

大叶紫珠总黄酮的提取工艺优选及其抗炎、镇痛及止血作用考察

余行,徐诗强,马冬晴,胡霞敏*
(武汉科技大学,武汉 430065)

[摘要] **目的:** 优选大叶紫珠总黄酮的提取工艺并评价其抗炎、镇痛、止血作用。**方法:** 以总黄酮提取率为指标,在单因素试验基础上,采用正交试验考察乙醇体积分数、提取次数、提取时间及料液比对大叶紫珠总黄酮提取工艺的影响;通过二甲苯致耳肿胀法、醋酸扭体法、毛细玻管法依次评价大叶紫珠总黄酮的抗炎、镇痛、止血作用。**结果:** 最佳提取工艺为加 20 倍量 90% 乙醇于 80 ℃ 回流 2 次,每次 2 h,总黄酮提取率 63.1 g·kg⁻¹。大叶紫珠总黄酮提取物经 SP825 型大孔吸附树脂和聚酰胺树脂纯化后,总黄酮纯度达 53.3%。动物试验表明中、高剂量的大叶紫珠总黄酮表现出明显的抗炎、镇痛及止血作用,低剂量时仅表现出镇痛作用。**结论:** 优选的工艺能达到富集有效成分的目的,大叶紫珠总黄酮具有抗炎镇痛止血作用,且呈剂量相关性。

[关键词] 大叶紫珠; 总黄酮; 提取; 纯化; 抗炎; 镇痛; 止血

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0008-04

[doi] 10.11653/syfy2013120008

Optimization of Extraction Technology and Investigation of Anti-inflammatory, Antalgic and Hemostatic Activities of Total Flavonoids from *Callicarpa macrophylla*

YU Xing, XU Shi-qiang, MA Dong-qing, HU Xia-min*
(Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of total flavonoids from *Callicarpa macrophylla* (TFCM) and estimate its anti-inflammatory, antalgic and hemostatic activities. **Method:** With yield of total flavonoids as index, on the basis of single factor test, effect of the concentration of ethanol, liquid-solid ratio, extraction times and time on extraction technology of TFCM; Anti-inflammatory, antalgic and hemostatic activities of TFCM were evaluated by xylene-induced ear edema, acetic acid-induced writhing, glass capillary tube method in mice, respectively. **Result:** Optimal extraction parameters of TFCM were ethanol concentration 90%, ratio of solid to liquid 1:20, extraction temperature 80 ℃, extracted 2 times with 2 h per time. Under these conditions, yield of TFCM was 63.1 g·kg⁻¹. After purified by macroporous resin and polyamide resin, purity of TFCM was up to 53.3%. TFCM displayed potent anti-inflammatory, antinociceptive activity and significantly shortened the blood coagulation time in mice at the dose of 200 and 400 mg·kg⁻¹, but TFCM merely exhibited antalgic activity at the dose of 100 mg·kg⁻¹. **Conclusion:** Optimized process could achieve purpose of enrichment of active ingredients, TFCM possessed significant anti-inflammatory, antalgic and hemostatic activities with dose-related.

[收稿日期] 20121206(017)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑项目(2006BAI06A19)

[第一作者] 余行, 硕士, 从事神经药理研究, Tel:15527001527, E-mail:yuxing_wust@163.com

[通讯作者] *胡霞敏, 博士, 教授, 从事细胞损伤的分子机制研究, Tel:027-68893640, E-mail:huxiamin@wust.edu.cn

[Key words] *Callicarpa macrophylla*; total flavonoids; extraction; purification; anti-inflammation; analgesia; hemostasis

大叶紫珠具有收敛止血、清热解毒的功效,可用于治疗各种内外出血症,对肺胃之出血尤为多用,还可治疗烧烫伤及热毒疮痍。该植物在民间主要用于治疗偏头风痛、吐血、跌打肿痛、外伤出血等^[1]。现代药理学研究表明大叶紫珠具有抗炎、抗脂质过氧化、抗菌、抗病毒、神经保护和镇痛等作用^[2-5]。其药理活性成分包括黄酮类、萜类、挥发油、脂肪酸、氨基酸、甾醇等^[6]。通过成分分析可知,大叶紫珠中总黄酮含量较高,主要有5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲基黄酮、5,4'-二羟基-3,7-二甲基黄酮、槲皮素及槲皮素-7-O-L-葡萄糖苷^[7-8]。目前国内外对大叶紫珠总黄酮(TFCM)的研究较少,本试验在单因素试验基础上,采用正交试验优选其提取工艺,用大孔吸附树脂和聚酰胺树脂进行纯化,并考察TFCM的抗炎、镇痛、止血作用,为大叶紫珠总黄酮的开发利用提供实验依据。

1 材料

TU-1900型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

SP825型大孔吸附树脂(北京绿百草科技发展有限公司),聚酰胺柱色谱树脂(浙江省台州市路桥四甲厂),芦丁对照品(批号100080-200707,中国药品生物制品检定所),阿司匹林肠溶片(批号1001181,神威药业有限公司),云南白药粉(批号20100304,云南白药集团股份有限公司),试剂均为国产分析纯。

大叶紫珠叶由广西万寿药业有限公司提供,经武汉科技大学生药系张永忠教授鉴定为马鞭草科植物大叶紫珠 *Callicarpa macrophylla* Vahl. 的干燥叶。用食品粉碎机粉碎后过40目筛,装瓶备用。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定

采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 法测定。取干燥至恒重的芦丁对照品30 mg,精密称定,用70%乙醇溶解并定容至100 mL,摇匀,得储备液。精密量取该储备液1,2,3,4,5,6 mL,分别置于25 mL棕色量瓶中,各加入5% NaNO_2 溶液1 mL,摇匀放置6 min后,加10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液1 mL,摇匀放置6 min,加入4% NaOH 10 mL,用70%乙醇定容,摇匀,放置15 min后于510 nm处测定吸光度(A)。以A为纵坐标,质量浓度为横坐标,得标准曲线 $Y = 10.405X + 0.0123$

($r = 0.9997$),表明芦丁在 $0.00265 \sim 0.0265 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.2 提取工艺优选

2.2.1 单因素试验考察

准确称取大叶紫珠叶粉末2.0 g置于250 mL磨口圆底烧瓶中,于不同条件下提取。

2.2.1.1 乙醇体积分数

固定提取温度80℃,料液比1:20,提取时间1 h,浸提1次,分别考察体积分数为45%,60%,75%,90%,100%的乙醇溶液对提取工艺的影响。结果总黄酮提取率分别为54.9,57.4,65.5,69.7,63.7 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,故选择90%乙醇。

2.2.1.2 提取温度

固定料液比1:20,提取时间1 h,用70%乙醇浸提1次,考察提取温度为60,70,80,90,100℃对TFCM提取工艺的影响。结果测得总黄酮提取率分别为51.34,55.32,58.42,58.99,50.91 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,推测温度太高会使黄酮类成分发生氧化,同时杂质溶出增多、能耗增加,故温度选择80℃为宜。

2.2.1.3 料液比

固定乙醇体积分数70%,提取温度80℃,提取时间1 h,浸提1次,考察料液比为1:10,1:15,1:20,1:30对TFCM提取工艺的影响。结果总黄酮提取率分别为41.3,49.3,61.5,63.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,故选择料液比1:20。

2.2.1.4 提取时间

固定乙醇体积分数70%,提取温度80℃,料液比1:20,浸提1次,分别提取0.5,1,1.5,2,2.5 h,测定总黄酮提取率分别为44.06,55.33,62.03,70.16,72.12 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,故提取时间宜控制在2 h内。

2.2.1.5 提取次数

固定乙醇体积分数70%,提取温度80℃,料液比1:20,提取时间1 h,分别提取1,2,3次,测定总黄酮提取率分别为62.3,70.81,72.18 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,故选择浸提2次。

2.2.2 正交试验

在单因素试验基础上,选定乙醇体积分数、提取次数、提取时间、料液比为考察因素,以总黄酮提取率为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,因素水平见表1,试验安排及结果见表2。

由表2可知,各因素对TFCM提取量的影响顺序为 $D > B > A > C$,确定TFCM最佳工艺为 $A_3B_2C_3D_3$,即乙醇体积分数90%,提取2次,提取时间2 h,料液比1:20。按该工艺进行提取,结果TFCM提取率达63.1 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

表 1 大叶紫珠总黄酮醇提工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数 /%	B 提取数 /次	C 提取时间 /h	D 料液比 /g·mL ⁻¹
1	60	1	1	1:10
2	75	2	1.5	1:15
3	90	3	2	1:20

表 2 大叶紫珠总黄酮醇提工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	总黄酮提 取率/g·kg ⁻¹
1	1	1	1	1	12.68
2	1	2	2	2	37.38
3	1	3	3	3	43.54
4	2	1	2	3	32.60
5	2	2	3	1	28.62
6	2	3	1	2	32.82
7	3	1	3	2	33.76
8	3	2	1	3	50.15
9	3	3	2	1	32.29
K ₁	31.20	26.35	31.88	24.53	
K ₂	31.35	38.72	34.09	34.65	
K ₃	38.73	36.22	35.31	42.10	
R	7.53	12.37	3.43	17.57	

2.3 纯化工艺 将醇提取液浓缩,浓缩液静置过夜,取上层溶液过 SP825 型大孔吸附树脂柱^[9],用去离子水洗脱去除水溶性杂质,再依次用体积分数为 10%,60%,95% 的乙醇溶液梯度洗脱,取 60% 乙醇洗脱液浓缩,用正丁醇萃取,正丁醇萃取部分上聚酰胺树脂柱^[10],依次用水、50% 乙醇、95% 乙醇洗脱,取 50% 乙醇洗脱液浓缩精制得 TFCM (纯度 53.3%)。

2.4 药理作用考察

2.4.1 抗炎作用^[11] 采用二甲苯致小鼠耳肿胀法。取雄性昆明种小鼠 60 只,随机等分成 5 组。TFCM (纯度 53.3%) 给药组分低、中、高剂量组 (100,200,400 mg·kg⁻¹,以水为溶剂),阳性对照组 (阿司匹林 200 mg·kg⁻¹,以水为溶剂),模型对照组给予等量生理盐水。所有小鼠均每天灌胃给药 1 次,连续给药 3 d,末次给药后 1 h 于小鼠左耳涂二甲苯 30 μL/只,右耳作正常对照。30 min 后断头处死小鼠,沿耳廓基线剪下两耳,用打孔器于两耳同一部位打下 8 mm 圆片,即时称定质量,以左右耳片的

质量差作为肿胀度。与模型对照组比较,进行 *t* 检验,计算肿胀度和肿胀抑制率,见表 3。结果显示,TFCM 的中、高剂量组显著抑制小鼠耳肿胀度,且高剂量组抑制小鼠耳肿胀度作用明显优于阿司匹林,说明 TFCM 对于急性炎症反应具有较强的抑制作用。

$$\text{肿胀度} = \text{右耳廓质量} - \text{左耳廓质量};$$

$$\text{肿胀抑制率} = (\text{模型对照组肿胀度} - \text{给药组肿胀度}) / \text{模型对照组肿胀度} \times 100\%$$

表 3 大叶紫珠总黄酮对二甲苯致小鼠耳肿胀和冰乙酸诱发小鼠扭体次数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	肿胀度 /mg	抑制率 /%	扭体数 /次
模型对照	-	15.4 ± 3.13	-	32.3 ± 3.2
阿司匹林	200	11.8 ± 1.81 ²⁾	23.38	3.8 ± 2.4 ²⁾
TFCM	100	13.6 ± 2.01	11.69	19.5 ± 3.4 ¹⁾
	200	12.2 ± 3.61 ¹⁾	20.78	8.7 ± 3.9 ¹⁾
	400	7.8 ± 3.30 ^{2,3)}	49.35	4.7 ± 3.6 ²⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01; 与阿司匹林组比较³⁾ *P* < 0.01。

2.4.2 镇痛作用^[12] 采用醋酸扭体法。昆明种小鼠 60 只,雌雄兼用,按 2.4.1 项下方法分组和给药,末次注射给药 30 min 后,各组小鼠按 20 mL·kg⁻¹ 腹腔注射 0.6% 乙酸溶液,观察记录注射后 15 min 内各小鼠的扭体次数,与模型对照组比较,进行 *t* 检验,结果见表 3,说明 TFCM 各剂量组均能明显抑制冰乙酸诱发的小鼠扭体次数,且呈剂量依赖性。

2.4.3 止血作用^[13] 采用毛细玻璃管法。昆明种小鼠 60 只,雌雄兼用。除阳性对照药改为云南白药粉 (800 mg·kg⁻¹,灌胃给药) 外,其余分组和给药同 2.4.1 项下,末次灌胃给药后 30 min,用内径 0.5 mm 的毛细玻璃管插入小鼠内眦球后静脉丛取血,达 5 cm 血柱。每隔 10 s 折断毛细玻璃管一小截,检查有无血凝丝出现,结果空白对照组,云南白药组及 TFCM 低、中、高剂量组的凝血时间分别为 (144 ± 19.55), (89 ± 20.79), (132 ± 28.60), (122 ± 18.14), (74 ± 26.33) s。其中与空白对照组比较,TFCM 低剂量组止血作用不明显,中剂量组能缩短凝血时间 (*P* < 0.05),云南白药组凝血时间明显缩短 (*P* < 0.01),TFCM 高剂量组能明显缩短凝血时间 (*P* < 0.01) 并且止血效果优于云南白药 (*P* < 0.05)。

3 讨论

试验表明醇提-大孔树脂-聚酰胺吸附法的提取、纯化工艺能大幅度提高 TFCM 含量且达到富集 TFCM 的目的,为进一步制备具有开发价值的大叶紫珠总黄酮制剂提供实验依据。药理作用显示中、高剂量 TFCM 具有明显的抗炎、镇痛及止血作用,并呈一定的量效关系。其抗炎作用可能与抑制的炎症早期反应(毛细血管扩张和通透性增加)有关;止血机制可能为升高血小板,使出血时间、血块收缩时间和凝血酶原时间均缩短,同时抑制纤溶系统。但 TFCM 镇痛作用机制尚不明确,还需作进一步研究。

[参考文献]

[1] 颜冬兰,刘珊珊,宁云山.紫珠属植物化学药理及临床应用进展[J].中成药,2008,30(9):1361.

[2] 黄夏琴,蒋惠娣,徐庆,等.紫珠草抗脂质过氧化作用的实验研究[J].中草药,1998,29(4):246.

[3] 李德英,袁惠德.华紫珠和杜虹花的成分、毒性与抑菌作用比较[J].现代应用药学,1992,9(1):13.

[4] Koo K A, Kim S H, Oh T H. Acteoside and its aglycones protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity [J]. Life Sci, 2006,79(7):709.

[5] 任风芝,牛桂云,栾新慧,等.紫珠叶化学成分的镇痛活性研究[J].天然产物研究与开发,2003,15

(2):155.

[6] 仲浩,薛晓霞,姚庆强.紫珠属植物的化学成分与药理作用[J].国外医药:植物药分册,2007,22(1):18.

[7] Subramanian S S, Nair AGR, Vedantham TNC. Terpenoids and flavones of *Callicarpa macrophylla* and *C. longifolia*[J]. Phytochem, 1974,13(1):306.

[8] Talapatra S K, Polley M, Talapatra B. Calliphyllin, a new diterpene from the leaves of *Callicarpa macrophylla* [J]. J Indian Chem Soc, 1994, 71(52):527.

[9] 裴丹,赵明,欧阳臻,等.龙柴方中黄芩、垂盆草总黄酮的提取纯化工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(4):59.

[10] 蔡凌云,黎云祥,石凤湘,等.白筋叶总黄酮的聚酰胺树脂纯化工艺[J].时珍国医国药,2011,22(4):926.

[11] 曹亮,李娜,姜雅琼,等.胆木叶提取部位群的抗炎镇痛作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(24):124.

[12] 廖晓燕,陈良俊,阮晓琪,等.葱汁的镇痛抗炎止血作用[J].武汉大学学报,2006,27(4):474.

[13] 胡颖,罗俊,李玲,黄能慧.妇科再造丸镇痛、抗炎、止血作用的实验研究[J].贵阳医学院学报,2005,30(5):406.

[责任编辑 仝燕]

欢迎订阅 2013 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于1995年10月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、信息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16开本,350页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价35元,全年840元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街16号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfjx_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。