

构树叶中总黄酮微波提取工艺优化

朱开梅¹, 刘建楠¹, 顾生玖^{1*}, 唐世锭², 欧奕³, 赵磊¹

(1. 桂林医学院药学院, 广西 桂林 541004; 2. 桂林华信制药有限公司, 广西 灵川 541200;
3. 桂林三金药业 质检科, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的:优化构树叶总黄酮(TFBP)的微波辅助提取最佳工艺。方法:运用微波辅助提取构树叶总黄酮,以芦丁为指标,利用紫外分光光度计测定总黄酮吸光度进行指标控制,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法筛选最佳提取工艺。结果:微波辅助提取构树叶总黄酮的最佳工艺条件为微波功率 350 W,温度 45℃,微波时间 15 min,料液比 1:10。结论:提取工艺方法简单、合理、稳定且可行。

[关键词] 微波辅助; 构树叶; 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(2011)17-0051-04

Microwave-assisted Extraction of Total Flavonoids from *Broussonetia papyrifera*

ZHU Kai-mei¹, LIU Jiang-nan¹, GU Sheng-jiu^{1*}, TANG Shi-ding², OU Yi³, ZHAO Lei¹

(1. School of Pharmacy, Guilin Medical College, Guilin 541004, China;
2. Guilin Huaxin Pharmaceutical Co., LTD, Lingchuan 541200, China;
3. Department of Quality, Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., LTD, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the microwave-assisted extraction of the total flavonoids from *Broussonetia papyrifera*. **Method:** The total flavonoids were extracted by microwave-assisted, the optimum extraction process was investigated by $L_9(3^4)$ orthogonal test with rutin as index which controlled the absorbance of total flavonoids by UV. **Result:** The optimum extraction technology was as follows: 350 W of microwave power for 15 minutes at 45 °C, the ratio of solid to liquid was 1:10. **Conclusion:** This process is simple, reasonable, stable and feasible.

[Key words] microwave assisted; *Broussonetia papyrifera*; total flavonoids; orthogonal design; extraction process

构树 *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent 为桑科构树属植物,主要分布在我国南方大部分地区,资源十分丰富。在我国历版药典中均被做为一种常见的

宝贵药材被收藏^[1]。其叶、果实、树皮、根皮和乳汁均含有一定的生理活性物质,具有广泛的医药用途。《本草纲目》上记载构树叶具有凉血、利水、治吐血,血崩外伤出血、水肿、疝气、痢疾、癣疮之功效^[2-3]。近年来发现,将构树叶提取物做成软膏制剂,构树叶软膏治疗浅部真菌病的疗效与达克宁相当,构树叶不溶剂提取物体外抗浅部真菌试验显示具有明显的抗真菌作用^[4-5]。现代科学研究构树属提取物还具有抑制心房收缩力、钙拮抗、抗过氧化、抗癌以及抗血小板形成等作用^[6-10]。

但目前对构树叶的研究开发利用严重滞后,构树叶的精加工产品较少,人们只将部分构树的嫩叶

[收稿日期] 20110506(004)

[基金项目] 广西科技攻关项目(0815005-1-17;0992003A-25;09321056);桂林市科技攻关项目(20050105-3)

[第一作者] 朱开梅,教授,从事天然活性成分提取分离及活性分析,Tel:13977375180,E-mail:glzkm@163.com

[通讯作者] *顾生玖,教授,博士,从事天然抗肿瘤活性成分分离的开发与研究,Tel:13607733816,E-mail:gushengjiu@163.com

用于喂养猪、牛、羊,除此之外别无它用,造成资源的极大浪费^[11]。利用现代高科技手段从构树叶中提取生物活性物质,做成保健品或天然药物可以大大地提高其经济效益。目前从构树中提取黄酮多采用传统的溶剂提取法进行研究^[12-13],而有关微波辅助提取构树叶黄酮的研究却没有。本实验首次选用乙醇为溶剂,采用正交试验设计微波辅助提取构树叶总黄酮,考察了影响微波提取的各种因素,并对其进行优化处理,为构树叶资源的合理利用提供了一定的技术。

1 材料

芦丁对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 100080-200707),构树叶(采集于桂林医学院药用植物园,由药学院天然药化教研室傅鹏博士鉴定其来源于桑科构属植物构树 *Broussonetia papyrifera* 的叶,水为双蒸水,试剂均为分析纯。

NJL07-3 型微波炉(南京杰全微波设备有限公司),722 型紫外-可见分光光度计(上海精密科技有限公司),DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

2 方法与结果

2.1 构树叶样品制备 将采集好的构树叶进行筛选,将部分无病虫害的构树叶日晒干燥,粉碎过 80 目筛,40 ℃ 烘箱中干燥 3 h,冷却到室温,置于干燥箱中,备用。

2.2 构树叶总黄酮含量测定 试验选取芦丁为对照品,利用紫外-可见分光光度法测定构树叶总黄酮含量。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取在 120 ℃ 干燥至恒重芦丁对照品 0.023 g,置于 100 mL 量瓶中,加 30% 乙醇 60 mL 置于超声波清洗机中促其溶解,加乙醇至刻度线,摇匀,即得 0.23 g·L⁻¹ 芦丁对照品溶液。

2.4 供试样品溶液的制备 称取构树叶粉末 10 g,置于圆底烧瓶中,采用微波辅助提取构树叶总黄酮(60% 乙醇,料液比 1:10,温度 60 ℃,微波功率 300 W,时间 10 min)。提取液过滤,回收乙醇,过聚酰胺柱,收集滤液,回收乙醇溶液,将浓缩液转至 100 mL 量瓶,定容,摇匀,待测。

2.5 比色原理及最大吸收波长选择^[13-14] 构树叶含有多种黄酮类化合物,由于其含有酚羟基及 γ -吡喃铜环在适当的介质条件下能与铝盐生成黄色络合

物并有荧光。本试验用一定质量浓度的 NaNO₂ 溶液、Al(NO₃)₃ 溶液、NaOH 溶液显色,在 400 ~ 600 nm 处进行扫描,结果对照品和待测溶液在 510 nm 处有最大吸收,因此将测定波长确定为 510 nm。

2.6 方法学考察

2.6.1 标准曲线 精密量取对照品溶液 0, 1.0, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4.0 mL, 分别置于 10 mL 的量瓶中,用 30% 乙醇溶液定容至 5 mL,加入 5.0% NaNO₂ 溶液 0.3 mL,混匀,放置 5 min,加入 10.0% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL,混匀,放置 6 min,加 1.0 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 2.0 mL,再加 30% 乙醇定容至 10 mL,放置 15 min。于 510 nm 波长处测定其吸光度(A),以 A 为纵坐标、质量浓度 C 为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $A = 0.8694X - 0.0017$ ($R^2 = 0.9992$),芦丁对照品在 0.25 ~ 0.95 g·L⁻¹ 线性良好。

2.6.2 重复性试验 取同一批构树叶样品 5 份,按照 2.4 供试样品溶液的制备方法进行试验,按 2.6.1 项操作显色,计算每份样品中总黄酮的含量,5 次测得的平均含量为 69.61 mg·g⁻¹,RSD 1.87%,由此可见试验选用的测定方法重复性良好。

2.6.3 显色剂稳定性实验 精密吸取供试品溶液 1 mL,按 2.6.1 项下操作显色,在 0 ~ 60 min 每隔 10 min 进行测定吸光度值。计算 RSD 0.99% ($n = 6$),表明样品在 1 h 内稳定。

2.6.4 加样回收率实验 准确称取构树叶样品 9 份,每份各 10 g,分别精密加入一定量的对照品溶液,按 2.4 项下方法制备项进行实验,并取 1 mL 于 10 mL 量瓶中,按 2.6.1 项下操作显色,测定吸光度;按回归方程求得总黄酮量,得平均回收率为 98.31%,RSD 2.46%,表明该方法测得的结果准确。

2.7 构树叶总黄酮样品含量测定 取各实验组构树叶总黄酮待测液 1 mL,用 30% 乙醇稀释至 10 mL 后,各取 1 mL 放入量瓶中按 2.6.1 方法进行处理,测定吸光度及回归方程计算各组构树叶总黄酮百分含量,黄酮含量按如下公式计算:

$$\text{黄酮类化合物提取量} = \frac{C \times V}{W}$$

C 为样品溶液质量浓度;V 为样品溶液体积;W 为样品质量。

2.8 微波辅助提取法优化工艺的正交试验 由于构树叶黄酮提取主要受到微波功率、微波时间、微波温度、料液比、提取次数等因素的影响,纵观文

献^[15-17],当药材选用乙醇进行提取时,其提取次数一般选用2~3次,故本试验提取次数选择为3次,考虑到安全性及经济性,设计了4因素3水平正交试验,以构树叶总黄酮含量为指标,应用SPSS 17.0统计软件表进行试验,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验(表1)。

表1 构树叶中总黄酮微波提取工艺正交因素和水平

水平	A 微波温度/℃	B 微波时间/min	C 微波功率/w	D 料液比/g·mL ⁻¹
1	35	9	150	1:10
2	45	12	250	1:20
3	55	15	350	1:30

表2 构树叶中总黄酮微波提取工艺正交试验安排及结果

No.	A	B	C	D	总黄酮含量/ 10 ⁻² mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	67.71
2	1	2	2	2	67.00
3	1	3	3	3	96.32
4	2	1	2	3	80.00
5	2	2	3	1	107.42
6	2	3	1	2	100.98
7	3	1	3	2	109.99
8	3	2	1	3	92.08
9	3	3	2	1	90.00
K_1	77.010	82.900	86.923	88.377	
K_2	96.133	88.833	79.00	89.657	
K_3	94.357	95.767	101.577	89.467	
R	19.123	12.867	22.577	1.280	

表3 方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	669.765	2	233.938	<0.01
B	248.827	2	86.911	<0.05
C	787.205	2	274.958	<0.01
D(误差)	2.863	2	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

表2结果表明,影响微波辅助提取构树叶总黄酮含量的4个因素影响构树叶总黄酮含量的顺序为C(微波功率)>A(微波温度)>B(微波时间)>D(料液比);但由于料液比对微波辅助提取构树叶黄酮的影响最小,故以其做为误差进行方差分析。

以D因素为误差项的方差分析结果显示见表3,A,C因素有高度显著性意义,B因素有显著性意义。微波提取构树叶总黄酮的最佳工艺为 $C_3A_2B_3D_2$,即在微波功率350W,温度45℃,微波时间15min,物料比例1:10。

2.9 验证试验 精确称取构树叶粉末10g,经过60%乙醇浸泡4h后,用筛选出的最佳工艺条件组即微波功率350W,温度45℃,微波时间15min,料液比1:10($g \cdot mL^{-1}$)进行3次微波辅助提取,测定总黄酮的平均质量分数为 $1.39 mg \cdot g^{-1}$,由结果可以看出正交试验筛选出的微波辅助提取构树叶总黄酮工艺是稳定、合理的。

2.10 微波辅助提取法与传统水浴回流法比较

2.10.1 微波辅助提取 称取干燥的构树叶粉10.0g,放入两口圆底烧瓶中,用60%乙醇做溶剂按1:10($g \cdot mL^{-1}$)物料比例浸泡4h,在功率350W,45℃,微波辅助提取15min,稍冷,过滤。收集滤液,回收乙醇至浓缩液无醇味。将浓缩液倒入预处理的聚酰胺柱内,静置30min,用大量的蒸馏水冲洗至无色后用70%乙醇洗脱,流速为 $0.8 mL \cdot min^{-1}$,至流出液基本无色,收集流出液,回收乙醇,将浓缩液转至100mL量瓶,定容,摇匀,待测。

2.10.2 水浴回流提取 称取干燥的构树叶粉10.0g,按1:20($g \cdot mL^{-1}$)料液比加入60%乙醇,摇匀后浸泡4h。在45℃浸提15min,浸提3次,过滤,收集3次滤液,回收乙醇至浓缩液无醇味。将浓缩液倒入预处理的聚酰胺柱内,静置30min,用大量的蒸馏水冲洗至无色后用70%乙醇洗脱,流速为 $0.8 mL \cdot min^{-1}$,至流出液基本无色,收集流出液。回收乙醇,将浓缩液转至100mL量瓶,定容,摇匀,待测。

结果测得微波辅助提取法和水浴回流法提取构树叶总黄酮含量分别为 $1.39, 0.41 mg \cdot g^{-1}$,由此可知微波辅助提取法明显优于水浴回流提取法。

3 讨论

微波辅助提取是利用微波能来提高提取率的一种技术。用微波能加热浸提溶剂,将目标化合物从样品基体中分离进入溶剂。微波提取过程中,由于体系中不同物质对微波吸收能力不同,其产热及其传递周围环境的热能不同,使某些活性成分被选择性加热进入到介电常数小、微波吸收能力差的溶剂中。与传统的索氏提取法、回流法相比,微波提取因促进反应的高效性和强选择性,具有工艺简单、加热

效率高、升温均匀、节约溶剂、选择性好、副产物少、产率高、可减少由于高温引起的目标物质分解等特点,被广泛应用在天然植物中提取黄酮类化合物反应中^[14-18]。

本实验利用微波辅助提取构树叶黄酮,与传统工艺相比,具有提取量高,准确、快速,操作成本低,稳定性好,并且对环境无害等特点。因此微波辅助提取构树叶总黄酮是一种绿色环保的新方法,具有广阔的应用前景。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2000:275.
[2] 黄宝康,秦路平,郑汉臣,等. 中药楮实子及其原植物的本草考证[J]. 中药材, 2002, 25(5): 357.
[3] 朱开梅,刘建楠,顾生玖,等. 构树药用活性化学成分及药理临床应用研究进展[J]. 中国实验方剂学, 2011, 17(1): 198, 204.
[4] 卞美广,黄一平,朱黎明,等. 楮叶软膏治疗浅部真菌病 50 例临床观察[J]. 中医外治杂志, 2003, 12(3): 19.
[5] 黄一平,卞美广,朱黎明. 楮叶体外抗真菌作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学, 2006, 12(1): 49.
[6] 徐小花,钱士辉,卞美广,等. 构树叶的化学成分[J]. 中国天然药物, 2007, 5(3): 190.
[7] 高允生,邱玉芳,高聆,等. 构叶醇提取物与黄酮苷对离体心房的抑制作用[J]. 中国药理学通报, 1988, 4

(2): 122.
[8] 冯卫生,李红伟,郑晓珂. 构树化学成分的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(4): 272.
[9] Shirata Akira, Takahashia Kokichi. Production of antifungal substances in the root of mulberry[J]. Sanshi Shikenjo Kokoku. 1982, 28(5): 691.
[10] Lin C N, Lu C M, Lin H C, et al. Novel antiplatelet constituents from *osan moraceous* plants[J]. J nat products, 1996, 59(9): 834.
[11] 张秋玉,李远发,梁芳. 构树资源研究利用现状及其展望[J]. 广西农业科学, 2009(2): 217.
[12] 马养民,吉艳芬. 构树属植物活性成分的提取分离研究进展[J]. 中药材, 2008, 31(1): 161.
[13] 冯颖,孟宪军. 无梗五加果黄酮的测定及提取方法的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12): 2642.
[14] 迟玉新,窦德强. 楮实子与构树叶中总黄酮含量测定[J]. 中国现代中药, 2008, 10(10): 16.
[15] 张丽珍,周之荣. 微波辅助提取野菊花中总黄酮的工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 823.
[16] 吕鉴全,付勤. 微波提取鱼腥草中黄酮的研究[J]. 化学与生物工程, 2008, 25(10): 49.
[17] 刘慎,邓煜,鲁双,等. 核桃叶黄酮微波辅助提取及抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6): 21.
[18] 甘琳,周芳,张越飞,等. 葛根总黄酮提取工艺的比较[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 929.

[责任编辑 仝燕]

《中国中药杂志》2012 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2012 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www.cjcm.com.cn 或 www.中国中药杂志.com。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。