

正交试验优选黑面神枝叶中总黄酮水提工艺^Δ

彭伟文*,王英晶,梅全喜,戴卫波,吴飞(广州中医药大学附属中山医院,广东中山 528400)

中图分类号 R284.2;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)19-1763-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.11

摘要 目的:优选黑面神枝叶中总黄酮的水提工艺。方法:采用单因素试验考察提取方法、提取温度、提取时间、加水量及提取次数对总黄酮提取率的影响。在此基础上,以总黄酮含量为评价指标,采用正交试验优选提取时间、提取次数和加水量对总黄酮提取率的影响。结果:最佳总黄酮水提工艺为100℃下加热提取,加20倍量水,提取2次,每次1h。该条件下,黑面神枝叶中提取的总黄酮含量为79.16 mg/g。结论:所选工艺合理、可行,可用于黑面神枝叶中总黄酮的提取。

关键词 黑面神;总黄酮;提取工艺;单因素试验;正交试验

Optimization of Water Extraction Technology of Total Flavonoids from the Leaves of *Breynia fruticosa*

PENG Wei-wen, WANG Ying-jing, MEI Quan-xi, DAI Wei-bo, WU Fei (The Affiliated Zhongshan Hospital, Guangzhou University of TCM, Guangdong Zhongshan 528400, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the water extraction technology of total flavonoids from the leaves of *Breynia fruticosa*. METHODS: Single factor test was adopted to investigate the effects of extraction method, extraction temperature, extraction time, water amount and extraction times on extraction rate of total flavonoids. Using the content of total flavonoids as index, the effects of extraction time, extraction times and water amount on the extraction rate of total flavonoids were optimized by orthogonal design. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows: extraction temperature of 100℃, 20 folds of water, extracting for 2 times, 1 h for each time. Under above conditions, the content of total flavonoids from the leaves of *B. fruticosa* was 79.16 mg/g. CONCLUSIONS: The technology is reasonable and feasible, and can be used for the extraction of total flavonoids from the leaves of *B. fruticosa*.

KEYWORDS *Breynia fruticosa*; Total flavonoids; Extraction technology; Single factor test; Orthogonal experiment

黑面神系属大戟科黑面神属植物 *Breynia fruticosa* (L.) Hook. f. 的干燥嫩枝叶,主产于广东、广西等地,具有清湿热、化痰滞之功效。黑面神可用于皮炎、湿疹、皮肤瘙痒等多种皮肤病及慢性支气管炎的治疗,还作为“湛江蛇药”的一种重要成分治疗毒蛇咬伤^[1]。黑面神主要含有三萜类、黄酮类^[2-4]、酚类和鞣质等成分^[5]。黄酮类成分广泛存在于自然界中,且具有广泛的生物活性,如抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗氧化、调节心血管等^[6-7]。本试验采用紫外分光光度法首次对黑面神枝叶总黄酮水提工艺进行优化,以为有效利用黄酮类成分提供依据^[8-9]。

1 材料

1.1 仪器

BS224S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);UV-2550型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);KQ3200E医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH-S4数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);RE-2000B型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III型循环水真空泵(巩义市英峪华中仪器厂)。

1.2 药材

黑面神枝叶,购自广州致信药业有限公司,经笔者鉴定为大戟科黑面神属植物 *B. fruticosa* (L.) Hook. f. 的干燥嫩枝叶。

1.3 试剂

芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:0080-9705);硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠、无水乙醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取芦丁对照品0.0109g,置25ml量瓶中,加入适量70%乙醇,超声处理(功率:250W,频率:20kHz),使溶解,放冷,加70%乙醇至刻度,摇匀,即得(每1ml含芦丁0.436mg)。

2.2 标准曲线的制备

精密量取芦丁对照品溶液0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0ml,分别置25ml量瓶中,各加水至6ml,分别加5%NaNO₂溶液1ml,摇匀,静置6min,再加10%Al(NO₃)₃溶液1ml,摇匀,静

环烯醚萜苷对大鼠血液凝集参数的影响[J].中国药房,2007,18(03):231.

Δ 基金项目:广东省建设中医药强省立项资助课题(No.2010073);中山市科技计划项目(No.20102A033)

*主任中药师,教授,硕士研究生导师。研究方向:中药制剂研发。电话:0760-88815106。E-mail:pww200688@21cn.com

[9] 李茂星,贾正平,胡之德,等.藏药独一味中总环烯醚萜苷的含量测定[J].华西药学杂志,2007,22(2):208.

[10] 孙振球.医学统计学[M].北京:人民卫生出版社,2005:405.

(收稿日期:2013-07-02 修回日期:2013-08-17)

置6 min,再加10% NaOH溶液10 ml,最后加水至刻度,摇匀,静置15 min。以加0 ml对照品溶液量瓶中的试剂为空白对照,用紫外分光光度计,在511 nm波长处测定吸光度。以芦丁质量浓度为横坐标(x),吸光度(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=11.105x-0.0099$ ($r=0.9999$)。结果表明,芦丁对照品质量浓度在9.0~52.0 μg/ml范围内与吸光度呈良好的线性关系。芦丁对照品的标准曲线见图1。

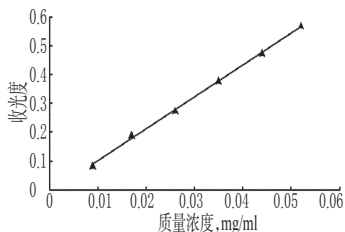


图1 芦丁对照品的标准曲线

Fig 1 Standard curve of rutin control

2.3 单因素试验

2.3.1 提取方法考察 取黑面神枝叶粗粉约1.5 g,精密称定,加20倍量水,分别采用煎煮法、超声法(功率:250 W,频率:20 kHz)和80 °C温浸法,提取时间均为50 min,各平行制备2份,趁热抽滤,用10 ml水清洗滤渣及容器2~3次,合并滤液,用水定容至100 ml量瓶中。精密移取超声法提取药液和煎煮法提取药液各2 ml,温浸法提取药液1 ml,分别置25 ml量瓶中,按2.2项下“分别加入5%NaNO₂溶液1 ml”起操作,加入各显色剂显色。以加提取药液0 ml的各显色剂为空白对照,于511 nm波长处测定吸光度,代入标准曲线方程中计算总黄酮含量,并按下式计算总黄酮提取率(总黄酮提取率=总黄酮含量/生药量×100%)。结果,3种提取方法对总黄酮提取率的影响大小为温浸法>超声法>煎煮法,温浸法下总黄酮提取率最高,故选定温浸法为最佳提取方法。提取方法对总黄酮提取率的影响见图2。

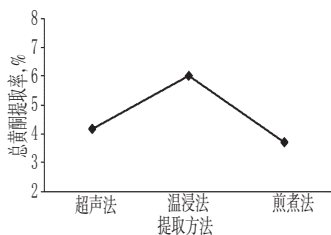


图2 提取方法对总黄酮提取率的影响

Fig 2 Effects of extraction method on the extraction rate of total flavonoids

2.3.2 提取温度考察 取黑面神枝叶粗粉约1.5 g,精密称定,加20倍量水,分别于40、60、80、100 °C提取50 min,各平行制备2份,趁热抽滤,用10 ml水清洗滤渣及容器2~3次,滤液合并,用水定容至100 ml量瓶中。从中精密移取40 °C提取药液2 ml,其余提取药液各1 ml,置25 ml量瓶中,加入各种显色剂显色,于511 nm波长处测定吸光度,计算总黄酮提取率。结果,提取温度为100 °C时总黄酮提取率最高,故选定100 °C为最佳提取温度。提取温度对总黄酮提取率的影响见图3。

2.3.3 提取时间考察 取黑面神枝叶粗粉约1.5 g,精密称定,加20倍量水,分别于100 °C加热提取30、50、70、90 min,各平行制备2份,趁热抽滤,分别用10 ml水清洗滤渣及容器2~3次,滤液合并,用水定容至100 ml量瓶中。从中精密移取各提

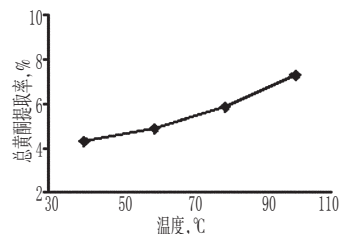


图3 提取温度对总黄酮提取率的影响

Fig 3 Effects of extraction temperature on the extraction rate of total flavonoids

取药液1 ml,置25 ml量瓶中,加入各种显色剂显色,于511 nm波长处测定吸光度,计算总黄酮提取率。结果,提取时间为90 min时,总黄酮提取率最高,与30、50、70 min相比较,总黄酮提取率分别提高了11.3%、7.2%、6.4%。考虑到节约能源成本,暂定提取时间为50 min。提取时间对总黄酮提取率的影响见图4。

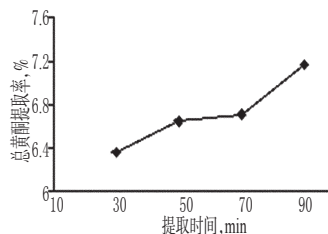


图4 提取时间对总黄酮提取率的影响

Fig 4 Effects of extraction time on the extraction rate of total flavonoids

2.3.4 加水量考察 取黑面神枝叶粗粉约1.5 g,精密称定,分别加入6、10、20倍量的水,于100 °C加热提取50 min,趁热抽滤,分别用10 ml水清洗滤渣及容器2~3次,滤液合并,用水定容至100 ml量瓶中。从中精密移取6、10倍提取药液2 ml,20倍提取药液1.5 ml,置25 ml量瓶中,加入各种显色剂显色,于511 nm波长处测定吸光度,计算总黄酮提取率。结果,随着加水量的增加,总黄酮提取率增大,故选定加水量为20倍。加水量对总黄酮提取率的影响见图5。

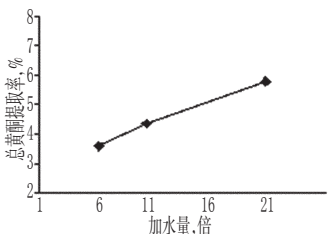


图5 加水量对总黄酮提取率的影响

Fig 5 Effects of water amount on the extraction rate of total flavonoids

2.3.5 提取次数考察 取黑面神枝叶粗粉约1.5 g,精密称定,平行制备3份,各加入20倍量的水,于100 °C下加热提取3次,每次50 min,趁热抽滤,3次提取液分别用水定容至100、50、50 ml量瓶中。从中精密移取3次提取药液各1、2、5 ml,置25 ml量瓶中,加入各种显色剂显色,于511 nm波长处测定吸光度,计算总黄酮提取率。结果表明,提取2次的总黄酮提取率占提取3次总黄酮提取率的百分比都达到93%以上,考虑到节约能源成本,提取次数暂定为2次。提取次数对总黄酮提取率的影响见表1。

表1 提取次数对总黄酮提取率的影响

Tab 1 Effects of extraction times on the extraction rate of total flavonoids

试验号	提取次数,次	生药质量,g	吸光度	总黄酮质量浓度,mg/ml	总黄酮提取率,%	2次提取率,%
1	1	1.5103	0.468	0.043 0	7.12	93.76
	2		0.367	0.033 9	1.40	
	3		0.371	0.034 3	0.57	
2	1	1.5163	0.455	0.041 9	6.90	93.55
	2		0.403	0.037 2	1.53	
	3		0.382	0.035 3	0.58	
3	1	1.5035	0.450	0.041 4	6.89	93.48
	2		0.382	0.035 3	1.47	
	3		0.379	0.035 0	0.58	

2.4 正交试验优选水提取工艺

根据单因素试验结果,选取提取时间(A)、加水量(B)和提取次数(C)为考察因素,每个因素选取3个水平,以总黄酮提取率为评价指标,采用L₉(3⁴)正交表进行试验。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, min	B,倍	C,次
1	40	15	1
2	50	20	2
3	60	25	3

表3 正交试验结果

Tab 3 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	总黄酮提取率,%
1	1	1	1	1	5.77
2	1	2	2	2	7.94
3	1	3	3	3	7.50
4	2	1	2	3	6.98
5	2	2	3	1	7.47
6	2	3	1	2	6.00
7	3	1	3	2	7.44
8	3	2	1	3	6.34
9	3	3	2	1	7.90
K ₁	7.070	6.730	6.037	7.047	
K ₂	6.817	7.250	7.607	7.127	
K ₃	7.227	7.133	7.470	6.940	
R	0.410	0.520	1.570	0.187	

表4 方差分析结果

Tab 4 Result of variance analysis

因素	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.257	2	0.128	4.849	
B	0.447	2	0.223	8.434	
C	4.538	2	2.269	85.623	<0.05
D(误差)	0.050	2	0.025		

注: F_{0.05}(2, 2)=19.00

note: F_{0.05}(2, 2)=19.00

由表3、表4可知,各因素对总黄酮提取率的影响大小为提取次数>溶剂用量>提取时间,其中提取次数对总黄酮提取率的影响具有统计学意义(P<0.05)。优选的提取工艺为A₃B₂C₂,即药材加20倍量水,100℃加热提取2次,每次1h。

2.5 工艺验证试验

取黑面神枝叶粗粉约1.5g,精密称定,共3份,按优选的工艺进行提取,并计算总黄酮提取率。结果,平均总黄酮提取率为7.96%,RSD=0.58%(n=3),与正交试验结果基本一致,表明所选工艺合理、稳定、可行。

2.6 黑面神枝叶水提物中总黄酮含量测定

取黑面神枝叶粗粉约1.5g,精密称定,共3份,分别加入20倍量水,100℃加热提取2次,每次1h,趁热抽滤,用10ml水清洗滤渣及容器2~3次,滤液合并,用水定容至100ml量瓶中。从中精密移取1ml,定容至25ml量瓶中,加入各种显色剂显色,于511nm波长处测定吸光度,计算总黄酮含量。样品含量测定结果见表5。

表5 样品含量测定结果

Tab 5 Result of content determination of samples

试验号	生药质量,g	吸光度	总黄酮质量浓度,mg/ml	总黄酮含量,mg/g	\bar{x}
1	1.500 8	0.515	0.047 3	78.74	79.16
2	1.501 1	0.516	0.047 4	78.87	
3	1.501 9	0.523	0.048 0	79.88	

3 讨论

黑面神主要含有三萜类、黄酮类、酚类和鞣质等成分。有文献报道从黑面神中分离鉴定了多个黄酮类化合物。本试验首次以芦丁作为对照品,采用Al(NO₃)₃-NaNO₂-NaOH显色法显色,通过单因素试验法和正交试验设计法优选黑面神枝叶总黄酮的水提工艺,最终确定了水提法提取黑面神枝叶中总黄酮的最佳工艺:加水量为20倍药材量,提取温度为100℃,提取时间为1h,提取次数为2次。在此条件下,黑面神枝叶总黄酮含量为79.16mg/g。本试验可为进一步研究黑面神中黄酮类成分提供依据。

参考文献

- [1] 《广东中药志》编辑委员会. 广东中药志: 第一卷[M]. 广州: 广东科技出版社, 1990: 362.
- [2] 浮光茵, 余伯阳, 朱丹妮. 黑面神化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(2): 114.
- [3] 浮光茵, 徐增莱, 余伯阳, 等. 民间药物黑面神化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(11): 1 052.
- [4] 毛华丽. 黑面神化学成分的分离及结构鉴定[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2009.
- [5] Hiroyuki M, Ryoji K, Hideaki O, et al. Terpenic and phenolic glycosides from leaves of *Breynia officinalis*[J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(9): 1 086.
- [6] 朱海扬, 曾慧兰. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 山东医药, 2009, 49(17): 114.
- [7] 钱俊臻, 王伯初, 谭君, 等. 黄酮类化合物的金属配合物及其药理作用[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(8): 1 158.
- [8] 黄林芳, 万德光. 川产苦丁茶中总黄酮的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(6): 327.
- [9] 阿布力米提·伊力, 李桂芳. 紫外分光光度法测定鹰嘴豆豆叶、豆茎中总黄酮含量[J]. 中国医药指南, 2012, 10(6): 1.

(收稿日期: 2013-06-19 修回日期: 2013-08-05)