

## 正交试验法优选大蝎子草总黄酮提取工艺<sup>\*</sup>

徐旖旎<sup>1,2</sup>, 姜 丰<sup>1,2</sup>, 李守巧<sup>3</sup>, 周 雪<sup>3</sup>, 刘文炜<sup>1,2</sup>, 沈祥春<sup>2\*\*</sup>, 张彦燕<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 天然药物优效利用重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 临沭县人民医院, 山东 临沭 276700)

**[摘要]** 目的: 优选大蝎子草(HGD)总黄酮最佳提取工艺。方法: 以加水量(A), 提取次数(B), 提取时间(C)为影响因素, 采用正交试验方案 $L_9(3^4)$ 进行HGD总黄酮的提取, 紫外分光光度法在波长269 nm处测定吸光度, 以浸膏收率、总黄酮含量为考察指标, 进行综合加权评分, 确定HGD总黄酮最佳提取工艺。结果: 最佳水提取工艺为 $A_2B_3C_3$ , 即18倍加水量、提取3次、每次提取3 h时可获得较高的浸膏收率及总黄酮含量; 加权评分方差分析结果表明: 因素B及因素C对总黄酮提取量有显著影响。结论: 利用正交试验设计方法对HGB总黄酮提取工艺进行优化, 为该药材的深入研究提供一定的参考。

**[关键词]** 大蝎子草; 黄酮类; 正交实验; 工艺学; 制药

**[中图分类号]** R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)01-0041-04

## Optimization of Extraction Tecnique of Total Flavonoids in *Girardinia diversifolia* by Orthogonal Test

XU Yimi<sup>1,2</sup>, JIANG Feng<sup>1,2</sup>, LI Shouqiao<sup>3</sup>, ZHOU Xue<sup>3</sup>, LIU Wenwei<sup>1,2</sup>, SHEN Xiangchun<sup>2</sup>, ZHANG Yanyan<sup>1,2</sup>

(1. School of Basic Medical Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicinal Resources, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

3. The People's Hospital of Linmu County, Linmu 276700, Shandong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the technique to extract total flavonoids (TFA) in *Girardinia diversifolia* (HGD). **Methods:** The amount of water(A), extracting frequency(B) and time (C) were used as influencing factors, extracting HGD TFA with orthogonal test  $L_9(3^4)$ . Determination of absorbance at the wavelength of 269 nm by UV Spectrophotometry with extract yield, content of TFA as inspection indexes. Then comprehensive weighted scoring was applied to determine optimized HGD THA extraction technique. **Result:** The best technique was  $A_2B_3C_3$ , added 18 times volume of water and extracted for 3 times, 3 hours each time in order to acquire relatively high extract yield and TFA content. Analysis of weighted scoring variance indicated that factor B and C had significant influence on TFA extraction amount. **Conclusion:** Optimization of extraction technique by orthogonal test can reduce the time of experiment.

**[Key words]** *Girardinia diversifolia*; flavones; orthogonal test; technology, pharmaceutical

大蝎子草 [*Girardinia diversifolia* (Link) Fr-lirs], 别名大苎麻、大荃麻及蝎子草, 为苎麻科蝎子草属植物大蝎子草的全草, 主要分布于湖北西部、

四川西南部、贵州及云南等地。蝎子草属植物作为民间药使用历史悠久, 具有祛风解表、利气消痰、清热解毒之功效, 常用于治疗伤风咳嗽、胸闷痰多、水

<sup>\*</sup> [基金项目] 贵阳市科技局现代药业计划(2012204-41); 贵州省中医药管理局(QZYY2012-46); 贵州省中医药管理局课题(QZYY2019-92); 贵阳市科技局大学生创新课题(黔科合同2012-2); 贵州省高等教育科技创新团队[黔教合人才团队字(2014)31]; 贵州省高等学校创新能力提升计划[黔教合协同创新字(2013)04]; 贵州省高层次创新型人才[黔科合人才(2015)4029]; 贵州省科技创新团队[黔科合人才团队(2015)4025号]

<sup>\*\*</sup> 通信作者 E-mail: shenxiangchun@126.com; 9127397@qq.com

网络出版时间: 2016-01-07 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160107.2051.058.html>

肿及皮肤瘙痒等症状<sup>[1-2]</sup>。研究表明,大蝎子草同科属植物的水提成分具有较好的抗炎、镇痛作用<sup>[3-5]</sup>。本实验以大蝎子草水提浸膏收率及总黄酮含量为质量控制指标,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,对各因素水平进行综合加权评分,确定大蝎子草最佳水提工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品、仪器及试剂

大蝎子草药材采自贵州省花溪乡,由贵州医科大学药用植物学与生药学教研室龙庆德鉴定为蝎子草属植物大蝎子草的地上部分。UV-2401PC 型紫外分光光度仪(日本岛津),沃特浦超纯水机(四川沃特水处理设备有限公司),RE-52A 型旋转蒸发器(巩义市英峪予华仪器厂),JT74-2 型晶体管鼓风电热恒温箱(浙江余姚低塘恒温箱厂),芹菜素(成都普思生物科技有限公司,批号 20100107),BS223S 型分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),乙醇(中国上海振兴化工一厂 AR,批号 200703106),HH-601 型超级恒温水浴(江苏金坛市环宇科学仪器厂)。

### 1.2 药物提取

**1.2.1 药材吸水量及吸水率** 称取适当粉碎的大蝎子草干药材 50 g,加入 1 000 mL 蒸馏水浸泡,每隔 0.5 h 将水滤出,称重,直到滤出的水量不再增加为止;重复 3 次,到 1.5 h 时得到最大吸水量分别为 140、130、135 mL,故确定浸泡时间为 1.5 h。

**1.2.2 提取工艺** 称取适当粉碎的大蝎子草干药材 25 g,置入 2 000 mL 圆底烧瓶,首次提取前浸泡 1.5 h,选取加水量(A),提取次数(B),提取时间(C)为影响因素,每个因素设计 3 个水平,按照 $L_9(3^4)$ 正交试验设计的方案提取总黄酮<sup>[6-8]</sup>,提取液浓缩至 50 mL 备用。以水提浸膏收率和总黄酮含量综合加权评分为考察指标,筛选最优工艺。各因素水平见表 1。

表 1 正交试验的各因素水平

Tab. 1 Factor levels of orthogonal test

水平	A 加水量(倍)	B 提取时间(h)	C 提取次数(次)
1	14	1	1
2	18	2	2
3	22	3	3

### 1.3 浸膏收率测定

将洗净的蒸发皿于烘箱 105 ℃干燥 3 h,取出后,放入干燥皿中冷却 30 min,迅速取出称重。精密吸取 1.2.2 项下大蝎子草水提液 40 mL,放入蒸发皿中,水浴蒸干,置烘箱中 105 ℃干燥 3 h,再置干燥皿中冷却 30 min,迅速精密称定重量,计算浸膏收率。

$$\text{浸膏收率} = \frac{(\text{浸膏重量}/40 \text{ mL}) \times 50 \text{ mL}}{25 \text{ g}}$$

### 1.4 总黄酮含量测定

**1.4.1 对照品溶液的制备** 精密称取芹菜素对照品 10 mg,置 25 mL 容量瓶,乙醇溶解并定容于刻度;精密吸取该溶液 3 mL,用 60% 乙醇定容于 25 mL 容量瓶;再精密吸取该溶液 1 mL,置于 25 mL 容量瓶中,再用 95% 乙醇定容,得浓度为 1.92 mg/L 的贮备液,备用。

**1.4.2 供试品溶液的制备** 精密吸取正交试验样品溶液 2 mL,置于蒸发皿中水浴蒸干,放置至室温,60% 的乙醇洗至 25 mL 容量瓶中,定容,过滤。精密吸取续滤液 1 mL,置于 25 mL 容量瓶中,95% 乙醇定容,摇匀,滤过,取续滤液备用。

**1.4.3 波长的确定** 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液适量,95% 乙醇为空白对照,于 200 ~ 400 nm 波长范围内进行扫描。供试品和对照品溶液在 269 nm 左右均有最大吸收峰,空白对照在相应位置无干扰,故确定检测波长为 269 nm。

**1.4.4 标准曲线的制备** 分别精密吸取 1.4.1 项下芹菜素对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 于 25 mL 容量瓶,95% 乙醇定容,以乙醇为空白对照,于 269 nm 波长下测定吸光度 A 值。以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制得标准曲线: $A = 2.2548C - 0.0029$ , $r = 1$ 。芹菜素在 0.076 8 ~ 0.460 8 mg/L 线性良好。

**1.4.5 重复性实验** 精密移取 6 份供试溶液 1 mL 置于 25 mL 容量瓶中,分别测定吸光度值。结果总黄酮含量的平均值是 0.09 mg/g,计算得到 RSD 为 2.05%,说明该方法重现性良好。

**1.4.6 稳定性实验** 取由同一份大蝎子草药材制备的供试品溶液,分别在 30、60、90、120、150 min,测定其吸光度,计算得 RSD = 0.539%,样品在 150 min 内稳定性良好。

**1.4.7 精密度实验** 精密吸取对照品溶液 1 mL 于 25 mL 的容量瓶中,95% 乙醇定容,测定 269 nm 处吸光度,重复测定 6 次,计算得 RSD 为 0.80%,

表明该方法精密度良好。

**1.4.8 回收率实验** 精密吸取大蝎子草水提液 1 mL 6 份,精密加入芹菜素对照品 0.40 mg,水浴挥干,用 60% 的乙醇定容于 25 mL 容量瓶中,过滤,取续滤液 1 mL 置于 25 mL 容量瓶中,95% 乙醇定容,取续滤液,测吸光度值,带入回归方程计算含量,并计算回收率。回收率(%)=(加样后实测总黄酮含量-样品中总黄酮含量)/芹菜素标准品加入量×100% 平均回收率为 108%,RSD=0.942%,符合要求。

**1.4.9 总黄酮含量测定** 按照 1.4.2 项下供试品溶液的制备方法,制备正交试验各因素水平样品溶液,以 95 % 乙醇为空白对照,在 269 nm 波长下测定吸光度值,带入回归方程计算每克生药总黄酮含量。

**1.5 验证实验**

按照正交试验所得最优条件,取药材 3 份,每份 25 g,加水量 18 倍,提取 3 次,每次提取 3 h,分别计算 3 次浸膏收率和总黄酮含量。3 次提取的浸膏收率分别是:134.7、149.95、143.1 mg/g,平均值为 142.58 mg/g,3 次提取总黄酮含量分别是:

0.105、0.100、0.101 mg/g,平均值为 0.102 mg/g, RSD 为 2.6%。

**1.6 统计学方法**

对各因素综合加权评分结果进行方差分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 正交试验**

根据指标因素对提取工艺贡献大小的差异分配不同的权重系数,即浸膏收率为 30%,总黄酮含量为 70%,再对各个指标的加权求和值进行综合评分,结合直观分析结果,优选最佳工艺条件。方差分析结果表明,因素 B 和 C 对提取工艺的影响具有显著性,各因素对水提浸膏收率、总黄酮含量的影响顺序为  $C>B>A$ ,最佳工艺为  $A_2B_3C_3$ ,即 18 倍加水量,提取 3 次,每次提取 3 h 为最佳提取工艺。实验结果见表 2。方差分析结果见表 3。浸膏收率与总黄酮含量的呈正相关关系, $r$  为 0.891 0,说明相关性较大,见图 1。

表 2 正交试验及加权评分优选大蝎子草总黄酮最佳提取工艺

Tab. 2 Orthogonal experiment and weighted scoring optimized extraction technique of TFA in HGD							
No.	A 加水量 (倍)	B 提取时间 (h)	C 提取次数 (次)	D(空白)	浸膏收率 (mg/g)	总黄酮含量 (mg/g)	综合加权评分 (%)
1	14	1	1	1	107.1	0.08	64.66
2	14	2	2	2	159.6	0.11	90.97
3	14	3	3	3	166.6	0.12	97.98
4	18	1	2	3	149.7	0.10	83.48
5	18	2	3	1	178.6	0.12	100.00
6	18	3	1	2	129.5	0.10	80.09
7	22	1	3	2	165.3	0.11	91.93
8	22	2	1	3	128.7	0.09	74.12
9	22	3	2	1	162.9	0.12	97.36
K1	253.61	240.07	218.87	262.02			
K2	263.57	265.09	271.81	262.99			
K3	263.41	275.43	289.91	255.58			
R	9.96	35.36	71.04	7.41			

表 3 正交试验各因素综合评分方差分析

Tab. 3 Comprehensive score of variance analysis of orthogonal experiment factors					
方差来源	SS	<i>v</i>	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
A	68.09	2	34.05	2.10	>0.05
B	661.08	2	330.54	20.38	<0.05
C	2 725.65	2	1 362.83	84.02	<0.01
D(误差)	32.44	2	16.22		

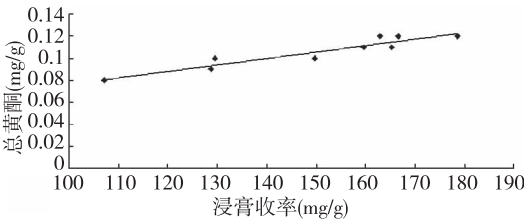


图 1 浸膏收率和总黄酮含量相关性分析  
Fig.1 Correlation analysis of extract yield and contents of general flavone

## 2.2 验证实验

用优选的工艺条件提取得到大蝎子草水提浸膏收率、总黄酮含量均达到较高水平,且工艺稳定,适合大蝎子草总黄酮的提取。

## 3 讨论

大蝎子草为荨麻科大蝎子草属植物,是贵州省苗族常用的特色药材。前期研究显示,大蝎子草水提溶液具有较好的抗炎作用,结合民间对于大蝎子草干品常采用水煎煮的习惯用法及前期预实验表明总黄酮有较好的抗炎效果,本实验采用 3 因素 3 水平的正交表设计方案,用水溶液回流提取,并以浸膏收率、总黄酮含量为考察指标,采用综合加权评分法进行评分,优化大蝎子草的总黄酮提取工艺。

由正交表的结果可以看出,大蝎子草最佳总黄酮提取工艺为  $A_2B_3C_3$ 。即 18 倍加水量、提取 3 次、每次提取 3 h 可获得较高的浸膏收率及总黄酮含量。方差分析结果表明,提取次数和提取时间对大蝎子草浸膏收率和总黄酮含量具有显著性影响,浸膏收率与总黄酮含量具有一定的相关关系。由于大蝎子草药材材质的特殊性,采用常规的 6 至 12 倍水不足以浸没药材,根据预实验,采用了 14 至 22 倍水进行提取。

本实验通过正交试验设计对大蝎子草中总黄

酮化合物的提取方法进行了优化,得到了稳定的提取工艺,并有效的缩短了试验时间,为进一步研究提供了参考。

## 4 参考文献

- [1] 陶玲,支娜,柏帅,等. 大蝎子草抗炎镇痛活性部位研究[J]. 时珍国医国药, 2009(6):1404-1405.
- [2] 沈祥春,支娜,刘文炜,等. 大蝎子草乙酸乙酯部位对脂多糖诱导巨噬细胞炎症介质表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2010(9):1397-1400.
- [3] 秦超,容蓉,杨勇,等. 多指标正交试验优选麻黄附子细辛汤提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012(9):35-39.
- [4] 刘文炜,沈祥春,陶玲,等. 荨麻属植物大蝎子草化学成分及质量标准研究[J]. 中国药理学杂志, 2012(19):1943-1946.
- [5] 靳波,刘友平,彭月,等. 多指标正交实验优选升麻提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011(6):27-29.
- [6] 陈飞龙,谭晓梅,戴开金,等. 正交试验法优选神爽片提取工艺的研究[J]. 中药材, 2009(1):129-131.
- [7] 董薇薇,柯木灵,关晶,等. 正交试验优选新疆紫草的醇提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013(4):48-49.
- [8] 向少能,刘媛,王洁,等. 蝎子草浸膏的抗炎、抗痛风及镇静作用研究[J]. 西南师范大学学报, 2010(3):162-167.

(2015-09-14 收稿,2015-12-02 修回)

中文编辑:周 凌;英文编辑:赵 毅

(上接第 40 页)

- [11] 王小绒. 孕前体质指数与妊娠不良结局的相关性研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2014(17):1463-1465.
- [12] 黄磊. 剖宫产术后再次妊娠 208 例分娩方式临床分析[J]. 医学临床研究, 2008(3):521-522.
- [13] 张淑萍,史新,梁文化. 健康孕妇足月新生儿出生体重相关影响因素研究[J]. 热带医学杂志, 2014(9):1190-1192.
- [14] 徐海耿,毛亚飞,顾雷君. 孕前 BMI 及孕期 BMI 增加对妊娠并发症及新生儿出生体重的影响[J]. 中国现代

医生, 2014(10):18-20.

- [15] Barker JP, Martyn CN, Osmond C, et al. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adults life[J]. BMJ, 2003(307):1524-1528.
- [16] 王芳,程冉,程义玲,等. 初产妇巨大儿与妊娠结局的分析[J]. 安徽医药, 2014(8):1521-1522.
- [17] 孟国花,周玲. 孕前体质指数及孕期体重的增加对妊娠结局的影响[J]. 安徽医药, 2012(6):778-180.

(2015-09-23 收稿,2015-11-17 修回)

中文编辑:周 凌;英文编辑:刘 华