

正交试验优选血三七中槲皮素的提取工艺

彭艳红^{1*}, 刘新义², 李嫦玲¹(1. 益阳市第一中医医院, 湖南 益阳 413000; 2. 中南大学湘雅二医院, 长沙 410013)

中图分类号 R284.2; R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2538-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.15

摘要 目的: 优选血三七中槲皮素的提取工艺。方法: 以乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数为考察因素, 以槲皮素提取率为指标, 采用正交试验优选提取工艺。结果: 最佳提取工艺为用8倍量70%乙醇, 提取4次, 每次2 h。结论: 优选的工艺稳定、合理, 可用于血三七中槲皮素的提取。

关键词 血三七; 槲皮素; 正交试验; 提取工艺

Optimization of the Extraction Technology of Quercetin from *Polygonum amplexicaule* by Orthogonal Test

PENG Yan-hong¹, LIU Xin-yi², LI Chang-ling¹(1. Yiyang Municipal First Hospital of TCM, Hunan Yiyang 413000, China; 2. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of quercetin from *Polygonum amplexicaule*. METHODS: The extraction technology of quercetin from *P. amplexicaule* was optimized by orthogonal experiment using ethanol concentration, ethanol ratio, extracting time and extracting times as factors with the extraction rate of quercetin as index. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows: 8-folds of 70% ethanol, extracting for 4 times, 2 hours each time. CONCLUSIONS: The optimum technology is stable and feasible. It is suitable for the extraction of quercetin from *P. amplexicaule*.

KEY WORDS *Polygonum amplexicaule*; Quercetin; Orthogonal experiment; Extraction technology

血三七为蓼科植物中华抱茎蓼 *Polygonum amplexicaule* var. *sinense* 的根茎, 又称蓼子七、散血丹^[1-2], 具有活血通经的功效, 用于治疗胃痛、跌打损伤、骨折、劳伤腰痛、风湿疼痛等症^[3-4]。目前研究发现, 血三七中含有槲皮素、补骨脂内酯、白芷内酯、表儿茶素等多种化学成分^[5], 其中槲皮素具有抗肿瘤、抗炎、抗血小板聚集、抗氧化自由基、扩张血管等多种药理作用^[6]。因此, 笔者选择槲皮素作为指标成分, 采用正交试验优选血三七中槲皮素的提取工艺, 系统地考察提取过程中的乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间和提取次数等因素, 以为规范血三七的提取工艺提供理论依据, 进而为深入研究与利用血三七奠定理论基础。

1 材料

1.1 仪器

Aglient 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); FA1104 型电子分析天平(上海天普分析仪器有限公司); DZKW-S-4 型电热恒温水浴锅(湖南精密科学仪器设备有限公司)。

1.2 药材

血三七药材采自湖北恩施州利川市, 经中南大学药学院生药教研室鉴定为蓼科植物中华抱茎蓼的根茎。

1.3 试剂

槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100081-200406); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 槲皮素的含量测定

2.1.1 色谱条件^[7-8] 色谱柱: Diamonsil C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸水(40:60, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 368 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μl。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素对照品 10.1 mg, 置 100 ml 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取粉碎成细粉的血三七 10.0 g, 置于烧瓶中, 加入 70% 乙醇 300 ml, 回流提取 2 h, 提取液真空抽滤, 记录提取液体积。精密吸取滤液 50 ml, 转移至蒸发皿中水浴蒸干, 残渣用适量甲醇溶解并转移至 25 ml 量瓶中, 加甲醇定容, 从中再精密吸取 1 ml, 转移至 10 ml 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得。

2.1.4 系统适用性试验 分别吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μl, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件分析, 记录色谱图。结果, 槲皮素的保留时间约为 6.833 min, 其色谱峰与其他组分峰分离良好, 且峰形对称; 理论板数按槲皮素峰计算应为 3 000。色谱见图 1。

2.1.5 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 ml, 分别置 10 ml 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件进样 10 μl, 记录峰面积。以槲皮素质量浓度(x)对峰面积积分值(y)进行线性回归, 得回归方程为 $y = 4.287 \times 10^4 x - 57.9$ ($r = 0.999 8, n = 6$)。结果表明, 槲皮素质量浓度在 5~80 μg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.1.6 精密度试验 精密吸取质量浓度为 40 μg/ml 的槲皮素对照品溶液 10 μl, 按上述色谱条件连续 6 次进样测定。结果,

* 副主任中药师。研究方向: 中药的研究与检验。电话: 0737-4439108。E-mail: 870124004@qq.com

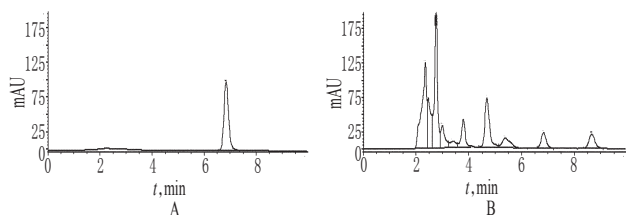


图1 高效液相色谱图

A. 槲皮素对照品; B. 供试品

Fig 1 HPLC chromatograms

A. quercetin control; B. test sample

RSD=1.09% (n=6), 表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液适量, 于室温下放置 3、6、9、12、15、18 h 后, 按上述色谱条件进样测定。结果, RSD=1.21% (n=6), 表明供试品溶液在 18 h 内基本稳定。

2.1.8 重复性试验 取血三七药材 10.0 g, 按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 照上述色谱条件进样测定。结果, RSD=1.35% (n=6), 表明方法重复性较好。

2.1.9 加样回收率试验 取血三七药材 10.0 g, 共 6 份, 分别精密加入相应含量的槲皮素对照品, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按上述色谱条件进样测定, 计算加样回收率。结果, 平均回收率为 99.15%, RSD=1.39% (n=6)。

2.2 正交试验优选提取工艺

2.2.1 因素水平的选择 根据预试验和笔者经验, 选取影响回流法提取的乙醇体积分数(A)、乙醇用量(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为考察因素, 选用 $L_9(3^4)$ 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

Tab 1 Factors and levels

| 水平 | 因素 | | | |
|----|------|------|------|------|
| | A, % | B, 倍 | C, h | D, 次 |
| 1 | 80 | 10 | 2.5 | 4 |
| 2 | 70 | 8 | 2.0 | 3 |
| 3 | 60 | 6 | 1.5 | 2 |

2.2.2 试验结果与分析 取血三七药材 10.0 g, 参照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按设定方案进行提取, 滤过, 再照上述色谱条件测定供试品溶液中槲皮素含量, 并计算药材中槲皮素提取率(槲皮素提取率=槲皮素含量×体积×稀释倍数/药材质量×100%)。试验重复 2 次, 取平均值。正交试验结果见表 2; 方差分析结果见表 3。

由表 2、表 3 可知, 各因素对槲皮素提取工艺的影响程度依次为 A>B>C>D, 即乙醇体积分数>乙醇用量>提取时间>提取次数。由此得最佳提取工艺为 $A_2B_2C_2D_1$, 即乙醇体积分数为 70%, 加入 8 倍量乙醇, 提取时间为 2 h, 提取次数为 4 次。

2.3 工艺验证试验

称取 3 份血三七药材, 各 10.0 g, 按上述优选的最佳工艺进行提取, 照上述色谱条件进样测定, 计算槲皮素提取率。结果, 槲皮素的平均提取率为 0.73%, RSD=1.28% (n=3), 表明所选工艺合理、稳定、可行。

表 2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal experiments

| 试验号 | 因素 | | | | 槲皮素提取率, % |
|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| | A | B | C | D | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.62 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0.66 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 0.61 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 0.70 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 0.73 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 0.66 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 0.61 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 0.63 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0.60 |
| K_1 | 1.890 | 1.930 | 1.910 | 1.950 | |
| K_2 | 2.090 | 2.020 | 1.960 | 1.930 | |
| K_3 | 1.840 | 1.870 | 1.950 | 1.940 | |
| R | 0.250 | 0.150 | 0.050 | 0.020 | |

表 3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

| 方差来源 | 离差平方和 | 自由度 | 均方 | F | P |
|------|----------------------|-----|----------------------|-----|-------|
| A | 0.011 7 | 2 | 0.005 8 | 175 | <0.01 |
| B | 0.003 8 | 2 | 0.001 9 | 57 | <0.05 |
| C | 0.000 5 | 2 | 0.000 2 | 7 | |
| D | 6.6×10^{-5} | 2 | 3.3×10^{-5} | 3 | |

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

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

3 讨论

槲皮素属于黄酮类化合物, 常采用甲醇、乙醇、热水为溶媒进行提取。笔者在预试验中比较了甲醇、乙醇、热水作为溶剂的提取率, 结果为乙醇>甲醇>热水, 故选用乙醇作为血三七中槲皮素的提取溶媒, 且能适合工业化生产的需要。

参考文献

- [1] 方志先, 胡淑玲, 雷永恕. 鄂西药物志: 第 1 册[M]. 武汉: 湖北民族出版社, 1998: 338.
- [2] 恩施地区中草药研究小组. 恩施中草药手册[M]. 武汉: 湖北省新生印刷厂, 1970: 454.
- [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.
- [4] 向梅先, 苏汉文, 严子焱, 等. 血三七有效部位抗真菌活性的初步研究[J]. 中药材, 2010, 33(9): 1 463.
- [5] 任恒春, 万定荣, 邹忠梅. 血三七化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(2): 183.
- [6] 王艳芳, 王新华, 朱宇同. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(2): 171.
- [7] 王义潮, 李多伟, 任静, 等. 反相高效液相色谱法测定苹果渣中槲皮素含量的方法研究[J]. 西北大学学报, 2006, 36(4): 607.
- [8] 李元宏, 杨务彬, 兰鸿. HPLC 法测定杠板归不同药用部位槲皮素的含量[J]. 中国药房, 2011, 22(39): 3 714.

(收稿日期: 2012-07-30 修回日期: 2012-10-14)