

# 超声提取白花蛇舌草总黄酮工艺研究

谢璟, 陈永刚

(武汉市第三医院药学部, 430061)

**摘要** 目的 研究白花蛇舌草总黄酮的超声提取工艺。方法 以超声波法提取总黄酮类物质, 采用正交实验优化提取工艺。利用聚酰胺柱色谱法纯化提取的总黄酮, 以芦丁为对照品, 利用  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  显色法计算总黄酮含量。结果 最佳提取工艺为白花蛇舌草药材以 70% 乙醇为提取溶剂, 料液比 1 : 20, 超声提取 30 min, 提取 3 次, 提取率 2.38%。结论 优选出的最佳工艺简单易行, 能完全提取白花蛇舌草中总黄酮。

**关键词** 白花蛇舌草; 总黄酮; 正交实验; 超声波提取; 紫外分光光度法

中图分类号 R286; TQ450.1 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)05-0640-03

## Ultrasonic Extraction Technique for the Total Flavonoids from *Hedyotis diffusa* Willd.

XIE Jing, CHEN Yong-gang (Department of Pharmacy, the Third Hospital of Wuhan City, Wuhan 430060, China)

**ABSTRACT Objective** To study the ultrasonic extraction technique for the total flavonoids from *Hedyotis diffusa* Willd.

**Methods** To extract the total flavonoids with an ultrasonic method, optimize the extraction process with the orthogonal experiment and purify them by chromatography with polyamide (PA) column using rutin as standard. The content of total flavonoids was calculated by  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  chromogenic method. **Results** The optimized extraction technique was that extracting *Hedyotis diffusa* Willd 30 min once for three times with 70% ethanol (raw material : solvent = 1 : 20) as solvent, and the yield of which reached 2.38%. **Conclusion** The best extraction technique is easy and practical, which assuring the complete extraction of the total flavonoids from *Hedyotis diffusa* Willd.

**KEY WORDS** *Hedyotis diffusa* Willd; Total flavonoids; Orthogonal experiment; Ultrasonic extraction; Ultraviolet spectrophotometry

白花蛇舌草为茜草科一年生草本植物白花蛇舌草 (*Hedyotis diffusa* Willd.) 的干燥或新鲜全草, 具有清热解毒、利湿通淋之功效, 是民间常用中草药<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明, 其含有的总黄酮具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、增强免疫等作用, 是一类极具开发价值的天然活性物质<sup>[2-5]</sup>。超声波提取法具有空化效应、热效应、机械搅拌、强化扩散等特点, 在提取天然活性物质时, 具有快速、低温、能耗低、提取率高等特点, 可降低生产成本, 提高经济效益, 已被广泛用于中药提取工艺研究<sup>[6-8]</sup>。笔者在本实验采用正交设计法<sup>[7]</sup>, 以总黄酮含量为控制指标, 通过考察不同因素水平对总黄酮提取率的影响, 优选最佳超声提取工艺, 以期为白花蛇舌草的开发利用提供参考。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** Agilent 8453 紫外-可见分光光度计 (美国 Agilent 公司), BP211D Sartorius 型分析天平 (德国赛

多利斯), DFY-200 型粉碎机 (浙江温岭市大德中药机械有限公司), HH-4 型数显恒温水浴锅 (上海浦东物理光学仪器厂), KQ-500 型超声波清洗器 (40 kHz, 500 W, 江苏省昆山市超声仪器有限公司)。

**1.2 试剂** 白花蛇舌草 (市售, 经湖北中医药大学中药鉴定教研室鉴定为茜草科一年生草本植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的干燥全草), 芦丁对照品 (购自中国食品药品检定研究院, 批号: 100080-200707), 聚酰胺 (柱层析用, 60~80 目, 浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂), 水为纯化水, 其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 取芦丁对照品适量, 精密称定, 用 50% 乙醇溶液配制成  $0.1016 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  对照品储备液。

**2.2 供试品溶液的制备** 白花蛇舌草粉末过内径  $355 \mu\text{m}$  筛 (三号筛), 取约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶, 加石油醚 50 mL, 超声提取 30 min, 弃去石油醚, 滤渣挥干石油醚。加入 70% 乙醇溶液, 超声提取, 滤过, 合并滤液, 置 80 °C 水浴上浓缩至约 10 mL, 放冷, 加入聚酰胺粉末 0.4 g, 搅匀, 置 80 °C 水浴蒸干, 装柱 (柱内径 1.0 cm, 长 20 cm), 纯化水淋洗至洗脱液无颜

收稿日期 2011-07-19 修回日期 2011-09-09

**作者简介** 谢璟 (1979-), 女, 湖北武汉人, 药师, 学士, 研究方向: 医院药学。E-mail: 41129628@qq.com。

**通讯作者** 陈永刚 (1975-), 男, 湖北武汉人, 副主任药师, 博士, 研究方向: 中药资源开发利用与新药研究。电话: 027-68894886, E-mail: cyg508@163.com。

色,弃去洗脱液。70%乙醇洗脱,自黄色色带流出时开始收集洗脱液至 50 mL 量瓶,70%乙醇定容,摇匀,即为供试品溶液。

### 2.3 测定方法的建立

**2.3.1 溶液的显色** 精密移取适量样品溶液至 10 mL 具塞刻度试管,50%乙醇稀释至 5 mL,加 10% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,静置 5 min。加 5% 硝酸铝 0.3 mL,摇匀,静置 6 min。再加入  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液 2 mL,50%乙醇补足至 10 mL,摇匀,静置 15 min 即可。

**2.3.2 测定波长的选择** 取一定量供试品溶液和芦丁对照品溶液,按“2.3.1”项方法显色,以 50%乙醇为空白试剂,在 400~600 nm 波长范围内进行紫外扫描。两者最大吸收波长均在 505 nm 处。因此,选择 505 nm 作为测定波长(图 1)。

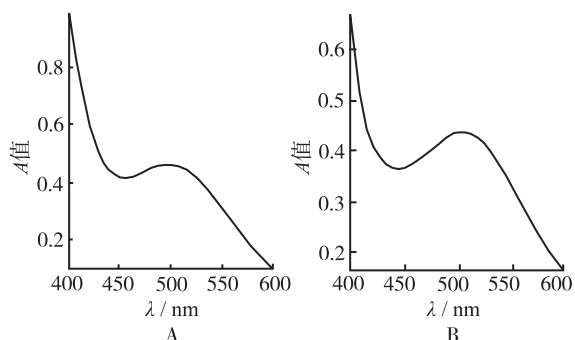


图 1 供试品溶液(A)与芦丁对照品溶液(B)紫外吸收波长扫描图谱

Fig. 1 Ultraviolet scanning of sample (A) and rutin solution (B)

**2.3.3 标准曲线的绘制** 分别精密吸取对照品储备液 0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL,置 10 mL 具塞刻度试管,按“2.3.1”项方法显色,用对照品储备液 0 mL 做空白对照,于 505 nm 波长处测定吸光度(A)。以芦丁对照品溶液浓度( $C, \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )为横坐标,A 值为纵坐标作图,得回归方程: $Y=11.728 0X-0.008 5, r=0.999 4$ 。结果表明,芦丁在  $0.010 16 \sim 0.061 00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内与 A 值呈良好线性关系。

**2.3.4 精密度实验** 取同一  $0.101 6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  芦丁对照品溶液 2.0 mL,按“2.3.1”项方法操作,测定 A 值,连续测定 5 次。A 值平均为 0.225 2, RSD 为 0.37% ( $n=5$ ),表明仪器精密度良好。

**2.3.5 稳定性实验** 取同一份供试品溶液,按“2.3.4”项方法操作,分别在 0,15,20,25,30,35 和 40 min 测定 A 值。结果 A 值 RSD 为 1.79%,表明供试品溶液

在 40 min 内稳定。

**2.3.6 重复性实验** 白花蛇舌草粉末过内径  $355 \mu\text{m}$  筛(三号筛),取 5 份,每份约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶,按“2.2”项方法制备供试液,按“2.3.1”项方法显色后测定总黄酮含量。结果平均含量为 2.35%, RSD 为 1.37%。

**2.3.7 加样回收率实验** 取 5 份已知总黄酮含量的白花蛇舌草粉末约 0.5 g,精密称定,分别精密加入芦丁对照品 11.76 mg,按供试品溶液制备方法操作,计算加样回收率。结果平均加样回收率为 96.61%, RSD 为 1.21%。见表 1。

表 1 总黄酮加样回收率实验结果

Tab. 1 Recovery of the total flavonoids

样品号	称样量/	原有量	加入量	测得量	回收率/
	g		mg		%
1	0.511 1	12.14	11.76	23.54	96.94
2	0.528 6	12.56	11.76	23.88	96.26
3	0.520 0	12.35	11.76	23.53	95.07
4	0.521 6	12.39	11.76	23.99	98.64
5	0.530 5	12.60	11.76	23.95	96.51
6	0.507 3	12.05	11.76	23.37	96.26

**2.3.8 样品含量测定** 精密移取供试品溶液 1.0 mL 至 10 mL 具塞刻度试管,按“2.3.1”项方法显色并进行紫外测定,将 A 值代入回归方程,计算总黄酮的含量,并计算提取率。白花蛇舌草总黄酮提取率(% ) =  $(Y+0.008 5) \times 10 \times 100 / (11.728 \times 1 000 \times W) \times 100\%$ 。Y 为吸光度,W 为白花蛇舌草粉末的取样量。

### 2.4 提取工艺研究

**2.4.1 乙醇浓度考察** 称取白花蛇舌草药材粉末 1.0 g,石油醚脱脂,选择料液比为 1:20,提取时间为 20 min,提取次数为 2 次,分别以 30%,40%,50%,60%,70%,80%,90% 乙醇超声提取,测定总黄酮含量。结果乙醇浓度为 70% 时提取率最高,故选择 70% 乙醇为提取溶剂。见图 2。

**2.4.2 正交实验** 参考文献资料,以乙醇浓度(A)、料液比(B)、超声时间(C)、提取次数(D)为因素,每因素选用 3 个水平,用  $L_9(3^4)$  正交表安排实验,每个实验重复两次。因素水平见表 3,正交实验结果见表 4。

方差分析结果表明,各因素对实验结果均无影响,由极差 R 结果可知,各因素影响顺序为  $D > A > C > B$ 。最佳组合为  $A_2 B_2 C_2 D_3$ ,即乙醇浓度为 70%,料液比为 1:20,提取时间 30 min,提取 3 次,总黄酮提取率最高。

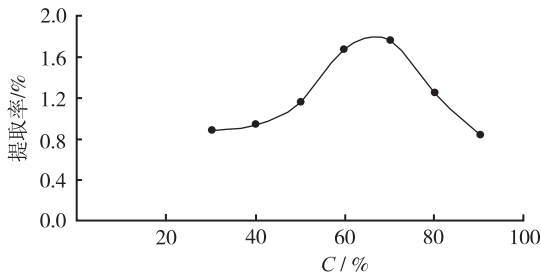


图2 乙醇浓度对提取率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on extraction rate

表2 因素水平表

Tab.2 Factors and levels

水平	乙醇浓度 (A) / %	料液比(B) (W : V)	超声时间 (C) / min	提取次数 (D)
1	60	1 : 10	20	1
2	70	1 : 20	30	2
3	80	1 : 30	40	3

表3 正交实验结果

Tab.3 Results of orthogonal experiment

实验号	因素				总黄酮含量 / %		
	A	B	C	D	$X_1$	$X_2$	$\bar{x}$
1	1	1	1	1	0.793 4	0.803 6	1.597 0
2	1	2	2	2	1.701 5	1.677 3	3.378 8
3	1	3	3	3	1.578 1	1.556 7	3.134 8
4	2	1	2	3	1.785 2	1.771 6	3.556 7
5	2	2	3	1	1.098 1	1.103 6	2.201 7
6	2	3	1	2	1.637 5	1.649 4	3.286 9
7	3	1	3	2	0.828 2	0.861 3	1.689 5
8	3	2	1	3	1.289 0	1.308 0	2.597 0
9	3	3	2	1	0.880 8	0.856 2	1.737 0
$K_1$	8.110 6	6.843 2	7.480 9	5.535 7			
$K_2$	9.045 3	8.177 5	8.672 5	8.355 2			
$K_3$	6.023 5	8.158 7	7.026 0	9.288 5			
R	3.021 8	1.334 3	1.646 5	3.752 8			
SS	1.595 7	0.390 1	0.482 0	2.544 9			

**2.4.3 最佳提取工艺条件验证** 取供试品5份,每份约1.0 g,精密称定。石油醚脱脂,按最优条件  $A_2B_2C_2D_3$  平行操作,按“2.4”项方法测定 A 值,根据标准曲线方程计算,5次测得总黄酮含量分别为 2.35%, 2.37%, 2.38%, 2.42% 和 2.35%, 平均含量 2.38%, RSD 为 1.29%, 表明工艺稳定。

3 讨论

若将提取液直接浓缩蒸干,加水溶解上柱,会有部

分脂溶性黄酮析出,使检测结果明显偏低。故将聚酰胺粉末 0.4 g 加入提取液中搅拌蒸干,使总黄酮充分吸附在聚酰胺粉末上,然后再采用干法上柱进行净化洗脱操作。

表4 方差分析

Tab.4 Variance analysis

方差来源	平方和 (SSj)	自由度 (f)	均方 (MSSj)	F 值
A	1.595 7	2	0.797 8	4.090 0
B	0.390 1	2	0.195 1	1.000 0
C	0.482 0	2	0.241 0	1.235 4
D	2.544 9	2	1.272 5	6.523 1
误差 SSe	0.482 0	2	0.241 0	

$F_{(2,2)0.05} = 19; F_{(2,2)0.01} = 99$

白花蛇舌草含有较多叶绿素,直接提取会干扰紫外分光光度法测定结果。提取前先用石油醚超声处理两次,可以去除大部分叶绿素,而且可以提高总黄酮提取率。

稳定性实验中,每隔 5 min 测定样品 A 值,结果 40 min 时 A 值降为 0.447 0,并且溶液颜色已开始变浅,RSD 为 1.79%。考虑到对测定结果准确性的影响,故应在显色后 40 min 内测定。而 15 min 时其 A 值最大,故选择在显色 15 min 后进行测定。

参考文献

[1] 方岩雄,张永成,陈敏敏,等.抗肿瘤药物白花蛇舌草及其活性成分[J].中成药,2004,26(7):577-578.

[2] 周亚军,吴孔松,曾光尧,等.白花蛇舌草化学成分的研究[J].中国中药杂志,2007,32(7):590-593.

[3] 任凤芝,刘刚叁,张丽,等.白花蛇舌草黄酮类化学成分研究[J].中国药学杂志,2005,40(7):502-504.

[4] 王宇翎,张艳,方明,等.白花蛇舌草总黄酮的抗炎及抗菌作用[J].中国药理学通报,2005,21(3):348-350.

[5] 王宇翎,张艳,方明,等.白花蛇舌草总黄酮的免疫调节作用[J].中国药理学通报,2005,21(4):444-447.

[6] 哈及尼沙,地力夏提·艾比布拉,美丽万·阿不都热依木,等.槭寄生总黄酮提取工艺研究[J].医药导报,2011,30(7):926-928.

[7] 王薇,张长弓.葱白总黄酮提取工艺的优化[J].医药导报,2010,29(3):357-359.

[8] 余琪,姜艳,周丹英,等.杭白菊提取物中活性成分及总黄酮的含量测定[J].中国现代应用药学,2011,28(6):530-532,547.