

加味桑葛汤总黄酮提取工艺优化研究

曾玲¹ 穆杰² 宋虹霏² 雷娜³ 周子力¹ (通讯作者)

1.四川省第二中医医院 四川 成都 610031

2.成都中医药大学 四川 成都 611137

3.重庆市中医院 重庆 400013

【摘要】：目的：优化防治非酒精性脂肪性肝病的有效处方加味桑葛汤总黄酮的提取工艺。方法：以芦丁为对照品，采用紫外分光光度法，探究乙醇浓度、液料比、提取时间、提取次数对加味桑葛汤总黄酮提取率的影响，在单因素实验的基础上进一步采用正交实验优化提取工艺。结果：各因素影响顺序为乙醇浓度>液料比>提取时间>提取次数，最佳提取工艺为60%乙醇，液料比1:40 (g/mL)，提取时间1.5h，提取1次；此条件下总黄酮提取率平均值为7.69%，RSD=1.25% (n=5)。结论：优选出的最佳提取工艺稳定、准确、合理，可为加味桑葛汤的制剂繁育提供科学依据。

【关键词】：加味桑葛汤；总黄酮；正交设计；提取工艺

DOI:10.12417/2811-051X.26.09.007

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的全球患病率高达 25.24%^[1]，我国 NAFLD 的流行率为 29.81%^[2]，可见 NAFLD 已成为全球主要的公共卫生问题之一^[3]。然其复杂的网络病理机制导致目前还没有 FAD 批准的特效药^[4]，而中医药具有多靶点、多途径作用的优势^[5]，在 NAFLD 的临床治疗中具有巨大的潜力^[6,7]。

加味桑葛汤由桑叶、葛花、金银花、沙棘、银杏叶、赶黄草组成。临床治疗 NAFLD 有效。前期网络药理学提示黄酮类化合物为核心有效组分。本实验聚焦加味桑葛汤黄酮类化合物，采用乙醇回流提取，紫外分光光度法，以芦丁为对照，以总黄酮提取率为考察指标，在对乙醇浓度、液料比、提取时间、提取次数进行单因素实验的基础上^[8]，进一步采用正交实验优化提取工艺，为加味桑葛汤的制剂繁育及临床推广提供有力的科学依据。

1 实验材料

1.1 仪器

Molecular Devices 酶标仪 (SpectraMax ABS Plus), Sartorius Germany 电子天平 (GL323-1SCN)，智能型电热恒温鼓风干燥箱，ZNHW 数显电热套。

1.2 药品与试剂

桑叶 (批号 210901)、葛花 (20110103)、金银花 (210301)、沙棘 (20100203)、银杏叶 (210501)、赶黄草 (20110101)，均由四川博医堂大药房零售连锁有限公司提供。无水乙醇

(AR, 2022011302)，硝酸铝 (2021090803)，亚硝酸钠 (2021032401)，氢氧化钠 (2021070101)，均由成都市科隆化学用品有限公司提供。芦丁对照品 (UV 级，成都曼斯特生物科技有限公司，批号：MUST-21012102)。

2 方法与结果

2.1 芦丁对照品溶液的制备

精密称取 5mg 芦丁，置于 25mL 量瓶，加无水乙醇定容，得 0.2mg/mL 对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取加味桑葛汤粗粉 5g，置于圆底烧瓶中，按要求回流提取，过滤，合并滤液备用。

2.3 芦丁标准曲线的绘制^[9]

分别精密吸取对照品 0、0.25、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00mL 于 10mL 容量瓶，加 5% NaNO₂ 0.30mL，静置 6min；加 10% Al(NO₃)₃ 0.30mL，静置 6min；加 4% NaOH 2.00mL，无水乙醇定容，静置 15min，于 510nm 波长处测吸光度 (A) 值，获吸光度 (A) 值与质量浓度 (C) 关系的回归方程：A=10.676C+0.0092 (R²=0.9991)，线性范围 0.005-0.08mg/mL。

2.4 供试品总黄酮含量测定

精密吸取供试品溶液 2mL 于 25mL 量瓶，无水乙醇稀释至刻度，再吸取 2mL 于 10mL 试管，按“2.3”显色，测吸光度。提取率 P = (C×D)/m × 100%，C 为质量浓度 (mg/mL)，D 为稀释倍数，m 为取样量 (mg)。

作者简介：曾玲 (1993-)，女 (汉)，四川省第二中医医院消化科，中西医结合主治医师。

通讯作者：周子力 (1979-)，女 (汉)，四川省第二中医医院消化科主任，中西医结合主任医师。

基金项目：四川省科技创新苗子工程项目 (NO: 2021046)。

2.5 精密度

按“2.4”方法，重复测定6次吸光度，RSD=0.85%，仪器精密度良好。

2.6 稳定性

按“2.4”方法，显色后0,15,30,45,60,90min测定吸光度，90min内RSD=1.20%，供试品溶液在90min内比较稳定。

2.7 重复性

按“2.2”方法，制备5份供试品溶液，按“2.4”方法分别测其吸光度，总黄酮提取率RSD=2.17%，该方法重复性良好。

2.8 单因素实验

2.8.1 乙醇浓度

固定液料比1:30，提取时间1h，提取2次，浓度40%、50%、60%、70%、80%。结果如图1A，60%时提取率最高，之后下降。推测在60%乙醇浓度下，黄酮类化合物能更好地溶于溶剂，而随着乙醇浓度的增加，溶剂极性增加，其他醇溶性物质的溶解会影响黄酮类化合物的提取。选取50%、60%、70%进行正交。

2.8.2 液料比

固定乙醇60%，提取时间1h，提取2次，液料比1:10、1:20、1:30、1:40、1:50。结果如图1B，1:40时最高。分析可能的原因为当液料比为1:40时，大部分黄酮类化合物已基本溶解，随着溶剂的增加，其他杂质的溶解反而会降低黄酮类化合物的提取。选取1:30、1:40、1:50进行正交。

2.8.3 提取时间

固定乙醇60%，液料比1:40，提取2次，时间1,1.5,2,2.5,3h。结果如图1C，1.5h接近最大值。这可能与提取时间延长黄酮类化合物溶解达到饱和有关。选取1,1.5,2h进行正交。

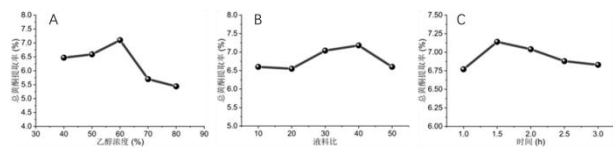


图1 (A)乙醇浓度对总黄酮提取率的影响;(B)液料比对总黄酮提取率的影响;(C)提取时间对总黄酮提取率的影响

Fig.1 (A) the effect of ethanol concentration on extraction rate of total flavonoids ;(B) the effect of solid-liquid ratio on extraction rate of total flavonoids;(C) the effect of extraction time on extraction rate of total flavonoids

2.8.4 提取次数

为节约成本，直接选取1次、2次、3次三个水平进行正交设计。

2.9 正交实验设计

采用 $L_9(3^4)$ 正交表，因素水平见表1，实验结果与分析见表2、表3。

表1 正交实验因素及水平

水平	1	2	3
乙醇浓度 A (%)	50	60	70
液料比 B (g/mL)	1: 30	1: 40	1: 50
提取时间 C (h)	1	1.5	2
提取次数 D (次)	1	2	3

表2 正交表头设计与实验结果

实验号	因素				实验方案	总黄酮提取率 (%)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	A1B1C1D1	6.60
2	1	2	2	2	A1B2C2D2	7.56
3	1	3	3	3	A1B3C3D3	6.89
4	2	1	2	3	A2B1C2D2	7.20
5	2	2	3	1	A2B2C3D1	7.61
6	2	3	1	2	A2B3C1D2	6.63
7	3	1	3	2	A3B1C3D2	5.98
8	3	2	1	3	A3B2C1D3	6.23
9	3	3	2	1	A3B3C2D1	5.71
K1	21.05	19.78	19.46	19.92		
K2	21.44	21.4	20.47	20.17		
K3	17.92	19.23	20.48	20.32		
K1	7.02	6.59	6.49	6.64		
K2	7.15	7.13	6.82	6.72		
K3	5.97	6.41	6.83	6.77		
R	1.18	0.72	0.34	0.13		

表3 方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	显著性
------	-----	-----	----	----	-----

A	2.482	2	1.241	91.181	<0.05
B	0.848	2	0.424	31.167	<0.05
C	0.229	2	0.114	8.411	>0.05
D	0.027	2	0.014	—	—

表2 极差结果：在对总黄酮提取率的影响中，A（乙醇浓度）>B（液料比）>C（提取时间）>D（提取次数），最佳提取工艺方案为A2B2C3D3。表3 方差分析：乙醇浓度和液料比对加味桑葛汤总黄酮提取率有显著性影响，而提取时间、提取次数无显著性影响。综合考虑成本，最终优化提取工艺方案为A2B2C2D1，即60%乙醇浓度，液料比为1:40，提取时间为1.5h，提取1次。

2.10 最佳工艺验证

精密称取5份粗粉各5g，按优化工艺提取，总黄酮提取率平均值为7.69%，RSD=1.25%（n=5），验证了最佳提取工艺

的合理性与稳定性。

3 分析与讨论

黄酮类化合物提取方法多样^[10]，其中超声波辅助提取法和微波提取法对样品处理和机器设备的要求较高，生产成本也相对较高；双水相提取法不利于原料的综合利用，相分离时间较长，生产成本也较高^[11]。故本实验选择成本较低、易于操作、应用较广泛的溶剂提取法。乙醇具有溶解性强、毒性小、价廉、易于回收的优点^[9]，因此选乙醇为提取溶剂。在实验中遇显色后产生絮状沉淀的情况，马志慧等^[24]研究表明此现象与样品溶液取样量大小有关，故在显色中应控制取样量。测吸光度时波动较大，可待仪器稳定后测3-5次取均值，可减小误差。

本研究采用正交设计得到加味桑葛汤总黄酮的最佳提取工艺为：60%乙醇浓度，液料比1:40（g/mL），提取1.5h，提取1次；在此条件下总黄酮提取率均值为7.69%。本研究优化的提取工艺稳定合理，为加味桑葛汤的制剂开发提供了依据。

参考文献：

[1] YOUNOSSI Z M,KOENIG A B,ABDELATIF D,et al.Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta - analytic assessment of prevalence,incidence,and outcomes[J].Hepatology,2016,64(1)

[2] WESTON S R,LEYDEN W,MURPHY R,et al.Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease[J].Hepatology,2005,41(2):372-379.

[3] YOUNOSSI Z M.Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective[J].Journal of Hepatology,2019,70(3):531-544.

[4] MUTHIAH M D,SANYAL A J.Current management of non-alcoholic steatohepatitis[J].Liver International,2020,40(S1):89-95.

[5] 胡义扬.中医药治疗非酒精性脂肪性肝病的优势与展望[J].世界中医药,2015,10(02):149-152.

[6] 陈邵霞,孙建光.关于治疗非酒精性脂肪肝中医外治法的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(92):80-81+83.

[7] 卜理琳,黄峰.非酒精性脂肪肝的中医治疗研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(95):92-93+96.

[8] 洪军,刘俊红,管玉周.超声波辅助提取大叶黄杨总黄酮的工艺及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2014,35(13):266-270.

[9] 尹文清,陈柳生,王力生,等.正交设计优选蔓荆子中总黄酮的提取工艺[J].中草药,2007,(02):216-217.

[10] 王梦杰,李镐,华会明,等.柿叶中黄酮类化合物及提取工艺研究进展[J].中草药,2022,53(13).

[11] 郝梦超,安超娜,王乙颖,等.金银花黄酮的提取工艺及其药理活性研究进展[J].饮料工业,2022,25(5).