com

[通讯作者] 秦路平, 教授. 研究方向: 生药活性物质基础及其品质评价研究. Tel: (021)81871300; E-mail: qinluping@126.com

2012年8月购自安徽亳州,经第二军医大学药学院生药学教研室秦路平教授鉴定为金丝桃科多年生草本植物元宝草(*Hypericum sampsonii* Hance),选用部位为全草;NaNO₂、Al(NO₃)₃、NaOH、乙醇、甲醇均为分析纯。

1.2 仪器 UV5500紫外分光光度仪,旋转蒸发仪(RE-52C,上海清浦泸西仪器厂),超声仪(USC-702,上海波龙电子设备有限公司),粉碎机(DFY-500,上海鼎广机械有限公司)。

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 精密称取芒果苷对照品5 mg于25 ml容量瓶中,甲醇定容,摇匀,配成0.2 mg/ml的对照品溶液。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液0、0.125、0.25、0.5、0.75、1.0、1.2、1.5 ml,分别置于10 ml容量瓶中,分别加入5% NaNO₂溶液0.3 ml,摇匀,放置6 min后各加入10% Al(NO₃)₃溶液0.3 ml,摇匀,放置6 min,再分别加入10% NaOH溶液4.0 ml,再加甲醇至刻度,摇匀,放置15 min,在366 nm波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线,标准回归曲线方程 $Y=35.288X-0.1941$, $r=0.9992$ 。

2.1.3 波长的选择 取芒果苷标准溶液1.0 ml,按标准曲线项下操作,用UV5500紫外分光光度计进行测定,芒果苷反应产物在366、316、258 nm处有最大吸收,因316、258 nm处干扰大,因此,选择366 nm为测定波长。

2.1.4 供试品溶液的制备 称取5 g干燥、粉碎的元宝草全草,加入70%乙醇50 ml回流1.5 h,将提取液抽滤,滤渣在相同条件下提取1次,合并滤液定容至250 ml容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,稀释50倍,按标准曲线项下操作,测定吸光度。芒果苷提取率(%)= $(C \times N \times V / W) \times 100$,式中C为测定样品溶液中芒果苷的浓度,N为稀释倍数,V为最初样品定容体积,W为样品质量。

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度实验 取同一份供试品溶液,按标准曲线项下操作,重复测定5次,求得RSD=1.4%。

2.2.2 稳定性实验 取同一份供试品溶液,同上操作,于1、2、3、5、6 h测定吸收度,求得RSD=1.2%。

2.2.3 重复性实验 取同一批次元宝草药材样品,平行制备5份供试品溶液,同上操作,结果RSD=1.7%。

2.2.4 加样回收率实验 精密量取2 ml已测定总黄酮含量($C=0.19953$ mg/ml)的样品液9份,各分别加入芒果苷对照品溶液(0.2 g/ml)1、1、1、2、2、2、3、3、3 ml,同上操作,平均回收率为94.56%,计算RSD=2.3%。

表1 回收率实验结果(n=9)

样品中总黄酮含量(m/mg)	加入芒果苷量(m/mg)	测得总黄酮量(m/mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.399	0.2	0.571	95.32	94.56	2.3
0.399	0.2	0.581	96.99		
0.399	0.2	0.579	96.66		
0.399	0.4	0.720	90.11		
0.399	0.4	0.758	94.86		
0.399	0.4	0.765	95.74		
0.399	0.6	0.921	92.19		
0.399	0.6	0.937	93.79		
0.399	0.6	0.953	95.39		

2.3 总黄酮提取工艺单因素试验

2.3.1 乙醇浓度 10倍量、50℃下提取2次,每次1 h,考察30%、40%、60%、80%、95%乙醇浓度,样品中总黄酮的提取率。结果显示,随着乙醇浓度的增加,元宝草中总黄酮的提取率先增加后降低,在80%乙醇浓度时总黄酮提取率达到最大值。

2.3.2 提取时间 10倍量80%乙醇,50℃下提取2次,考察提取时间0.5、1、1.5、2、2.5 h时样品中总黄酮的提取率。结果表明,随着提取时间的增加,样品中总黄酮的提取率逐渐增加,当提取时间增加到1.5 h后,总黄酮的提取率趋于平稳。

2.3.3 料液比 80%乙醇在50℃下提取2次,每次1.5 h,考察料液比1:5,1:10,1:15,1:20,1:25时样品中总黄酮的提取率。结果表明,当料液比为1:5时,溶剂用量过小,总黄酮提取率较低;当料液比为1:15时,总黄酮提取率最高,继续增加料液比,总黄酮提取率反而降低。

2.3.4 提取温度 10倍量80%乙醇,提取2次,每次1.5 h,考察提取温度40、50、60、70、80℃时样品中总黄酮的提取率。结果表明,温度70℃时,提取率最高,当温度升高,提取率趋于平稳。

2.3.5 提取次数 10倍量80%乙醇,50℃、每次1.5 h考察提取1次、2次、3次、4次时样品中总黄酮的提取率。结果表明,提取次数为2次时总黄酮提取率达到最大值,3次时平衡,随着提取次数增加,提取率稍有减少。

2.4 正交试验优选总黄酮的提取工艺 在单因素试验基础上,选择4个影响较显著的因素:乙醇浓

度、料液比、提取次数、提取温度,以总黄酮的提取率(%)为考察指标,按照 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行试验,确定元宝草中总黄酮的最佳提取工艺。

表 2 正交试验因素水平

水平	A 因素	B 因素	C 因素	D 因素
	乙醇浓度 (%)	提取温度 (°C)	料液比 (倍)	提取次数 (次)
1	70	60	10	1
2	80	70	15	2
3	90	80	20	3

表 3 正交试验设计与结果

序号	A	B	C	D	提取率 (%)
1	1	1	1	1	2.040
2	1	2	2	2	2.060
3	1	3	3	3	2.197
4	2	1	2	3	2.107
5	2	2	3	1	2.100
6	2	3	1	2	1.983
7	3	1	3	2	2.017
8	3	2	1	3	1.917
9	3	3	2	1	1.900
K_1	2.099	2.054	1.98	2.013	
K_2	2.063	2.026	2.022	2.020	
K_3	1.944	2.027	2.104	2.073	
R	0.155	0.028	0.124	0.060	

表 4 SPSS 方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性 (P 值)
校正模型	0.214 ¹⁾	8	0.027	9.349	4.82×10^{-5}
截距	111.874	1	111.874	39 076.347	1.73×10^{-3}
乙醇浓度	0.118	2	0.059	20.565	2.24×10^{-5}
提取温度	0.005	2	0.002	0.842	0.447
料液比	0.072	2	0.036	12.590	3.80×10^{-4}
提取次数	0.019	2	0.010	3.400	0.056
误差	0.052	18	0.003		
总计	112.140	27			
校正的总计	0.266	26			

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.0, {}^1) R^2 = 0.806 (\text{调整 } R^2 = 0.720)$$

由表 3 中极差 R 值大小显示,各因素作用主次为: $A > C > D > B$, 即乙醇浓度影响最大,其次是料液比和提取次数,提取温度影响最小。从表 4 的方差分析结果可以看出,乙醇浓度与料液比对总黄酮的提取率有较大影响 ($P_A = 2.24 \times 10^{-5} < 0.05$, $P_C = 3.80 \times 10^{-4} < 0.05$), 而提取温度与提取次数对总黄酮的提取率影响较小 ($P_B = 0.447 > 0.05$, $P_D = 0.056 > 0.05$)。因此,以 $A_1 B_1 C_3 D_3$ 为最佳提取工艺,即 70% 乙醇,提取温度 60 °C,乙醇用量 20

倍,提取次数 3 次。

2.5 最佳提取工艺验证 按最佳提取工艺条件 $A_1 B_1 C_3 D_3$ 组合进行试验,平行提取 3 次,总黄酮的提取率分别为 2.41%、2.35%、2.38%,提取率均值为 2.38%,且高于正交试验中的最高值,表明该优化条件稳定有效。

3 讨论

本实验中曾采用超声、乙醇热回流、水进行提取,相比较而言,超声的提取效果好,但超声不易用于大批量工业化生产,水对黄酮的溶解度小,故本实验采用乙醇提取,具有实用性。

元宝草中黄酮类成分较多^[3],例如芦丁、2-hydroxyxanthone、芒果苷、hyperxanthone 等。若采用高效液相色谱法来检测总黄酮成分,因标准品较多,不易购买,需通过分离化合物得到其他的标准品,比紫外分析法复杂;且若采用一测多评,因其相对校正因子有波动,实测值与计算值之间有误差,主要问题是由于只有内参物用到了对照品,其他待测成分无对照品,通过液-质联用等辅助才可确认,有些目标峰还不确定,相比较而言成本高、方法复杂。最终决定采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 法来检测元宝草中的总黄酮。文献[7]元宝草总黄酮的提取工艺是以芦丁为对照品,在 500 nm 波长处测其吸收度,由于咕酮类成分占元宝草总黄酮的比例大^[3],以芒果苷作为对照品能更好地检测元宝草中黄酮的含量,也为元宝草咕酮类成分的含量测定提供参考,本课题主要考察芒果苷和总黄酮的抗抑郁活性,则以芒果苷作对照品更有意义。

近年来研究表明,元宝草具有抗抑郁活性^[10],并可分离出较多的咕酮类成分,且现代药理学研究表明咕酮类成分也具有抗抑郁活性^[6],如芒果苷亦具有良好的抗抑郁作用^[11],这些研究结果加强了元宝草总黄酮具有抗抑郁作用的依据。本课题以芒果苷作为对照品,通过单因素和正交试验研究各因素对元宝草中总黄酮提取率的影响,筛选出总黄酮的最佳提取工艺,为大批量从元宝草中提取总黄酮提供理论依据,为以后进一步研究黄酮类成分抗抑郁活性提供参考。

【参考文献】

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 605.
- [2] 郭澄, 郑清明, 郑汉臣. 元宝草黄酮类成分的抗抑郁作用研究[J]. 药 学 实 践 杂 志, 2005, 23(6): 345-347, 361.
- [3] 康佳敏, 欧阳胜, 炳炳坤, 等. 元宝草化学成分及药理作用的研究[J]. 科学技术与工程, 2011, 11(14): 3248-3252, 3262.

- [4] Xin WB, Mao ZJ, Jin GL, et al. Two new xanthenes from *Hypericum sampsonii* and biological activity of the isolated compounds[J]. *Phytother Res*, 2011, 25(4): 536-539.
- [5] Xin WB, Jin GL, Mao ZJ, et al. Two unusual phenolic substances and one new xanthone from *Hypericum sampsonii* [J]. *Helvetica Chim Acta*, 2011, 94(4): 686-692.
- [6] 傅 芑, 张 川, 张卫东, 等. 咕吨酮类化合物的药理活性研究进展[J]. *药学实践杂志*, 2005, 23(1): 6-12.
- [7] 郑清明. 元宝草及同属植物的生药学研究[D]. 第二军医大学, 2005.
- [8] Chen MT, Chen CM. Xanthenes from *Hypericum sampsonii* [J]. *Heterocycles*, 1985, 23(10): 2543-2548.
- [9] 郭 澄, 郑清明, 郑汉臣. 元宝草不同药用部位中芒果苷和总黄酮的含量测定[J]. *分析化学*, 2006, 34(11): 1666.
- [10] 石金城, 闫显光, 刘 媛, 等. 元宝草抗抑郁活性部位筛选研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2010, 12(5): 7-9.
- [11] 郑子敏, 韦健全, 罗 莹, 等. 芒果苷对行为绝望小鼠的抗抑郁作用[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(4): 978-979.
- [收稿日期] 2013-10-17 [修回日期] 2014-03-17
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 105 页)

- [4] 郑汉臣, 黄宝康, 王忠壮. 明党参鲜根与药材饮片精油成分和氨基酸含量比较[J]. *中国中药杂志*, 1994, 19(12): 723-725.
- [5] 王亚淑, 许益民, 陈建伟. 明党参多糖的分离、纯化及其理化性质[J]. *中国野生植物*, 1992, (3): 35-39.
- [6] 张林维, 吴东儒, 赵帜平, 等. 药用植物明党参多糖的研究[J]. *安徽大学学报(自然科学版)*, 1996, 20(3): 95-100.
- [7] 王莹莹, 何智健, 李 祥. 明党参多糖的提取分离及结构分析 II [J]. *长春中医药大学学报*, 2007, 23(6): 18-20.
- [8] 陈建伟, 赵智强, 许益民, 等. 明党参煎液及多糖对小鼠腹腔巨噬细胞 C3b 受体的影响[J]. *中国中药杂志*, 1992, 17(9): 561-562.
- [9] 黄泰康, 李 祥, 陆平成, 等. 明党参水煎液及多糖的药理研究[J]. *中成药*, 1994, 16(7): 31-33.
- [10] 陈建伟, 李 祥, 吴慧平, 等. 明党参多糖对 NF- κ B 结合活性的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 1999, 15(6): 356-357.
- [11] 李 祥, 陈建伟, 许益民, 等. 明党参脂肪油成分 GC/MS 快速分析[J]. *中药材*, 1992, 15(6): 26-27.
- [12] 吴志平, 李 祥, 陈建伟. 明党参果实脂肪油成分 GC/MSD 分析[J]. *南京中医药大学学报(自然科学版)*, 2002, 18(5): 293-294.
- [13] 王 萌, 陈建伟, 李 祥. 明党参根皮超临界萃取部位化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(6): 764-767.
- [14] 任东春, 钱士辉, 杨念云, 等. 明党参化学成分研究[J]. *中药材*, 2008, 31(1): 47-49.
- [15] 顾源远, 陈建伟, 李 祥, 等. 明党参果实超临界萃取部位化学成分研究[J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(1): 75-77.
- [16] Kimura Y, Ohminami H, Arichi H, et al. Effects of various coumarins from roots of *Angelica dahurica* on actions on actions of adrenaline, ACTH and insulin in fat cell [J]. *Planta Med*, 1982, 45(3): 183-187.
- [17] Dekermendjian K, Ai J, Nielsen M, et al. Characterization of the furanocoumarin phellopterin as a rat brain benzodiazepine receptor partial agonist *in vitro* [J]. *Neurosci Lett*, 1996, 219(3): 151-154.
- [18] Li TH, He L, Qiu JB. Effects of the Chinese herb component phellopterin on the increase in cytosolic free calcium in PC12 cells [J]. *Drug Dev Res*, 2007, 68(2): 79-83.
- [19] 顾源远, 陈建伟. 紫外分光光度法测定明党参中总香豆素类成分的含量[J]. *现代中药研究与实践*, 2010, 24(2): 58-60.
- [20] 张 莹, 陈建伟, 徐建亚, 等. 明党参中香豆素成分的组织定位、分布和荧光相对定量研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(3): 625-627.
- [21] 张 莹, 陈建伟, 李 祥, 等. 珍稀药用植物明党参呋喃香豆素成分累积分布研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(4): 510-513.
- [22] 陈建伟, 李 祥, 许益民, 等. 明党参挥发油的 GC-MS 初步分析[J]. *南京中医学院学报*, 1992, 8(4): 223.
- [23] 陈建伟, 李 祥, 武露凌, 等. 中国珍稀植物明党参嫩茎叶挥发油化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2000, 12(3): 48-51.
- [24] 李 祥, 陈建伟, 叶定江, 等. 明党参挥发油及致敏活性成分 CSY 在加工炮制中的化学动态变化研究 [J]. *中成药*, 2001, 23(1): 29-31.
- [25] 陈建伟, 段志富, 李 祥, 等. 明党参药材水溶性活性成分的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 22(2): 232-234, 247.
- [26] 吴泽鹏. 明党参的活性成分分析[J]. *亚太传统医药*, 2010, 6(3): 32-33.
- [27] 李 祥, 陈建伟, 孙 骏, 等. 明党参中水溶性活性成分的分离、鉴定及定量分析[J]. *天然产物研究与开发*, 1995, 7(2): 1-5.
- [28] 陆平成, 陈建伟, 许益民. 明党参对小鼠 NK 活性的调节作用[J]. *南京中医学院学报*, 1991, 7(1): 33-34.
- [29] 黄宝康, 胡淑雅, 郑汉臣, 等. 野生与栽培明党参抗疲劳和耐缺氧作用比较[J]. *解放军医学高等专科学校学报*, 1996, 24(4): 19-21.
- [30] 侯春丽, 闫守扶, 孙红梅. 运动性疲劳的细胞机制及研究进展[J]. *首都体育学院学报*, 2003, 15(10): 89-92.
- [31] 吴慧平, 陶学勤, 陈建伟, 等. 明党参不同提取物对大鼠肝匀浆上清液生成脂质过氧化物的影响[J]. *南京中医药大学学报(自然科学版)*, 1993, 9(1): 26.
- [32] 王 萌, 陈建伟, 李 祥. 明党参根皮中 5 种呋喃香豆素类成分的体外抗肿瘤活性[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(6): 203-205.
- [33] 胡小鹰, 陈建伟, 陈汝炎, 等. 明党参水提液及结晶 VI 的镇咳祛痰平喘作用[J]. *南京中医药大学学报*, 1995, 11(6): 28-30.
- [34] 华一利, 陈建伟, 吴慧平, 等. 明党参降血脂作用的实验研究[J]. *南京中医学院学报*, 1994, 10(4): 31-32.
- [35] 李 祥, 陈建伟, 黄玉宁. 明党参炮制品对凝血时间、血小板聚集的影响[J]. *中成药*, 1998, 20(7): 17-19.
- [收稿日期] 2013-11-18 [修回日期] 2014-04-09
[本文编辑] 陈 静