

藤三七总皂苷和总黄酮提取工艺优选

蒋珍藕^{1*}, 邱宏聪^{1,2}, 邓聿胤¹

(1. 广西中医药研究院, 南宁 530022; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022)

[摘要] 目的: 优选藤三七总皂苷和总黄酮的提取工艺。方法: 采用 UV 测定总皂苷和总黄酮含量。以总皂苷和总黄酮提取量为指标, 采用单因素试验考察提取次数, 正交试验考察乙醇体积分数、提取时间及乙醇用量对藤三七中总皂苷和总黄酮提取工艺的影响。结果: 藤三七中总皂苷和总黄酮的最佳提取工艺为加 12 倍量 75% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 总皂苷、总黄酮平均提取量分别为 16.23, 46.40 mg·g⁻¹。结论: 优选的提取工艺合理可行。

[关键词] 藤三七; 总皂苷; 总黄酮; 提取工艺

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0028-03

[doi] 10.11653/syjf2013190028

Optimization of Extraction Technology of Total Saponins and Total Flavonoids from *Anredera cordifolia*

JIANG Zhen-ou^{1*}, QIU Hong-cong^{1,2}, DENG Yu-yin¹

(1. Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China;
2. Guangxi Key Laboratory of Quality Standards of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530022, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total saponins and total flavonoids from *Anredera cordifolia*. **Method:** The contents of total saponins and total flavonoids were determined by UV. With extraction amounts of total saponins and total flavonoids as indexes, extraction times was investigated by single factor test, effects of ethanol concentration, extraction time and ethanol amount on extraction technology of total saponins and total flavonoids were investigated by orthogonal design. **Result:** The best extraction conditions for total saponins and total flavonoids from *A. cordifolia* was as following: extracted 2 times with 12-fold the amount of 75% ethanol, 2 h per time; Average extraction volume of total saponins and total flavonoids were 16.23, 46.40 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** Optimized extraction process was reasonable and feasible.

[Key words] *Anredera cordifolia*; total saponins; total flavonoids; extraction technology

藤三七为药食同源植物, 具有滋补强壮、活血化瘀、通脉止痛、降脂降血压的功效, 常用于治疗腰膝痹痛、病后体弱、跌打损伤、高脂血症等症^[1-2]。药理研究表明藤三七具有降血糖^[3]、抗脂质过氧化^[4]、抗菌消炎^[5-6]、抗 HIV^[7] 等活性, 主要成分为皂苷类和黄酮类化合物^[7-8]。本实验以总皂苷和总

黄酮含量为考核指标, 优选藤三七总皂苷和总黄酮的提取工艺, 为分离、纯化总皂苷和总黄酮有效部位提供实验基础。

1 材料

UV2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司), AEL-200 型电子天平(日本岛津公司)。齐墩果酸、芦丁对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110709-200505, 080-9002), 水为蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。藤三七采自南宁市马山县郊区, 经广西中医药研究院饶伟源副主任中药师鉴定为落葵科植物落葵薯 *Anredera cordifolia* (Tenore) Sreenis 的地上部分, 在自然通风条件下阴干, 粉碎备用。

[收稿日期] 20130524(003)

[基金项目] 广西医疗卫生重点科研课题(重 2010112)

[通讯作者] * 蒋珍藕, 硕士, 副主任中药师, 从事中草药开发研究, Tel: 0771-5868275, E-mail: zhenoujiang@163.com

2 方法和结果

2.1 总皂苷的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取齐墩果酸对照品适量,加 95% 乙醇制成 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取藤三七药材粗粉 0.5 g ,精密称定,精密加入 95% 乙醇 50 mL ,称定质量,超声处理(80 W, 50 kHz, 下同) 60 min ,放冷,称定质量,用 95% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 检测波长的选择^[9-10] 取齐墩果酸对照品溶液及供试品溶液各适量,分别置于 10 mL 具塞比色管中,于 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中挥去溶剂,加 5% 香草醛-冰醋酸 0.30 mL 和高氯酸 0.80 mL ,摇匀,于 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中保温 15 min ,取出,冰浴中冷却 5 min ,加冰醋酸至 5 mL ,摇匀,以试剂为空白参比液,于 $400 \sim 800 \text{ nm}$ 进行扫描,显示对照品溶液及供试品溶液均在 539 nm 处有最大吸收,且试剂无干扰。

2.1.4 线性关系考察 精密称取齐墩果酸对照品 10.8 mg ,置 50 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为贮备液。精密量取贮备液 $0.1, 0.3, 0.6, 1, 2, 3 \text{ mL}$,分别置 10 mL 具塞比色管中,以试剂为空白参比液,按 2.1.3 项下方法处理,测定吸光度(A),以齐墩果酸质量浓度为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $A = 0.026 1C + 0.016 3$ ($r = 0.999 5$),齐墩果酸在 $2.16 \sim 64.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 取同一供试品溶液,连续测定 6 次,结果 A 的 RSD 0.95% 。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后 $0, 15, 30, 40, 50, 60 \text{ min}$ 测定,结果 A 的 RSD 1.63% ,表明供试品溶液在 1 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批样品平行制备 6 份供试品溶液,结果总皂苷平均质量分数 $16.82 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.82% 。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取已知总皂苷含量 ($16.82 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 的同批样品约 0.25 g ,共 6 份,分别精密加入齐墩果酸对照品适量,按 2.1.2 和 2.1.3 项下方法处理,测定 A ,计算平均回收率 99.58% , RSD 1.74% 。

2.2 总黄酮的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品适量,加 75% 乙醇制成 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取藤三七药材粗粉

0.5 g ,精密称定,精密加入 75% 乙醇 25 mL ,称定质量,超声处理 60 min ,放冷,称定质量,用 75% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 检测波长的选择^[11] 取芦丁对照品溶液及供试品溶液各适量,分别置于 25 mL 量瓶中,加 75% 乙醇 5 mL ,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL ,摇匀,放置 6 min ;加 10% 硝酸铝溶液 1 mL ,摇匀,放置 6 min ;加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠试液 10 mL ,加 75% 乙醇至刻度,摇匀,放置 15 min 。以试剂为空白参比液,于 $400 \sim 800 \text{ nm}$ 进行扫描,结果对照品溶液及供试品溶液均在 512 nm 处有最大吸收。

2.2.4 线性关系考察 精密称取芦丁对照品 12.4 mg ,置 25 mL 量瓶中,加 75% 乙醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为贮备液。精密量取贮备液 $0.5, 1, 2, 4, 6, 8 \text{ mL}$,分别置于 25 mL 量瓶中,以试剂为空白参比液,按 2.2.3 项下方法处理,测定 A ,以芦丁质量浓度为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $A = 0.002 4 + 0.008 8C$ ($r = 0.999 4$),芦丁在 $9.92 \sim 158.72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密量取同一供试品溶液,连续测定 6 次,结果 A 的 RSD 0.94% 。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 $0, 10, 15, 20, 25, 30 \text{ min}$ 测定 A ,结果 RSD 1.08% ,表明供试品溶液在 0.5 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 称取同一批样品,按 2.2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液,测定 A ,计算总黄酮质量分数 $51.36 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.71% 。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已知总黄酮含量 ($51.36 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 的同批样品 6 份,每份约 0.25 g ,分别精密加入芦丁对照品适量,按 2.2.2 和 2.2.3 项下方法处理,测定 A ,计算平均回收率 98.66% , RSD 1.77% 。

2.3 提取工艺优选

2.3.1 提取次数考察 称取藤三七粗粉 5 g ,平行 3 份,分别加 10 倍量 75% 乙醇回流提取 $1, 2, 3$ 次,每次 2 h ,回收乙醇,浓缩至稠膏,真空干燥,加适量淀粉定量至 5 g ,混匀,测定总皂苷提取量分别为 $9.47, 15.82, 16.26 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,总黄酮提取量分别为 $28.85, 46.42, 47.58 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,综合工业生产实际,确定提取数 2 次。

2.3.2 正交试验 在单因素试验基础上,选取乙醇体积分数、提取时间、乙醇用量为考察因素,每个因素选取 3 个水平,因素水平见表 1,称取藤三七粗粉 9 份,每份 5 g ,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,确定提取

2 次,合并提取液,回收乙醇浓缩至稠膏,真空干燥,加适量淀粉定量至 5 g,混匀,测定总皂苷和总黄酮含量,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 藤三七乙醇回流提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数 /%	B 提取时间 /h	C 乙醇用量 /倍
1	50	1	8
2	75	2	10
3	95	3	12

表 2 藤三七乙醇回流提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D (空白)	总皂苷 /mg·g ⁻¹	总黄酮 /mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	3.84	18.7
2	1	2	2	2	9.74	28.9
3	1	3	3	3	10.32	31.4
4	2	1	2	3	14.44	43.8
5	2	2	3	1	16.24	45.5
6	2	3	1	2	13.10	32.7
7	3	1	3	2	12.04	27.5
8	3	2	1	3	13.34	32.4
9	3	3	2	1	13.78	33.2
总皂苷						
K ₁	23.90	30.32	30.28	33.86		
K ₂	43.78	39.32	37.96	34.88		
K ₃	39.16	37.20	38.60	38.10		
R	6.63	3.00	2.77	1.41		
总黄酮						
K ₁	79.00	90.00	83.80	97.40		
K ₂	122.00	106.80	105.90	89.10		
K ₃	93.10	97.30	104.40	107.60		
R	14.30	5.60	7.40	6.20		

表 3 方差分析

成分	方差来源	SS	f	MS	F	P
总皂苷	A	72.16	2	36.08	22.10	<0.05
	B	14.76	2	7.38	4.52	>0.05
	C	14.29	2	7.15	4.38	>0.05
	D(误差)	3.27	2	1.63		
	总黄酮	A	320.34	2	160.17	5.59
	B	47.31	2	23.65	0.83	>0.05
	C	101.67	2	50.83	1.78	>0.05
	D(误差)	57.24	2	28.62		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,影响藤三七总皂苷提取的因素主次顺序为 $A > B > C$,方差分析表明 A 因素影响具有显著性,最佳工艺条件为 $A_2B_2C_3$ 。影响藤三七总黄酮提取的因素主次顺序为 $A > C > B$,方差分析表明各因素均无显著性影响,最佳工艺条件为 $A_2B_2C_2$ 。综合考虑,确定藤三七总皂苷和总黄酮的最佳提取方案为 $A_2B_2C_3$,即加 12 倍量 75% 乙醇回

流提取 2 次,每次 2 h。

2.4 验证试验 称取藤三七粗粉 5 g,平行 3 份,按优选的工艺进行提取,结果总皂苷提取量分别为 16.34,15.87,16.47 mg·g⁻¹,总黄酮提取量分别为 46.31,45.76,47.12 mg·g⁻¹,表明优选的工艺条件稳定可行。

3 讨论

曾尝试用水提取皂苷类和黄酮类成分,但藤三七含有较多黏液质,导致过滤极困难,且影响皂苷类和黄酮类成分的提取和分离,故选取乙醇为提取溶剂。加热回流法的提取效果较佳,所用设备较简单,易开展较大规模的工业生产,故选择回流提取法。优化的工艺可同时提取藤三七总皂苷和总黄酮,且简便、耗能低、稳定可行,可用于工业化生产。

[参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第 26 卷[M]. 北京:科学出版社,1996:46.

[2] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草. 第 2 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:760.

[3] LIN H Y. Studies on the chemical constituents and antihyperglycemic effect of *Boussingaultia gracilis* [C]. Taichung:China Medical College,1986.

[4] 仇洁,周永标,谭玉兰,等. 落葵薯提取物清除氧自由基及抗脂质过氧化作用[J]. 中药材,2004,27(8):608.

[5] Tshikange T E, Meyerj J M, Hussein A A. Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases[J]. J Ethnopharmacol,2005,96(3):515.

[6] 刘佳,陈晓辉,钱忠直,等. RP-HPLC 法测定藤三七不同部位中腺苷的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2009,26(9):724.

[7] LIN H Y, KUO S C, Lee Chao P D, et al. A new sapogenin from *Boussingaultia gracilis* [J]. J Nat Prod, 1988,51(4):797.

[8] 顾琼,马云保,张雪梅,等. 藤三七中一个新黄烷醇和抗 HIV 活性成分[J]. 高等学校化学学报,2007,28(8):1508.

[9] 盛继文,刘冬梅,李耀辉,等. 东北山梅花根总皂苷提取工艺及抗炎活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):24.

[10] 王巍,鞠成国,刘威,等. 急性子中总皂苷的含量测定[J]. 光谱实验室,2011,28(6):3029.

[11] 谢臻,陈勇,曾海生,等. 星点设计-响应面法优选地桃花中总黄酮的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):27.

[责任编辑 全燕]