

正交试验法优选黄芪中总黄酮提取工艺^{*}

赵琦¹，张军武^{2△}

(1. 咸阳市卫生学校，陕西咸阳 712000；2. 陕西中医学院，陕西咸阳 712046)

〔摘 要〕目的：优选黄芪总黄酮的提取工艺条件。方法：采用正交试验法对黄芪总黄酮提取工艺条件进行优选，以总提物和总黄酮含量为指标，考察影响提取指标的 4 个因素，即溶媒用量（A），乙醇浓度（B），提取时间（C），提取次数（D）；每个因素取 3 个水平。结果：用乙醇提取黄芪总黄酮的最佳工艺为 A₂B₂C₁D₂，即用 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次，每次 60min。结论：此法稳定可行，可为黄芪总黄酮提取工艺的确定提供依据。

〔关键词〕正交试验法；黄芪；总黄酮；提取工艺
中图分类号：R284·2 文献标志码：A 文章编号：1000—2723(2012)01—0027—03

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根^[1]。黄芪的化学成分复杂^[2]，包括皂苷类、多糖类、黄酮类以及各种氨基酸、微量元素、生物碱类、有机酸类等。实验研究表明^[3]，黄芪总黄酮能明显降低血浆胆固醇浓度和主动脉壁中胆固醇的沉积，缩小动脉粥样硬化斑块面积和降低内膜/中膜比率。黄芪临床应用广泛，有效部位及药理作用明确，已经证实黄芪总皂苷和总黄酮是黄芪功效的主要物质基础和有效部位，具有强心、改善心脏功能、保护心肌、减轻心肌缺血等明确的心血管药理作用，可用于心血管疾病的治疗。本文用正交试验设计优选黄芪总黄酮的提取工艺，以期为其深层次开发提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UV1102 型紫外/可见分光光度计（上海天美科学仪器有限公司）；FA1004N 电子分析天平（上海天平厂）；ZK-82A 型真空干燥箱（上海实验仪器厂）；GKC-11-CR2 型电热恒温水浴锅（上海金桥科析仪器厂）；KQ3200DB 型数控超声波清洗

器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 材料

2 年生黄芪采集于陕西省旬邑县黄芪 GAP 基地，经陕西中医学院生药教研室鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao；芦丁对照品购自中国药品生物制品检定所（批号：0080-9705）；亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等所用试剂均为分析纯；聚酰胺，安徽皖西硅源材料厂。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计

结合文献资料^[4]及大生产实际情况，对影响提取的主要因素溶媒用量（A），乙醇浓度（B），提取时间（C），提取次数（D）采用 L₉（3⁴）正交试验进行考察，以黄芪有效部位总黄酮及总提取物含量为考察指标，确定因素水平，方案设计见表 1。

2.2 总提取物的测定

称取黄芪粗粉 10g，共 9 份，分别置 500mL 烧瓶中，加入 95% 乙醇 200mL，摇匀，加热回流 1h，放冷至室温，滤过，滤液浓缩至适量，将得到的浓缩液定容至 250mL 容量瓶中，备用。将 1~9 号提

^{*} 基金项目：陕西省中药制药学重点学科资助项目
收稿日期：2011—08—29 修回日期：2011—09—30
作者简介：赵琦（1978~），女，河南偃师人，讲师，研究方向为中药抗衰老机理及新药研究。△通讯作者：张军武，E-mail: zjw19982005@163.com.

表 1 因素水平的设计

水平	因素			
	A	B	C	D
1	8	50	60	1
2	10	70	90	2
3	12	95	120	3

注：A：乙醇用量（倍）B：乙醇浓度（%）C：提取时间（min）D：提取次数

取物分别浓缩后定容于 100mL 量瓶中，摇匀、分别精密量取 25mL，置于在 105 ~ 110℃ 条件下干燥至恒重的蒸发器中，烘干至恒重，计算出总提取物（%），结果见表 2。

2.3 总黄酮含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备

精密称取在 105 ~ 110℃ 干燥至恒重的芦丁对照品 10.5mg，加 95% 乙醇定容于 25mL 容量瓶中，得到浓度为 0.42mg/mL 的溶液作为对照品溶液。

2.3.2 标准曲线的绘制

精密吸取对照品溶液（浓度为：0.42mg/mL）0.0，0.2，0.4，0.6，0.8，1.0mL；分别置于 10mL 容量瓶中，加 5% 亚硝酸钠溶液 0.3mL，放置 6min；再加 10% 硝酸铝溶液 0.3mL，放置 6min；最后加入 4% 氢氧化钠溶液 4mL；分别加 95% 乙醇至刻度，摇匀，放置 15min，置比色皿中，进行 400 ~ 800nm 波长扫描，在 510nm 波长处均有最大吸收。以吸光度 A 为纵坐标，总黄酮含量（ug/mL）为横坐标计算回归方程为： $A = 0.008940476C + 0.3225$ ，相关系数 $r = 0.9983$ ，线性范围：8.4ug/mL ~ 42.0ug/mL。

2.3.3 供试品溶液的制备

照“2.2 总提取物的测定”项下制备供试品溶液，分别精密吸取样品溶液 1mL，共 9 份，分别置 10mL 容量瓶中，照标准曲线下方法操作，测定吸收度，由回归方程求出稀释液中总黄酮浓度，结果见表 2。

从表 2 试验结果可以看出，以总提取物及总黄酮含量为考察指标，综合分析各因素及水平得到醇提条件应为 A₂B₂C₁D₂，考虑到大生产实际情况，所以很有必要对各因素水平的显著性进行方差分析，结果见表 3，表 4。

表 2 正交试验含量测定结果

试验号	试验方案				考察指标	
	乙醇用量/倍	乙醇浓度/%	提取时间/min	提取次数	总提取物/%	总黄酮含量/mg · g ⁻¹
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	18.91	5.11
2	1	2	2	2	19.53	5.27
3	1	3	3	3	12.72	4.05
4	2	1	2	3	17.38	3.81
5	2	2	3	1	21.24	5.19
6	2	3	1	2	22.36	5.07
7	3	1	3	2	16.02	3.34
8	3	2	1	3	24.47	5.40
9	3	3	2	1	15.81	3.25
K1	51.16	52.31	65.74	55.96	G = 168.44	
总提取物 %	K2	60.98	65.24	52.72	57.91	CT = 3152.45
	K3	56.30	50.89	49.98	54.57	
	R	9.82	14.35	15.7	63.34	
	SS _j	16.08	41.68	47.27	1.87	
总黄酮含量	K1	14.43	12.26	15.58	13.55	G = 40.49
	K2	14.07	15.86	12.33	13.68	
	K3	11.99	12.37	12.58	13.26	
	R	2.44	3.60	3.25	0.42	
	SS _j	1.16	2.79	2.18	0.03	

从表 3 方差分析结果表明，因素 B、C 对总提取物均有显著性影响，因素 A 和 D 几乎无影响。从表 4 方差分析结果表明，因素 A、B、C 对总黄酮含量均有显著性影响，因素 D 几乎无影响；结合表 2 的直观分析，其优选工艺为：A₂B₂C₁D₂，考虑到黄芪提取物中总黄酮指标的重要性，确定其工艺为：A₂B₂C₁D₂，即用 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次，每次 60min。

表 3 总提取物含量方差分析

方差来源	离均差平方和/SS _j	自由度 /f	均方 /MS	F 值	P *
总变异		8			
A	16. 08	2	8. 04	8. 55	>0. 05
B	41. 68	2	20. 84	22. 17	<0. 05
C	47. 27	2	23. 64	25. 15	<0. 05
D	1. 87	2	0. 94		
误差(e = D)					

* F_{0.05}(2,2) = 19. 00

表 4 总黄酮含量方差分析

方差来源	离均差平方和/SS _j	自由度 /f	均方 /MS	F 值	P *
总变异		8			
A	1. 16	2	0. 58	29. 00	<0. 05
B	2. 79	2	1. 40	70. 00	<0. 05
C	2. 18	2	1. 09	54. 50	<0. 05
D	0. 03	2	0. 02		
误差(e = D)					

* F_{0.05}(2,2) = 19. 00

3 结论

采用正交设计法优选出提取黄芪总黄酮的最佳工艺,试验证明:黄芪总黄酮醇提取的最佳工艺为用 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 60min。此工艺较为符合大生产实际情况,故可以进一步推广、应用并改进,为黄芪的深层次开发利用提供科学依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.

[2] 齐宗韶. 黄芪化学成分的研究概况[J]. 中草药,1987,18(5):41.

[3] 汪德清,丁保国,Tomas G Neil,等. 黄芪总黄酮对动脉粥样硬化早期形成的影响[J]. 中国药理学通报,2003,19(6):637 - 640.

[4] 纪松岗,李翔,姜子洋,等. 正交设计法确定黄芪中黄酮类成分的超声提取条件[J]. 第二军医大学学报,2005,26(10):1168 - 1169.

(编辑:迟 越)

Studing on Extraction Condition of Total Flavonoids
from Radix Astragali by Orthogonal Test Method
ZHAO - Qi¹, ZHANG Jun - Wu²

(1. Health School of Xianyang, Xianyang shanxi 712000, China;
2. Shanxi University of Chinese Medicine, Xianyang shanxi 712046, China)

[ABSTRACT] Objective: Select the best condition for extraction process of total flavonoids from Radix Astragali. Method: Regard the total extract yield and the yield of total flavonoids as indicators, total flavonoids extraction conditions were optimized by using orthogonal test method. Four factors were examined by three levels: the amount of solvent (A), ethanol concentration (B), extraction time (C), extraction frequency (D). Results: The best extraction process of total flavonoids from Radix Astragali by ethanol is A2B2C1D2, that is, it was extracted with 10 times the amount of 70% ethanol two times, 60min every time. Conclusion: The method can provide a stable basis for extraction process of total flavonoids from Radix Astragali.

[KEY WORDS] orthogonal test method; radix Astragali; total flavonoids; extraction process