

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.03.007

正交试验设计优化蓝刺头总黄酮提取工艺

郑 敏

(内蒙古自治区人民医院, 内蒙古 呼和浩特 010010)

摘要:目的 建立并优化蓝刺头总黄酮提取工艺,为蓝刺头的开发及利用提供理论依据。方法 以乙醇用量、乙醇体积分数、提取时间和提取次数为考察因素,以蓝刺头总黄酮含量作为指标,采用正交试验对提取工艺进行优化。结果 蓝刺头总黄酮的最佳提取工艺为乙醇用量12倍量、乙醇体积分数70%、提取次数3次、每次2h。结论 该提取工艺简单、高效,适用于蓝刺头总黄酮的提取。

关键词:蓝刺头;总黄酮;正交试验;提取工艺

中图分类号:R282.71;TQ460.6

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)03-0024-03

Extraction Technology for Total Flavonoids from *Echinops Latifolius* by Orthogonal Experimental Design

Zheng Min

(Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot, Inner Mongolia, China 010010)

Abstract: Objective To establish and optimize a method of extraction technology of total flavonoids from *Echinops laizfolius*, and provide a basis for development and utilization of *Echinops latifolius*. **Methods** The extraction technology of total flavonoids was optimized by orthogonal experiment design with the content of total flavonoids as index and with ethanol dosage, ethanol concentration, extracting time and extracting frequency as factors. **Results** The optimal extraction technology of total flavonoids from *Echinops laizfolius* was 12 fold and 70% ethanol, 3 times of extraction and 2 hour of reflux. **Conclusion** The extraction technology is simple and efficient, which can be used for the extraction of total flavonoids from *Echinops latifolius*.

Key words: *Echinops latifolius*; total flavonoid; orthogonal experimental; extraction technology

蓝刺头 *Echinops latifolius* Tausch. 为菊科蓝刺头属植物,以根入药,名为“禹州漏芦”,均收载于历版《中国药典(一部)》,主要用于清热解毒、排脓止血、消痈下乳^[1]。蓝刺头的干燥头状花序为蒙古族常用药材,名为“蓝刺头”,蒙药名为“扎日阿-乌拉”,是一种具民族特色及地方特色的植物药,在民族医药及民间广泛应用。其味苦,性稀、柔、轻、钝、凉,具有固骨质、接骨愈伤、清热止痛的功效,用于骨折、骨热、刺痛等证^[2]。曾有报道禹州漏芦的研究情况^[3-6],而蒙药蓝刺头的研究文献极少。蓝刺头属植物含有噻吩类、黄酮类、三萜类、生物碱

类、脂肪酸和甾醇类等多种化合物^[7-8],具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒、杀虫、保肝等多种药理活性^[9-11]。黄酮类化合物因其广泛的生物活性已成为研究热点,但对其提取工艺研究较少。本研究中对蓝刺头总黄酮的提取工艺进行了初步探讨,为其开发利用提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);AL204 型电子天平(十万分之一,梅特勒-托利多仪器<上海>有限公司);RE-52A 型旋转蒸发仪(上海振捷

第一作者:郑敏,女,大学本科,副主任药师,主要从事医院药学工作,(电子信箱)454962527@qq.com。

- [6] Fioretti FM, Sitalumsden A, Bevan CL, et al. Revising the role of the androgen receptor in breast cancer[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2014, 52(3): 257-265.
- [7] Morvillo V, Lüthy IA, Bravo AI, et al. Androgen receptors in human melanoma cell lines IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN and in human melanoma metastases[J]. Portela P Melanoma Research, 2002, 12(6): 529.
- [8] Vega DR, Polla G, Martinez A, et al. Conformational polymorphism in bicalutamide[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2006, 328(2): 112-118.
- [9] Rams-Baron M, Włodarczyk P, Dulski M, et al. The indications of tautomeric conversion in amorphous bicalutamide drug. European Journal of Pharmaceutical Sciences Official[J]. Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, 2017, 110(15): 117-123.
- [10] Westheim RJH, Nijmegen. Bicalutamide forms: US, 0063782A1[P].

- 2004-04-01.
- [11] Jenkins S, Liversidge G. Nanoparticulate bicalutamide formulations: US, 0159767A1[P]. 2006-06-20.
- [12] Reddy BP. Bicalutamide polymorphs: US, 0020675A1[P]. 2005-01-27.
- [13] 新宅哲也, 桂正, 板谷信重. 比卡鲁胺晶体及其制造方法: CN, 1602299A[P]. 2005-03-30.
- [14] 李艳芹, 倪旭辉. 比卡鲁胺的合成[J]. 浙江化工, 2013, 44(6): 7-9.
- [15] 季华, 乐国, 沈志刚, 等. 反溶剂重结晶法制备多晶型比卡鲁胺[J]. 北京化工大学学报, 2008, 35(4): 14-17.
- [16] Surov AO, Solanko K, Bond AD, et al. Cocrystals of the antiandrogenic drug Bicalutamide: screening, crystal structures, formation thermodynamics and lattice energies[J]. Crystengcomm, 2016, 18(25): 4818-4829.

(收稿日期: 2017-10-12)

实验设备有限公司)。

1.2 试药

蓝刺头 *Echinops latifolius* Tausch. 购自安国义通中药材有限公司,经我院中药鉴定室高级工程师刘斌主任鉴定,均符合相关规定^[2];芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号为100080-201409,纯度为98%);甲醇为色谱纯(德国Merck公司,批号为20140213);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 蓝刺头提取物制备

分别取蓝刺头药材粉末9份,每份40 g,按正交试验表的因素和水平进行加热回流提取,提取液过滤,滤液定容至1 000 mL容量瓶,备用。精密吸取10 mL,置25 mL容量瓶,加95%乙醇10 mL,加水稀释至刻度,微孔滤膜滤过,即得。

2.2 总黄酮含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Waters C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.4%磷酸(45:55);流速:1.0 mL/min;检测波长:360 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。在此色谱条件下的色谱图见图1。

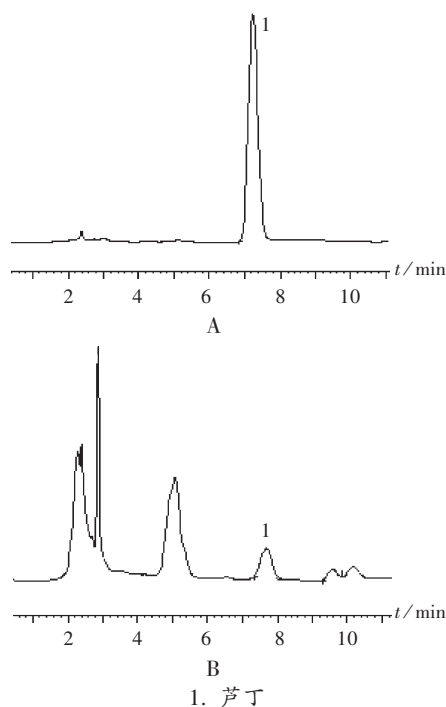
2.2.2 溶液制备

取芦丁对照品6.21 mg,精密称定,置10 mL容量瓶,加甲醇使溶解至刻度,即得质量浓度为0.621 g/L的标准溶液,作为对照品贮备液。精密吸取对照品贮备液1 mL,置10 mL容量瓶,加甲醇使溶解至刻度,摇匀,即得每1 mL含62.10 μg的对照品溶液。

将蓝刺头药材粉碎,过80目筛。称取蓝刺头药材粉末约0.5 g,精密称定,置锥形瓶,精密加入95%乙醇25 mL,称定质量,超声处理15 min,取出,放冷,用80%甲醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,得供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

标准曲线制备:分别精密吸取芦丁对照品贮备溶液0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,置10 mL容量瓶,加甲醇稀释至刻度,摇匀。分别吸取10 μL,按拟订色谱条件测定峰面积,以峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X)为横坐标



1. 芦丁
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液
图1 高效液相色谱图

标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 195\,516X - 110\,924$, $R^2 = 0.999\,0$ ($n = 6$)。结果表明,芦丁进样量在6.21~62.10 μg范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取同一对照品溶液10 μL,连续进样6次,测定峰面积。结果的RSD为0.43% ($n = 6$),表明仪器精密良好。

重复性试验:精密称取同一批样品6份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定。结果的RSD为0.52% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液,分别于0,1,2,4,8,10 h时测定峰面积。结果的RSD为1.32% ($n = 6$),表明供试品溶液在10 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品9份,每份0.25 g,分别精密加入对照品贮备溶液10,12,15 mL,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表1。

表1 蓝刺头总黄酮加样回收试验结果($n = 9$)

取样量(g)	样品含量(mg/g)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.250 5	0.498 9	0.621 0	1.106 5	97.84		
0.251 1	0.489 7	0.621 0	1.099 7	98.23		
0.251 3	0.493 9	0.621 0	1.104 3	98.29		
0.251 0	0.487 7	0.745 2	1.234 2	100.17		
0.250 9	0.486 4	0.745 2	1.234 1	100.34	98.35	1.27
0.251 4	0.496 1	0.745 2	1.233 1	98.90		
0.251 2	0.491 6	0.931 5	1.394 3	96.91		
0.250 5	0.489 2	0.931 5	1.396 4	97.39		
0.251 2	0.491 2	0.931 5	1.395 1	97.04		

2.2.4 样品含量测定

取样品适量,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,结果测得蓝刺头药材中总黄酮的含量为2.676 mg/g。

2.3 提取工艺优选

2.3.1 正交试验设计及结果

在预试验基础上,采用正交试验优化提取工艺。选择乙醇体积分数(因素A)、加醇量(因素B)、提取时间(因素C)、提取次数(因素D)作为考察因素。各因素取3个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验表安排试验,以总黄酮含量为评价指标。采用SPSS 12.0统计软件进行数据处理,对试验结果进行直观分析和方差分析,筛选最佳工艺条件。结果见表2至表4。由表3可知,各因素影响提取效果的顺序为 $D > C > B > A$ 。根据直观分析,最佳提取工艺条件为 $A_2B_3C_3D_3$,即加12倍量70%乙醇,提取3次,每次2 h。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

水平	因素A(%)	因素B(倍)	因素C(h)	因素D(次)
1	60	8	0.5	1
2	70	10	1	2
3	80	12	2	3

表3 蓝刺头总黄酮提取工艺正交试验结果

试验号	因素				总黄酮含量 (mg/g)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.064
2	1	2	2	2	1.974
3	1	3	3	3	2.940
4	2	1	2	3	2.929
5	2	2	3	1	1.606
6	2	3	1	2	2.324
7	3	1	3	2	2.436
8	3	2	1	3	2.209
9	3	3	2	1	1.502
K_1	1.993	2.143	1.865	1.391	
K_2	2.287	1.930	2.135	2.244	
K_3	2.049	2.255	2.436	2.693	
R	0.294	0.325	0.462	1.302	

表4 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值
因素A	0.146	2	0.073	0.056
因素B	0.164	2	0.082	0.063
因素C	0.323	2	0.161	0.123
因素D	2.625	2	1.313	

注: $F_{0.10}(2,2) = 9.00$, $F_{0.05}(2,2) = 19.00$, $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

2.3.2 验证试验

为确定该工艺的优劣和稳定性,按优选工艺提取,

对同一批样品进行3次试验。结果3批蓝刺头样品中总黄酮的含量分别为2.676, 2.899, 2.727 mg/g, 平均2.767 mg/g。可见,该提取工艺总黄酮含量高,重复性好,工艺稳定可行,实际操作简单,适合工业化生产。

3 讨论

本试验研究结果显示,采用乙醇为提取溶剂有多种影响因素。通过正交试验结果表明,各因素对提取效果的影响顺序为 $D > C > B > A$ 。通过直观分析方法,筛选出最佳提取工艺条件为 $A_2B_3C_3D_3$,即加12倍量70%乙醇,提取3次,每次2 h。该方法蓝刺头中总黄酮提取率平均达0.27%,工艺稳定,且提取率高。

蓝刺头的主要固骨质有效成分为黄酮类化合物,关于蓝刺头中黄酮的含量测定方法很多,大多数使用紫外分光光度法测定总黄酮的含量。本研究中采用高效液相色谱法测定蓝刺头中总黄酮的含量,具有较好的灵敏性和准确度。不同产地的蓝刺头属植物(禹州漏芦)成分含量也存在一定差异^[12],其原因可能是受气候或土壤等因素的影响,因此有必要对蓝刺头属植物的生长环境进行考察,建立标准、规范的种植基地,从而确保药材质量。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 260-261.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 药品标准·蒙药分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 51.
- [3] 汪毅, 李锐, 张鹏. 禹州漏芦化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(2): 309-311.
- [4] 余云辉, 李喜凤, 高伟利, 等. 禹州漏芦活性成分的现代提取工艺研究[J]. 中国现代药物应用, 2013, 21(11): 228-229.
- [5] 汪毅, 李锐, 孟大利, 等. 禹州漏芦中噻吩类的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(3): 194-196.
- [6] 李喜凤, 王优滑, 安硕, 等. 禹州漏芦抗炎有效部位的谱效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(9): 137-141.
- [7] 汪毅, 李锐, 孟大利, 等. 蓝刺头化学成分的研究[J]. 中草药, 2006, 37(2): 189-190.
- [8] 王宏伟, 杨婷, 董玉. 蓝刺头的研究进展[J]. 疾病监测与控制杂志, 2011, 5(12): 734-735.
- [9] 李喜凤, 张伟晓, 王优滑, 等. 禹州漏芦抗炎和抑菌有效部位的筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(2): 138-141.
- [10] 黄华, 杨巧丽, 王雪, 等. 新疆蓝刺头抗肿瘤活性部位初筛研究[J]. 中草药, 2009, 40(S1): 232-234.
- [11] 杨斌, 萨如丽, 刘敏, 等. 蓝刺头花絮水提物的降血糖作用研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2015, 13(6): 1-5.
- [12] 李春风, 胡春月, 胡利欣, 等. 不同产地禹州漏芦 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 96-99.

(收稿日期: 2017-06-06; 修回日期: 2017-08-08)