

# 联合优化提取甘草菊花复方中甘草酸和总黄酮的研究

陈继宗, 张喜梅, 李晓玺, 陈玲

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

**摘要:** 目的 研究甘草菊花复方中甘草酸和总黄酮的联合提取工艺。方法 以甘草酸和总黄酮的提取率为指标, 考察提取时间、提取温度、固液比和提取次数对甘草酸和总黄酮提取率的影响, 并通过正交实验确定最適提取工艺。结果 优化的甘草/菊花中甘草酸和总黄酮的联合提取工艺为: 提取时间 3 h, 提取温度 90 °C, 固液比 1 : 12, 提取次数 2 次。

**关键词:** 甘草; 菊花; 甘草酸; 总黄酮; 提取

中图分类号: R284.2; 文献标识码; 文章篇号: 1673-9078(2007)02-0033-04

## Combined Extraction Technique of Glycyrrhizic Acid and Flavonoids from Compound of Licorice and Chrysanthemum

CHEN Ji-zong, ZHANG Xi-mei, LI Xiao-xi, CHEN Ling

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract: Objective:** To study the combined extraction techniques of glycyrrhizic acid and flavonoids from compound of licorice and chrysanthemum. **Methods:** The effects of extraction time, extraction temperature, the ratio of water to solid and extraction times on the extraction rate of glycyrrhizic acid and flavonoids were investigated. And the optimal extraction conditions were determined by orthogonal experiments. **Results:** The optimal combined extraction time, temperature, the ratio of water to solid and extraction times were 3 h, 90 °C, 12:1 and 2, respectively.

**Key words:** licorice; chrysanthemum; glycyrrhizic acid; flavonoid; extraction

甘草菊花复方是根据中医配伍理论, 由不同种类的甘草和不同种类的菊花等药味组成, 具有保肝作用的, 能治疗相关疾病的一种方剂。甘草酸具有解毒、镇咳去痰、保肝以及抗免疫等作用<sup>[1,2]</sup>。甘草黄酮则有抗肿瘤、抗病原微生物等作用<sup>[3,4]</sup>。菊花黄酮具有抗氧化、抗肿瘤等作用<sup>[5]</sup>。根据生物药剂学的方法, 本文采用水提法联合提取甘草菊花复方中的甘草酸和总黄酮, 以甘草酸和总黄酮的综合提取率为考察指标, 采用正交实验来优化甘草酸和总黄酮的联合提取工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

甘草和菊花: 由南海北洋生物工程有限公司提供

### 1.2 试剂与仪器

试剂: 甘草酸单铵盐标准品 (HPLC>98%), 成都

收稿日期: 2006-09-20

作者简介: 陈继宗, 在读硕士, 研究方向为糖类物质及其药物的制备与生物利用

通讯作者: 陈玲, 副研究员/副所长, 研究方向为糖类物质及其药物的制备与生物利用

思科华生物技术有限公司; 芦丁 (BR), 国药集团化学试剂有限公司; 香草醛 (AR), 成都市联合化工试剂研究所; 其他试剂均为分析纯, 水为蒸馏水。

仪器: UV-2102 PCS 型紫外可见分光光度计, 尤尼柯 (上海) 仪器有限公司; SHZ-D (III) 循环水式真空泵, 巩义市英峪予华仪器厂; SHA-BA 恒温振荡器, 江苏金坛富华仪器有限公司; 分析天平, 德国北京赛多利斯仪器系统有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 甘草酸含量的测定 (比色法)<sup>[6,7]</sup>

##### 1.3.1.1 标准液的配制

精密称取甘草酸单铵盐标准品 9.3 mg, 置于小烧杯中, 用 80%乙醇溶解, 全部溶解后转移至 10 mL 的容量瓶中, 用 80%乙醇定容, 摇匀, 即得甘草酸单铵盐标准品溶液, 浓度为 0.93 mg/mL。

##### 1.3.1.2 标准曲线的绘制

精密量取甘草酸单铵盐标准品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL 于 50 mL 三角瓶中, 分别加入 80%乙醇溶液 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0 mL 至 0.5 mL, 然后分别加入 0.45% (w/v) 香草醛-浓硫酸溶液 9.5 mL, 摇匀,

置于 60 °C 水浴中水浴振荡 20 min; 另精密量取 80% 乙醇 0.5 mL, 同法操作, 做为空白对照。水浴完毕取出, 并置于冰浴中冷却至室温。以空白为对照, 在 400~800 nm 范围内扫描甘草酸单铵盐标准品溶液, 所得最大吸收波长为  $\lambda_{\max}=515$  nm。

在 515 nm 处, 以空白为对照, 测定系列标准品溶液的吸光度, 以吸光度与标准品溶液的浓度作图, 即得标准曲线。其线性回归方程为:  $A=9.4685C+0.0002$ , 线性相关系数为  $R^2=0.9994$ 。

### 1.3.1.3 样品液中甘草酸提取率的测定

取提取液 1 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 用 80% 乙醇定容, 得稀释液。准确量取稀释液 0.5 mL 于 50 mL 三角瓶中, 其他操作按 1.3.1.2 项下同法进行。然后根据标准曲线计算被测液中甘草酸浓度  $C$ , 再计算甘草酸提取率。公式如下:

$$\text{甘草酸提取率} = \frac{CV}{5m} \times 100\%$$

其中:  $C$ —被测液中的甘草酸浓度, mg/mL;  $V$ —提取液体积, mL;  $m$ —原料的质量, g。

### 1.3.2 总黄酮的含量测定<sup>[5,8]</sup>

#### 1.3.2.1 标准液的配制

精密称取 120 °C 烘至恒重后的芦丁 10.0 mg 于烧杯中, 用 80% 乙醇溶解, 溶解完毕转移至 100 mL 容量瓶中, 用 80% 乙醇定容, 摇匀, 得芦丁标准溶液, 浓度为 0.1 mg/mL。

#### 1.3.2.2 标准曲线的绘制

精密量取芦丁标准溶液 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 然后分别加 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液 0.3 mL, 摇匀放置 5 min, 再分别加 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液 0.3 mL, 摇匀放置 5 min, 各加 1 mol/L  $\text{NaOH}$  溶液 4 mL, 以 80% 乙醇定容至刻度。另精密量取 80% 乙醇 1 mL, 同法操作, 作为空白对照。在 400~800 nm 范围内进行扫描, 得芦丁标准品溶液的最大吸收波长为 500 nm。在 500 nm 处, 以空白样品为对照, 测定系列标准对照品溶液的吸光度, 以吸光度与标准品溶液的浓度作图, 即得标准曲线。线性回归方程为:  $A=12.28C-0.0047$ , 线性相关系数为  $R^2=0.9996$ 。

#### 1.3.2.3 样品液中总黄酮提取率的测定

取提取液 1 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 用 80% 乙醇定容, 得稀释液。准确吸取稀释液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 其他操作按 1.3.2.2 方法进行。然后根据标准曲线计算其浓度  $C$ ; 再计算总黄酮提取率, 公式如下:

$$\text{总黄酮提取率} = \frac{CV}{10m} \times 100\%$$

其中:  $n$ —提取液稀释倍数;  $C$ —被测液中的甘草酸浓度, mg/mL;  $V$ —提取液体积, mL;  $m$ —原料的质量, g。

### 1.3.3 实验方法

准确称取一定配比的甘草和菊花混合物 10 g, 分别研究提取温度、固液比。提取时间以及提取次数对甘草酸和总黄酮提取效果的影响, 并在单因素实验的基础上, 以甘草酸和总黄酮综合提取效果为考察指标, 通过正交实验确定最佳提取工艺。

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取时间对甘草酸和总黄酮提取效果的影响

固液比即原料粉末 (g) 和提取溶剂 (mL) 的比。在提取温度为 70 °C, 固液比为 1 : 8 (g/mL), 提取次数为 1 次的条件下, 考察不同提取时间对甘草酸和总黄酮提取效果的影响。实验结果如 1 所示。

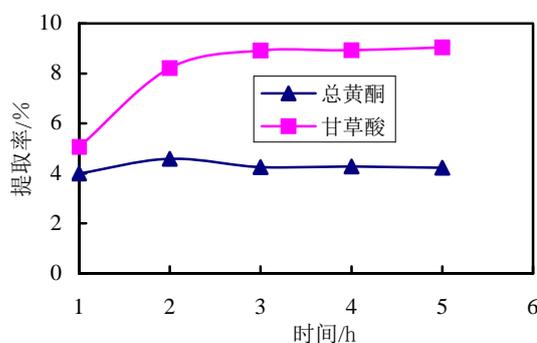


图 1 提取时间对甘草酸和总黄酮提取效果的影响

由图 1 可知, 在提取时间低于 3 h 时, 甘草酸提取率随时间增加而大幅增加, 大于 3 h 后, 甘草酸提取率变化减缓且逐渐趋于平衡。对于总黄酮, 在 2 h 以内, 总黄酮的提取率随时间增加而增加, 2 h 后, 总黄酮提取率随时间的变化逐渐下降, 而在 3 h 后, 总黄酮的提取率趋于平衡。

有效成分的提取过程是一个固液传质提取过程, 其主要推动力为两体系之间有效成分的浓度差。提取开始时, 两个体系之间具有较高的浓度差, 传质推动力较大, 甘草酸和总黄酮的溶出速度较快, 二者的提取率随之增加。而随着时间的增加, 两体系之间的浓度差减小, 二者的提取率变化也随之减小, 直至达到平衡, 此时, 二者的提取率不再变化。

在极性水溶剂中, 甘草酸比黄酮的更易于溶解。而且, 当溶液中的酸性达到一定值时, 和含有酚基基的黄酮类物质发生反应, 生成盐, 从而导致总黄酮含量降低, 当二者的溶解速度、反应速度达到平衡时, 二者的提取率亦不再发生变化。

### 2.2 提取温度对甘草酸和总黄酮提取效果的影响

在固液比为 1 : 8 (g/mL), 提取次数为 1 次, 提取时间为 2 h 的条件下, 考察不同提取温度对甘草酸和总黄酮提取效果的影响, 实验结果如图 2 所示。

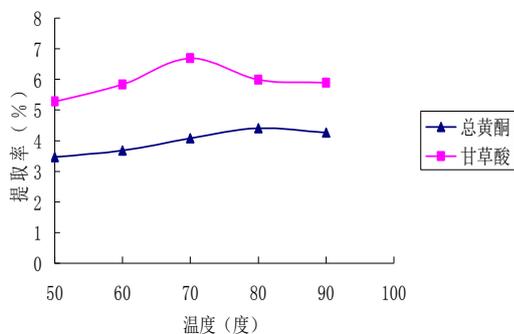


图2 提取温度对甘草酸和总黄酮提取效果的影响

由图2可知, 甘草酸提取率随温度的升高而增高, 当温度大于 70 °C 后, 甘草酸提取率随温度的升高而降低。总黄酮的提取率随温度的增高而增高, 当温度大于 80 °C 后, 总黄酮提取率随温度升高而有所下降。

一般来说, 温度升高, 分子运动速率加快, 渗透、扩散、溶解速率加快, 有效成分更易从细胞中转移到溶剂中, 因此, 甘草酸和总黄酮的提取率随提取温度的升高而提高。

实验过程中发现, 甘草酸在 70 °C 以后, 提取速率下降, 这可能是由于黄酮类物质受温度影响较大, 温度升高, 黄酮类物质溶出率提高较大, 同时, 部分含有酚羟基的黄酮与甘草酸反应生成盐类物质, 以及其他杂质的溶出亦增加, 导致甘草酸的提取率降低。

### 2.3 固液比对甘草酸和总黄酮提取效果的影响

在提取温度为 70 °C, 提取次数为 1 次, 提取时间为 2 h 的条件下, 考察不同固液比对甘草酸和总黄酮提取效果的影响, 实验结果如图 3 所示。

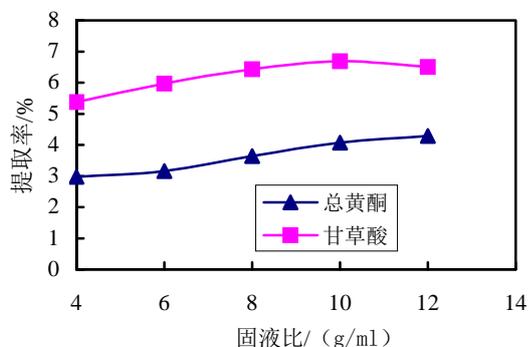


图3 固液比对甘草酸和总黄酮提取效果的影响

由图3可知, 当固液比小于 1 : 10 时, 甘草酸提取率随着固液比的增加而增加; 随着固液比的继续增

大, 甘草酸的提取率略有下降。总黄酮的提取率随着固液比的增加而增高。一般来说, 溶剂用量越大, 提取率越大, 但当固液比大到一定程度时, 有效成分已经基本释出完全, 再增大固液比, 不但不会提高提取率, 反而会稀释有效成分, 使其浓度降低。

### 2.4 提取次数对甘草酸和总黄酮提取效果的影响

在提取温度为 70 °C, 固液比为 1 : 8, 提取时间为 2 h 的条件下, 考察不同提取次数对甘草酸和总黄酮提取效果的影响, 实验结果如图 4 所示。

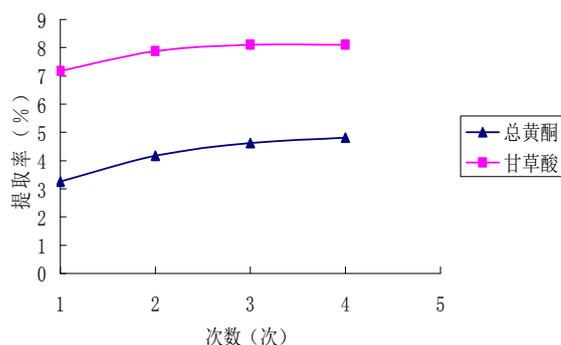


图4 提取次数对甘草酸和总黄酮提取效果的影响

由图4可知, 当提取次数达到 2 次时, 甘草酸和总黄酮的提取率已接近最大值, 继续增加次数, 对甘草酸和总黄酮的提取率影响很小。

### 2.5 正交试验

在上述单因素实验的基础上, 在提取次数为 2 次的条件下, 对提取时间、提取温度和固液比对甘草酸和总黄酮提取效果的影响进行了  $L_{16}(4^3)$  正交实验, 实验因素水平如表 1, 正交实验结果如表 2。正交实验的结果采用甘草酸提取率和总黄酮提取率的加权结果, 其加权公式为: 正交实验结果 = 甘草酸提取率  $\times$  80% + 总黄酮提取率  $\times$  20%。

根据极差 R 的大小可以判断试验中各因素影响的大小, 从表 2 中可知影响因素最大的是时间, 其次是固液比和温度。根据  $k_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$ 、 $k_4$  值的大小, 可以确定各因素较优的水平组合为  $A_4B_4C_4$ 。

### 2.6 甘草酸和总黄酮提取验证实验

由正交试验结果分析可知, 第 13 组实验的条件最好, 试验的最优组合  $A_4B_4C_4$ , 以此为验证实验, 并将结果与第 13 组的实验的结果进行比较。结果见表 3。

由表 3 的结果可看出, 验证实验的结果要优于对照实验的结果, 表明正交实验所确定的最佳工艺条件  $A_4B_4C_4$  为较优的实际工艺条件, 即提取时间为 3 h, 提取温度为 90 °C, 固液比为 1 : 12, 提取次数为 2 次 (每次为 3 h)。

表1 实验因素水平 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 表

水平	A.时间/h	B.温度/℃	C.固液比 /(g/mL)
1	1	60	6
2	1.5	70	8
3	2	80	10
4	3	90	12

表2 正交试验结果表

试验号	因素			试验结果
	A	B	C	
1	1	60	6	7.3404
2	1	70	8	6.94238
3	1	80	10	7.76412
4	1	90	12	8.10296
5	1.5	60	8	7.12772
6	1.5	70	6	6.7702
7	1.5	80	12	7.5934
8	1.5	90	10	7.02636
9	2	60	10	6.70376
10	2	70	12	7.58756
11	2	80	6	6.93244
12	2	90	8	7.739
13	3	60	12	8.21224
14	3	70	10	7.58922
15	3	80	8	8.20108
16	3	90	6	8.03824
k <sub>1</sub>	7.537	7.346	7.270	
k <sub>2</sub>	7.129	7.222	7.503	
k <sub>3</sub>	7.241	7.623	7.271	
k <sub>4</sub>	8.010	7.727	7.874	
极差 R	0.881	0.505	0.604	

表3 验证实验

试验号	A.时间/h	B.温度/℃	C.固液比/(g/mL)	试验结果
1	3	60	12	8.21224
2	3	90	12	9.08102

(上接第 32 页)

抗氧化性物质的提得率为: 4.96%; 总酚含量为: 39.60 μg/mg 样品; 总黄酮含量为: 17.53 μg/mg 样品; 终浓度 0.5 mg/mL 对 DPPH 清除率 62.09%。菠菜中抗氧化性成分除了 β-胡萝卜素、V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub> 等, 还含有一定量的酚类和黄酮类结构化合物。

### 3 结论

通过实验研究表明, 提取时间、提取温度、固液比以及提取次数均影响影响甘草/菊花复方中甘草酸和总黄酮联合提取效果。通过正交实验研究, 影响甘草/菊花复方中甘草酸和总黄酮联合提取效果的因素依次为: 提取时间>固液比>提取温度。最佳工艺条件为: 提取时间 3 h, 固液比 1 : 10, 提取温度 90, 提取次数 2 次。

### 参考文献

- [1] Yoshikawa,M. Effects of Glycyrrhizin on Immune-Mediated Cytotoxicity[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 1997, 12,(3):243-248.
- [2] Thabrew M.I. Phytogetic Agents in the Therapy of Liver Disease[J]. Phytotherapy Research,1996 10 (6):461-467
- [3] Mashiba,H. ,et al. Augments antiproliferative effect of tumor necrosis factor (TNF), lumphotoxin,and glycyrrhizin in combined use with diethyldicarbamate on MethA tumor cells in vitro[J]. Japan Journal of Experimental Medicine, 1990, 60 (2):67-71
- [4] Numazki K, et al. Effect of Glucyrrhizin,cycloporin and tumor necrosis factor alpha on infection of U-937 and MRC-5 cells by human cytomegalovirus[J]. J Leukocyte Biology, 1994, 55:24-28
- [5] 孔琪,吴春.菊花黄酮的提取及抗氧化活性研究[J]. 中草药 2004, 35,(9):1001-1002
- [6] 王巧娥,王文慎等.甘草GAP 研究中的快速质量检测方法研究[J].现代中药研究与实践,2004,18(1):37-40
- [7] 刘岩,胡汉芳等.用比色法测定不同产地甘草中甘草酸的含量[J].河北大学学报(自然科学版),1998,18(4):369-374
- [8] 郭永学,李楠等. 山楂叶总黄酮的微波辅助萃取研究[J].中草药,2005,36(7):1011-1013

### 参考文献

- [1] 李宝树.人人皆宜食蔬菜[J].吉林蔬菜, 2002, (2):19
- [2] 李建武,等.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社, 1994.
- [3] 徐清萍,陶文沂,敖宗华.镇江香醋抗氧化活性成分来源分析[J].食品与发酵工业, 2005, 31 (3): 33-36.