

正交试验法优选三叶青中总黄酮的提取工艺

黄真,胡瑛瑛(浙江中医药大学药学院,杭州 310053)

摘要:目的 优选三叶青中总黄酮的提取工艺。方法 以三叶青总黄酮为指标,采用单因素考察和正交试验相结合的方法,对乙醇浓度、乙醇用量、提取时间、提取次数 4个影响因素进行研究,优选提取工艺。结果 乙醇浓度对三叶青总黄酮的提取影响较大,其他 3个因素影响程度排序为:提取次数①提取时间②乙醇用量。结论 最佳提取工艺参数为:50%乙醇、15倍

作者简介:黄真,女,硕士,教授,博士生导师

Tel: (0571) 86613576

E-mail: zhen626@yahoo.com.cn

Orthogonal Test for Optimizing the Extracting Method of Total Flavonoids from Radix Tetrastigmae

HUANG Zhen, HU Ying-ying (College of Pharmacy Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize extraction technology of the total flavonoids from Radix Tetrastigmae. **METHODS** In the method of one-way and orthogonal test, the ethanol concentration and amount, extraction time and number of extractions were studied with the total flavonoids from Radix Tetrastigmae as the target of the test. **RESULTS** The ethanol concentration had great impact on the target. The order of the other 3 factors that affected the flavonoid extractions was number of extractions ① extraction time ② amount of ethanol. **CONCLUSION** The parameters of the best extraction technology are as follows: 50% ethanol, 15 times the weight of the dried material, refluxing and extracting 2 h for 3 times.

KEY WORDS: Radix Tetrastigmae; flavonoids; orthogonal test; extraction technology

三叶青 (Radix Tetrastigmae) 为葡萄科植物三叶崖爬藤 (*Tetastigma hemsleyanum* Diels et Gilg) 的干燥块根, 是我国特有植物。三叶青具有清热解毒、祛风化痰、活血止痛的功能, 临床用于治疗高热惊厥、腹痛、肺炎、哮喘、肝炎等症。其化学成分有黄酮及其苷、淀粉、还原糖、甾类化合物、氨基酸等^[1], 药理研究表明三叶青具有解热、镇痛、抗炎、抗病毒、保肝、增强免疫、抗肿瘤^[2-6]等作用。研究发现三叶青含黄酮 F 对流感病毒 PR3 株及仙台病毒有较强的抗病毒效果^[3], 三叶青黄酮具有抗肿瘤细胞增殖和诱导凋亡的作用^[7]。为有效开发和利用三叶青, 充分提取其中所含的黄酮类物质, 本实验采用正交试验法对其提取工艺进行了研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Spectrum lab 22PC 分光光度计; ABI04 - N 分析天平; HSW24 型电热恒温水浴锅; SENCO R 系列旋转蒸发器。

1.2 试剂

芦丁标准品 (100080 - 200306), 购自中国药品生物制品检定所; 无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝均为分析纯; 水为蒸馏水; 三叶青购自浙江省中医院中药房, 经浙江中医药大学资源鉴定教研室陈孔荣副教授鉴定为三叶青 Radix Tetrastigmae。

2 方法与结果

2.1 乙醇浓度的选择

精密称取三叶青粗粉 5.0 g, 加 8 倍量乙醇, 浸泡 1 h, 水浴回流提取 2 次, 每次 60 min, 合并提取液, 50% 乙醇定容至 100 mL 量瓶。精密吸取 1.0 mL 样品, 置 25 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇至 6.0 mL, 加 5% NaNO₂ 液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 10% Al(NO₃)₃ 试液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 10% NaOH 试液 10.0 mL, 加 50% 乙醇至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以相应试剂作空白, UV 测定黄酮含量。考察 20%, 40%, 60%, 80% 4 个乙醇浓度, 结果显示乙醇浓度为 60% 最佳。随后追加考察 50% 和 70% 2 个乙醇浓度, 结果浓度为 50%

的乙醇提取效率最高, 分别是 70%、80% 乙醇的 1.46 倍和 2.59 倍。

2.2 正交试验设计

参考有关文献并根据药材性质和生产实际要求, 选用 L₉(3⁴) 正交试验表安排试验。拟订影响浸出效果的 3 个因素, 即 A 为乙醇用量 (倍体积), B 为提取时间 (h), C 为提取次数, 每个因素选择 3 个水平, 确立因素水平表, 见表 1。

表 1 因素水平表

水平	因 素			
	A	B	C	D
	乙醇用量	提取时间 /h	提取次数	(空白)
1	8	1.0	1	-
2	12	1.5	2	-
3	15	2.0	3	-

2.3 样品提取

精密称取 5.0 g 三叶青干燥粗粉 9 份, 按正交设计表所列条件加入 50% 一定体积的乙醇, 在恒温水浴中回流提取一定时间后, 趁热过滤, 合并提取液, 回收乙醇, 收集至 100 mL 量瓶中, 用 50% 乙醇定容, 作为供试品溶液, 备用。

2.4 总黄酮含量测定

2.4.1 最大吸收波长选择 精密吸取三叶青样品 1.0 mL, 芦丁对照品液 1.0 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 照“2.1”项下操作, 于 Spectrum lab 22PC 分光光度计在波长 400 ~ 600 nm 之间进行扫描, 实验测定最大吸收波长, 结果两者最大吸收波长均为 500 nm, 故选 500 nm 为本次实验测定波长。

2.4.2 标准曲线的制作^[8] 精密称取经 120 °C 干燥至恒重的芦丁标准品 5.5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇适量, 使充分溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液 (每 1 mL 含芦丁标准品 0.2 mg)。精密量取对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 与 6.0 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 照“2.1”项下操作, 在 500 nm 处测定吸光度。以吸光度为横坐标, 对照品溶

液浓度为纵坐标绘制标准曲线,得回归线性方程 $C = 80.913A - 0.5614$, $r = 0.9999$,线性范围 $8.0696 \sim 48.4176 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4.3 样品中总黄酮的含量测定 精密吸取供试品溶液 1.0 mL 置 25 mL 量瓶中,照“2.1”项下操作,测定吸光度。由回归方程计算供试品溶液中总黄酮的含量。选择乙醇体积为误差项,结果进行直观分析和方差分析,见表 2,表 3。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验表及结果

Tab 2 $L_9(3^4)$ arrangement and the results of orthogonal test					总黄酮含量
序号	A	B	C	D	/mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	22.015 8
2	1	2	2	2	25.265 8
3	1	3	3	3	29.224 8
4	2	1	2	3	26.272 0
5	2	2	3	1	26.995 4
6	2	3	1	2	25.377 9
7	3	1	3	2	26.456 7
8	3	2	1	3	25.643 4
9	3	3	2	1	28.618 3
K1	25.502	24.915	24.346	25.877	
K2	26.215	25.968	26.719	25.700	
K3	26.906	27.740	27.559	27.047	
R	1.404	2.825	3.213	1.347	

表 3 方差分析表

Tab 3 Analysis of variance				
变异来源	偏差平方和	自由度	F 比	P
A	2.957	2	1.000	
B	12.233	2	4.137	0.05
C	16.662	2	5.635	0.05
误差	2.957	2		

由表 2,表 3 方可知,所考察的因素中,对三叶青总黄酮的提取影响程度为: $C > B > A$,但三个因素间无显著差异,说明溶剂体积、提取时间、提取次数对提取均无显著影响。根据实验结果确定三叶青总黄酮的最佳提取工艺为: $A_3 B_3 C_3$,即用 15 倍体积的 50%乙醇提取 3 次,每次 2 h。

2.5 方法学考察

2.5.1 仪器精密性试验 精密吸取供试品 0.5 mL 于 25 mL 量瓶中,照“2.1”项下操作,在 500 nm 处测定吸光度,重复测定 5 次,得 RSD 为 1.70%。

2.5.2 稳定性试验 取同一供试品 0.5 mL 于 25 mL 量瓶中,照“2.1”项下操作,在 500 nm 处测定吸光度,每 10 min 测定 1 次,40 min 内 RSD 为 4.04%,说明样品在 40 min 内稳定。

2.5.3 加样回收率试验 取已知含量的同一批供试品溶液 0.5 mL 6 份,分别加 0.6 mg 芦丁对照品,照“2.1”项下操作,测定结果并计算。回收率分别为 98.60%, 99.48%, 98.30%, 101.70%, 99.53%, 101.13%, RSD 1.36% ($n = 6$)。

2.5.4 最佳工艺的验证试验 为进一步考察优选工艺的可靠性及稳定性,取 5 份药材按上述最佳提取工艺进行验证试验,操作方法同前述,结果总黄酮含量分别为 29.522 7,

30.695 3, 31.008 8, 28.337 4, 32.021 9 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 平均含量 $30.317 2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 为 4.69%。

3 讨论

3.1 三叶青含有较多的淀粉、黏液质,过细的粉末在加热情况下容易使淀粉糊化,细胞内大量的黏液质渗出,不利于其他成分的浸出,因此本实验采用将其粉碎成粗粉,有利于提取和过滤。在提取过程中,发现提取液放冷后较黏稠,使得浓缩定容和吸取样品不易操作,造成了一定的测量误差。

3.2 本次实验考察了乙醇浓度的选择,结果显示乙醇浓度对三叶青总黄酮的提取影响较大,在相同的溶剂体积、提取时间和提取次数条件下,50%乙醇提取的总黄酮量分别是 70%、80%乙醇的 1.46 倍和 2.59 倍。

3.3 通过正交试验法对三叶青总黄酮的提取工艺进行了优化,正交结果分析后得到最佳因素水平为 $A_3 B_3 C_3$,即用 15 倍体积的 50%乙醇提取 3 次,每次 2 h。并按最佳进行了验证试验,测定的结果其平均值高于正交试验表中的任何一组,结果证明用该工艺提取三叶青总黄酮工艺简单、稳定性好。本次实验优选出来的实验条件,对今后开发利用三叶青中的总黄酮具有一定的指导意义。

REFERENCES

[1] Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. Traditional Chinese Medicine Will(The second volume) [中药志(第二册)] [M]. Beijing: People's Health Publisher, 1984: 219.

[2] HUANG ZH, MAO Q Q, WEI J P. Evaluation of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic actions for the extracts from Radix Tetrastigma[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2005, 14 (7): 861-864.

[3] YANG X L, LUO J, SUN S B, et al. Researches on anti-virus function of *Tetrastigma hemsleyanum* [J]. Hubei Tradit Chin Med (湖北中医杂志), 1989, (4): 40-41.

[4] ZHONG X M, MAO Q Q, HUANG ZH, et al. The protective effects of the extract from Radix Tetrastigmae on mice with CCl_4 acute liver damage and its acute toxicity testing [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2006, 28(3): 422-424.

[5] ZHONG X M, MAO Q Q, HUANG ZH, et al. The influence of the extracts of Radix Tetrastigmae on intestinal and systemic immune function[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2006, 29(9): 953-955.

[6] DING G Q, ZHENG J X, WEI K M, et al. Toxicological effects of the extract of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and primary rat hepatocytes *in vitro* [J]. Zhejiang J Prev Med(浙江预防医学), 2005, 17(9): 1-2, 5.

[7] FENG ZH Q, NIK F, HE Y, et al. Experimental study on effect of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg flavone on inducing apoptosis of SGC-7901 cell line *in vitro* [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2006, 11(6): 669-672.

[8] Ch. P(2005) VolII (中国药典 2005 年版, 二部) [S]. 2005: 247.

收稿日期: 2007-02-25