

正交试验法优化罗布麻叶中总黄酮的闪式提取工艺

白明¹, 李连珍², 王亚宁¹, 王宪龄^{1*} (1. 河南中医学院, 河南郑州 450046; 2. 河南农业大学, 河南郑州 450002)

摘要 [目的]优化闪式提取器提取罗布麻叶中总黄酮成分工艺条件。[方法]在单因素试验的基础上,运用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选罗布麻叶总黄酮的闪式提取工艺。[结果]闪式提取法提取罗布麻叶中总黄酮的最佳工艺为:乙醇浓度55%,料液比1:50(W/V,g/ml,下同),提取时间50 s,提取次数2次;在此条件下,最高提取率为4.24%。验证性试验用最佳工艺条件提取5次,RSD为1.07%。[结论]该工艺稳定可行,闪式提取高效、快速,不破坏成分,有推广价值。

关键词 罗布麻叶(FOLIUM APOCYNII VENETI);正交试验;闪式提取;总黄酮

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)18-07761-02

The Optimization of Flash-type Extractional Process of Total Flavonoids in Apocynum Venetum Leaves by Orthogonal Experiment BAI Ming et al (Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450046)

Abstract [Objective] To explore the best process of flash-type extractor for extracting total flavonoids in *Apocynum venetum* leaves. [Method] Using $L_9(3^4)$ orthogonal experimental method to optimize the flash-type extractional process of total flavonoids in *Apocynum venetum* leaves by single factor and orthogonal experiment. [Result] The optimal extraction technology is: ethanol concentration 55%, ratio of solid to liquid 1:50, extraction time 50 s, 2 times, the highest extraction rate is 4.24%. The optimum technique conditions for verification test is extracting for 5 times, RSD is 1.07%. [Conclusion] The process is stable and feasible, suitable for promotion, and the flash-type extraction is efficient, fast and no damage for the components.

Key words *Apocynum venetum* leaves; Orthogonal experiment; Flash-type extraction; Total flavonoids

罗布麻叶(FOLIUM APOCYNII VENETI),又名茶叶花、泽漆麻、野茶叶、红根草、野麻,为夹竹桃科(Apocynaceae)植物罗布麻(*Apocynum venetum* L.)的干燥叶,主产于我国东北、西北和华北等地,夏季采收,除去杂质,干燥。其性甘、苦、凉,归肝经,具有平肝安神和清热利水的关系,治疗肝阳眩晕、心悸失眠、浮肿尿少、高血压、神经衰弱和肾炎浮肿等症^[1]。现代研究认为,罗布麻具有降血压、降血脂、抗抑郁、镇静、保肝、抗氧化及抗衰老的作用^[2]。罗布麻叶含黄酮类化合物,主要有槲皮素、芸香苷、异槲皮素和黄酮苷类等。笔者在单因素试验的基础上,运用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选罗布麻叶总黄酮的闪式提取工艺,以期罗布麻叶的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。罗布麻叶,采自新疆,经鉴定为夹竹桃科植物罗布麻(*Apocynum venetum* L.)的干燥叶。

1.1.2 主要仪器。分析天平,购自上海精科天美仪器有限公司;DZF-6210真空干燥箱,购自苏州东精密仪器有限公司;JHBE-50T闪式提取器,购自河南金鼎科技发展有限公司;SHB-ⅢA循环水式多用真空泵,购自郑州长城科工贸有限公司;EYELA旋转蒸发仪,购自上海爱朗仪器有限公司;UV-2000型紫外-可见分光光度计,购自尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.1.3 主要试剂。芦丁标准品,批号:100080-200707,购自中国药品生物制品检定所;无水乙醇(批号:20120110)、亚硝

酸钠(批号:20120524)、硝酸铝(批号:20021228)和氢氧化钠(批号:20110908),市售;蒸馏水,实验室自制。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的制备。精密称取在120℃减压干燥至恒重的芦丁对照品100 mg,置100 ml容量瓶中,加无水甲醇70 ml,置水浴上微热使溶解,放冷,再加无水甲醇至刻度,摇匀;精密吸取10 ml,置100 ml量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得。

1.2.2 线性关系的考察。精密量取对照品溶液(0.1 mg/ml)0、1.0、2.0、3.0、4.0和5.0 ml,分别置于10 ml容量瓶中,加浓度30%乙醇至5.0 ml,然后各加入0.3 ml浓度5%亚硝酸钠溶液,充分摇匀,放置6 min后,继续各加入0.3 ml浓度10%硝酸铝溶液,充分摇匀,放置6 min;再各加4.0 ml浓度4%的氢氧化钠溶液,最后用蒸馏水稀释至刻度,充分摇匀,放置15 min,用紫外分光光度计在510 nm波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线^[3],计算线性回归方程。

1.2.3 罗布麻叶中黄酮的测定。取各组罗布麻叶提取液取0.1 ml,按照“线性关系的考察”项下溶液配制方法,于波长510 nm处测定吸光度,按回归方程计算黄酮浓度,再用以下公式计算黄酮得率:

$$\text{黄酮得率}(\%) = \frac{C \times a \times V}{W} \times 100 \quad \text{公式(1)}$$

公式中:C(mg/ml)为由回归方程计算出的黄酮浓度;a为稀释倍数;V(ml)为提取液体积;W(g)为荷叶干粉质量。

1.2.4 单因素试验。(1)料液比的考察。精密称取罗布麻叶5份,每份2.000 g,分别按料液比1:20、1:30、1:40、1:50和1:60加入浓度为60%的乙醇,浸泡30 min后,在70 V的提取电压下闪式提取60 s(提取注意不要使药液溅出),减压抽滤,按公式(1)计算黄酮得率。(2)乙醇浓度的考察。精密称取罗布麻叶5份,每份2.000 g,分别加入乙醇浓度为30%、

基金项目 河南中医学院科技创新支持计划(No. 2012PYTD03)。
作者简介 白明(1968-),女,河南郑州人,副教授,从事中药研究工作。*通讯作者,教授,从事中药基础理论和配伍研究及开发应用,E-mail:wxl_zz@126.com。
收稿日期 2013-06-07

40%、50%、60%和70%的溶剂100 ml(料液比1:50),浸泡30 min后,用闪式提取器提取60 s,减压抽滤,按公式(1)计算黄酮得率。(3)提取时间的考察。精密称取罗布麻叶5份,每份2.000 g,加入浓度为50%的乙醇100 ml(料液比1:50),浸泡30 min后,用闪式提取器提取,提取电压为70 V,提取时间分别为40、60、80、100和120 s,减压抽滤,按公式(1)计算黄酮得率。

1.2.5 正交试验。根据单因素试验考察结果,料液比、时间、乙醇体浓度、提取次数4个因素按 $L_9(3^4)$ 正交设计,确定最优工艺和最佳参数^[4]。

表1 正交试验的因素水平设计

水平	因素			
	A 料液比 g/ml	B 乙醇浓 度//%	C 提取时 间//s	D 次数
1	1:45	45	50	1
2	1:50	50	60	2
3	1:55	55	70	3

2 结果与分析

2.1 线性关系的考察 计算得线性回归方程为: $Y = 13.866X + 0.0119$, $R^2 = 0.999$ 。试验结果表明,在0~0.05 mg/ml范围内,芦丁浓度与吸光度的线性关系良好。

2.2 单因素试验

2.2.1 料液比的选择。图1表明,随着溶剂体积的增加,闪式提取罗布麻叶中总黄酮的含量增加;当料液比为1:50之后,提取的黄酮含量有小幅下降;当料液比为1:50时,黄酮得率最高。故最佳料液比为1:50。

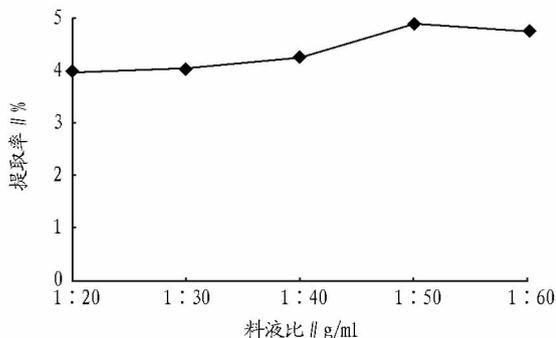


图1 料液比对闪式提取罗布麻叶中总黄酮得率的影响

2.2.2 乙醇浓度的选择。图2表明,随着乙醇浓度的提高,黄酮含量先增加后降低,黄酮类成分既可溶于水又可溶于乙醇,适当的浓度可以得到较好的提取效果。当乙醇浓度为50%时,总黄酮的得率最高。

2.2.3 提取时间的选择。图3表明,随着提取时间增加,提取的黄酮含量增加,随着时间的增长,黄酮提取率逐渐降低,可能是提取时间越长,黄酮成分被破坏,或者时间延长,其他成分溶出,使溶液黏度增加,影响黄酮的溶出。当提取时间为60 s时,黄酮得率最高。

2.3 正交试验 由表2可知,闪式提取考察的4个因素中,对黄酮含量影响的大小顺序是B(乙醇浓度)>A(料液比)>D(提取次数)>C(提取时间)。方差分析可知,料液比和

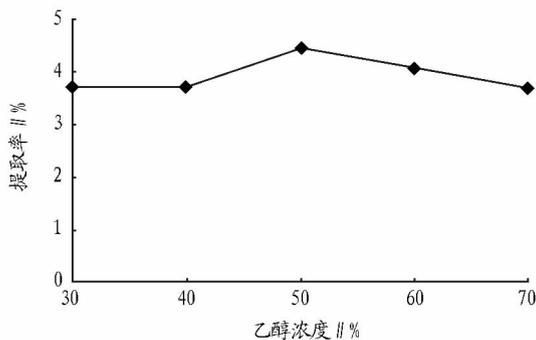


图2 乙醇浓度对闪式提取罗布麻叶黄酮含量的影响

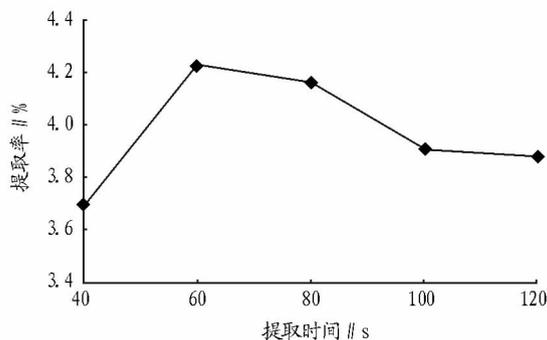


图3 式提取时间对罗布麻叶总黄酮提取率的影响

乙醇浓度对闪式提取罗布麻叶中总黄酮含量的影响较大,有显著性结果;提取时间和提取次数对试验结果无明显影响。在试验条件下,最佳提取工艺为 $A_2B_3C_1D_2$,即料液比1:50,乙醇浓度55%,提取时间55 s,提取2次。

2.4 验证试验 按闪式提取罗布麻叶中总黄酮的最佳工艺为 $A_2B_3C_1D_2$,即料液比1:50、乙醇浓度55%、提取时间55 s、提取2次得到总黄酮提取物的RSD值为1.07%,表明该工艺稳定可行。

表2 正交试验安排与结果

试验号	A	B	C	D	总黄酮得率//%
1	1	1	1	1	3.53
2	1	2	2	2	3.72
3	1	3	3	3	3.89
4	2	1	2	3	3.75
5	2	2	3	1	3.94
6	2	3	1	2	4.24
7	3	1	3	2	3.65
8	3	2	1	3	3.80
9	3	3	2	1	4.13
k_1	3.713	3.643	3.857	3.867	$B > A > D > C$
k_2	3.977	3.820	3.867	3.870	
k_3	3.860	4.087	3.827	3.813	
R	0.264	0.444	0.040	0.057	

3 结论与讨论

闪式提取罗布麻叶中总黄酮的最佳工艺为 $A_2B_3C_1D_2$,即料液比1:50、乙醇浓度55%、提取时间55 s、提取2次。利用正交结果得出的最佳提取方案进行验证性试验,得到总黄酮提取物的RSD值为1.07%,说明该工艺条件稳定可行。

(下转第7767页)

寒,为君药;可治中焦痞塞、气逆上攻和心腹痛等。

4 应用注意事项

外寒内侵,如有表症未解的,应当配伍解表药。夏季天气炎热,或素体火旺,孕妇剂量宜酌量减轻。温里药性多辛温燥烈,易于伤津耗液,凡属阴虚患者均应慎用。阴虚血分有热,发热咳嗽禁用。萆澄茄油毒性很低,以小鼠为研究对象,半数致死量为 5 000 mg/kg。从遗传毒性试验中未发现可导致小鼠精母细胞中染色体畸变和骨髓细胞的癌变,表明基本无遗传毒性^[44]。

5 小结和展望

萆澄茄分布比较广泛,国外对萆澄茄研究比较全面,国内相对较少。研究表明,萆澄茄对解热镇痛、抗菌、心血管疾病、镇咳平喘和健胃利胆等方面确切疗效,但国内萆澄茄药材市场存在较多问题,主要问题有产量不足和药材质量良莠不齐。总之,要对萆澄茄深入展开质量标准、临床前和临床药理学研究,努力提高研究层次,开发新药,为医疗健康事业服务。

参考文献

- [1] 戚秀萍,侯沧. 黑胡椒萆澄茄与南五味子性状鉴别[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(5): 423.
- [2] 杨敏,陈勇,张廷模,等. 对中国药典萆澄茄命名的思考[J]. 中药与临床, 2010, 1(2): 52-53.
- [3] 宋立人,丁绪亮. 现代中药学大辞典[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000: 2397.
- [4] 程轩轩,黄懿. 萆澄茄挥发油的成分分析及提取过程动力学研究[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(1): 9-11.
- [5] HU L S, WANG Y D, DU M H, et al. Characterization of the volatiles and active components in ethanol extracts of fruits of *Litsea cubeba* (Lour.) by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-olfactometry (GC-O) [J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, 5(14): 3298-3303.
- [6] 张加,陈晓辉,张迪,等. GC 法同时测定萆澄茄挥发油种 6 种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(3): 424-426.
- [7] ZHAO O, ZHOU J W, BAN D M. Analysis of volatile oil from different parts of *Litsea cubeba* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2010, 33(9): 1417-1419.
- [8] SI L L, CHEN Y C, HAN X J, et al. Chemical Composition of Essential Oils of *Litsea cubeba* Harvested from Its Distribution Areas in China [J]. Molecules, 2012, 17(6): 7057-7066.
- [9] 于双慧,陈晓辉,毕开顺. GC 法测定萆澄茄中棕榈酸、油酸、亚油酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(9): 1485-1488.
- [10] 张加,陈晓辉,杨晨,等. 萆澄茄 RP-HPLC 指纹图谱研究[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(4): 256-258.
- [11] 黄梁绮龄,苏美玲. 山鸡椒挥发油成分分析及其抗真菌保鲜作用的研究[J]. 天然产物的研究和开发, 1994, 6(4): 1-5.
- [12] 王晓伟,刘吉金,熊英,等. 澄茄子挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 天津药学, 2005, 17(3): 7-9.
- [13] 周宏辉,葛发欢. 山鸡椒化学成分和药理作用的研究概况[J]. 中药材, 1990, 13(9): 43-44.
- [14] 王鸿梅,冯静. 萆澄茄油中脂肪酸组成的分析[J]. 天津医科大学学报, 2001, 7(4): 509-510.
- [15] 于双慧. 萆澄茄化学成分和质量控制方法研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2008.

- [16] 张加. 萆澄茄质量控制方法研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2009.
- [17] 张亚楠,王飞. 萆澄茄果实成分的化学研究[J]. 吉林医药学院学报, 2009, 30(2): 84-85.
- [18] 武可泗,王宏杰,陈海生. 温里药的化学成分初步分析[J]. 陕西中医函授, 1995(4): 14-17.
- [19] 胡竟一,李兴平,邓文龙,等. 萆澄茄的解热作用研究[J]. 中药药理和临床, 2012, 28(2): 119-121.
- [20] 张明发,沈雅琴. 萆澄茄及其有效成分柠檬醛的抗病原作用[J]. 上海医药, 2011, 32(10): 495-497.
- [21] 汤杰,万进,施春阳. 萆澄茄超临界二氧化碳萃取提取物的药效学研究[J]. 医学导报, 2011, 30(2): 193-196.
- [22] WANG H W, LIU Y Q. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Different Parts of *Litsea cubeba* [J]. Chemistry & Biodiversity, 2010, 7(1): 229-235.
- [23] 吴淑荣. 萆澄茄、丁香挥发油防治中药材霉变的初步探讨[J]. 中成药研究, 1982(10): 14-16.
- [24] 王姿媛,何泽民,蒋笑寒. 萆澄茄超临界萃取物工艺筛选及药效学研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1722-1724.
- [25] 汤杰,万进,施春阳,等. 萆澄茄超临界二氧化碳提取工艺及其镇痛活性评价[J]. 中南药学, 2008, 6(3): 301-303.
- [26] 张明发,沈雅琴. 温里药温经止痛处痹的药理研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(1): 29-32.
- [27] CHEN C J, TSENG Y H, CHU F H, et al. Neuropharmacological activities of fruit essential oil from *Litsea cubeba* Persoon [J]. Journal of Wood Science, 2012, 58(6): 538-543.
- [28] 沈雅琴. 萆澄茄的理作用及其温里功效[J]. 中西医结合杂志, 1990, 10(12): 751-754.
- [29] 许青媛,于利森,张小莉,等. 萆澄茄粗提物对实验性体内血栓形成及凝血系统的影响[J]. 中药药理与临床, 1991, 7(6): 29-30.
- [30] 张明发,许青媛,沈雅琴. 温里药温通血脉和回阳救逆药理研究(续完)[J]. 中国中医药信息杂志, 1999, 6(12): 38.
- [31] 沈雅琴,陈光娟,朱自平,等. 中药萆澄茄“温中止痢”药理研究[J]. 中药药理与临床, 1991, 7(2): 18-22.
- [32] 陈亦洋. 施今墨治胃八法[J]. 中国社区医师, 2007, 18(23): 30.
- [33] 张明发,沈雅琴. 温里药“温中散寒”药理研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(2): 30-32.
- [34] 殷志勇,王秋娟,贾莹. 山苍子水提物柠檬醛抗哮喘作用的实验研究[J]. 中国临床药理学和治疗学, 2005, 11(2): 197-201.
- [35] 王虹. 温肾健脾汤治疗慢性腹泻 60 例[J]. 中医研究, 2010, 23(5): 53.
- [36] HO C L, OU J P, LIU Y C, et al. Compositions and in vitro Anticancer activities of the Leaf and Fruit Oils of *Litsea cubeba* from Taiwan [J]. Natural Product Communications, 2010, 5(4): 617-620.
- [37] 李艳杰,马云淑. 萆澄茄、干姜、辛夷挥发油对雪上一枝蒿总碱体外经皮渗透的影响[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(4): 310-313.
- [38] 李艳杰,马云淑. 萆澄茄等 3 种挥发油对乌头碱经皮渗透的影响[J]. 中国中医药杂志, 2008, 23(1): 40-42.
- [39] CUI L L, MA Y S, HAN H X. Enhancing effect of volatile oils of *Rhizoma zingiberis*, *Flos magnoliae* and *Fructus litseae* on permeation of *Rotundine* in vitro [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2011, 34(5): 753-757.
- [40] 刘晓云,王德华,马树德. 中药萆澄茄“温中止痢”药理研究[J]. 中药药理与临床, 1991, 7(2): 18-22.
- [41] 崔利利,马云淑,汉会勋. 萆澄茄挥发油对罗通定的经皮促渗作用[J]. 云南中医学院学报, 2011, 34(2): 18-21.
- [42] 周开国. “香附萆澄茄汤”加减治疗母马血滞腹痛症[J]. 中兽医学杂志, 1982(3): 52-53.
- [43] LUO M, JIANG L K, ZOU G L. Acute and genetic toxicity of essential oil extracted from *Litsea cubeba* (Lour.) Pers [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(3): 581-588.

(上接第 7762 页)

闪式提取法高效快速、不需加热、不破坏成分,与回流提取相比,操作上较稳定、安全、简捷,可变因素较少,是适用范围较广的一种提取方法。提取罗布麻叶时,由于罗布麻叶质地较轻,闪提时粉碎可能会不够完全,导致提取含量不稳定,在考察同一因素时,应尽量使药材粉碎程度接近,可以在提取前用玻璃棒搅拌,还要避免容器内溶剂溅出^[5]。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:化学工业出版社, 2005: 196-197.
- [2] 张格. 罗布麻叶药理作用的研究综述[J]. 中国中医药咨讯, 2011, 3(1): 44-45.
- [3] 刘玉峰,王程程,刘宇,等. 正交试验法优化赤芍芍总苷闪式提取工艺[J]. 中药实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 12.
- [4] 王平,陈丹龙,朱兴一,等. 闪式提取银杏叶中萜类内酯的工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2825-2826.
- [5] 杨天明,李纯,付海燕,等. 葛丝子总黄酮的闪式提取工艺及近红外透射光谱含量分析方法[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(9): 87-88.