

榅桲叶和果实中总黄酮提取工艺优选

孙晓伟¹, 艾尼瓦尔·吾买尔^{1*}, 周文婷¹, 刘宏炳², 田树革²

(1. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的: 优选新疆榅桲叶与果实中总黄酮的提取工艺。方法: 以总黄酮含量为指标, 采用正交试验考察加醇量、超声提取时间、超声功率、乙醇体积分数 4 个因素对提取工艺的影响。结果: 榅桲叶和果实中总黄酮最佳提取工艺均为 $A_3B_3C_3D_1$, 即加 30 倍量 60% 乙醇超声提取 40 min, 超声功率 80%。叶中总黄酮含量较果实中高。结论: 优选的总黄酮提取工艺稳定可行, 为新疆医药的开发提供实验依据。

[关键词] 榅桲; 总黄酮; 正交试验; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0068-03

Optimization of Extraction Technology for Total Flavonoids from Leaves and Fruit of *Cydonia oblonga*

SUN Xiao-wei¹, Umar Anwar^{1*}, ZHOU Wen-ting¹, LIU Hong-bing², TIAN Shu-ge²

(1. Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Traditional Chinese Medicine College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total flavonoids from leaves and fruit of *Cydonia oblonga*. **Method:** With the content of total flavonoids as index, orthogonal design was used to investigate influence of four factors on extraction technology, including the concentration of ethanol, ultrasonic time, ultrasonic power and ethanol amount. **Result:** Optimum extraction technologies of leaves and fruit were $A_3B_3C_3D_1$, ultrasonic extracted 40 min with 30 times the amount of 60% ethanol, ultrasonic power 80%, the content of total flavonoids in leaves was higher than fruit. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible, and it could provide experimental basis for development of Chinese medicine in Xinjiang.

[Key words] *Cydonia oblonga*; total flavonoids; orthogonal test; extraction technology

榅桲别名木梨、土木瓜、比也, 世界各国均有分布, 国内新疆、陕西分布较多^[1-2]。在新疆, 其常用于生食、制作抓饭、熬制果酱等。据记载, 榅桲果、叶、根、枝等部分均可入药, 对心血管等疾病有一定疗效, 具有广泛的医药用途。近年来, 将榅桲果实和叶子的提取物进行动物实验时发现, 其具有明显抑

制血栓形成、抗凝血和纤溶作用^[3]。目前, 榅桲总黄酮的提取工艺研究较少, 仅有少部分研究榅桲果实及榅桲子, 尚无榅桲叶提取工艺的报道, 造成了资源的极大浪费。本实验采用正交试验法首次探讨超声提取对新疆榅桲叶与果实中总黄酮含量的影响, 优化榅桲总黄酮的提取工艺, 为榅桲叶资源的合理利用提供实验依据。

1 材料

XS205DU 型分析天平(梅特勒 METTLER TOLEDO), GBC Cintra-40 型紫外可见分光光度计(澳大利亚 GBC 科学仪器公司), FW177 型高速万能粉碎机(北京市永光明医疗仪器厂), TDL-5A 型离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司)。

芦丁对照品(中国食品药品检定研究院, 批号

[收稿日期] 20121107(016)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技计划项目(201033126); 国家自然科学基金(地区基金)项目(81060268)

[第一作者] 孙晓伟, 在读硕士, 从事心血管药理学研究, Tel: 18699156430, E-mail: 36156754@qq.com

[通讯作者] * 艾尼瓦尔·吾买尔, 教授, 博士生导师, 从事心血管药理学研究, Tel: 0991-4362421, E-mail: anwar.umar@126.com

2010-A0103), 试剂均为分析纯; 椴椴由新疆医科大学药学院天药/生药学教研室帕丽达·阿不力孜教授鉴定为蔷薇科椴椴属植物 *Cydonia oblonga* Mill. 的叶和果实。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定^[4-6]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥恒重的芦丁对照品 10.14 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加 60% 乙醇适量使溶解, 待凉后定容至刻度, 即得。

2.1.2 标准曲线的绘制 采用吸收光谱法测定总黄酮含量, 通过于 200~800 nm 进行全波长扫描, 确定检查波长 504 nm。准确吸取对照品溶液 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加 60% 乙醇至 6 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 使混匀, 放置 6 min, 加 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 4% 氢氧化钠溶液 10 mL, 用乙醇定容至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以相应试剂为空白, 于 504 nm 测定吸光度 (A), 得回归方程 $A = 0.013C + 0.0015$ ($R^2 = 0.9994$), 线性范围 0~1.217 mg。

2.1.3 供试品溶液的制备 分别取新疆椴椴叶子和果实, 用水洗净, 55 °C 鼓风干燥 48 h, 冷却后粉碎, 过 60 目筛, 准确称取粉末各 15 g, 分别采用索式提取器石油醚脱脂 2 h, 药渣挥干溶剂, 真空干燥, 备用。每次称取 1.000 g, 用于正交试验, 提取温度 60 °C, 提取 1 次, 抽滤, 滤液于 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 去除残留色素等干扰, 抽滤, 取上清液, 测定总黄酮含量。

2.1.4 稳定性试验 准确称取椴椴果实粉末 1.0 g, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 1 mL, 按 2.1.2 项下方法于 504 nm 处测定 A , 每隔 20 min 测定 1 次。结果表明供试品溶液显色后 2 h 内稳定, RSD 0.98%。

2.1.5 精密度试验 准确称取椴椴果实粉末 1.0 g, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 1 mL, 按 2.1.2 项下自“加 60% 乙醇至 6 mL”起操作, 连续测定 6 次, RSD 0.11%, 说明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批椴椴果实粉末样品, 按 2.1.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.1.2 项下方法于 504 nm 处测定 A 。结果 RSD 0.54%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密量取已知总黄酮含量的样品液 6 份, 各加入芦丁对照品溶液 (0.2028 g·L⁻¹) 0.5 mL, 按 2.1.3 项下方法制备供

试品溶液, 在 504 nm 处测定 A , 计算回收率。结果平均回收率 99.69%, RSD 1.06%。

2.2 正交试验 采用 L₉(3⁴) 正交试验对影响乙醇超声提取的主要因素加醇量、超声时间、超声功率、乙醇体积分数进行考察, 每个因素选择 3 个水平, 以总黄酮含量为指标, 确定最佳提取工艺, 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 新疆椴椴叶与果实中总黄酮的提取工艺正交试验因素水平

水平	A 加醇量 /mL	B 超声时间 /min	C 超声功率 /%	D 乙醇体积 分数/%
1	10	20	60	60
2	20	30	70	70
3	30	40	80	80

表 2 新疆椴椴叶与果实中总黄酮的提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	叶中总黄酮 果实中总	
					提取量 /mg·g ⁻¹	黄酮提取量 /mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	41.86	11.98
2	1	2	2	2	47.60	13.61
3	1	3	3	3	52.10	11.72
4	2	1	2	3	52.75	13.32
5	2	2	3	1	70.29	18.12
6	2	3	1	2	64.23	16.75
7	3	1	3	2	63.39	19.10
8	3	2	1	3	55.78	15.66
9	3	3	2	1	73.40	21.61
叶	K ₁	47.19	52.67	53.96	61.85	
	K ₂	62.42	57.89	57.92	58.41	
	K ₃	64.19	63.24	61.93	53.54	
	R	17.00	10.58	7.97	8.31	
果实	K ₁	12.44	14.80	14.80	17.24	
	K ₂	16.06	15.80	16.18	16.49	
	K ₃	18.79	16.69	16.31	13.57	
	R	6.35	1.89	1.52	3.67	

由以上结果可知, 叶中总黄酮含量明显高于果实。由叶的直观分析可知, 各因素的主次顺序 $A > B > D > C$; 由果实的极差可知, 各因素主次顺序为 $A > D > B > C$ 。分别以极差最小的因素为误差项进行方差分析, 表明各因素对提取工艺均无显著性差异。确定椴椴叶和果实的最佳提取工艺均为

表 3 总黄酮提取量方差分析

类别	误差来源	SS	f	F	P
叶	A	524.39	2	5.50	>0.05
	B	167.81	2	1.76	>0.05
	C(误差)	95.28	2	1.00	
	D	104.51	2	1.10	>0.05
果实	A	60.95	2	14.40	>0.05
	B	5.38	2	1.27	>0.05
	C(误差)	4.23	2	1.00	
	D	22.56	2	5.33	>0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

$A_3B_3C_3D_1$, 即加 30 倍量 60% 乙醇超声提取 40 min, 超声功率 80%。

2.3 验证试验^[7] 精密称取椴椴叶与果实各 1.00 g, 按优选的提取工艺进行 3 次验证试验, 测得总黄酮平均提取量分别为 74.24, 21.81 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。表明该工艺稳定可行。

3 讨论

本实验通过索氏提取预处理以除去干扰物质, 超声后又经离心除去残存干扰物质, 使总黄酮含量测定更加可靠; 通过正交试验筛选出椴椴叶和果实总黄酮的最佳提取工艺一致, 但影响因素的主次顺序却不同, 说明各因素对提取工艺的影响不同。新疆椴椴叶中总黄酮的含量是果实的 3.4 倍。说明采

用叶作为原料提取总黄酮更具有开发价值, 效率更高, 同时可节省成本, 更适合于工业化生产。本实验收集的样品均采用 1 次提取, 预试验采用单因素试验考察提取次数, 发现提取 3 次效果更显著。

[参考文献]

- [1] 茹克娅·沙德克·维吾尔常用药材学·上册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1993: 233.
- [2] 王济宪. 新疆的稀有果类——椴椴[J]. 特种经济动植物, 2000, 19(5): 30.
- [3] 乌兰巴依尔, 杨永新, 王雪飞, 等. 椴椴提取物对抗血栓作用的实验观察[J]. 中成药, 2011, 33(8): 1407.
- [4] 杜芳艳, 邓保炜, 张智芳, 等. 正交设计优选掌裂草葡萄中总黄酮的提取工艺[J]. 光谱实验室, 2012, 29(2): 875.
- [5] 毛海立, 周德超, 龙成梅, 等. 铁包金中不同部位总黄酮含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 115.
- [6] 张文莉, 高敏, 石森林. 分光光度法测定山楂叶提取物中总黄酮的含量[J]. 中华中医药学刊, 2011, 30(5): 1148.
- [7] 吕鹏, 贾秀梅, 张振凌, 等. 怀山药及非药用部位总黄酮含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 65.

[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, 320 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。