

多指标综合评价法优选湖北海棠叶中总黄酮提取工艺

王幸, 师延琼, 覃鸿恩, 郭东艳*
(陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的: 优选湖北海棠中总黄酮的提取工艺。方法: 以总黄酮及根皮苷含量为指标, 采用单因素试验法筛选提取方法和提取次数; 以浸膏得率, 总黄酮及根皮苷含量为综合评价指标, 对主要影响因素乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间进行正交试验优选。结果: 最佳提取工艺为8倍量70%乙醇回流提取3次, 每次1h。结论: 优选工艺稳定可行, 可作为湖北海棠中总黄酮的提取工艺。

[关键词] 湖北海棠; 正交设计; 总黄酮; 综合评价; 根皮苷

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0046-04

Optimization of Extraction Technology for Total Flavonoids from *Malus hupehensis* by Multi-index Comprehensive Evaluation Method

WANG Xing, SHI Yan-qiong, QIN Hong-en, GUO Dong-yan*
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total flavonoids from *Malus hupehensis*. **Method:** Single factor test was made to select extraction method and extraction times with the content of total flavonoids and phloridzin as indexes; With the content of extract yield, total flavonoids and phloridzin as comprehensive evaluation index, main factors were optimized by orthogonal test which including the concentration of ethanol, the amount of solvent and extraction time. **Result:** Optimum extraction technology was: refluxing extracted 3 times with 8 folds the amount of 70% ethanol, 1 h each time. **Conclusion:** Optimized process was stable and feasible, and it could be extraction process of total flavonoids from *M. hupehensis*.

[Key words] *Malus hupehensis*; orthogonal design; total flavonoids; comprehensive evaluation; phloridzin

湖北海棠又叫野海棠、茶海棠、野花红, 树姿优美, 花蕾深粉红, 开放后近白色, 有芳香。湖北海棠

含有茶多酚、黄酮、Zn、Cr、Mn等多种矿物质, 具有抗菌消炎、耐缺氧、抗疲劳、降血糖等药理作用^[1-3],

[收稿日期] 20120221(002)

[基金项目] 陕西省教育厅重点实验室项目(11JS036); 陕西省重点学科专项资金项目

[第一作者] 王幸, 在读硕士研究生, 从事中药制剂研究, Tel: 029-38185180

[通讯作者] * 郭东艳, 博士, 教授, 从事中药新制剂与新剂型研究, Tel: 029-38185180, E-mail: winter180@163.com

[7] 苏红, 黄川生, 陈文, 等. 单向灌流法研究紫草素的大鼠在体肠吸收[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 190.

[8] 张英丰, 李玉洁, 杨庆, 等. 大鼠在体单向肠灌流法进行丹参素、丹酚酸B的肠吸收研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 96.

[9] Gao Q, Shan J J, Di L Q, et al. Therapeutic effects of daphnetin on adjuvant-induced arthritic rats [J]. J Ethnopharmacol, 2008(120): 259.

[10] 许蕾, 杨中林. 大鼠在体单向灌流法研究橙皮苷肠道吸收性质[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(8): 594.

[责任编辑 全燕]

主要用于治疗慢性肝炎、脂肪肝、急慢性肝损伤、高血糖、高血脂等症^[4-5]。其主要化学成分为黄酮类成分,而黄酮类成分中以根皮苷含量较高,根皮苷易分离提纯,具有良好的开发应用前景。故本试验以总黄酮及根皮苷含量为综合评价指标,对影响提取的因素进行考察,优选提取工艺参数,以期总黄酮的开发利用提供实验依据。

1 材料

L-2000型高效液相色谱仪(日本日立),UV1102型紫外可见分光光度仪(上海天美科学仪器有限公司),BT25S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),GB204型电子分析天平(瑞士梅特勒公司)。

湖北海棠(天然产物研究与开发湖北省重点实验室提供,经三峡大学汪鋆植教授鉴定为苹果属湖北海棠 *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd 的干燥叶),根皮苷对照品(自制),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 取根皮苷对照品适量,精密称定,加50%甲醇制成 $0.1026\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密量取样品液10 mL至蒸发皿中,水浴蒸干,残渣加50%甲醇溶解移至50 mL量瓶中,用50%甲醇定容至刻度,精密量取0.5 mL置50 mL量瓶中,用50%甲醇定容至刻度,摇匀。0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 检测波长的确定 取根皮苷对照品溶液和供试品溶液,以50%甲醇为空白试剂,照紫外-可见分光光度法,于200~400 nm波长进行扫描,结果发现两者紫外吸收图谱类似,均在287 nm处有最大吸收,故选择287 nm为测定波长。

2.1.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取根皮苷对照品溶液0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mL于10 mL量瓶中,用50%甲醇稀释至刻度。采用紫外-可见分光光度法于287 nm波长处测定吸光度(A)。以 A 为纵坐标,根皮苷质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线。得回归方程 $A = 34.39C - 0.012$ ($R^2 = 0.9996$)。结果表明对照品溶液在 $0.00513 \sim 0.03078\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 A 呈良好线性关系。

2.1.5 精密度考察 取根皮苷对照品溶液,重复测定5次,记录 A ,计算RSD 0.11%。表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性考察 取样品液5份,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,测定 A ,计算总黄酮含量,结果其平均含量为16.37%,RSD 2.47%。表明本方法重复性良好。

2.1.7 稳定性考察 取2.1.2项下制得的供试品溶液分别于0,0.5,1.0,1.5,2.0 h测定其 A ,结果RSD 0.16%,表明本样品在2.0 h内稳定性良好。

2.2 根皮苷含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适应性 Diamonsil C_{18} (2)色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(25:75),检测波长287 nm,流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取根皮苷对照品1.01 mg,用50%甲醇溶解,定容至10 mL量瓶中,配制成 $0.101\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的根皮苷对照品溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密移取样品液10 mL至蒸发皿中,水浴蒸干,将残渣转移至50 mL量瓶中,用50%甲醇定容至刻度,精密移取3 mL置25 mL量瓶中,用50%甲醇定容至刻度。0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取对照品溶液4,6,8,10,12,14 μL ,注入液相色谱仪,记录峰面积。以峰面积为纵坐标,根皮苷含量为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 8 \times 10^6 X - 405488$ ($R^2 = 0.9997$),表明根皮苷在 $0.404 \sim 1.414\text{ }\mu\text{g}$ 线性关系良好。

2.2.5 精密度考察 精密吸取2.2.3项下制得的供试品溶液10 μL ,按上述色谱条件,重复进样5次,记录峰面积,计算RSD 1.15%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 精密吸取2.2.3项下制得的供试品溶液10 μL ,按上述色谱条件,分别于0,2,4,6,8 h进行测定,结果RSD 1.26%,表明供试品溶液在8 h内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取样品液5份,分别按2.2.3项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件,精密吸取各样品溶液10 μL 注入液相色谱仪,进行测定,结果根皮苷含量为6.93%,RSD 1.55%,表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 精密称取一定量已知含量的样品液6份,分别按照1:0.8,1:1,1:1.2比例加入根皮苷对照品,按2.2.3项下方法操作,进行测定,考查本方法的加样回收率,结果见表1。表明本方法回收率良好。

表 1 根皮苷加样回收率试验

样品中含 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 /%	RSD /%
0.851	0.67	1.535	102.14		
0.841	0.65	1.516	103.93		
1.132	1.10	2.250	101.64	102.03	1.03
1.141	1.11	2.273	102.00		
1.117	1.32	2.460	101.72		
1.090	1.30	2.400	100.765		

2.3 单因素考察^[6]

2.3.1 提取方法的考察

2.3.1.1 回流法 取湖北海棠粗粉 3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 30 mL, 于 85 °C 水浴回流提取 2 次, 每次 1 h, 提取液滤过合并后, 置 500 mL 量瓶中, 用 70% 乙醇定容至刻度, 精密移取 10 mL 置蒸发皿中, 水浴蒸干后, 残渣用 50% 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中。精密移取 0.4 mL 于 25 mL 量瓶中, 以 50% 甲醇稀释至刻度, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.1.2 渗漉法 取湖北海棠粗粉 3 g, 精密称定, 置烧杯中, 加入少量 70% 乙醇浸泡 1 h, 精密加 70% 乙醇 30 mL 放置过夜, 加 70% 乙醇 60 mL 进行渗漉, 收集渗漉液, 置 500 mL 量瓶中, 用 70% 乙醇定容至刻度。精密移取 10 mL 置蒸发皿中, 水浴蒸干, 残渣转移至 10 mL 量瓶, 用 50% 甲醇定容至刻度。精密移取 0.4 mL 于 25 mL 量瓶中, 以 50% 甲醇定容至刻度, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.1.3 水提法 取湖北海棠粗粉 3 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 加水 60 mL 煎煮 2 次, 每次 1 h, 提取液滤过后合并, 置 500 mL 量瓶中, 加水定容至刻度。精密移取 10 mL 置蒸发皿中, 水浴蒸干, 将残渣转移至 10 mL 量瓶, 用 50% 甲醇定容至刻度。精密移取 0.4 mL 于 10 mL 量瓶中, 以甲醇稀释定容至刻度, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

将以上 3 种方法所得供试品溶液用紫外分光光度仪及高效液相色谱仪进行测定, 计算总黄酮质量分数依次为 18.82%, 18.91%, 7.74%; 根皮苷质量分数分别为 6.28%, 6.44%, 3.16%。由结果可知, 渗漉法和回流法提取液中总黄酮及根皮苷含量均明显高于水提法, 综合成本及操作实际, 故选择回流法进行提取。

2.3.2 提取次数的考察 分别称取湖北海棠粗粉 20 g, 置具塞锥形瓶中, 加入 10 倍量 70% 乙醇于 85

°C 水浴回流提取 1, 2, 3, 4 次, 每次 1 h, 提取液滤过浓缩后, 分别置 50 mL 量瓶中, 用 70% 乙醇定容至刻度, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。用紫外分光光度仪及高效液相色谱仪进行测定, 计算总黄酮质量分数依次为 12.36%, 5.53%, 2.31%, 0.80%; 根皮苷质量分数分别为 4.85%, 1.69%, 0.92%, 0.31%。说明提取 3 次已基本完全。

2.4 正交试验工艺优化^[7] 在单因素试验基础上, 选取乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间 3 个因素进行 L₉(3⁴) 正交试验(表 2)。精确称取湖北海棠 5 g, 共 9 份, 按正交表进行试验, 提取液浓缩, 定容至 100 mL 量瓶中, 精密移取 10 mL 至蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 °C 干燥, 置干燥器中冷却 0.5 h, 迅速称重。按下式计算浸膏得率, 浸膏得率 = $W \times 100 / 10 \times 5 \times 100\%$ (W 为浸膏净重); 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 紫外分光光度仪测定 A , 计算总黄酮含量; 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定峰面积, 计算根皮苷含量, 结果见表 3。综合评分^[8-9] (OD) = $0.2W_1/W_{max1} + 0.4W_2/W_{max2} + 0.4W_3/W_{max3}$, 方差分析见表 4。

表 2 湖北海棠中总黄酮提取工艺正交试验因素水平

水平	A	B	C
	乙醇体积分数/%	溶剂用量/倍	提取时间/h
1	60	6	0.5
2	70	8	1.0
3	80	10	1.5

表 3 湖北海棠中总黄酮提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	浸膏	总黄酮	根皮苷	综合
					得率	含量	含量	
					/%	/mg·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	评分
1	1	1	1	1	26.87	139.29	57.47	0.793 8
2	1	2	2	2	29.79	163.92	61.40	0.887 2
3	1	3	3	3	26.36	140.98	52.19	0.763 9
4	2	1	2	3	32.42	174.89	65.58	0.950 8
5	2	2	3	1	32.00	173.96	64.49	0.939 9
6	2	3	1	2	33.35	180.45	68.23	0.983 6
7	3	1	3	2	27.49	153.80	61.23	0.850 6
8	3	2	1	3	30.35	172.12	64.18	0.924 3
9	3	3	2	1	33.42	185.37	69.15	1.000 0
K ₁	2.445	2.595	2.702	2.734				
K ₂	2.874	2.751	2.838	2.721				
K ₃	2.775	2.748	2.554	0.639				
R	0.430	0.156	0.284	0.095				

表4 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.033 7	2	19.82	<0.05
B	0.005 3	2	3.12	
C	0.013 4	2	7.88	
D(误差)	0.001 7	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

由表3结果可知,各因素的作用主次为 $A > C > B$ 。方差分析结果表明A因素具有显著性差异,B,C因素各水平之间差异无显著性。综上所述,最佳提取工艺确定为 $A_2B_2C_2$,即8倍量70%乙醇提取3次,每次1h。

2.5 验证试验 称取湖北海棠100g,按优选工艺条件进行3次验证试验,测得总黄酮质量分数分别为18.63%,18.83%,18.44%;根皮苷质量分数依次为6.85%,6.97%,6.86%。表明优选工艺合理、稳定、可行。

3 讨论

在正交试验评价指标选择时,本工艺确定评价指标有3个^[10-12]。由于单一指标难以反映中药多成分、多靶点的作用特点。多指标综合评价在一定程度上可客观评价提取效果的优劣。同时前期试验研究结果表明湖北海棠的主要有效成分为黄酮类化合物,且根皮苷含量较高,同时是其活性成分之一,故试验采用紫外分光光度法测定总黄酮含量,以HPLC测定根皮苷含量,并对出膏率进行考察,三者进行权重作为综合评价指标,优选湖北海棠中总黄酮的提取工艺,其较单一指标更加科学、合理。

[参考文献]

- [1] 方荣,杨茜,李莉,等. 湖北海棠中根皮苷含量测定[J]. 食品科技,2008(6):195.
- [2] 郭东艳,李瑾,师延琼,等. 三种海棠黄酮类成分分析[J]. 中药材,2011,34(7):1026.
- [3] 冯改利,郭东艳,李瑾,等. 湖北海棠 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):67.
- [4] 朱靖静,刘呈雄,张红艳,等. 湖北海棠质量标准研究[J]. 中药材,2010,33(5):707.
- [5] 郭东艳,李瑾,董凯,等. 多指标加权评分法优选海棠泡腾片的制备工艺[J]. 中成药,2011,33(9):1617.
- [6] 马文兵,曹端林,王建龙. 北柴胡茎叶总黄酮提取工艺研究[J]. 中药材,2010,33(2):288.
- [7] 殷丹,陈科力. 正交试验优选江南卷柏总黄酮提取工艺[J]. 中国药房,2010,21(15):1368.
- [8] 张丽娟. 生地黄止血物质基础及海绵剂制备工艺研究[D]. 西安:陕西中医学院,2011.
- [9] 王洁,宋忠兴,郭东艳,等. 多指标综合加权评分法优选桑蒂复肝胶囊的提取工艺[J]. 现代中医药,2010,30(1):56.
- [10] 任爱农. 多指标综合评分法优选清清颗粒提取工艺[J]. 中成药,2008,30(7):1059.
- [11] 何迅,李勇军,王爱民,等. 多指标综合评分法优选紫金透骨喷雾剂渗漉提取工艺[J]. 中成药,2010,32(6):1061.
- [12] 李丽,周军,张莹,等. 多指标综合评分法优化痛风宁颗粒提取工艺[J]. 中成药,2007,29(2):281.

[责任编辑 全燕]