

# 野菊花超声辅助提取工艺优选

张建海<sup>1</sup>, 徐晓玉<sup>2</sup>, 冯彬彬<sup>1\*</sup>

(1. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120; 2. 西南大学, 重庆 400716)

**[摘要]** 目的: 优选野菊花提取工艺。方法: 以总黄酮、绿原酸和蒙花苷含量为指标, 采用超声辅助及正交试验优选野菊花水提和醇提工艺, 并与常规回流提取进行比较; 采用 UV 测定总黄酮含量, RP-HPLC 测定绿原酸和蒙花苷含量。结果: 综合 3 个指标, 最佳水提工艺为加 15 倍量水提取 2 次, 每次 30 min, 提取温度 75 ℃; 最佳醇提工艺为 15 倍量 80% 乙醇提取 30 min, 提取温度 70 ℃。结论: 采用醇提工艺提取野菊花时, 总黄酮、绿原酸和蒙花苷得率均较高, 可为野菊花综合开发提供实验依据。

**[关键词]** 超声辅助提取; 野菊花; 总黄酮; 绿原酸; 蒙花苷; 正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0021-04

## Optimization of Ultrasound-assisted Extraction Technology for *Chrysanthemum indicum*

ZHANG Jian-hai<sup>1</sup>, XU Xiao-yu<sup>2</sup>, FENG Bin-bin<sup>1\*</sup>

(1. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China;

2. Southwest University, Chongqing 400716, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of *Chrysanthemum indicum*. **Method:** With the content of total flavonoids, chlorogenic acid and linarin as indexes, water extraction and ethanol extraction technology were optimized by ultrasound-assisted and orthogonal test, and compared with conventional reflux extraction; The content of total flavonoids was determined by UV, the content of chlorogenic acid and linarin were

**[收稿日期]** 20120104(017)

**[基金项目]** 重庆市“十一五”规划项目(104290-41000307)

**[第一作者]** 张建海, 硕士, 高级讲师, 从事药用植物种植及有效成分分析研究, Tel:023-58567075, E-mail: zhjh200596@126.com

**[通讯作者]** \* 冯彬彬, 博士, 副教授, 从事中药药理与新药开发研究, Tel:023-58567075, E-mail: fbb200596@126.com

### [参考文献]

- [1] 王秀玲. 泰山珍稀濒危植物资源及保护[J]. 国土与自然资源研究, 2001(1): 79.
- [2] 李文喆, 王勇. 丹参药用成分研究进展[J]. 人民军医, 2008, 51(3): 180.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2010: 70.
- [4] 王文祥, 周巧霞, 蒋木岗, 等. 比色法测定丹参及其提取物水溶性总酚的改进[J]. 中草药, 2001, 32(8): 711.
- [5] 杨光义, 叶方, 雷震, 等. 正交试验设计优选丹参仿生集成提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 40.
- [6] 李绍林, 张建军. 丹参提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 45.
- [7] 黄元红, 卫天喜, 张发生, 等. 星点设计-效应面法优选丹参提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 28.
- [8] 李广胜, 王光新, 赵牛和. 丹参口服液中总酚酸性成分的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(8): 683.
- [9] 徐翠红, 舒志明, 王研, 等. 紫花丹参和白花丹参不同器官主要药用成分积累规律研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2129.
- [10] 汪月珍, 聂万松. 丹参皮质部与木质部有效成分含量比较[J]. 儿科药科学杂志, 2004, 10(4): 18.

[责任编辑 全燕]

determined by RP-HPLC. **Result:** In total of three indexes, optimum water extraction technology was as follows: Adding 15 folds of water and extracting for 2 times, 30 min each time, extraction temperature 75 °C; optimum alcohol extraction process was as follows: extracted 30 min with 15 folds the amount of 80% ethanol, extraction temperature 70 °C. **Conclusion:** Total flavonoids, chlorogenic acid and linarin were relatively high with alcohol extraction technology for *C. indicum*; it could provide experimental basis for comprehensive development and utilization of *C. indicum*.

[ **Key words** ] ultrasonic-assisted extraction; *Chrysanthemum indicum*; total flavonoids; chlorogenic acid; linarin; orthogonal test

野菊花具有清热解毒、疏风平肝之功效,在我国民间药用历史悠久,《中国药典》早有收载。现代药理表明野菊花具有广谱抗菌、抗病毒、增加冠脉血流量、清除氧自由基等作用<sup>[1-2]</sup>。其主要含有黄酮类、挥发油及绿原酸等化合物,由于药源广泛、价格低廉,在药品、食品、保健品及化妆品等多领域具有较高的开发价值<sup>[3]</sup>。目前常用的提取方式存在提取时间长、溶剂用量多、能耗大、生产成本高等缺陷,故探索新的提取技术对提高提取效率有重要意义。本试验对超声辅助回流的方法进行探讨,并采用正交试验法对野菊花水提和醇提工艺进行优选,以确定野菊花最佳提取工艺,为野菊花综合利用提供实验依据。

### 1 材料

LC-20AB 型高效液相色谱仪 (SPD-20 紫外检测器,日本岛津),U-3010 型紫外分光光度计(日本日立),EL-2046 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),HHSYZ1-NI 型电热恒温水浴锅(北京市风仪

器仪表公司),GG328 型摩尔超纯水机(上海摩勒科学仪器有限公司)。

绿原酸、芦丁及蒙花苷等对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110753-200413,100080-200707,111528-200303),野菊花干燥花蕾(重庆桐君阁中药批发有限公司提供,批号 20090418,本品由西南大学植物学教研室王海洋教授鉴定为野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥花蕾),乙腈、甲醇均为色谱纯,水为去离子水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 水提、醇提工艺优选

**2.1.1 正交试验设计** 根据黄酮类、绿原酸和蒙花苷的理化性质及中药材传统提取经验<sup>[4-6]</sup>,确定考察野菊花水提工艺的影响因素为提取水量(A)、提取温度(B)、提取时间(C)、提取次数(D);醇提工艺的影响因素为乙醇体积分数(A)、提取温度(B)、溶剂倍数(C)、提取时间(D)。采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计表,具体因素水平安排见表 1。

表 1 野菊花水提及醇提工艺正交试验因素水平

水平	水提				醇提			
	A 水量 /倍数	B 提取温度 /°C	C 提取时间 /min	D 提取数 /次	A 乙醇体积 分数/%	B 提取 温度/°C	C 溶剂 /倍数	D 提取 时间/min
1	10	65	30	1	60	60	10	30
2	15	75	60	2	70	70	15	60
3	20	85	90	3	80	80	20	90

**2.1.2 超声辅助提取** 取置于干燥器内的野菊花 1 g,精密称定,加入圆底烧瓶中,超声辅助提取 5 min,按表 1 工艺条件分别进行试验。水提滤液和醇提滤液置于蒸发皿上蒸干,即为野菊花的水提物和醇提物。取野菊花水提取物和醇提取物的干浸膏,加 50% 甲醇溶解稀释并定容至 25 mL 量瓶中,过滤,取续滤液 1 mL 加入 10 mL 量瓶,50% 甲醇稀释定容至刻度,即得供试品溶液。

### 2.2 含量测定

**2.2.1 总黄酮** 以芦丁为对照品,采用紫外分光光度法进行测定。用 50% 甲醇溶解并配制成 100 mg·L<sup>-1</sup> 的芦丁对照品储备液。分别精密吸取芦丁对照品溶液适量于 10 mL 量瓶中,各加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.30 mL,摇匀,静置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 0.30 mL,摇匀,静置 6 min,加 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,用水稀释至刻度,摇匀,静置 15 min,分别制成 3.25,6.50,13.00,26.00,34.67,52.00 mg·L<sup>-1</sup> 的芦丁对照品溶液;以 50% 甲醇溶液按上述步骤操作制

得空白对照液,于 512 nm 波长处测吸光度,以芦丁对照品质量浓度为横坐标,吸收度为纵坐标,作线性回归,得回归方程  $Y = 0.0114X + 0.0004$  ( $r = 0.9992$ ),表明总黄酮在 3.25 ~ 52.00 mg·L<sup>-1</sup>与吸光度呈良好线性关系。

**2.2.2 绿原酸** 采用高效液相色谱法进行检测,Platisil ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.2%磷酸(17:83),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25 °C,检测波长 326 nm,进样量 20 μL。用 50% 甲醇溶解并配制质量浓度为 500 mg·L<sup>-1</sup>绿原酸对照储备液,将储备液稀释分别至 6.50,13.00,16.25,32.50,65.00 mg·L<sup>-1</sup>,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程  $Y = 30315X - 130074$ ( $r = 0.9996$ )。

**2.2.3 蒙花苷** 含量测定参照 2010 年版《中国药典》一部野菊花含量测定方法进行,Platisil ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-水-冰醋酸(26:23:1),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25 °C,检测波长 334 nm,进样量 20 μL。用 50% 甲醇溶解并配制质量浓度 100 mg·L<sup>-1</sup>蒙花苷对照品储备液,将

储备液分别稀释至 8.00,16.00,24.00,40.00,64.00 mg·L<sup>-1</sup>的溶液,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得线性方程  $Y = 50627X - 19811$ ( $r = 0.9994$ )。

**2.2.4 样品含量测定** 取 2.1.2 项下的供试品溶液 1 mL 量于 10 mL 量瓶中,按 2.2.1 项下方法进行样品处理并测定,计算样品中总黄酮的含量;按 2.2.2 和 2.2.3 项下 HPLC 进行测定,计算绿原酸与蒙花苷的含量。结果见图 1。

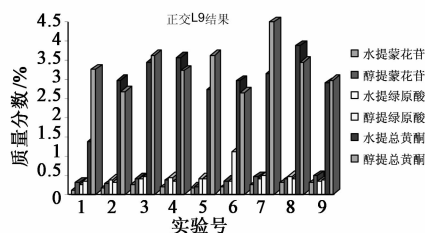


图 1 野菊花水提-醇提工艺正交试验安排

**2.3 统计学处理** 采用 Excel 2003 进行回归分析,SPSS 13.0 统计软件进行方差分析,方差分析中将方差值最小项 C 因素作为误差项,计算各因子列的 F 值,结果见表 2。

表 2 总黄酮含量、绿原酸和蒙花苷含量方差分析

方差来源		SS		f	MS		F		P	
		水提	醇提		水提	醇提	水提	醇提	水提	醇提
总黄酮得率	A	0.770	0.424	2	0.385	0.212	2.58	9.64		
	B	0.407	0.517	2	0.203	0.258	1.36	11.73		
	C	0.299	1.522	2	0.149	0.761	1.00	34.59		<0.05
	D	2.480	0.043	2	1.240	0.022	8.32	1.00		
绿原酸得率	A	0.007	0.099	2	0.003	0.030	3.00	60.00		<0.05
	B	0.006	0.134	2	0.003	0.040	3.00	80.00		<0.05
	C	0.003	0.117	2	0.001	0.0005	1.00	1.00		
	D	0.015	0.139	2	0.008	0.005	8.00	10.00		
蒙花苷得率	A	0.020	0.029	2	0.010	0.0145	20.00	29.00	<0.05	<0.05
	B	0.007	0.023	2	0.0035	0.0125	7.00	23.00		<0.05
	C	0.001	0.001	2	0.0005	0.0005	1.00	1.00		
	D	0.005	0.006	2	0.0025	0.003	5.00	6.00		

在水提工艺过程中,以总黄酮和绿原酸得率为考察指标,由方差和极差分析结果表明,各指标因素的显著性顺序是  $D > A > B > C$ ,因素 D 对试验结果影响最大,因素 A, B, C 对结果影响较小,综合考虑确定最佳提取方案为  $D_2A_1B_1C_1$ 。即加 10 倍量水提取 2 次,提取温度 65 °C,提取时间 30 min;以蒙花苷得率为考察指标,由方差分析表明,各指标因素的显

著性顺序为  $A > B > D > C$ ,因素 A 对结果有显著影响,因素 B, D, C 对结果影响较小,综合考虑确定最佳提取方案为  $A_3B_2D_2C_1$ ,即加 20 倍量水提取 1 次,提取温度 75 °C,提取时间 30 min。综合 3 个成分考察,确定的最佳水提取工艺加 15 倍量水 75 °C 提取 2 次,每次 30 min。

在醇提取工艺过程中,以总黄酮得率为考察指

标,由方差和极差分析结果表明,各指标因素的显著性顺序是  $C > B > A > D$ , 因素  $C$  对结果有显著影响, 因素  $A, B, D$  对结果影响较小, 综合考虑确定最佳提取方案为  $C_3B_2A_2D_1$ , 即 20 倍量 70% 乙醇提取 30 min, 提取温度 70 °C; 以绿原酸和蒙花苷得率为考察指标, 由方差和极差结果分析表明, 绿原酸和蒙花苷各指标因素的显著性顺序分别是  $B > A > D > C$  和  $A > B > D > C$ , 综合考虑确定绿原酸和蒙花苷最佳提取方案为  $A_3B_3D_1C_1$ , 即 10 倍量 80% 乙醇提取 30 min, 提取温度 80 °C。综合 3 个成分考察, 确定的最佳水提取工艺加 15 倍量 80% 乙醇, 70 °C 提取 30 min。

**2.4 验证试验** 为验证上述优选工艺的稳定性, 分别按上述最佳工艺各提取 3 批样品, 测总黄酮、绿原酸和蒙花苷含量。计算得水提取总黄酮、绿原酸及蒙花苷平均含量分别为 30.120, 4.124, 3.105  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 醇提取总黄酮、绿原酸及蒙花苷的平均含量分别为 34.250, 4.952, 4.526  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。3 次结果差异较小, 说明该工艺稳定可行。

### 3 讨论

从检测灵敏度和分离度考虑, 绿原酸和蒙花苷均采用 RP-HPLC 进行检测, 绿原酸流动相筛选由参照文献[7]和预试验最终确定; 蒙花苷含量测定的色谱条件参照 2010 年版《中国药典》一部的办法。

绿原酸受温度影响较大, 过高容易分解, 太低则

会影响提取效率, 故选择 75 °C; 总黄酮同样受温度的影响较大, 故总黄酮的提取温度亦选用 75 °C。蒙花苷醇提比水提含量高, 可能由于蒙花苷在乙醇中的溶解度较大, 不易分解的原因, 故选用乙醇提取蒙花苷合适。

### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:292.
- [2] 吴钉红, 杨立伟, 苏薇薇. 野菊花化学成分及药理研究进展[J]. 中药材, 2004, 27(2):142.
- [3] 高美华, 李华, 张莉, 等. 野菊花化学成分的研究[J]. 中药材, 2008, 31(5):682.
- [4] 朱晓丽, 宋亚芳, 李学林, 等. 高效液相色谱法测定野菊花中绿原酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2):32.
- [5] 崔兰冲, 李小琴, 韩莹, 等. HPLC 测定野菊花中蒙花苷与木犀草素的含量[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(1):33.
- [6] 吴艳芳, 王新胜, 尹延彦, 等. 超声辅助提取连翘总黄酮工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14):30.
- [7] 张建海, 冯彬彬, 胡奎, 等. 优选秀山灰毡毛忍冬醇提取工艺研究[J]. 西南大学学报:自然科学版, 2008, 30(11):58.

[责任编辑 全燕]

## 欢迎订阅 2012 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。本刊立足于行业报道的前沿, 关注相关的政策动态, 跟踪报道中医药重大课题, 及时分析报道中医药的新政策、新技术、新发明、新成果、新疗法, 努力使信息的选择与表达方式能够充分体现中医药发展水平, 为广大读者提供一流的信息服务。

《中国中医药信息杂志》1994 年创刊, 2002 年, 被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录, 成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升, 已被波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等国际检索系统收录。

《中国中医药信息杂志》为月刊, 大 16 开国际开本, 112 页, 国内外公开发行, 每册定价 10 元, 全年 120 元。国内邮发代号: 82-670; 国外代号: M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址: 北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部 邮编: 100700 电话: 010-64014411-3278 E-mail: Lxx@mail.cintcm.ac.cn