

葛根软胶囊中总黄酮含量测定提取条件优选

李剑, 罗波, 李谭瑶, 刘先军, 冯家力, 潘振球

湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 研究葛根软胶囊中总黄酮含量测定提取方法的最佳水平组合。 **方法** 采用紫外分光光度法测定, 以总黄酮含量为试验效应, 以聚酰胺粉的粒径、乙醇浓度、超声功率和超声温度为试验因素, 选择 $L_9(3^4)$ 正交试验设计筛选最佳水平组合。 **结果** 最佳测定组合为 70% 乙醇浓度、200 W 功率、60 ℃ 超声, 60~80 目聚酰胺粉柱层析, 验证试验总黄酮含量测定为 3.49 g/100 g。 **结论** 通过实验优选出了葛根软胶囊中总黄酮含量测定提取方法的最佳水平组合, 验证实验结果满意, 避免了因提取不当而导致测得的总黄酮含量偏低。

关键词: 正交试验; 葛根; 软胶囊; 总黄酮

中图分类号: R155.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2016)08-0996-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.08.032

Optimization of extraction condition in determination of the content of total flavonoids in puerariae soft capsule

LI Jian, LUO Bo, LI Tan-yao, LIU Xian-jun, FENG Jia-li, PAN Zhen-qiu

Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China

Abstract: **Objective** To study the optimal combination of extraction method of total flavonoids content in puerariae soft capsule. **Methods** The content of total flavonoids determined by ultraviolet spectrophotometry was used for evaluating the experimental effects. Polyamide powder particle size, ethanol concentration, ultrasonic power and ultrasonic temperature were employed as the experimental factors. $L_9(3^4)$ orthogonal experiment design was selected to screen the optimal combination. **Results** The optimal combination was 70% ethanol concentration, 200w power, 60℃ ultrasound and 60-80 mesh powder polyamide column chromatography. Validation test showed that the total flavonoids content was 3.49 g/100 g. **Conclusions** The optimal combination of extraction method of total flavonoids content in puerariae soft capsule is verified through the experiment, and it avoids the low content of total flavonoids caused by improper extraction method. The results of validation test are satisfactory.

Key words: Orthogonal experiment; Puerariae; Soft capsule; Total flavonoids

葛根是豆科植物野葛或甘葛藤的块根, 其主要成分是淀粉, 此外含有约 12% 的黄酮类化合物, 包括大豆(黄豆)甙、大豆甙元、葛根素等 10 余种; 黄酮类化合物泛指两个苯环通过三个碳原子相互连接而成的一系列化合物, 广泛存在于自然界并且具有广谱的药理作用, 是许多保健食品中的重要功效成分^[1]。现代医学研究, 葛根黄酮具有防癌抗癌和雌激素样作用, 可促进女性养颜, 尤其对中年妇女和绝经期妇女养颜保健作用明显。目前, 总黄酮含量测定的常用方法有^[2-4]: HPLC 法、硝酸铝比色法和紫外分光光度法, 本研究采用紫外分光光度法。实践发现该方法的提取过

程对于检测结果影响较大, 然而, 在 2003 年版《保健食品检验与评价技术规范》总黄酮测定方法中并没有对这些提取条件做详细说明, 同时也未见对葛根软胶囊中总黄酮含量测定需要的聚酰胺粉粒径、乙醇浓度、超声功率和超声温度这四个因素同时进行正交筛选研究的报道。因此, 本文采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对葛根软胶囊中总黄酮含量测定提取方法进行了优化, 结果满意。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 仪器设备 BT125D 电子天平(德国赛多利斯公司), UV-2450 可见-紫外分光光度计(日本岛津公司), T1-H-15 超声波清洗器(德国艾尔玛), 数字式

作者简介: 李剑(1978-), 女, 主管技师, 主要从事卫生检验工作。

[14] Paavola J1, Schliffke S, Rossetti S, et al. Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 58(5):199-208.

[15] Qian Q, Hunter LW, Li M, et al. Pkd2 haploinsufficiency alters intracellular calcium regulation in vascular smooth muscle cells [J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(15):1875-1880. 收稿日期: 2015-12-18

电热恒温水浴锅(上海比朗仪器有限公司)。

1.1.2 主要试剂 聚酰胺粉:30~60 目,60~80 目,80~100 目,国药集团化学试剂有限公司;芦丁化学对照品:批号(100080-201408),含量(92.8%),产地(中国食品药品检定研究所),CAS 号(153-18-4);苯:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;乙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;甲醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 受试样品 某保健食品葛根软胶囊,共三个批号,由某企业提供。

1.2 实验方法

1.2.1 实验方法依据 采用卫生部 2003 年版《保健食品检验与评价技术规范》,以下简称《规范》。

1.2.2 芦丁标准曲线 准确称取 0.0050 g 芦丁对照品,用甲醇溶解并定容至 100 ml,得浓度为 50.0 μg/ml 的芦丁标准溶液。分别吸取芦丁标准溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml 于 10 ml 比色管中,用甲醇定容至刻度,摇匀,于波长 360 nm 比色。

1.2.3 试样处理 依据《规范》中总黄酮测定方法,对样品提取的几个因素进行考察,同时代入芦丁标准曲线计算试样中总黄酮含量,以测得的总黄酮含量为指标进行优选。

1.2.4 正交试验设计 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,以总黄酮含量为试验效应,聚酰胺粉粒径、乙醇浓度、超声功率和超声温度为试验因素。根据对上述 4 个因

素的单因素实验结果,选取聚酰胺粉粒径的三个研究水平为 30~60 目、60~80 目、80~100 目;选取乙醇浓度的三个研究水平为 40%、70%、100%;超声功率的三个研究水平为 100 W、200 W、400 W;超声温度的三个研究水平为 30 ℃、60 ℃、80 ℃。每次试验重复 3 次。正交试验因素水平见表 1。

表 1 葛根软胶囊中总黄酮含量测定正交试验因素及水平

水平	A	B	C	D
	聚酰胺粉粒径 (目)	乙醇浓度 (%)	超声功率 (W)	超声温度 (℃)
1	30~60	40	100	30
2	60~80	70	200	60
3	80~100	100	400	80

1.3 统计分析 使用 SPSS16.0 统计分析软件包对正交设计结果进行方差分析,对有统计学意义的因素采用 LSD 法进行各水平间的多重比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正交试验结果 葛根软胶囊中总黄酮含量测定正交试验结果见表 2。通过极差分析可知,因素 B 具有最大的极差,因素 C、D 次之,因素 A 最小,因此对于总黄酮含量测定的影响因素大小次序为: $B>C>D>A$,且 $A_2>A_3>A_1$ 、 $B_2>B_3>B_1$ 、 $C_2>C_3>C_1$ 、 $D_2>D_3>D_1$,正交试验结果最佳水平组合为 $A_2B_2C_2D_2$ 。

表 2 葛根软胶囊中总黄酮含量测定正交试验结果

试验	因素				总黄酮含量(g/100g)			
	A	B	C	D	x_1	x_2	x_3	合计
1	1	1	1	1	0.84	0.84	0.85	2.53
2	1	2	2	2	3.07	3.02	3.05	9.14
3	1	3	3	3	2.24	2.26	2.27	6.77
4	2	1	2	3	1.98	2.00	2.02	6.00
5	2	2	3	1	2.50	2.55	2.52	7.57
6	2	3	1	2	2.33	2.36	2.37	7.06
7	3	1	3	2	1.53	1.51	1.53	4.57
8	3	2	1	3	2.53	2.57	2.53	7.63
9	3	3	2	1	2.74	2.71	2.75	8.19
I	6.15	4.37	5.74	6.10				
II	6.88	8.11	7.78	6.92				
III	6.80	7.34	6.30	6.80				
R	0.73	3.75	2.04	0.83				

2.2 正交试验方差分析结果 葛根软胶囊中总黄酮含量测定正交试验方差分析结果见表 3,多重比较结果见表 4。因素 A、B、C、D 均能明显影响总黄酮含量的测定($P<0.001$),且影响大小次序: $B>C>D>A$ 。

对因素 A 三个水平进行多重比较,发现差异均有统计学意义,且 $A_2>A_3>A_1$,因此选择 A_2 即聚酰胺粉粒径 60~80 目。对于分离黄酮类化合物来说,聚酰胺是较理想的吸附剂。其吸附强度主要取决于黄酮类化

合物分子中的羟基数目与位置以及溶剂与黄酮类化合物或与聚酰胺形成氢键缔合能力的大小。从表 3、表 4 看出,聚酰胺粉的粒径偏大,则层析时样液流速加快,可能造成总黄酮吸附不充分而导致检测结果偏低;聚酰胺粉的粒径偏小,则层析柱吸附表面积增大,吸附能力增强,可能造成杂质吸附或者同体积的洗脱液不能完全洗脱,也导致检测结果偏低,所以中间粒径 60~80 目,结果较好。

因素 B 三个水平多重比较结果显示差异均有统计学意义,且 $B_2>B_3>B_1$, 因此选择 B_2 即 70% 乙醇浓度。从表 3、表 4 可以看出,按《规范》中用 100% 乙醇(无水乙醇)提取,结果不如 70% 乙醇理想。由于黄酮类化合物中的一般游离苷元易溶于甲醇、乙醇、乙酸乙酯等有机溶剂而难溶于水,其中黄酮、黄酮醇、查儿酮等更难溶于水,而二氢黄酮及二氢黄酮醇等水中溶解度稍大^[5], 所以,乙醇浓度偏低可能降低黄酮类化合物的溶出,而乙醇浓度偏高又可能会增加其他杂质的溶出从而增加溶液黏度,不利于黄酮类物质的溶出。同时,表 2 显示,提取用乙醇浓度对葛根软胶囊总黄酮含量检测结果的影响是四个因素中最大的,因此,合理的选择提取用乙醇浓度是很有必要的。

因素 C 三个水平多重比较结果显示差异均有统计学意义,并且 $C_2>C_3>C_1$, 因此选择 C_2 即超声功率 200 W。当超声功率偏小时,同时间内,黄酮类化合物未完全溶出,而当超功率偏大时,又可能增加其他杂质的溶出从而影响了黄酮类化合物的溶出。

因素 D 三个水平多重比较结果同样显示差异均有统计学意义,且 $D_2>D_3>D_1$, 因此选择 D_2 即超声温度 60 ℃。超声波提取一般不需加热,因其本身存在较强的热效应,但介质的温度对超声波空化作用的强度有一定的影响,因此提取过程中进行适当的温度控制是有必要的。表 3、表 4 可知,按照《规范》方法不加热,直接超声提取 20 min 样品溶液的温度为 30 ℃时的实验结果不如 60 ℃加热超声提取结果。同时,随着温度的升高,溶质扩散加快,对产生空化作用有利,从而增加黄酮类化合物溶出,但温度过高则会导致空化作用减弱进而影响黄酮类化合物的溶出,此外过高的温度可能会导致黄酮类化合物的分解^[6]。

综上所述,正交试验方差分析表明最佳水平组合为 $A_2B_2C_2D_2$ 。

表 3 葛根软胶囊中总黄酮含量测定正交试验方差分析结果

方差来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	0.322	2	0.161	417.817	<0.001
B	7.830	2	3.915	1.016×10^4	<0.001
C	2.220	2	1.110	2.882×10^3	<0.001
D	0.394	2	0.197	511.913	<0.001
误差	0.007	18	0.000389		
总变异	10.773	26			

2.3 验证试验结果 采用 $A_2B_2C_2D_2$ 组合,对样品三

个批号每个批号进行 3 次平行检测,测得结果分别为 3.43 g/100 g、3.50 g/100 g 和 3.54 g/100 g,均值为 3.49 g/100 g。

表 4 葛根软胶囊中总黄酮含量测定各因素水平多重比较结果

因素	水平		均值		P 值
	I	J	I	J	
A	1	2	2.049	2.292	<0.001
	1	3	2.049	2.267	<0.001
	2	3	2.292	2.267	0.013
B	1	2	1.456	2.704	<0.001
	1	3	1.456	2.448	<0.001
	2	3	2.704	2.448	<0.001
C	1	2	1.913	2.593	<0.001
	1	3	1.913	2.101	<0.001
	2	3	2.593	2.101	<0.001
D	1	2	2.033	2.308	<0.001
	1	3	2.033	2.267	<0.001
	2	3	2.308	2.267	<0.001

3 结 论

试验结果显示,聚酰胺粉粒径、乙醇浓度、超声功率和超声温度对于葛根软胶囊中总黄酮含量的测定均有明显的影响,然而《规范》中对这些提取条件并没有做详细说明。本文通过正交试验得出最佳提取组合为乙醇浓度 70%、超声功率 200 W,超声温度 60 ℃,聚酰胺粉柱层析柱粒径 60~80 目。验证试验总黄酮含量测定结果为 3.49 g/100 g,优于正交试验中各次检测结果。至于聚酰胺粉粒径、乙醇浓度、超声功率和超声温度,这四个因素之间是否还存在交互作用还有待进一步的实验研究。

本次试验对葛根软胶囊中总黄酮含量测定的提取方法进行了优化,提高了总黄酮含量的检测水平,避免因提取不当而导致检测结果偏低。

参考文献

[1] 易文实.黄酮类化合物的生物活性研究进展[J].广州化工,2012,40(2):47~50.

[2] 颜仁梁,刘志刚.中草药、中药制剂中总黄酮类化合物含量测定方法综述[J].广州医药,2005,36(1):6~10.

[3] 肖香兰,罗仁才,张楠.保健食品中总黄酮的测定方法[J].中国卫生检验杂志,2007,17(6):1037~1142.

[4] 孔鲁鲁.分光光度法测定保健食品中总黄酮[J].生命科学仪器,2009,7(2):29~37.

[5] 张纪宁,杨洁.黄酮类化合物的生物活性研究进展[J].伊犁师范学院学报(自然科学版),2009,3(1):29~31.

[6] 王小明,刘逆夫.微波提取蜂胶总黄酮的工艺研究[J].中国医药导报,2007,28(21):127~128.