

## · 论著 ·

## 正交试验法优选葛花异黄酮的提取工艺

王金凤, 赵楠, 魏颖, 杨翠燕, 王芳, 刘丹(解放军208医院, 吉林长春130062)

**[摘要]** 目的 优选葛花异黄酮的提取工艺。方法 乙醇回流提取葛花异黄酮, 采用紫外分光光度(UV)法和高效液相色谱(HPLC)法测定葛花中总黄酮及鸢尾苷、鸢尾苷元含量。在对乙醇浓度、溶剂用量、提取时间等进行单因素考察基础上, 选用 $L_9(3^4)$ 正交设计试验优选提取工艺。结果 葛花异黄酮的最佳提取工艺为第1次加入12倍量70%乙醇提取90 min, 第2次加入10倍量70%乙醇提取60 min。结论 优选的葛花异黄酮提取工艺合理可行, 能为实际生产提供参考。

**[关键词]** 葛花; 鸢尾苷; 鸢尾苷元; 提取工艺; 正交试验

**[中图分类号]** R284.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2015)04-0338-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.04.013

## Optimized extraction technology of flos *Puerariae lobata* isoflavone using orthogonal test

WANG Jinfeng, ZHAO Nan, WEI Ying, YANG Cuiyan, WANG Fang, LIU Dan (No. 208 Hospital of PLA, Changchun 130062, China)

**[Abstract]** **Objective** To optimize the extraction technology of flos *Puerariae lobata* isoflavone. **Methods** The flos *Puerariae lobata* isoflavone was distilled by ethanol circumfluence. Total flavonoids, tectoridin and tectorigenin extracted from *Puerariae* using the UV and HPLC spectrometry methods were taken as evaluation indexes. Extraction technology was optimized with  $L_9(3^4)$  orthogonal test on the base of single observation of ethanol concentration, solvent dosage and distilling time. **Results** The best extraction technology of flos *Puerariae lobata* isoflavone was: to add 12 times the amount of 70% ethanol for 90 minutes for the first time, and 10 times the amount of 70% ethanol for 60 minutes for the second time. **Conclusion** The optimized extraction process of flos *Puerariae lobata* isoflavone is reasonable and feasible, and it can offer reference to actual production.

**[Key words]** flos *Puerariae lobata*; tectoridin; tectorigenin; extract technology; orthogonal test

葛花是豆科植物葛根 *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi 的干燥花蕾。《神农本草经》记载葛花主要用于解酒醒脾, 治伤酒发热烦渴、不思饮食、呕呃吐酸、吐血和肠风下血等, 是最具代表性的解酒药物。现代药学研究发现, 葛花中含有13种异黄酮<sup>[1]</sup>, 鸢尾苷和鸢尾苷元为其主要成分<sup>[2]</sup>。口服鸢尾苷经肠道细菌作用转化为鸢尾苷元而具有生物活性。鸢尾苷元具有保肝、降血糖、降血脂、抗炎、抗过敏和防治糖尿病并发症等多种生物活性<sup>[3-6]</sup>。本实验采用乙醇回流提取的方法, 在单因素考察基础上, 通过正交试验法优选葛花异黄酮提取工艺, 为其开发应用奠定基础。

### 1 仪器与试剂

葛花药材: 2012年6月下旬采于吉林省临江市, 取花蕾、花及其顶生20 cm以内的茎叶, 自然阴干后, 粉碎至60目。鸢尾苷、鸢尾苷元对照品(实验室自制20050817、20051208, 纯度>99.0%)。乙醇等化学试剂均为分析纯, 北京化工厂生产。水为重蒸水。旋转蒸发器(上海申生科技有限公司), SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂), UV-3200S紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司), CP225D电子天平(德国赛多利斯股份公司)。

### 2 方法与结果

#### 2.1 紫外分光光度法检测葛花异黄酮

**2.1.1 溶液的制备** 对照品溶液: 精密称取鸢尾苷对照品4 mg, 用70%乙醇定容于10 ml容量瓶中,

**[基金项目]** 吉林省科技发展计划项目(20090919, 20130101145JC)

**[作者简介]** 王金凤, 主任医师, 研究方向: 心血管疾病的新药研发。  
E-mail: 13944927368@139.com

摇匀,即得0.4 mg/ml 鸢尾苷对照品储备液。精密量取鸢尾苷对照品储备液3 ml,用70%乙醇定容于50 ml容量瓶中,摇匀,得24 μg/ml 鸢尾苷对照品溶液。

供试品溶液:取干燥的葛花粗粉10 g,按照不同方法提取,冷却后70%乙醇定容于200 ml量瓶中,摇匀。精密量取0.5 ml,用70%乙醇定容于10 ml容量瓶中,摇匀。再精密量取0.5 ml置于10 ml容量瓶中,加70%乙醇稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

**2.1.2 标准曲线的确立** 测定波长的选择:取鸢尾苷对照品溶液3 ml,以70%乙醇为空白对照,在波长200~400 nm处进行扫描,结果在264 nm处有最大吸收,因此将测定波长确定为264 nm。

标准曲线的绘制:精密称取鸢尾苷对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、5.0和10.0 ml,置于10 ml容量瓶中,加70%乙醇定容,在264 nm处测定吸光度。以对照品溶液浓度( $X$ )为横坐标,吸光度( $Y$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程: $Y=0.0818X+0.0152$ , $r=0.9999$ ,表明鸢尾苷在1.20~24.0 μg/ml范围内线性关系良好。

**2.1.3 精密度实验** 精密量取鸢尾苷对照品溶液3 ml,加70%乙醇定容至10 ml。以70%乙醇为空白对照,在264 nm处连续测定5次,测得吸光度的相对偏差(RSD)为0.11%。表明仪器精密度良好。

**2.1.4 稳定性实验** 取同一供试品溶液,室温下放置,分别于0、2、4、6、8、24 h,测定其吸光度。RSD=0.46%,表明样品溶液在24 h内稳定。

**2.1.5 重复性考察** 取同一次定容后提取液5份,按供试品溶液制备方法制备,依次测定吸光度。RSD=1.87%,表明该方法重复性较好。

**2.1.6 加样回收率实验** 精密称取已知异黄酮含量的葛花提取液9份,分别加入不同体积的鸢尾苷对照品溶液,加70%乙醇定容至10 ml,摇匀,以70%乙醇为空白对照,在264 nm处测定吸光度。代入标准曲线求得总黄酮含量,计算回收率,结果见表1。

表1 加样回收率实验结果

取样量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
68.64	12.00	70.88	100.34		
68.64	12.00	69.85	98.88		
68.64	12.00	72.02	101.95		
68.64	24.00	94.23	101.72		
68.64	24.00	92.38	99.72	99.98	1.27
68.64	24.00	92.46	99.81		
68.64	36.00	103.21	98.63		
68.64	36.00	102.97	98.40		
68.64	36.00	105.01	100.35		

**2.2 HPLC法检测葛花异黄酮** 按照本实验室建立的方法<sup>[7]</sup>,色谱条件:美国Agilent C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相:甲醇-乙腈-水(2:1:2),流速1.0 ml/min;检测波长264 nm,柱温为室温。回归方程分别为 $Y=44122X+5039.1$ 和 $Y=61603X-6210.4$ , $r=0.9998$ 和 $r=0.9999$ 。鸢尾苷、鸢尾苷元分别在2.0~120.0 μg/ml、0.8~80.0 μg/ml范围内呈线性关系,代入标准曲线求供试品溶液中的鸢尾苷和鸢尾苷元含量,将鸢尾苷按等摩尔浓度换算成苷元含量,计算总鸢尾苷元含量。即供试品中总鸢尾苷元含量(mg)=鸢尾苷含量(mg)÷鸢尾苷相对分子质量(462)×鸢尾苷元分子量(300)。对照品及供试品色谱图见图1。

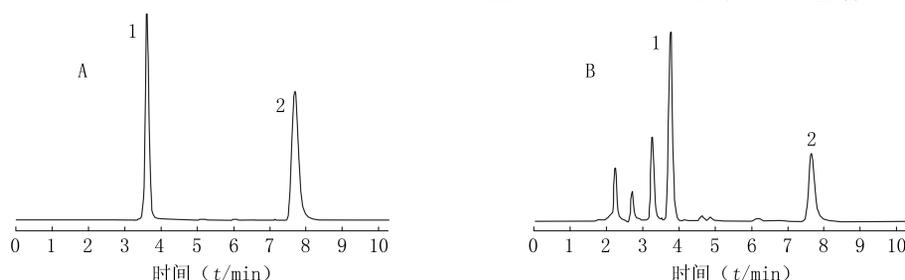


图1 对照品及供试品 HPLC 色谱图

A. 预混对照品; B. 葛花乙醇提取液; 1. 鸢尾苷; 2. 鸢尾苷元

**2.3 提取工艺优选**

**2.3.1 单因素实验** 提取次数的考察:精密称定干燥葛花粗粉10 g,加入14倍量70%乙醇(V/W),回流提取3次,每次1 h。按供试品溶液制备项下操

作,测定吸光度。结果第1次70%乙醇回流提取,可提取异黄酮总量的77.9%,第2次提取14.2%,第3次仅有7.8%。2次提取可达90%以上,因此正交试验设定为提取2次。

溶媒浓度的考察:取干燥葛花粗粉 5 份,每份 10 g,精密称定,分别加入 14 倍量 50%、60%、70%、80%、90% 乙醇,回流提取 1 次,每次提取时间 1 h。按供试品溶液制备项下操作,测定吸光度。结果发现从 50%~70% 乙醇提取异黄酮总量随乙醇浓度的增加而增加,80%、90% 乙醇提取量并未增加,得出 70% 乙醇的提取效果最好,因此选择 60%、70%、80% 作为正交试验的考察因素,进一步考察其对提取效果的影响。

提取时间的考察:取干燥葛花粗粉 5 份,每份 10 g,精密称定,加入 14 倍量 70% 乙醇,分别回流提取 30、50、60、90、120 min。按供试品溶液制备项下操作,测定吸光度。结果显示,从 30~120 min 提取量逐渐上升,因此选择 30、60、90 和 120 min 作为正交试验的考察因素,进一步考察其对提取效果的影响。

溶媒用量的考察:取干燥葛花粗粉 5 份,每份 10 g,精密称定,分别加入 8、12、14、16、20 倍量 70% 乙醇,回流提取 60 min。按供试品溶液制备项下操作,测定吸光度。结果发现,从 8~14 倍量溶媒提取

异黄酮总量随溶媒用量的增加逐渐上升,以 14 倍量提取效果最佳。但溶媒用量进一步增加,提取量并未随之增加,因此选择 10、12、14 倍量作为正交试验的考察因素,进一步考察对提取效果的影响。

**2.3.2 正交试验设计与结果分析** 根据单因素实验,选择乙醇浓度(A)、提取时间(B)、溶媒用量(C)为考察因素,以 HPLC 法检测鸢尾苷和鸢尾苷元含量为指标,优选回流提取工艺,采用  $L_9(3^4)$  正交设计表进行实验。因素水平见表 2,正交试验结果见表 3。

表 2 乙醇回流提取葛花异黄酮因素水平

水平	A 因素 乙醇浓度 (%)	B 因素 提取时间 (t/min)	C 因素 溶媒用量 (倍)
1	60	60、30	10、8
2	70	90、60	12、10
3	80	120、90	14、12

注:溶媒用量(10、8)指第 1 次、第 2 次回流分别加入乙醇的用量;提取时间(60、30)指第 1 次、第 2 次回流分别提取的时间

表 3 乙醇提取葛花异黄酮正交试验安排及结果

实验号(No.)	A	B	C	D	鸢尾苷(mg/g)	鸢尾苷元(mg/g)	苷元总量(mg/g)
1	1	1	1	1	31.38	1.72	22.10
2	1	2	2	2	28.93	5.35	24.14
3	1	3	3	3	33.46	5.35	27.08
4	2	1	2	3	34.70	6.35	28.88
5	2	2	3	1	40.85	6.72	33.25
6	2	3	1	2	34.50	6.76	29.16
7	3	1	3	2	31.66	4.89	25.45
8	3	2	1	3	31.72	5.25	25.84
9	3	3	2	1	31.42	4.39	24.79
$K_1$	24.44	25.48	257.003	26.71			
$K_2$	30.43	27.74	259.370	26.25		G=240.69	
$K_3$	25.36	27.01	285.930	27.27		CT=6 524.35	
R	5.99	2.27	28.927	1.02			

表 4 方差分析

变异来源	SS	f	MS	F	P
A	62.43	2	31.22	40.02	<0.05
B	8.03	2	4.01	5.15	>0.05
C	15.48	2	7.74	9.93	>0.05
误差	1.55	2	0.78		

注:  $F_{0.05(2,2)} = 19.00$

根据极差 R 分析结果得知,对总黄酮提取率影响的主要因素顺序为:A>C>B,即乙醇浓度>溶媒用量>提取时间,把 D(空白)作为误差列进行分

析。由表 4 方差分析结果可知,A 因素对提取效果的影响有显著意义( $P<0.05$ ),而 B 因素和 C 因素在经过单因素实验后,无显著意义。考虑到实际生产过程中,减少溶媒用量有利于节约资源、降低成本。因此, $A_2B_2C_2$  可作为最佳提取工艺,即第 1 次加入 12 倍量 70% 乙醇提取 90 min,第 2 次加入 10 倍量 70% 乙醇提取 60 min。

**2.3.3 工艺验证实验** 为进一步验证正交试验结果,取葛花粗粉 250 g,加入 70% 乙醇 3 000 ml 回流提取 90 min,滤过,收集滤液。残渣加入 70% 乙醇

(下转第 369 页)

人工气道的患者,应考虑对病原菌全覆盖治疗。该患者使用了呼吸机,前阶段的病情是有感染症状,使用了抗鲍曼不动杆菌的药物;5月9日,患者经过足疗程的抗感染治疗,感染症状消失,虽然仍有鲍曼不动杆菌的检出,可以考虑为定植菌,停止抗感染治疗。

## 5 结论

**5.1 抗菌药物药学监护** 患者使用的抗菌药物有:4月14日,头孢替安3g 静滴一剂;4月15—24日:哌拉西林钠-他唑巴坦钠4.5g,q8h 静滴;4月19—24日:奥硝唑0.5g,q12h 静滴;4月25日—5月8日:帕尼培南倍他米隆1g,q12h 静滴+阿米卡星0.6g,qd 静滴。对该患者使用抗菌药物的监护,临床药师需要注意:①关注感染状况,正确制订抗菌药物使用的疗程,预防空腔真菌、假膜性肠炎等二重感染;②患者使用了氨基糖苷类抗菌药,应严密关注患者的肾功能和听力;③患者有脑梗死病史,在使用帕尼培南倍他米隆时,应关注患者的神经精神状况;④使用奥硝唑的过程中,注意滴注时间应不少于30min,该药可能会引起口腔异味,这是此类药物的

常见不良反应。

**5.2 临床药师参与临床治疗的体会** 这是1例入住ICU的鲍曼不动杆菌感染的患者,最终得到了成功治疗。通过医生与药师的良好配合,制订安全、有效的治疗方案,取得了良好的治疗效果。临床药师通过文献与指南的学习,从药物安全与有效性的角度为临床提出合理的用药建议并做好药学监护,密切关注患者用药情况,及时建议调整用药方案,帮助患者康复。

## 【参考文献】

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013版)[J].中国结核和呼吸杂志,2013,36:255-264.
- [2] Gilbert DN.The Sanford guide to antimicrobial therapy [M].42th ed.Sperryville:Antimicrobial Therapy Press,2013.
- [3] 陈佰义,何礼贤,胡必杰,等.中国鲍曼不动杆菌感染诊疗与防控专家共识[J].中国医药科学杂志,2012,2(8):3-8.
- [4] Nature Publishing Group.Nature Rev Microbiol[J].2007,5:939-951.

[收稿日期] 2014-06-06 [修回日期] 2014-11-18

[本文编辑] 李睿旻

(上接第340页)

2500ml回流提取60min,滤过,收集滤液。合并两次滤液,测定体积后按“2.1.1”项下操作,按上述色谱条件测定鸢尾苷和鸢尾苷元的含量,重复5次。结果见表5。结果表明,在最佳提取条件下提取的鸢尾苷和鸢尾苷元含量高且均较稳定。

表5 最佳提取工艺验证

实验号 (No.)	生药量 (g)	鸢尾苷 (mg/g)	鸢尾苷元 (mg/g)	总苷元 (mg/g)
1	250	41.51	6.72	33.67
2	250	42.16	6.44	33.82
3	250	41.62	6.82	33.85
4	250	41.20	6.29	33.04
5	250	39.01	6.69	32.02
平均提取量(mg/g)	41.10	6.59	33.28	
RSD(%)	2.96	3.35	2.33	

## 3 讨论

本实验通过正交设计法优选出葛花的最佳提取工艺为乙醇浓度、乙醇用量、提取时间。按最佳提取条件进行5次平行的验证实验,稳定性较理想,适合于工业生产,且该工艺操作简单,有效成分含量较

高,提取工艺合理可行。

## 【参考文献】

- [1] 尹俊亭,仲英,孙敬勇,等.葛花的研究进展[J].中草药,2005,36(12):1905-1906.
- [2] Park EK,Shin YW,Lee HU,et al.Passive cutaneous anaphylaxis-inhibitory action of tectorigenin,a metabolite of tectoridin by intestinal microflora[J].Biol Pharm Bull,2004,27(7):1099-1102.
- [3] Lee HW,Choo MK,Bae EA,et al.Beta-glucuronidase inhibitor tectorigenin isolated from the flower of *Pueraria thunbergiana* protects carbon tetrachloride-induced liver injury[J].Liver Int,2003,23(4):221-226.
- [4] Lee HU,Bae EA, Kim DH.Hepatoprotective effect of tectoridin and tectorigenin on tert-butyl hydroperoxide-induced liver injury[J].J Pharmacol Sci,2005,97:541-544.
- [5] Moon HI,Jung JC,Lee HK.Aldose reductase inhibitory effect by tectorigenin derivatives from *Viola hondoensis*[J].Biorg Med Chem,2006,14(22):7592-7594.
- [6] 王金凤,杨翠燕,张艳萍,等.鸢尾苷对高脂血症大鼠血清脂质的影响[J].基础医学与临床,2010,30(9):925-929.
- [7] 赵楠,刘丹,王艳萍,等.HPLC法测定葛花中鸢尾苷和鸢尾苷元含量[J].药学实践杂志,2012,30(3):226-228.

[收稿日期] 2013-09-29 [修回日期] 2014-04-15

[本文编辑] 李睿旻