

# 半仿生酶法提取柿叶中总黄酮的工艺筛选及优化<sup>△</sup>

薛璇玑\*, 罗俊, 张新新, 钱春香, 赵晶, 郭增军<sup>#</sup>(西安交通大学药学院, 西安 710061)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)13-1813-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.13.24

**摘要** 目的: 筛选提取柿叶中黄酮的方法及最优提取工艺。方法: 以浸膏质量、黄酮含量为指标, 比较乙醇回流法、酶法(纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶及二者等量混合组成的复合酶)、半仿生法和半仿生酶法(同前3种酶)提取柿叶中总黄酮的效果。以黄酮含量为指标, 以料液比、回流温度和回流时间为因素, 设计正交试验优化半仿生酶法提取柿叶中黄酮的工艺条件, 并进行验证试验。结果: 在4种提取方法中, 以半仿生酶法得到的浸膏质量和黄酮含量最高, 并以复合酶效果最好; 优化的半仿生酶法提取工艺条件为料液比1:14、回流温度50℃、回流时间2.0h; 验证试验中3次黄酮提取率分别为5.9%、5.8%、5.9%(RSD=0.98%,  $n=3$ )。结论: 优化后的半仿生酶法提取柿叶中黄酮, 提取率高且工艺稳定。

**关键词** 半仿生酶法; 柿叶; 黄酮; 提取; 正交试验; 工艺优化

## Screening and Optimization of the Extraction Technology of Total Flavonoids in Persimmon Leaves by Semi-bionic-enzyme Method

XUE Xuanji, LUO Jun, ZHANG Xinxin, QIAN Chunxiang, ZHAO Jing, GUO Zengjun (School of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To screen the method for extracting total flavonoids in persimmon leaves and optimize extraction technology. METHODS: Using extract quality and flavonoids content as indexes, the effects of extracting total flavonoids in persimmon leaves by ethanol refluxing method, enzyme method (cellulase,  $\beta$ -glucanase and complex enzyme mixed by equal amounts of both), semi-bionic method and semi-bionic-enzyme method (the same enzymes) were compared. Using flavonoids content as index, solid-liquid ratio, reflux temperature, reflux time as factors, orthogonal test was designed to optimize the extraction technology conditions of flavonoids in persimmon leaves by semi-bionic-enzyme method, and the verification test was conducted. RESULTS: The extract quantity and flavonoids content by semi-bionic-enzyme method was the highest among the 4 extraction methods, and the complex enzyme was the most suitable; the optimized extracting condition of semi-bionic-enzyme method were as follows as solid-liquid ratio of 1:14, reflux temperature of 50℃, reflux time of 2.0 h; extraction rates of flavonoids in 3 verification tests were 5.9%, 5.8%, 5.9% (RSD=0.98%,  $n=3$ ). CONCLUSIONS: The optimized semi-bionic-enzyme method is efficient and stable in extracting flavonoids in persimmon leaves.

**KEYWORDS** Semi-bionic-enzyme method; Persimmon leaves; Flavonoids; Extraction; Orthogonal test; Technology optimization

柿叶为柿树科柿树属植物柿(*Diospyros kaki* L.f.)的新鲜或干燥的叶, 具有生津止渴、清热解毒、润肺强心、镇咳止血等功效<sup>[1-2]</sup>。柿叶中含有黄酮类、三萜类以及维生素类等成分, 其中黄酮类为其主要成分, 包括目前已发现的黄芪苷、紫云苷、异槲皮苷、槲皮素、异槲皮素、山柰酚、杨梅树皮苷、芦丁、金丝桃苷等<sup>[3-4]</sup>。近年来, 黄酮类化合物因有降脂、抗血栓、抗心律失常等药理作用, 而且具有毒性低、资源丰富、易于工业化提取制备等优点, 被广泛地用于医药食品等行业, 极具开发价值<sup>[5]</sup>。

<sup>△</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81172957); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(No.2016JM8075)

\* 博士研究生。研究方向: 天然药物。电话: 029-82655133。E-mail: xuanji0423@126.com

<sup>#</sup> 通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 中药及天然药物资源及活性成分。电话: 029-82655133。E-mail: guozj@mail.xjtu.edu.cn

传统提取黄酮类化合物的方法主要包括水煎煮法、碱提酸沉法和浸渍法, 这些方法存在工作量大且提取率不高的不足<sup>[6]</sup>。如果在提取前加入合适的酶(果胶酶、纤维素酶等)对药材进行处理, 可通过其溶解细胞壁组成成分果胶和纤维素来破坏药材细胞结构, 有效地加快提取进程, 提升提取效率<sup>[7]</sup>。半仿生酶法即是在酶法的基础上, 融入了半仿生法的优势, 在模拟胃肠道环境的过程中, 促进中药中活性成分的富集<sup>[8-9]</sup>。

目前, 关于柿叶中总黄酮提取的文献报道较多<sup>[10-12]</sup>, 但对采用不同酶进行提取的比较研究较少, 且尚未有采用半仿生酶法提取的报道。为深入研究柿叶中总黄酮的提取工艺, 提高其提取率, 笔者以浸膏质量和总黄酮含量为指标<sup>[13-14]</sup>, 对比分析了乙醇回流法、酶法、半仿生法及半仿生酶法对柿叶总黄酮的提取率; 并以提取温度、时间和料液比作为3个考察因素, 采用正交试验考察

半仿生酶法提取柿叶总黄酮的最优工艺条件<sup>[15]</sup>,为柿叶总黄酮的提取提供一种新的高效方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HH-恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司);EYEL4系列旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(郑州长城科工贸有限公司);101-2干燥箱(上海昕仪仪器仪表有限公司);紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);AE240电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);KQ3200B超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司)。

### 1.2 药材、药品与试剂

柿叶(2014年8月采自陕西蓝田县,经本课题组郭增军教授鉴定为柿树科柿树属植物柿树的干燥叶);芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-200707,纯度:98%);纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶(和氏璧生物技术有限公司,批号:GB11.006,酶活力:均为30 000 U/g)、复合酶(取纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶等量混匀自配);95%乙醇、10%硝酸铝溶液、5%亚硝酸钠溶液、4%氢氧化钠溶液、磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液均为分析纯、自配;水为蒸馏水。

## 2 方法与结果

### 2.1 柿叶中总黄酮的提取

参考文献[7]方法提取。

2.1.1 乙醇回流法 取粉碎后的柿叶约5 g置于圆底烧瓶中,加入10倍量的70%乙醇,70℃加热回流1 h,过滤;滤渣加入8倍量的70%乙醇,加热回流2次,每次1 h,合并滤液;回收溶剂并于80℃真空干燥,得干浸膏。

2.1.2 酶法 取粉碎后的柿叶约5 g置于圆底烧瓶中,加入复合酶0.025 0 g<sup>[7]</sup>,加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液50 mL,调节pH为3.6左右,50℃水浴中酶解2 h,过滤;药渣加入50 mL磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液,70℃回流3次,每次1 h,合并滤液;回收溶剂并于80℃真空干燥,得干浸膏。

换用纤维素酶和 $\beta$ -葡聚糖酶重复操作,分别得干浸膏。

2.1.3 半仿生法 取粉碎后的柿叶约5 g置于圆底烧瓶中,加入50 mL pH为2.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液为提取液,70℃下回流提取1 h,过滤;滤渣加入50 mL pH为7.5的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液为提取液,70℃下回流提取1 h,过滤;滤渣加入50 mL pH为8.3的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液为提取液,70℃下回流提取1 h,过滤;合并3次滤液,回收溶剂并于80℃真空干燥,得干浸膏。

2.1.4 半仿生酶法 取粉碎后的柿叶约5 g置于圆底烧瓶中,加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液50 mL为浸取剂,调节pH为2.0,混匀,70℃水浴中回流1 h,过滤;滤

渣加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液,调节pH为3.6,加入复合酶0.025 0 g,混匀,50℃水浴中浸泡2 h,过滤;滤渣加入50 mL pH为7.5的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液为提取液,70℃下回流提取1 h,过滤;滤渣加入50 mL pH为8.3的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液为提取液,70℃下回流提取1 h;合并滤液,回收溶剂并于80℃真空干燥,得干浸膏。

换用纤维素酶和 $\beta$ -葡聚糖酶重复操作,分别得干浸膏。

### 2.2 总黄酮含量测定

黄酮含量测定采用硝酸铝络合分光光度法。其原理是黄酮类化合物经亚硝酸钠还原后,与硝酸铝络合生成稳定的红橙色化合物,此化合物在510 nm波长处有最大吸收,然后以芦丁为标准,通过测定吸光度( $A$ )计算含量<sup>[14]</sup>。

2.2.1 芦丁标准曲线绘制 精密称取芦丁对照品0.010 3 g置于50 mL量瓶中,以60%乙醇溶液溶解定容,得质量浓度为0.206 mg/mL的芦丁对照品溶液。依次取对照品溶液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mL至25 mL量瓶中,分别每隔6 min加入5%亚硝酸钠溶液1.0 mL、10%硝酸铝溶液1.0 mL、4%氢氧化钠溶液10.0 mL,再以60%乙醇溶液定容。静置15 min后,在波长为510 nm下测定 $A$ 。以质量浓度( $c$ , mg/mL)为横坐标、 $A$ 为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $A=14.372c-0.007 6$ ( $R^2=0.999 6$ ),得芦丁检测质量浓度线性范围为8.24~57.68  $\mu$ g/mL。

2.2.2 方法学考察 (1)精密度试验。精密量取供试品溶液5 mL至25 mL量瓶中,同“2.2.1”项下方法处理,测定 $A$ ,重复6次。结果RSD=0.45%( $n=3$ ),表明方法精密度良好。(2)重复性试验。精密量取样品溶液5 mL至25 mL量瓶,同“2.2.3”项下方法处理,测定 $A$ ,重复6次。结果RSD=0.31%( $n=3$ ),表明方法重复性良好。(3)稳定性试验。取样品溶液分别于放置0、2、4、6、8、12、24 h后同“2.2.3”项下方法处理,测定 $A$ ,结果RSD=0.83%( $n=3$ ),表明样品溶液在24 h内稳定。(4)准确度试验。精密量取样品溶液5 mL及2 mL对照品溶液(0.412 mg)至25 mL量瓶中,同“2.2.3”项下方法处理,平行制备6份,测定 $A$ ,计算平均回收率为98.20%(RSD=0.56%, $n=3$ ),表明方法准确度高。

2.2.3 样品含量测定方法 精密称取样品浸膏0.050 0 g,溶解定容至50 mL量瓶中,得到样品溶液。精密量取5.0 mL至25 mL量瓶中,加入1.0 mL 5%亚硝酸钠溶液,摇匀静置6 min;加入1 mL 10%硝酸铝溶液,摇匀后静置6 min;加入4%氢氧化钠10 mL,用60%乙醇定容至刻度,静置15 min。在510 nm波长处测定 $A$ ,将各组 $A$ 数据代入回归方程中计算黄酮含量。

### 2.3 不同方法提取柿叶总黄酮结果比较分析

对乙醇回流法、半仿生法、酶法和半仿生酶法所提

取的浸膏称质量并测定其总黄酮含量,计算黄酮提取率(%)=浸膏中黄酮总量(g)/药材称量(g)×100%,结果见表1。

表1 不同提取方法的比较

提取方法	乙醇回流法	半仿生法	酶法			半仿生酶法		
			复合酶	纤维素酶	β-葡萄糖酶	复合酶	纤维素酶	β-葡萄糖酶
浸膏总质量,g	2.47	4.02	3.93	3.30	3.14	4.33	4.10	4.09
黄酮提取率,%	3.40	5.70	5.50	4.80	3.90	6.00	5.60	5.00

由表1可知,从浸膏总质量和黄酮提取率分析,半仿生酶法>半仿生法>酶法>乙醇回流法。半仿生法通过模拟药物在人体的pH梯度,能够有效提高提取率,比传统的乙醇回流法提高了67.6%。酶法通过破坏中草药的细胞壁,增大了内容化学成分的溶出;在3种酶中,最适宜柿叶中黄酮提取的酶为复合酶,其提取率比传统方法提高了61.8%。半仿生酶法结合了酶法与半仿生法的优势,取得了更好的提取效果。使用复合酶的半仿生酶法比传统提取法的提取率提高了76.5%,比半仿生法提高了5.3%,比酶法提高了9.1%。由此表明,半仿生酶法在上述几种提取柿叶黄酮的方法中效率较高,且以采用复合酶最优。

#### 2.4 半仿生酶法提取柿叶中黄酮的工艺优化

通过上述对提取方法的比较,初步选择半仿生酶法(复合酶)为提取方法。以回流温度(A)、回流时间(B)和料液比[C,即每次回流提取时药材量(g)与提取液量(mL)之比]作为考察的3个因素,以黄酮提取率为评价指标,设计L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验对半仿生酶法进行条件优化。因素与水平见表2;正交试验结果见表3;方差分析结果见表4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素		
	A(回流温度),℃	B(回流时间),h	C(料液比)
1	50	1.0	1:10
2	60	1.5	1:12
3	70	2.0	1:14

表3 正交试验结果

Tab 3 Results of orthogonal test

编号	A	B	C	黄酮提取率,%
1	1	3	1	5.1
2	1	2	2	2.1
3	1	1	3	5.7
4	2	3	2	4.6
5	2	2	3	8.4
6	2	1	1	4.5
7	3	3	3	5.9
8	3	2	1	4.4
9	3	1	2	4.3
K <sub>1</sub>	4.3	4.8	4.7	
K <sub>2</sub>	5.8	5.0	3.7	
K <sub>3</sub>	4.9	5.2	6.7	
R	1.5	0.4	3.0	

表4 方差分析结果

Tab 4 Analysis result of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
A	3.607	2	1.804	0.763	>0.05
B	0.207	2	0.104	0.044	>0.05
C	14.000	2	7.000	2.962	>0.05
误差(D)	4.726	2	2.363		

注:F<sub>0.05</sub>(2,2)=19.00

Note:F<sub>0.05</sub>(2,2)=19.00

由表2、表3可知,极差分析和方差分析结果一致,因素影响大小排序为C>A>B。由于随着回流温度的升高,黄酮提取率呈先升高再降低的趋势,提示温度升高有利于黄酮被充分提取,但回流温度>70℃时可能部分有效成分被破坏。由A因素的P>0.05可知,温度对提取率影响不显著,故选择较低的50℃为回流温度,既节省能源又可避免高温对化合物的破坏。等量原料下,随着提取溶剂的增加,黄酮提取率呈先下降再升高的趋势,可能的原因在料液比1:12时,黄酮未被充分提取而且被稀释;而在料液比为1:14时提取率最大,表明提取出的黄酮已抵消了稀释带来的影响,故选择此料液比较为合理。随着回流时间的延长,黄酮提取率呈逐渐上升趋势,故选择2h较为合理。综上,最优工艺为A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>,即料液比1:14、回流温度50℃、回流时间2.0h。

#### 2.5 工艺验证试验

取粉碎后的柿叶约100g,共3份,采用优化的工艺条件分别进行提取,测定黄酮含量并计算其提取率。结果,3次试验黄酮提取率分别为5.9%、5.8%、5.9%(RSD=0.98%,n=3),与正交试验结果最高值相当,表明优化的工艺提取率较高,且工艺稳定、方法可行。

### 3 讨论

柿叶为柿树科柿树属植物柿树的叶,含有大量以黄酮类化合物为代表的具有药理活性的化学成分,目前已广泛地应用于医疗和保健行业,具有广阔的应用前景和开发价值。本文从提取柿叶中总黄酮的角度出发,在半仿生法的基础上加入了纤维素酶和果胶酶以破坏细胞壁、加快有效成分溶出,并对比分析了乙醇回流法、半仿生法、酶法及半仿生酶法的浸膏得率和黄酮提取率,发现半仿生酶法提取率较高。因此,在前期确定的最优酶用量的基础上<sup>[7-9,16]</sup>,进一步设置了回流温度、回流时间和料液比3个参数,采用正交试验优化半仿生酶法提取柿叶中黄酮的工艺条件。本试验为柿叶中黄酮的提取以及半仿生酶法的推广提供了一定的依据。

#### 参考文献

- [1] 盛敬伟,徐萍,李学林,等.柿叶的药用[J].河南中医药大学学报,1995,10(6):24-33.
- [2] 辛宁,丰杰,姚波.柿叶黄酮类提取分离及药理作用研究概况[J].中医药学报,2007,35(2):49-51.
- [3] 林娇芬,林河通,谢联辉,等.柿叶的化学成分、药理作用、临床应用及开发利用[J].食品与发酵工业,2005,31(7):

# 超声波-酶法提取积雪草中积雪草总苷的工艺研究<sup>Δ</sup>

张丹丹<sup>1\*</sup>, 聂绪强<sup>1#</sup>, 张 涵<sup>1</sup>, 赵久凤<sup>1</sup>, 石秀君<sup>1</sup>, 杨建文<sup>1,2</sup>(1.遵义医学院药学院, 贵州 遵义 563003; 2.遵义医学院附属医院, 贵州 遵义 563003)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)13-1816-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.13.25

**摘要** 目的:优化积雪草中积雪草总苷的提取工艺。方法:以积雪草苷和羟基积雪草苷含量之和为考察指标,采用单因素试验和正交试验对酶用量、酶解时间、酶解温度、乙醇体积分数、液料比、超声提取时间进行考察,优化超声波-酶法提取积雪草中积雪草总苷的工艺条件并进行验证试验。结果:最优提取工艺为纤维素酶用量12 mg/g,以10倍液料比加入60%乙醇,60℃酶解60 min,超声提取50 min;验证试验中积雪草总苷平均提取率为1.92%(RSD=1.83%,n=3)。结论:超声波-酶法用于积雪草中积雪草总苷的提取,工艺稳定、可行。

**关键词** 积雪草;积雪草苷;羟基积雪草苷;超声波;纤维素酶;提取工艺;正交试验

## Study on the Extraction Technology of Asiaticosides from *Centella asiatica* by Ultrasonic-enzyme Method

ZHANG Dandan<sup>1</sup>, NIE Xuqiang<sup>1</sup>, ZHANG Han<sup>1</sup>, ZHAO Jiufeng<sup>1</sup>, SHI Xiujun<sup>1</sup>, YANG Jianwen<sup>1,2</sup>(1.College of Pharmacy, Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563003, China; 2.Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563003, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of asiaticosides from *Centella asiatica*. METHODS: Using total amounts of asiaticoside and hydroxy asiaticoside as investigation indexes, single factor and orthogonal test were used to investigate the enzyme amount, enzymolysis time, enzymolysis temperature, ethanol volume fraction, liquid material ratio and ultrasonic extraction time and optimize the extraction technology of asiaticosides from *C. asiatica* by ultrasonic-enzyme method, and verification test was conducted. RESULTS: Optimal extraction technology was as follow as cellulose dosage of 12 mg/g, 10-fold liquid material ratio added into 60% ethanol, enzyme hydrolysis for 60 min at 60 °C, ultrasonic assisted extraction for 50 min. Average extraction rate of total asiaticosides was 1.92% (RSD=1.83%, n=3) in verification test. CONCLUSIONS: Ultrasonic-enzyme method is stable and feasible for the extraction technology of asiaticosides from *C. asiatica*.

**KEYWORDS** *Centella asiatica*; Asiaticoside; Hydroxy asiaticoside; Ultrasonic; Cellulose; Extraction technology; Orthogonal test

- 90-96.
- [4] 郭玫,董晓萍,徐文萍.柿叶的研究概况[J].甘肃中医学院学报,2000,17(S1):78-82.
- [5] 马新博,宫汝飞.柿叶黄酮药理作用研究进展[J].中药学报,2012,40(4):130-132.
- [6] 徐浩锋,杨华俊,俞岚.中药有效成分现代提取技术研究进展[J].海峡药学,2012,24(1):13-18.
- [7] 薛璇玑,郭增军,戴柳江,等.半仿生酶法提取拐枣七总生物碱工艺研究[J].现代中药研究与实践,2014,28(3):48-51.
- [8] 张卉,赵婷婷,戴柳江,等.半仿生酶法提取甘草中甘草酸的工艺研究[J].中国现代应用药学,2013,30(9):969-972.
- [9] 孙福东,孙秀梅,张兆旺,等.半仿生酶法提取半夏白术天麻汤中天麻素的含量测定[J].中华中医药学刊,2008,26(8):1823-1825.
- [10] 赵晓莉.柿叶黄酮类化合物提取分离研究[D].西安:西北工业大学,2005.
- [11] 贾娜,李晓威,宋立,等.响应面法优化柿叶总黄酮的超声波辅助提取条件[J].食品与发酵科技,2013,49(6):1-6.
- [12] 赵文红,赵翊,白卫东,等.柿叶黄酮化合物提取工艺研究[J].陕西科技大学学报,2007,25(5):54-58.
- [13] 李艳提,赵金凤,张卫明,等.罗布麻茶总黄酮含量测定方法研究[J].食品科技,2010,35(6):274-278.
- [14] 杨帆,张轩,丁红.柿叶中总黄酮的鉴别与含量测定[J].中国医药指南,2013,11(8):435-436.
- [15] 彭凯丽,李新民,李元林,等.正交试验优选复方桑菊口服液中药材的提取工艺[J].中国药房,2014,25(3):243-245.
- [16] 郭增军,薛璇玑,赵雅韵,等.一种半仿生酶法提取柿叶总黄酮的方法和应用:中国,CN105012372A[P]. 2015-11-04.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81560712);贵州省科学技术基金项目(No.黔科合LH字[2014]7566号);贵州省科技计划课题(No.黔科合重大专项字[2015]6010)

\* 硕士研究生。研究方向:中药质量标准。电话:0851-28642516。E-mail:1450024131@qq.com

# 通信作者:副教授,博士。研究方向:生药的质量标准及活性成分分析。电话:0851-28642516。E-mail:niexuqiang@126.com

(收稿日期:2016-08-23 修回日期:2016-09-21)

(编辑:刘 萍)