

# 核桃隔膜中总黄酮的提取工艺优选

张淑兰<sup>1</sup>, 王国军<sup>2</sup>, 唐辉<sup>2\*</sup>, 刘艳芳<sup>2</sup>

(1. 新疆生产建设兵团医院药剂科, 乌鲁木齐 830002;

2. 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002)

[摘要] 目的: 优选核桃隔膜中总黄酮的提取工艺。方法: 以木犀草苷为定量指标, 在单因素试验基础上, 采用正交试验考察乙醇体积分数、料液比、原料粒径对总黄酮提取量的影响。结果: 最佳提取工艺为过 60 目筛的原料加 15 倍量 60% 乙醇超声提取, 总黄酮提取量达 2.985 mg·g<sup>-1</sup>。结论: 优选的总黄酮提取工艺稳定合理、重复性好, 为核桃资源的充分利用提供实验依据。

[关键词] 核桃隔膜; 黄酮; 正交试验; 超声提取; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)14-0050-03

[doi] 10.11653/syfy2013140050

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130514.0957.001.html>

[网络出版时间] 2013-05-14 09:57

## Optimization of Extraction Technology for Total Flavonoids from Diaphragm of *Juglans regia*

ZHANG Shu-lan<sup>1</sup>, WANG Guo-jun<sup>2</sup>, TANG Hui<sup>2\*</sup>, LIU Yan-fang<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacy, Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps, Urumqi 830002, China;

2. Key Laboratory of Phytomedicine Resources and Modernization of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shihezi 832002, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total flavonoids from diaphragm of *Juglans regia*. **Method:** With luteoloside as quantitative index, based on single factor tests, effect of ethanol concentration, solid-liquid ratio and mesh of raw material on yield of total flavonoids was investigated by orthogonal test. **Result:** Optimal extraction technology was as following: grinding degree of raw material 60 mesh, ultrasonic extracted with 15 times the amount of 60% ethanol, yield of total flavonoids was up to 2.985 mg·g<sup>-1</sup>. **Conclusion:** This optimized technology of total flavonoids was reasonable, reproducible and stable, it could provide basis for resources utilization of *J. regia*.

[Key words] diaphragm of *Juglans regia*; flavonoids; orthogonal test; ultrasonic extraction; HPLC

核桃隔膜又名分心木、胡桃衣、胡桃夹、胡桃隔, 体轻, 质脆, 易折断, 气微, 味微涩<sup>[1]</sup>。新疆人常将

其与茶一起泡制饮用, 可治疗肾虚遗精、滑精、尿路感染、结石、腰痛和噎膈等症<sup>[2]</sup>。现代药理试验表明, 维吾尔药核桃隔膜中黄酮苷等的正丁醇提取物对氢化可的松所致的小鼠肾“阳虚”症状确有改善, 作用明显<sup>[3]</sup>。目前, 国内外有关核桃隔膜有效成分的研究报道较少<sup>[4-5]</sup>。本课题组前期研究表明, 其总黄酮成分主要以木犀草苷存在, 因此本实验以该成分为定量指标, 采用快捷、高效的超声波法提取核桃隔膜中总黄酮<sup>[6-7]</sup>, 在单因素试验基础上, 通过正

[收稿日期] 20121123(019)

[基金项目] 新疆生产建设兵团科技项目(2011BA055)

[第一作者] 张淑兰, 主任药师, 从事药物成分分析研究, Tel: 0991-2668520, E-mail: btty2668520@163.com

[通讯作者] \*唐辉, 教授, 硕士研究生导师, 从事药物分析及新药研究, Tel: 0993-2055002, E-mail: th\_pha@shzu.edu.cn

交试验优选总黄酮提供工艺,为核桃隔膜黄酮类物质提取工艺的生产放大提供理论依据。

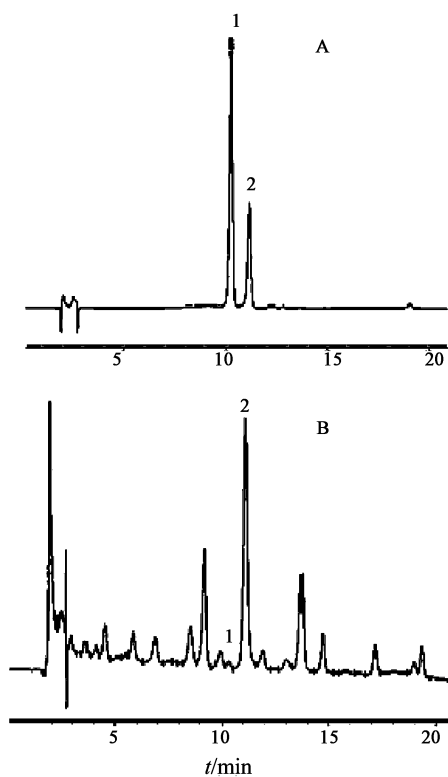
## 1 材料

HP1100 型高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司),BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯)。木犀草苷、芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 111720-201106,100080-200707),核桃隔膜(购于乌鲁木齐二道桥干果店,经石河子大学药学院成玉怀高级实验师鉴定为胡桃科植物胡桃 *Juglans regia* L. 的隔膜),乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 总黄酮含量测定

**2.1.1 色谱条件** Waters  $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.4% 磷酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 14% ~ 24% A, 10 ~ 30 min, 24% ~ 61% A),检测波长 254 nm,柱温 25 °C,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 20 μL,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 芦丁; 2. 木犀草苷

图 1 核桃隔膜 HPLC

**2.1.2 对照品溶液的配制** 精密称取木犀草苷对照品 5.04 mg,用甲醇溶解并定容,制成 100.8 mg·L<sup>-1</sup>的对照品储备液,摇匀,备用。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 称取核桃隔膜提取物适量,加甲醇溶解并定容至 25 mL,摇匀,即得。

**2.1.4 标准曲线的绘制** 精密量取对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,按 2.1.1 项下色谱条件进样,以峰面积为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 33.006X - 1.0833$  ( $r = 0.9998$ ),表明木犀草苷在 5.04 ~ 60.48 mg·L<sup>-1</sup>与峰面积呈良好线性关系。

**2.1.5 精密度试验** 精密量取同一对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件重复进样 6 次,结果峰面积的 RSD 0.2%,表明仪器精密度良好。

**2.1.6 加样回收率试验** 精密称取核桃隔膜总黄酮提取物 6 份,每份 45 mg,加入 0.1008 g·L<sup>-1</sup>木犀草苷对照品溶液 2 mL,按 2.1.3 项下方法处理,结果测得木犀草苷平均加样回收率 104.0%, RSD 1.1%。

### 2.2 单因素试验考察

**2.2.1 料液比** 称取过 60 目筛核桃隔膜 10 g,分别加 8, 10, 15, 20, 25 倍量 60% 乙醇超声提取 2 次,离心,浓缩,干燥,按 2.1.1 项下色谱条件进样,结果木犀草苷提取量分别为 0.946, 1.068, 1.627, 1.748, 1.567 mg·g<sup>-1</sup>,故选择料液比 1:20。

**2.2.2 乙醇体积分数** 称取过 60 目筛的核桃隔膜 10 g,分别加 20 倍量体积分数为 20%, 40%, 60%, 80%, 90% 的乙醇溶液超声提取 35 min,提取 2 次,离心,浓缩,干燥,按 2.1.1 项下色谱条件进样,结果木犀草苷提取量分别为 1.854, 2.262, 2.853, 2.766, 2.457 mg·g<sup>-1</sup>,故选择 60% 乙醇。

**2.2.3 原料粒径** 分别称取过 20, 40, 60, 80, 100 目筛的核桃隔膜 10 g,各加入 20 倍量 60% 乙醇超声提取 35 min,提取 2 次,离心,浓缩,干燥,按 2.1.1 项下色谱条件进样,结果木犀草苷提取量分别为 1.689, 2.853, 2.962, 3.093, 3.135 mg·g<sup>-1</sup>,结合生产实际考虑,选取 40 ~ 80 目为宜。

**2.3 正交试验优选** 在单因素试验基础上,选取料液比、乙醇体积分数、原料粒径为考察因素,以总黄酮提取量为评价指标,采用  $L_9(3^4)$  正交试验优选总黄酮提取工艺,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 核桃隔膜中总黄酮提取工艺优选正交试验因素水平

| 水平 | A 料液比/g·mL <sup>-1</sup> | B 乙醇体积分数/% | C 原料粒径/目 |
|----|--------------------------|------------|----------|
| 1  | 1:10                     | 40         | 40       |
| 2  | 1:15                     | 60         | 60       |
| 3  | 1:20                     | 80         | 80       |

表 2 核桃隔膜中总黄酮提取工艺优选正交试验安排

| No.            | A     | B     | C     | D(空白) | 总黄酮提取量<br>/mg·g <sup>-1</sup> |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|
| 1              | 1     | 1     | 1     | 1     | 1.88                          |
| 2              | 1     | 2     | 2     | 2     | 2.65                          |
| 3              | 1     | 3     | 3     | 3     | 2.17                          |
| 4              | 2     | 1     | 3     | 3     | 2.19                          |
| 5              | 2     | 2     | 1     | 1     | 2.95                          |
| 6              | 2     | 3     | 2     | 2     | 2.34                          |
| 7              | 3     | 1     | 2     | 2     | 2.13                          |
| 8              | 3     | 2     | 3     | 3     | 2.73                          |
| 9              | 3     | 3     | 1     | 1     | 2.50                          |
| K <sub>1</sub> | 2.233 | 2.067 | 2.317 | 2.443 |                               |
| K <sub>2</sub> | 2.493 | 2.777 | 2.447 | 2.373 |                               |
| K <sub>3</sub> | 2.453 | 2.337 | 2.417 | 2.363 |                               |
| R              | 0.260 | 0.710 | 0.130 | 0.080 |                               |

表 3 总黄酮提取工艺方差分析

| 方差来源  | SS    | f | F      | P     |
|-------|-------|---|--------|-------|
| A     | 0.118 | 2 | 10.727 | >0.05 |
| B     | 0.771 | 2 | 70.091 | <0.05 |
| C     | 0.028 | 2 | 2.545  | >0.05 |
| D(误差) | 0.010 | 2 |        |       |

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,影响总黄酮提取量的主次因素依次为  $B > A > C$ ; 方差分析表明,乙醇体积分对提取工艺的影响具有显著性,其他因素则无显著影响,确定最佳工艺条件为  $A_2B_2C_2$ , 即乙醇体积分 60%, 料液比 1:15, 原料粒径 60 目。

**2.4 验证试验** 称取过 60 目筛的核桃隔膜 10 g, 按优选的提取工艺进行 3 次平行试验, 结果总黄酮平均提取量  $2.985 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 0.22%, 说明该工艺稳定可行。

### 3 讨论

以芦丁为对照的比色法是测定黄酮类化合物的常用方法<sup>[8]</sup>, 但从图 1 可知, 核桃隔膜总黄酮提取物中芦丁含量较低, 很难准确定量, 虽然核桃隔膜黄酮提取物中木犀草苷含量最高, 但比色法专属性、精密性、重复性均较差。因此, 本实验以木犀草苷为定量指标, 采用 HPLC 测定其含量, 结果表明该方法专属性强、准确度高、重复性好。

预试验中比较了回流提取与超声波提取 2 种方法, 结果发现总黄酮提取量接近, 考虑到高温、长时间回流提取会造成样品结构的破坏, 而且回流法亦无超声法方便, 因此选择超声提取法。

### [参考文献]

- [1] 菇克娅·沙德克. 维吾尔医常药材学(维). 下册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1993: 53.
- [2] 江苏新医学院. 中草药大辞典. 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 667.
- [3] 王艳, 迪丽达尔·马合木提, 韩艳春, 等. 维吾尔药核桃分心木不同提取物对肾阳虚模型小鼠的实验研究[J]. 新疆医科大学学报, 2012, 35(2): 53.
- [4] 王艳梅, 高莉, 刘梦, 等. 核桃隔膜化学成分定性研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(12): 123.
- [5] 杨明珠, 周星利, 王珂玮, 等. 分心木化学成分研究[J]. 大理学院学报, 2011, 10(2): 7.
- [6] 赖红芳, 韦瑞松, 黄秀香. 金樱根总黄酮提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 13.
- [7] 桂婵, 吴安明, 何雁, 等. 夏天无提取工艺优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 4.
- [8] 郭亚健, 范莉, 王晓强, 等. 关于  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(2): 97.

[责任编辑 全燕]