

# 新疆维药欧芹根总黄酮的乙醇提取工艺优选及其大孔树脂筛选

陈妍<sup>1\*</sup>, 乌莉娅·沙依提<sup>2</sup>, 马亮英<sup>1</sup>

(1. 新疆医科大学第二附属医院药剂科, 乌鲁木齐 830063;

2. 新疆医科大学附属中医医院药学部, 乌鲁木齐 830000)

**[摘要]** 目的: 优选欧芹根总黄酮的提取工艺并筛选适合其富集纯化的大孔树脂型号。方法: 采用UV测定总黄酮含量, 检测波长510 nm。以总黄酮提取率和浸膏得率的综合评分为指标, 通过正交试验考察提取时间、提取次数、乙醇体积分数及乙醇用量对欧芹根总黄酮提取工艺的影响; 采用静态吸附-洗脱试验优选适合富集欧芹根总黄酮的大孔树脂型号。结果: 最佳提取工艺条件为加6倍量70%乙醇提取2次, 每次1 h; 总黄酮提取率和浸膏得率分别约0.75%, 14%。欧芹根总黄酮精制工艺中分离纯化效果最好的大孔吸附树脂为D101型。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 筛选的大孔树脂分离纯化效果良好, 为欧芹根的药物开发提供参考。

**[关键词]** 欧芹根; 总黄酮; 大孔树脂; 芦丁; 浸膏得率; 静态吸附-洗脱试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0019-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150019

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1538.009.html>

**[网络出版时间]** 2014-06-09 15:38

## Optimization of Ethanol Extraction Technology for Total Flavonoids in Roots of *Petroselinum crispum* and Screening of Its Type of Macroporous Resin

CHEN Yan<sup>1\*</sup>, Wuliya · Shayiti<sup>2</sup>, MA Liang-ying<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University,

Urumqi 830063, China; 2. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of

Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

**[收稿日期]** 20131122(018)

**[基金项目]** 新疆维吾尔自治区高校科研计划青年教师科研启动基金项目(XJEDU2009S48)

**[通讯作者]** \* 陈妍, 硕士, 主管中药师, 从事中维药的开发利用及维药物质基础研究, Tel:13201380316, E-mail:chenyan5711@sina.com

- [2] 姚金凤, 郭晨阳, 杨红, 等. 壳聚糖纳米粒在药物输送中的应用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(1):90.
- [3] 赵静, 曾建国, 邹剑锋, 等. 黄芩苷-血根碱离子对壳聚糖纳米粒的制备及表征[J]. 中草药, 2012, 43(4):676.
- [4] 何黎黎, 邓黎, 林芸竹. 红景天苷壳聚糖纳米粒的制备及其体外释放性能研究[J]. 中草药, 2013, 44(5):552.
- [5] Trapani A, Sitterberg J, Bakowsky U, et al. The potential of glycol chitosan nanoparticles as carrier for low water soluble drugs[J]. Int J Pharm, 2009, 375(1/2):97.
- [6] Lee Y S, Lowe J P, Gilby E, et al. The initial release of cisplatin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres[J]. Int J Pharm, 2010, 383(1/2):244.
- [7] 欧水平, 王森, 杨明, 等. 黄芩苷溶解性能的测定与表征[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(20):3954.
- [8] Garcia-Fuentes M, Alonso M J. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? [J]. J Control Release, 2012, 161(2):496.

[责任编辑 刘德文]

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total flavonoids in roots of *Petroselinum crispum* and screen type of macroporous resin which appropriated to its enrichment and purification. **Method:** UV was adopted to determine the content of total flavonoids with detection wavelength at 510 nm. With composite score of yields of total flavonoids and extract as index, orthogonal test was used to optimize extraction process by taking ethanol concentration, ratio of solid to liquid, extracting time and times as factors; the best type of macroporous resin was selected by static adsorption-elution test. **Result:** Optimum extraction process was as following: extracted twice with six times the amount of 70% ethanol for one hour per time; yields of total flavonoids and extract were 0.75% and 14%, respectively. D101 macroporous resin was the best one for purifying total flavonoids in roots of *P. crispum*. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible, this screened resin had good separation and purification effect, this study could provide a reference for drug development of roots of *P. crispum*.

[Key words] roots of *Petroselinum crispum*; total flavonoids; macroporous resin; rutin; extract yield; static adsorption-elution test

新疆维药欧芹根被临床广泛用于治疗肝脏疾病,具有独特的资源及品种优势,但并未得到合理地开发应用,其临床用药亦缺乏实验依据,除本课题组外,尚未见关于该药物的研究报道。前期试验发现该药的有效成分为总黄酮,故本实验以总黄酮提取率和浸膏得率的综合评分为指标,采用正交试验优选新疆维药欧芹根的提取工艺,并通过静态吸附-洗脱试验筛选适合富集欧芹根总黄酮的大孔树脂型号,为该药味的资源开发与临床推广提供参考。

## 1 材料

JD200-3 型电子天平(沈阳龙腾电子有限公司),TU-1901 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用公司)。欧芹根购自新疆乌市二道桥市场洛克曼维吾尔医药行,经新疆维吾尔自治区药物研究所张彦福教授鉴定为伞形科植物欧芹 *Petroselinum crispum* (Mill) Hill 的干燥根;AB-8, D4020, D140, X-5 型大孔树脂(天津南开大学化工厂),D101 型大孔树脂(天津光复研究所),100,450,700 型大孔树脂(河北沧州宝恩集团)。芦丁对照品(批号 20100402,中国食品药品检定研究院),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 总黄酮的含量测定

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取干燥至恒重的芦丁对照品 11.4 mg,置于 50 mL 量瓶中,加适量无水乙醇溶解,加 85% 乙醇定容至刻度,即得。

**2.1.2 标准曲线绘制** 精密移取芦丁对照品溶液 0,0.2,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,各加入 5% 亚硝酸钠和 1% 硝酸铝溶液各 0.3 mL,放置 6 min,加入 4% NaOH 溶液 4.0 mL,用

30% 乙醇定容至刻度,混匀,放置 16 min,以相应试剂为空白,于 510 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程  $A = 0.0099C + 0.0425$  ( $r = 0.995$ ),线性范围 4.56 ~ 91.2 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.1.3 供试品溶液的制备与测定** 取提取液过滤,弃去初滤液,取续滤液作为供试品溶液。精密吸取 3 mL 置于 25 mL 量瓶中,按 2.1.2 项下方法于 510 nm 处测定 A,计算总黄酮含量。

**2.2 浸膏得率测定** 精密吸取样品液 50 mL,置于干燥至恒重并称重的蒸发皿中,水浴蒸干,105 °C 烘箱干燥 3 h 至恒重,取出,迅速置干燥器中冷却,称重,重复 3 次,计算醇浸出物量。

**2.3 提取工艺优选** 在预试验基础上,选择乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数为考察因素,以总黄酮提取率及浸膏得率的综合评分为指标,综合评分 = (0.7/总黄酮提取率最大值) × 总黄酮提取率 + (0.3/浸膏得率最大值) × 浸膏得率<sup>[1-2]</sup>,通过 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验优选提取工艺,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 欧芹根总黄酮提取工艺正交试验因素水平

	A	B	C	D
水平	乙醇体积 分数/%	乙醇用量 /倍	提取时间 /h	提取数 /次
1	50	5	1.0	1
2	70	6	1.5	2
3	90	7	2.0	3

由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 A > B > D > C。方差分析表明因素 A 对提取工艺具有显著性影响,其他因素则无显著性影响,结合

表2 欧芹根总黄酮提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D	总黄酮 提取率 /%	浸膏 得率 /%	综合 评分
1	1	1	1	1	0.460	14.36	0.697
2	1	2	2	2	0.625	13.98	0.844
3	1	3	3	3	0.600	13.87	0.819
4	2	1	2	3	0.719	16.07	0.971
5	2	2	3	1	0.750	14.08	0.963
6	2	3	1	2	0.680	14.19	0.900
7	3	1	3	2	0.525	11.09	0.697
8	3	2	1	3	0.651	12.37	0.840
9	3	3	2	1	0.545	11.06	0.715
$K_1$	0.787	0.788	0.812	0.792			
$K_2$	0.945	0.882	0.843	0.814			
$K_3$	0.751	0.811	0.826	0.877			
R	0.194	0.094	0.031	0.085			

表3 综合评分方差分析

变异来源	SS	f	MS	F	P
A	0.064	2	0.032	64.00	<0.05
B	0.014	2	0.007	14.00	>0.05
C	0.004	2	0.002	4.00	>0.05
D	0.012	2	0.006	12.00	>0.05
E(误差)	0.001	9	0.000 1		

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

生产成本考虑,确定最佳提取工艺为  $A_2B_2C_1D_2$ ,按优选的工艺进行3次验证试验,结果总黄酮提取率与浸膏得率与正交试验试验相接近,故确定欧芹根总黄酮最佳提取工艺条件为加6倍量70%乙醇提取2次,每次1h。

**2.4 大孔吸附树脂型号的筛选** 取8种(D4020, X-5, D101, AB-8, 100, 450, 700, D140型)预处理好的大孔树脂各1g,分别加入欧芹根提取液30mL,

置全温振荡培养箱中振摇18h,转速  $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,分别精密吸取3mL置于25mL量瓶中,按2.1.2项下方法于510nm处测定A,计算各树脂对欧芹根总黄酮的吸附量分别为0.445,0.270,0.496,0.337,0.475,0.380,0.480,0.410  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。将静态吸附的各大孔树脂过滤抽干,加一定量水洗涤以清洗吸附在瓶壁上极性小的苷元,加入70%乙醇50mL洗脱,洗脱时间不可过长,约2h,将树脂从摇床中取出,按2.1.2项下方法于510nm处测定A,计算各树脂对欧芹根总黄酮的洗脱量<sup>[3,4]</sup>依次为0.250,0.245,0.430,0.155,0.182,0.180,0.220,0.176  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,结果发现D101型大孔树脂的吸附量和洗脱量均为最大,故选择D101型树脂。

### 3 讨论

欧芹根作为新疆维药已在维医临床应用已久,但缺乏实验依据,致使其在临床推广使用时受到极大限制,课题组前期已初步确定其有效成分为黄酮类成分,故选择芦丁为指标成分。通过正交试验优选欧芹根的提取工艺,为减少提取物中杂志的含量,选择总黄酮吸附量和洗脱量为指标,通过单因素试验筛选分离纯化效果最好的大孔吸附树脂,采用的试剂均无毒且成本较低,适用于工业化大生产,可为欧芹根总黄酮的新药研发提供参考。

### [参考文献]

- [1] 杨俊,蒋惠娣,徐娟华. 杭白菊总黄酮的提取工艺及其含量的动态变化研究[J]. 中草药,2002,33(11):988.
- [2] 王筱亮,张玉杰,陈明霞,等. 多指标正交试验优选酸枣仁最佳提取工艺[J]. 中国中药杂志,2005,30(10):753.
- [3] 张丽梅. 分离纯化野马追总黄酮精制工艺中大孔树脂的筛选方法[J]. 齐鲁药事,2006,25(4):244.
- [4] 谢天亮,杨明. 肝苏缓释胶囊精制工艺中大孔吸附树脂型号的筛选[J]. 华西药理学杂志,2005,20(5):385.

[责任编辑 刘德文]