

正交试验法优选珍珠菜中 4 种黄酮的提取工艺

丁林芬¹⁾, 马银海²⁾, 吴兴德³⁾, 秦智彬¹⁾, 徐文秀¹⁾, 郭亚东¹⁾

(1) 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500; 2) 昆明学院化学科学与技术系, 云南 昆明 650214; 3) 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650204)

[摘要] 目的 优选珍珠菜中芦丁、异槲皮苷、山柰酚 3-O- β -D-半乳糖苷及紫云英苷的最佳提取工艺。方法 通过正交试验设计考察甲醇浓度、提取时间、提取温度、料液比对珍珠菜中 4 种黄酮含量的影响。结果 最佳提取工艺条件为 70% 甲醇, 提取时间 45 min, 提取温度 45 °C, 料液比 (g/mL) 1:100。结论 该工艺稳定、有效, 简单易行。

[关键词] 珍珠菜; 4 种黄酮; 正交试验

[中图分类号] R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1003-4706 (2012) 09-0056-03

Optimization of Extraction Process of Four Flavonoids in *Lysimachia Clethroides* Duby by Orthogonal Design

DING Lin-fen¹⁾, MA Yin-hai²⁾, WU Xing-de³⁾, QIN Zhi-bin¹⁾, XU Wen-xiu¹⁾, GUO Ya-dong¹⁾

(1) School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Chemical Science and Technology Department, Kunming University, Kunming Yunnan 650214; 3) State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650204, China)

[Abstract] Objective To optimize the extraction technology and condition of rutin, isoquercitrin, kaempferol 3-O- β -D-galactoside and astragalgin from *Lysimachia clethroides* Duby. Method The concentration of methanol, the amount of solvent, extraction times and the solid-liquid ratio were investigated by orthogonal design experiment. Result The optimum extract conditions were: 70% methanol as the extraction solvent, 45 min of extraction time, 45 °C of extraction temperature and 1:100 of the solid-liquid ratio. Conclusion The optimum process of four flavonoids is stable, effective and simple.

[Key words] *Lysimachia clethroides* duby; Four flavonoids; Orthogonal design

珍珠菜 (*Lysimachia clethroides* duby) 为报春花科珍珠菜属多年生草本植物, 其味苦、辛、性平。全草入药, 具有清热解毒、活血调经、利水消肿等功效^[1]。在民间广泛用于治疗咽喉肿痛、虫蛇咬伤、跌打损伤、妇女月经不调等症。文献报道珍珠菜中的化学成分主要是黄酮类、三萜及皂苷类^[2-4]; 提取工艺方面报道的文献主要是黄酮类^[5-7], 未见研究珍珠菜中芦丁、异槲皮苷、山柰酚 3-O- β -D-半乳糖苷及紫云英苷的提取工艺报

道, 笔者旨在通过正交设计试验同时对珍珠菜中 4 种黄酮的超声提取工艺条件进行优化, 筛选最佳提取条件。

1 实验仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 series 高效液相色谱仪 (四元梯度泵, 自动进样器, 柱温箱, 紫外检测器和 Agilent

[作者简介] 丁林芬 (1985~), 女, 云南曲靖市人, 医学硕士, 助理实验师, 主要从事植物化学及药物分析研究工作。

[通讯作者] 郭亚东. E-mail: yadong_guo@yahoo.com.cn

色谱工作站);超声提取器(上海仪器制造厂,250 W,50 Hz);电子天平(德国赛多利斯CP-224S).

1.2 试药

芦丁对照品(由四川省彭州市植物提取厂提供,批号:990305,纯度>98%);异槲皮苷对照品(自制,运用面积归一化法测定其含量>98%),山奈酚 3-O- β -D-半乳糖苷对照品(自制,运用面积归一化法测定其含量>98%),紫云英苷对照品(自制,运用面积归一化法测定其含量>98%).

珍珠菜样品采自云南省大理市,由中国科学院昆明植物研究所李锡文教授鉴定为珍珠菜 *L. clethroides*,标本现存于该所标本室(标本号2006-19),乙腈为色谱纯(美国Merk公司),水为超纯水,其它试剂均为分析纯.

2 实验方法及结果

2.1 色谱条件^[8]

色谱柱:LiChrospher RP-C18(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m)色谱柱,以乙腈(A)0.4%的磷酸溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~15 min,15%

A \rightarrow 17%A,15~25 min,17%A \rightarrow 30%A),流速1 mL/min,柱温:35 $^{\circ}$ C,检测波长360 nm.

2.2 对照品溶液的配制^[8]

先分别精密称取对照品芦丁、异槲皮苷、山奈酚 3-O- β -D-半乳糖苷及紫云英苷适量,配成浓度分别为1.0,3.6,3.0,6.0 mg/mL的单一成分对照品储备液.然后分别精密量取芦丁、异槲皮苷、山奈酚 3-O- β -D-半乳糖苷及紫云英苷的对照品储备液1.0、1.0、0.6、0.8 mL置10 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得每1 mL含芦丁0.10 mg、异槲皮苷0.36 mg、山奈酚 3-O- β -D-半乳糖苷0.18 mg及紫云英苷0.48 mg的对照品混合溶液.

2.3 供试品溶液的配制

取珍珠菜粉末约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,按正交试验设计的甲醇浓度、提取时间、提取温度、料液比提取.进样前,取适量溶液用0.45 μ m微孔滤膜过滤.

2.4 正交试验设计

对甲醇浓度(A)、提取时间(B)、提取温度(C)、料液比(D)4个因素进行考察,按L₉(3⁴)正交表进行试验,确定最佳提取工艺条件,见表1.

表1 正交试验因素水平

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal design

水平	因素			
	(A) 溶剂组成 (%)	(B) 提取时间 (min)	(C) 温度 ($^{\circ}$ C)	(D) 料液比 (g/mL)
水平 1	50	15	30	1:25
水平 2	70	30	45	1:50
水平 3	85	45	60	1:100

2.5 正交试验结果及方差分析

通过对正交试验结果(见表2)的直观分析和方差分析(见表3)对比,可见对珍珠菜中芦丁、异槲皮苷、山奈酚 3-O- β -D-半乳糖苷及紫云英苷提取率影响的主次顺序为B>D>A>C,结果表明,最佳提取条件为A₂B₃C₂D₃,即提取溶剂为70%甲醇,提取时间为45 min,提取温度为45 $^{\circ}$ C,料液比(g/mL)为1:100.

2.6 验证性试验

根据正交试验中筛选的最佳提取条件进行验证(见表4),由表4可知,珍珠菜中芦丁、异槲皮苷、山奈酚 3-O- β -D-半乳糖苷及紫云英苷提取的最佳条件A₂B₃C₂D₃,经过验证,重复性良好.

3 讨论

在正交试验中采用超声法同时提取珍珠菜中芦丁、异槲皮苷、山奈酚 3-O- β -D-半乳糖苷及紫云英苷的提取率为指标优选工艺,选择影响提取的4个因素(甲醇浓度、提取时间、提取温度、料液比)进行优化,确定了珍珠菜的最佳提取条件,为进一步研究提供了基础.

[参考文献]

[1] 卫生部中华本草编委会,国家中医药管理局. 中华本

表 2 正交试验结果
Tab. 2 Result of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	提取率 (%)
1	1	1	1	1	2.706
2	1	2	2	2	2.408
3	1	3	3	3	2.859
4	2	1	2	3	2.523
5	2	2	3	1	2.714
6	2	3	1	2	2.701
7	3	1	3	2	2.091
8	3	2	1	3	2.672
9	3	3	2	1	2.797
	7.343	6.69	7.449	7.587	
	7.938	7.794	7.728	7.200	
	7.56	8.357	7.664	8.054	

表 3 方差分析
Tab. 3 Analysis of variance

来源	离差平方和	自由度	方差	F	P
A (%)	0.060 4	2	0.030 2	4.244 6	0.1906 7
B (min)	0.479 4	2	0.239 7	33.665 8	0.0288 5
C (°C)	0.014 2	2	0.007 1	1.000 0	0.5000 0
D (g/mL)	0.121 9	2	0.061 0	8.560 8	0.1045 9
误差	0.014 2	2	0.007 1		

表 4 验证试验结果
Tab. 4 Results of verification test

试验号	芦丁提取率 (%)	异槲皮苷提取率 (%)	山奈酚 3-O-β-D-半乳糖苷提取率 (%)	紫云英苷提取率 (%)	总提取率 (%)
1	0.495	0.842	0.985	0.688	3.010
2	0.435	0.875	0.998	0.627	2.935
3	0.501	0.844	0.973	0.658	2.976
4	0.483	0.892	0.981	0.649	3.005
5	0.479	0.886	0.973	0.652	2.990

- 草[M]. 第6卷. 上海:上海科学技术出版社,1999: 96-98.
- [2] 邹海艳,屠鹏飞. 珍珠菜黄酮类化合物的研究[J]. 中国天然药物,2004,2(1):59-61.
- [3] 任风芝,郝建坤,屈会化,等. 珍珠菜脂溶性部位的化学成分研究[J]. 解放军药学报,2001,17(4):178-180.
- [4] KITAGAWA I, MATASTUDA A, YOSIKA I. Saponin and Sapogenol. VII. Sapogenol Constituents of Five Primulaceous Plants [J]. Chem Pharm Bull,1972,20(10):226-2230.
- [5] 黄荣华,唐丽华,游本刚,等. 珍珠菜抗肿瘤有效成分的提取工艺优选 [J]. 中国野生植物资源,2009,28(2):58-60.
- [6] 黄荣华,唐丽华,游本刚,等. 正交试验法优化珍珠菜中总皂苷提取工艺 [J]. 抗感染药学,2007,4(4):158-161.
- [7] 唐丽华,游本刚,刘扬. 正交试验设计优化树脂对珍珠菜总黄酮的吸附条件 [J]. 抗感染药学,2006,3(3):102-104.
- [8] 丁林芬,郭亚东,吴兴德,等. HPLC法同时测定珍珠菜中4种黄酮类成分的含量 [J]. 药物分析杂志,2010,30(5):823-826.

(2012-07-05 收稿)