

正交试验优选血三七总黄酮的提取工艺研究

王金翠¹, 胡雄彬², 唐甜甜², 韩 萌², 刘新义^{2*}

1. 桑植县民族中医院 药剂科, 湖南 桑植 427100

2. 中南大学湘雅二医院 临床药学研究所, 湖南 长沙 410011

摘要: 目的 优选血三七 *Polygonum amplexicaule* var. *sinense* 中总黄酮的提取工艺。方法 以乙醇体积分数、提取时间、乙醇倍数、提取次数为因素, 以总黄酮提取率和浸膏得率为指标, 采用正交试验优选提取工艺。结果 最佳条件为用 10 倍 70% 乙醇, 提取 3 次, 每次 1.5 h。结论 优选的工艺稳定、合理, 可用于血三七中总黄酮的提取。

关键词: 血三七; 总黄酮; 浸膏得率; 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)04-0370-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.04.010

Extraction optimization of total flavonoids from *Polygonum amplexicaule* var. *sinense* by orthogonal test

WAMG Jin-cui¹, HU Xiong-bin², TANG Tian-tian², HAN Meng², LIU Xin-yi²

1. Department of Pharmacy, Sangzhi County National Hospital of Chinese Medicine, Sangzhi 427100, China

2. Institution of Clinical Pharmacy, The second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

Abstract: Objective To optimize the extraction technology of total flavonoids from *Polygonum amplexicaule* var. *sinense*. **Methods** The extraction technology of total flavonoids was optimized by orthogonal test using ethanol concentration, ethanol ratio, extracting time, and extracting times as factors with the extraction of total flavone and extract yield as indexes. **Results** The optimal extraction technology was as follows: 10-folds of 70% ethanol, extracting for three times, and 1.5 h each time. **Conclusions** The optimal technology is stable and feasible for the extraction of total flavonoids from *P. amplexicaule* var. *sinense*.

Key words: *Polygonum amplexicaule* D. Don var. *sinense* Forb. et Hemsl. ex Stew.; total flavonoids; extract yield; orthogonal test

血三七又名寥子七、散血丹, 为蓼科植物中华抱茎蓼 *Polygonum amplexicaule* D. Don var. *sinense* Forb. et Hemsl. ex Stew. 的根茎, 主要分布于湖北、陕西、四川和云南等地^[1]。味涩、微苦、性平, 具有清热解毒、活血止痛之功效, 土家族和苗族常用来治疗跌打损伤、外伤止血等疾病^[2]。研究者从血三七药材中分离出 4 个黄酮类成分^[3]; 药理实验证明血三七水煎液具有较好的防治脑血栓的效果^[4], 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用^[5]。研究发现, 黄酮类成分可以扩张血管, 增加血流量, 改善心脑血管循环^[6]。故本课题组推测血三七中黄酮类成分可能与抗脑动脉粥样硬化、防治脑血栓等密切相关。在前期优选血三七中槲皮素的基础上^[7],

考虑到血三七总黄酮可能是防治心脑血管疾病的有效组分, 故本研究对血三七中总黄酮的提取工艺进行了优化, 为该药材的药物制剂开发提供依据。

1 材料

血三七药材采自湖北省恩施土家族苗族自治州利川市, 经中南大学湘雅药学院鉴定为蓼科植物中华抱茎蓼 *Polygonum amplexicaule* D. Don var. *sinense* Forb. et Hemsl. ex Stew. 的根茎; 芦丁对照品购自中国食品药品检定研究院, 批号 100080-200907。

UV1901PC 紫外可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司); DZF-6050 真空干燥箱 (北京北方利辉试验仪器设备有限公司); ESJ200-4 电子分析天平 (郑州南北仪器设备有限公司); $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、

收稿日期: 2013-12-19

基金项目: 湖南省中医药管理局课题 (2013139)

作者简介: 王金翠 (1979—), 女, 本科, 主管中药师, 主要从事医院药学和民族药物研究。Tel: 13319646120 E-mail: 763394130@qq.com

*通信作者 刘新义, 博士, 主要从事新制剂开发和民族药物研究。Tel: (0731)85292093 E-mail: liuxinyi128@126.com

NaOH、NaNO₂ 等均为分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 血三七中总黄酮测定方法的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 15.0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并加至刻度, 即得 0.3 mg/mL 对照品溶液。

2.1.2 标准曲线的制备 精密吸取芦丁对照品溶液 0、1、2、3、4、5、6、10、15 mL, 分别置 50 mL 量瓶中, 依次加入 5% NaNO₂ 溶液 1 mL, 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1 mL, 4.3% NaOH 溶液 10 mL, 静置 5 min, 加水至相应刻度。在 500 nm 处测定各溶液的吸光度。以质量浓度对吸光度进行线性回归, 得回归方程 $A=8.174 C-0.498$, $r=0.999 3$ 。表明芦丁在 0.006~0.090 mg/mL 与吸光度线性关系良好。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取血三七药材 10 g, 采用适量 70%乙醇进行回流提取, 滤过, 收集滤液, 减压浓缩, 定容至 50 mL。取供试品溶液 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 其余的步骤按“标准曲线的制备”项下方法加显色剂显色进行处理, 即得。

2.1.4 精密度试验 取 0.016 mg/mL 芦丁对照品溶液, 按“标准曲线的制备”项下处理, 测定吸光度, 连续测定 5 次, 计算得吸光度 RSD 值为 0.78%。

2.1.5 重复性试验 称取血三七药材样品 6 份, 制备供试品溶液, 其余的步骤按“标准曲线的制备”项下方法处理, 测定吸光度值, 结果吸光度值的 RSD 值为 1.24%。

2.1.6 稳定性试验 称取血三七药材样品 1 份, 制备供试品溶液, 其余的步骤按“标准曲线的制备”项下方法进行处理, 分别于 2、6、8、12、16 h 测定吸光度值, 结果其 RSD 值为 1.87%。

2.1.7 回收率试验 称取血三七药材样品, 精密加入 0.3 mg/mL 芦丁对照品溶液 2 mL, 制备供试品溶液, 取供试品溶液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 其余的步骤按“标准曲线的制备”项下加显色剂显色进行处理。平行制备 5 份样品, 测定吸光度值, 结果平均回收率为 98.7%, RSD 值为 1.9%。

2.1.8 血三七药材中总黄酮的测定 取血三七药材制备供试品溶液, 按“标准曲线的制备”项下方法进行处理, 测定吸光度, 折算成药材中总黄酮的质量分数, 平行 3 份。结果血三七药材中总黄酮平均质量分数为 3.78%, RSD 值为 1.82%。

2.2 因素水平的选择

根据预试验和笔者经验, 选取影响血三七回流

提取的乙醇体积分数 (A)、提取时间 (B)、乙醇倍数 (C) 和提取次数 (D) 为考察因素, 选用 L₉(3⁴) 正交试验表筛选最佳工艺。因素与水平见表 1。

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels				
水平	因素			
	A/%	B/h	C/倍	D/次
1	60	1	6	1
2	70	1.5	8	2
3	80	2	10	3

2.3 正交试验结果与分析

取血三七药材 10 g, 按设定方案进行提取, 滤过, 测定提取液供试品溶液中总黄酮, 乘以稀释倍数, 最终折算成血三七药材中总黄酮的提取率。精密移取各实验号下的血三七提取液 50 mL, 置蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 °C 下干燥 3 h, 移至干燥器中, 冷却 30 min, 迅速称定质量, 计算浸膏得率。以该结果列入正交设表中进行统计, 结果见表 2、3。

提取率=血三七药材中总黄酮的提取量/血三七药材中总黄酮的总质量

表 2 正交试验设计和结果

Table 2 Design and results of orthogonal test						
试验号	A	B	C	D	提取率/%	浸膏得率/%
1	1	1	1	1	69.6	17.8
2	1	2	2	2	74.3	18.9
3	1	3	3	3	74.1	22.4
4	2	1	2	3	84.1	21.6
5	2	2	3	1	87.6	25.6
6	2	3	1	2	82.7	23.1
7	3	1	3	2	73.5	19.8
8	3	2	1	3	75.7	18.9
9	3	3	2	1	74.8	17.2
总黄酮提取率						
K ₁	218.0	227.2	228.0	232.0		
K ₂	254.4	237.6	233.2	230.5		
K ₃	224.0	231.6	235.2	233.9		
R	36.4	10.4	7.2	3.4		
浸膏得率						
K ₁	59.1	59.2	59.8	60.6		
K ₂	70.3	63.4	57.7	61.8		
K ₃	55.9	62.7	67.8	62.9		
R	14.4	4.2	10.1	2.3		

表 3 方差分析结果
Table 3 Results of variance analysis

项目	方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
总黄酮 提取 率	A	0.012 7	2	0.006 4	131.2	$P < 0.01$
	B	0.000 9	2	0.000 45	9.4	
	C	0.000 46	2	0.000 23	4.8	
	D	0.000 097	2	0.000 049		
浸膏 得率	A	19.058	2	9.529	43.2	$P < 0.05$
	B	1.688	2	0.844	3.8	
	C	9.468	2	4.734	21.5	
	D	0.441	2	0.221		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

极差结果显示各因素对提取率的影响程度依次为 $A > B > C > D$, 即乙醇体积分数 $>$ 提取时间 $>$ 乙醇倍数 $>$ 提取次数。由此得最佳提取工艺为 $A_2B_2C_3D_3$, 浸膏得率结果也表明, $A_2B_2C_3D_3$ 为最佳工艺, 与提取率结果恰好一致, 即乙醇体积分数为 70%, 加入 10 倍量乙醇, 提取时间为 1.5 h, 提取次数为 3 次。

2.4 验证试验

称取 3 份血三七药材适量, 按上述优选的最佳工艺进行提取, 照上述建立的测定方法条件测定, 计算血三七药材中总黄酮提取率, 同时测定提取后溶液的浸膏得率。结果三七药材中总黄酮的提取率分别为 88.5%、87.9%、89.3%, 平均值为 88.6%, RSD 值为 0.8%; 浸膏得率分别为 25.4%、24.1%、25.8%, 平均值为 25.1%, RSD 值为 3.5%。结果表明所选工艺合理、稳定、可行。

3 讨论

由实验结果分析可知, 乙醇体积分数对血三七中总黄酮提取影响最显著, 差异具有显著性意义, 其次为提取时间、乙醇倍数和提取次数。最终优选的工艺条件为采用 10 倍量 70% 的乙醇提取, 每次提取 1.5 h, 提取 3 次。该工艺经验证, 3 次提取结

果的总黄酮提取率 RSD 值为 0.8%, 浸膏得率的 RSD 值为 3.5%, 说明该工艺重复性良好, 且总黄酮提取量和浸膏得率也显著增加, 因此确定为该工艺为最佳的条件, 为血三七的民族药物制剂开发提供参考。

参考文献

- [1] 方志先, 胡淑玲, 雷永恕. 鄂西药物志 [M]. 第 1 册. 武汉: 湖北民族出版社, 1998: 338.
- [2] 殷智, 彭再生, 杨长丰. 复方血三七胶囊治疗脑动脉粥样硬化症 42 例疗效观察 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2005(2): 90-92.
- [3] 王海楼, 任恒春, 邹忠梅. 血三七抗氧化活性成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(11): 819-822.
- [4] 曾碧映, 李新才, 李学军, 等. 血三七水煎剂抗血栓作用及其机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 256-259.
- [5] 王金翠, 胡雄彬, 唐甜甜, 等. 血三七水煎液对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(3): 227-230.
- [6] 周俊, 周德生. 天然黄酮类化合物对心脑血管的药理研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(6): 725-727.
- [7] 彭艳红, 刘新义, 李嫦玲. 正交试验优选血三七中槲皮素的提取工艺 [J]. 中国药房, 2013, 24(27): 2538-2539.