

藏药材牛尾蒿中总黄酮提取 工艺优化及质量分数测定^①

杨正明¹, 滕云¹, 王景富¹, 李波¹, 刘圆²

1. 西南民族大学 化学与环境保护工程学院, 成都 610041; 2. 西南民族大学 民族医药研究院, 成都 610041

摘要: 采用紫外分光光度法, 以芦丁为对照品测定牛尾蒿中总黄酮的质量分数. 通过单因素试验考察乙醇体积分数、提取时间、提取温度和料液比对总黄酮提取率的影响, 并采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化藏药材牛尾蒿中总黄酮的提取工艺, 测定各样品中总黄酮质量分数. 结果表明: 最佳提取工艺为乙醇体积分数 20%, 提取温度 90 ℃, 提取时间 1.0 h, 料液比 1:50 (g/mL), 在此条件下, 牛尾蒿中总黄酮提取率为 67.88 mg/g; 不同植株部位总黄酮质量分数差异有统计学意义, 以叶中质量分数最高; 煅烧成炭后, 总黄酮质量分数明显降低. 优化后的提取工艺合理、可行, 可用于牛尾蒿总黄酮的提取; 牛尾蒿炭(闷煅)工艺的科学性和必要性有待进一步综合评价.

关键词: 牛尾蒿; 牛尾蒿炭; 总黄酮; 正交试验; 提取工艺

中图分类号: R931

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)02-0176-06

藏药材牛尾蒿为菊科植物牛尾蒿 *Artemisia subdigitata* Mattf. 的干燥地上部分, 是藏药普尔芒类药材来源之一, 被藏族人民视为止咳祛痰圣药^[1-3], 具有止咳平喘、祛痰、抗炎、抗菌、抗病毒、杀虫、抗疟疾、抗肿瘤、抗氧化性和保肝等作用^[4-5]. 普尔芒可以直接研磨药用、煎膏药用或煅灰(明煅和闷煅)药用, 常配方用药: 煎膏或直接入药常用于清热解毒、消炎以及瘟疫等症; 煅灰常用于虫病、疮疖、止血、干脓水或黄水等症^[6-7]. 牛尾蒿全草主要有效成分为挥发油、黄酮、香豆素、单萜类、倍半萜类、三萜类、苯丙素类、酚类、皂苷、鞣质、蛋白质、糖类、油脂等化学成分^[8-9]. 作为许多传统药材中的有效成分, 黄酮类化合物具有抗氧化、抗衰老、抗炎镇痛、免疫调节、降血脂、抗肿瘤、抗辐射等药理作用^[10-11]. 本试验以总黄酮提取率为考察指标, 在单因素试验的基础上, 采用正交试验优选牛尾蒿中总黄酮的回流提取工艺, 并测定牛尾蒿和牛尾蒿炭(闷煅)中总黄酮的质量分数, 以期对藏药材牛尾蒿的进一步开发研究及牛尾蒿和牛尾蒿炭的化学成分差异的研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

TU-1950 型双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; ESJ200-4 电子天平, 沈阳龙腾电子有限公司. 牛尾蒿(炭)药材分别于 2013 年 7 月 3 日采自于四川省阿坝州松潘县水晶乡川盘村(川主寺药泉山庄, 海拔 3 300 m), 2014 年 7 月 9 日购于四川省阿坝藏族羌族自治州藏医院, 所有样品均经西

① 收稿日期: 2015-05-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(81173653); 西南民族大学研究生创新型科研项目(CX2015SZ061).

作者简介: 杨正明(1990-), 男, 云南丽江人, 硕士研究生, 主要从事少数民族药物的研究.

通信作者: 刘圆, 博士, 教授.

南民族大学刘圆教授鉴定为菊科植物牛尾蒿 *A. subdigitata* Mattf, 粉碎, 过 3 号筛, 备用; 芦丁对照品 (批号: 100080-201408), 中国食品药品检定研究院; 水为纯净水; 试剂均为分析纯.

1.2 试验方法

1.2.1 对照品溶液的制备

精密称取 7.8 mg 的芦丁对照品, 用 70%乙醇定容至 50 mL, 摇匀, 即得 0.156 mg/mL 的芦丁对照品溶液.

1.2.2 供试品溶液的制备

取 0.5 g 牛尾蒿药材粉末(注: 单因素和正交试验所用药材均为采于川主寺药泉山庄的牛尾蒿地上部分), 精密称定, 在设定的试验条件下按一定的乙醇体积分数、提取温度、提取时间和料液比提取, 过滤, 并用少量提取液洗涤, 定容至 50 mL 容量瓶中, 摇匀, 即得牛尾蒿总黄酮供试液.

1.2.3 标准曲线的绘制^[12]

精确量取 1.4, 1.8, 2.2, 2.6, 3.0, 3.4, 3.8 mL 芦丁对照品溶液, 置于 10 mL 比色管中, 分别加入 0.4 mL 的 5%亚硝酸钠溶液, 摇匀, 放置 6 min 加入 0.4 mL 的 10%硝酸铝溶液, 摇匀, 6 min 后加入 5 mL 4%的氢氧化钠溶液, 并用水定容至刻度, 摇匀, 放置 15 min. 以试剂空白作参比, 于 510 nm 处测定其吸光度, 以芦丁质量浓度(C)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到线性回归方程:

$$A = 11.407C + 0.0358$$

其线性相关系数为 $R^2 = 0.9992$, 结果表明芦丁对照品溶液在 21.84~59.28 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好.

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 精密度试验

精密量取 6 份 1.2.1 项下对照品溶液 2 mL, 按 1.2.3 项下方法显色, 于 510 nm 处测定 A , 计算相对标准偏差(RSD)为 0.85%, 表明仪器精密度好.

2.1.2 重复性试验

取 6 份 0.5 g 牛尾蒿药材粉末, 精密称定, 按 1.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 1.2.3 项下方法于 510 nm 处测定 A , 计算 RSD 为 0.56%, 表明本方法重复性较好.

2.1.3 稳定性试验

取 6 份 0.5 g 牛尾蒿药材粉末, 精密称定, 按 1.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 1.2.3 项下方法显色, 每隔 15 min($n=6$)测定 1 次, RSD 为 1.12%, 表明在 90 min 内稳定性良好.

2.1.4 加样回收率试验

取 6 份 0.05 g 牛尾蒿药材粉末, 精密称定, 加入适量的芦丁对照品溶液, 按 1.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 1.2.3 项下方法显色, 于 510 nm 处测定 A , 计算平均回收率为 98.53%, RSD 为 1.86%, 表明该方法准确可靠.

2.2 单因素试验考察

2.2.1 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响

取 6 份 0.5 g 牛尾蒿药材粉末, 精密称定, 分别加入体积分数为 10%~60%的乙醇水溶液 15 mL, 70 °C 水浴加热 1.5 h, 提取 1 次. 过滤, 用少量提取液洗涤, 滤液定容至 50 mL 容量瓶中, 取 0.8 mL 于 10 mL 具塞比色管中, 按 1.2.3 项下方法显色测定, 计算总黄酮提取率, 结果如图 1 所示. 由图 1 可知, 乙醇体积分数为 30%时, 总黄酮提取率最高. 随着乙醇体积分数的增加, 产生较大的渗透压, 一些醇溶性杂质、色素等成分溶出增多, 导致黄酮类化合物提取率下降^[13-14].

2.2.2 提取时间对总黄酮提取率的影响

取 6 份 0.5 g 牛尾蒿药材粉末, 精密称定, 加入 30%的乙醇 15 mL, 70 °C 水浴分别加热 0.5, 1.0, 1.5,

2.0, 2.5, 3.0 h, 提取 1 次. 过滤, 用少量提取液洗涤, 滤液定容至 50 mL 容量瓶中, 取 0.8 mL 于 10 mL 具塞比色管中, 按 1.2.3 项下方法显色测定, 计算总黄酮提取率, 结果如图 2 所示. 由图 2 可知, 提取时间为 1 h 时, 总黄酮提取率最高. 随着提取时间的延长, 未溶出的总黄酮量已经很少, 其他杂质可能会增多, 从而导致提取率的降低^[15].

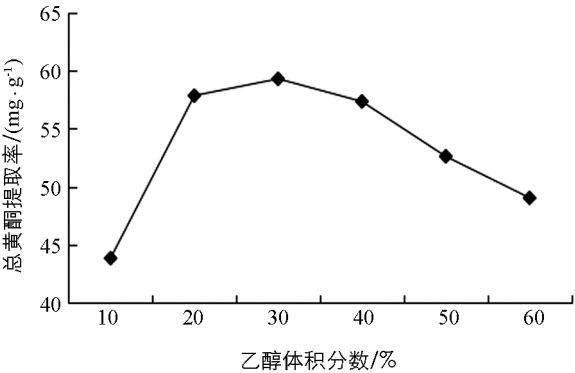


图 1 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响

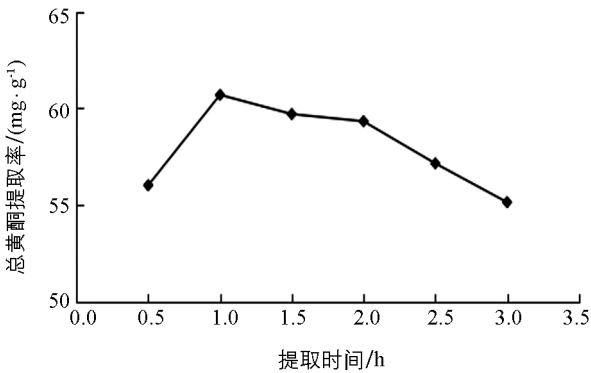


图 2 提取时间对总黄酮提取率的影响

2.2.3 提取温度对总黄酮提取率的影响

取 6 份 0.5 g 牛尾蒿药材粉末, 精密称定, 加入 30% 的乙醇 15 mL, 分别于 40~90 °C 下水浴加热 1.0 h, 提取 1 次. 过滤, 用少量提取液洗涤, 滤液定容至 50 mL 容量瓶中, 取 0.8 mL 于 10 mL 具塞比色管中, 按 1.2.3 项下方法显色测定, 计算总黄酮提取率, 结果如图 3 所示. 由图 3 可知, 提取温度为 80 °C 时, 总黄酮提取率最高. 随着提取温度的升高, 加快了分子的扩散能力, 总黄酮的提取率增大, 当达到一定温度时, 总黄酮提取率达到最大, 但继续升高温度, 提取率反而下降, 这可能是因为高温引起了黄酮类物质结构的变化, 亦或是温度达到溶剂沸点以后, 造成溶剂的损失, 总黄酮得率降低^[13, 16].

2.2.4 料液比对总黄酮提取率的影响

取 6 份 0.5 g 牛尾蒿药材粉末, 精密称定, 加入的料液比为 20~70 倍量的 30% 乙醇, 80 °C 水浴加热 1.0 h, 提取 1 次. 过滤, 用少量提取液洗涤, 滤液定容至 50 mL 容量瓶中, 取 0.8 mL 于 10 mL 具塞比色管中, 按 1.2.3 项下方法显色测定, 计算总黄酮提取率, 结果如图 4 所示. 料液比较低时, 牛尾蒿药材得不到完全浸润, 使得黄酮不能很好地溶出; 当料液比为 1:40 (g/mL) 时, 总黄酮提取率达到最大, 随着料液比的继续增加, 总黄酮提取率反而降低, 可能是某些脂溶性杂质的溶出量增加, 干扰因素增多所致^[17].

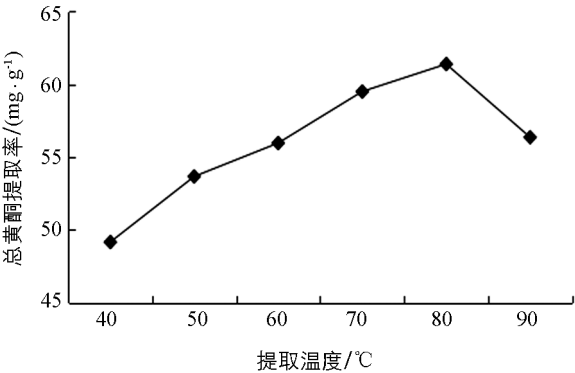


图 3 提取温度对总黄酮提取率的影响

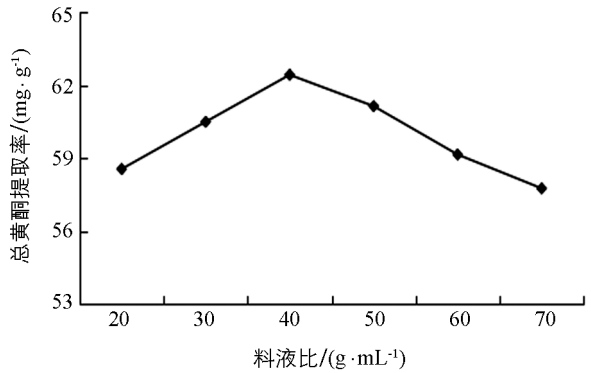


图 4 料液比对总黄酮提取率的影响

2.3 正交试验

根据单因素试验的结果, 选取影响牛尾蒿总黄酮质量分数的 4 个因素: 乙醇体积分数(A), 提取时间(B), 提取温度(C), 料液比(D)作为考察因素, 因素水平安排见表 1. 每个因素设定 3 个水平, 按 L₉(3⁴)表设计试验, 并计算总黄酮质量分数. 试验结果见表 2, 方差分析见表 3.

表 1 因素水平表

水平	因 素			
	乙醇体积分数 $A/\%$	提取温度 $B/^\circ\text{C}$	提取时间 C/h	料液比 $D/(\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	20	70	1	1 : 30
2	30	80	1.5	1 : 40
3	40	90	2	1 : 50

表 2 正交试验设计和结果

试验号	A	B	C	D	总黄酮得率/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$
1	1	1	1	1	57.73
2	1	2	2	2	61.06
3	1	3	3	3	67.31
4	2	2	1	3	66.66
5	2	3	2	1	59.46
6	2	1	3	2	58.85
7	3	3	1	2	65.03
8	3	1	2	3	62.20
9	3	2	3	1	58.67
K_1	62.03	59.59	63.14	58.62	
K_2	61.66	62.13	60.91	61.65	
K_3	61.97	63.93	61.61	65.39	
R	0.38	4.34	2.23	6.77	

表 3 方差分析结果

方差来源	SS	df	MS	F	p
校正模型	105.352	6	17.559	144.86	0.007
截距	34 468.398	1	34 468.398	284 366.652	0
B	28.522	2	14.261	117.655	<0.01
C	7.823	2	3.912	32.272	<0.05
D	69.006	2	34.503	284.653	<0.01
A (误差)	0.242	2	0.121		
总计	34 573.992	9			
校正的总计	105.594	8			

注： $F_{0.01}(1, 2)=99$ ， $F_{0.05}(1, 2)=19$ 。

由表 3 数据分析可知：各因素的影响程度依次为料液比,提取温度,提取时间,乙醇体积分数. 乙醇体积分数对牛尾蒿总黄酮的提取率影响最小,所以将其作为误差进行方差分析,提取温度和料液比各水平间差异有统计学意义($p<0.01$),提取时间各水平间差异有统计学意义($p<0.05$). 结合直观分析结果,最佳提取工艺为 $A_1B_3C_1D_3$,即乙醇体积分数 20%,提取温度 90 ℃,提取时间 1.0 h,料液比 1 : 50 (g/mL).

2.4 验证试验

取 3 份 0.5 g 牛尾蒿药材粉末,精密称定,采用上述优化条件进行提取,并计算总黄酮提取率. 结果显示,总黄酮平均提取率为 67.88 mg/g, $RSD=0.58\%(n=3)$,表明该提取工艺稳定可行.

2.5 各样品中总黄酮质量分数测定

牛尾蒿各样品中总黄酮质量分数测定结果如表 4 所示. 由表 4 可知,牛尾蒿不同植株部位总黄酮质量

分数差异有统计学意义, 以叶中质量分数为最高, 可达 $185.97 \pm 2.20 \text{ mg/g}$; 煅烧成炭后, 总黄酮质量分数明显降低.

表 4 各样品中黄酮质量分数测定结果($\bar{x} \pm S, n=3$)

样品编号	产地(来源)	药材	不同部位	总黄酮质量分数/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
S1	阿坝州川主寺药泉山庄	牛尾蒿	茎	12.77 ± 0.19
S2			叶	127.16 ± 1.50
S3			地上部分	67.88 ± 0.39
S4	阿坝州藏医院	牛尾蒿	茎	24.79 ± 0.65
S5			叶	185.97 ± 2.20
S6			地上部分	87.10 ± 2.71
S7	阿坝州藏医院	牛尾蒿炭	茎	2.94 ± 0.09
S8			地上部分	10.78 ± 0.37

3 结 论

黄酮类化合物与铝盐络合后会产生特征吸收, 本试验采用铝盐络合比色法, 方法学考察结果表明该方法合理、准确. 各样品中总黄酮质量分数测定结果表明: 叶中总黄酮质量分数较高于茎; 牛尾蒿烧炭后, 总黄酮质量分数明显降低, 可能是因为高温炭化引起黄酮类物质结构发生变化, 破坏了黄酮物质, 使总黄酮的质量分数降低^[13,18], 藏医临床煅烧前后化学成分的变化有待进一步试验研究, 因此, 牛尾蒿炭(闷煅)工艺的科学性和必要性有待进一步综合评价.

参考文献:

[1] 李衍文, 黄云晖, 黄月中, 等. 汉拉英中草药名称辞典 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1998: 224.

[2] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 青海: 青海人民出版社, 1991: 205—206.

[3] 向 佳. 藏药“天下第一蒿”实现工业化生产 [N]. 中国中医药报, 2010—12—27(1).

[4] 刘小珍. 藏药牛尾蒿和臭蒿的质量标准及有效成分提取工艺研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2014.

[5] 黄正胜. 药用植物牛尾蒿和鸡肉参的化学成分研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.

[6] 登巴达吉. 略论藏药普尔芒的识别及应用 [J]. 中国藏学, 2014(2): 146—151.

[7] 土旦次仁. 中国医学百科全书·藏医学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.

[8] CHU S S, LIU Z L, DU S S, et al. Chemical Composition and Insecticidal Activity Against *Sitophilus zeamais* of the Essential Oils Derived from *Artemisia giraldii* and *Artemisia subdigitata* [J]. *Molecules*, 2012, 17(6): 7255—7265.

[9] 陈伟民. 青海几种蒿属植物挥发油的化学成分及其药性与用途 [J]. 青海科技, 2004, 11(4): 7—9.

[10] 方一杰, 徐岩成, 安毛毛, 等. 黄酮类化合物的药动学和药理作用研究进展 [J]. 药学服务与研究, 2015, 15(1): 6—9.

[11] 黄河胜, 马传庚, 陈志武. 黄酮类化合物药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 13—16.

[12] 邓泽丽, OH Y J, 李洪军, 等. 响应面分析法优化超声辅助提取山楂中总黄酮的工艺 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(8): 160—166.

[13] 刘艳清, 汪洪武, 蔡 璇, 等. 响应面法优化栀子总黄酮提取工艺研究 [J]. 中药材, 2014, 37(2): 333—337.

[14] 陈志伟, 陈 坤, 胡银川, 等. 响应面法对苦丁茶总黄酮提取工艺的优化 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2012, 34(5): 119—125.

[15] 吴萍萍, 赖曼萍, 尹艳艳, 等. 响应面法优化山稔叶总黄酮提取工艺的研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(4): 223—227, 233.

[16] 卞京军, 程密密, 刘世尧, 等. 皱皮木瓜皮渣齐墩果酸、熊果酸和总黄酮连续提取工艺研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(3): 158—165.

[17] 罗 艳, 苏志恒, 蒋艳萍. 六堡茶中总黄酮的提取工艺研究 [J]. 食品工业, 2014, 35(1): 161—164.

- [18] 郭 辉, 罗宇倩, 章华伟, 等. 响应面法优化超声波辅助提取荷叶黄酮工艺研究 [J]. 中国食品学报, 2011, 11(1): 119—125.

Optimization of the Extraction Technology for Total Flavonoids from the Tibetan Medicine *Artemisia subdigitata* Mattf. and Determination of Their Content

YANG Zheng-ming¹, TENG Yun¹, WANG Jing-fu¹,
LI Bo¹, LIU Yuan²

1. School of Chemistry and Environmental Protection Engineering,

Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

2. Ethnic Medicine Institute, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

Abstract: Ultraviolet spectrophotometry was employed to determine the total flavonoids in *Artemisia subdigitata* Mattf., with rutin as the control. The effects of ethanol concentration (v/v), extraction time, extraction temperature and ratio of solid to liquid on the extraction rate of total flavonoids were evaluated in single-factor experiments, and an $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to optimize the extraction technology. The results showed that the optimum extraction conditions were 20% ethanol, extraction temperature 90 °C, extraction time 60 min, ratio of solid to liquid 1 : 50 (g/mL), and the average extraction yield of total flavonoids was 67.88 mg/g under the optimum conditions. The content of total flavonoids showed a large difference in different plant parts, being the highest in the leaves, and total flavonoids content decreased significantly after carbonization. This optimized extraction technology proved to be reasonable and feasible and is, therefore, recommended for use in the extraction of total flavonoids in *A. subdigitata*. Whether the process of carbonizing *A. subdigitata* is necessary and science-based is to be further evaluated.

Key words: *Artemisia subdigitata* Mattf.; carbonized *Artemisia subdigitata* Mattf.; total flavonoids; orthogonal test; extraction technology

责任编辑 周仁惠

