

天仙果根总黄酮提取工艺研究

王喜周¹, 应跃跃², 张昊¹, 姚晓伟¹, 陈学智³

(1. 丽水学院医学院, 浙江丽水 323000; 2. 丽水市质量技术监督检测院, 浙江丽水 323000; 3. 景宁县人民医院, 浙江丽水 31000)

摘要 [目的] 优选天仙果根中总黄酮的超声辅助提取工艺。[方法] 以总黄酮的含量为指标, 采用单因素试验考察乙醇浓度、料液比、提取时间和提取次数对天仙果根部总黄酮得率的影响, 并采用正交试验优选天仙果根总黄酮的超声辅助提取工艺。[结果] 4个因素对天仙果根部总黄酮提取得率的影响大小顺序为: 料液比 > 乙醇浓度 > 提取时间 > 提取次数; 最佳提取工艺为: 提取溶剂乙醇的浓度为 50%, 料液比 1:20 (W/V, g/ml, 下同), 提取 2 次, 每次 60 min; 在此条件下, 天仙果根部总黄酮得率为 27.83 mg/g。[结论] 提取工艺合理, 测定方法简单、快速、准确, 为天仙果深度开发提供了科学依据。

关键词 天仙果 (*Ficus erecta* Thunb. var. *beeheyana* (Hook. et Arn.) King); 总黄酮; 提取工艺; 紫外分光光度法
中图分类号 S663 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)02-00601-03

Extraction and Determination of Total Flavonoids from *Ficus beeheyana* Radix

WANG Xi-zhou et al (Medical College of Lishui University, Lishui, Zhejiang 323000)

Abstract [Objective] To optimum ultrasonic-assisted extraction technique of total flavonoids in radix of *Ficus beeheyana*. [Method] Effects of ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction time and times on yield of total flavonoids were investigated by using orthogonal test, and the contents were determined by UV spectrophotometry. [Result] The order of influencing factors is: solid-liquid ratio > ethanol concentration > extraction time > extraction times; the optimal extraction technique is: ethanol concentration 50%, solid-liquid ratio 1:20 (W/V, g/ml, the same as follows), extraction 2 times and extraction time 60 min. Under these optimum conditions, the extraction efficiency of total flavonoids reached as high as 27.83 mg/g. [Conclusion] The extraction technique is proper, the determination method is simple, rapid and accurate, which will provide a scientific basis for deeply utilization of *Ficus beeheyana*.

Key words *Ficus beeheyana*; Total flavonoids; Extraction technique; UV spectrophotometry

天仙果 (*Ficus erecta* Thunb. var. *beeheyana* (Hook. et Arn.) King) 为桑科 (Moraceae) 榕属 (*Ficus*) 植物, 又名大号牛奶仔、牛奶柴、鬼馒头^[1]、细叶牛乳绳、小叶牛奶绳、小攀坡^[2]、牛奶浆、野枇杷、牛奶珠、毛天仙果^[3], 最早记载于《本草纲目》^[4], 主要分布于浙江、江西、福建、安徽、湖北、湖南、广东、广西、四川、贵州和河南等地。天仙果是畲族常用的畲药, 也是苗药之一。其根入药, 性温、味甘、淡、无毒, 具有补中益气、健脾化湿、行气活血、强筋壮骨、祛风通络和清热解毒等功效, 主治风湿痹痛、贫血、月经不调、脱肛、骨结核、皮肤搔痒、跌打损伤和劳倦乏力等^[5-8]。天仙果除了药用之外, 在浙南山区还被用作烹制菜肴的调味品、保健品; 其嫩叶也是一种野菜^[9]。

黄酮是自然界中广泛存在的化合物。在唇形科 (Lamiaceae)、玄参科 (Scrophulariaceae)、爵床科 (Acanthaceae) 和菊科等植物中分布较多。研究表明, 桑科榕属植物中也富含黄酮类化合物, 如条叶榕 (*Ficus pandurata* Hance var. *angustifolia* Cheng)、全叶榕 (*Ficus pandurata* Hance var. *holophylla* Migo)、小叶榕 (*Ficus microcarpa* var. *pusillifolia*)、薜荔 (*Ficus pumila*)、无花果 (*Ficus carica* Linn)、珍珠莲 (*Ficus foveolata*)、孟加拉湾榕、聚果榕 (*Ficus racemosa* Linn) 和金卓叶 (*Ficus deltoidea*) 等。榕属药用植物中的黄酮类活性物质具有广泛的生物活性作用, 如抗氧化、清除自由基、抗胆碱酯酶、护肝作用、抗血管紧张素转换酶、抗菌、抗炎、抗动脉粥样硬化、抗醛糖还原酶、降血糖

等^[10-20]。笔者对天仙果根部的黄酮提取工艺进行研究, 以期充分发掘利用天仙果药用资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。野生天仙果, 于 2010 年 8 月中旬采自遂昌白马山国家森林公园, 经丽水食品药品监督管理局李建良鉴定为 *Ficus erecta* Thunb. var. *beeheyana* (Hook. et Arn.) King。

1.1.2 主要仪器。756 型分光光度计, 购自上海精密科学仪器有限公司; KQ-100DB 型数控超声波清洗器, 购自昆山市超声仪器有限公司; 台式离心机, 购自上海安亭科学仪器厂; 手提式高速中药粉碎机, 购自温岭市大德中药机械有限公司。

1.1.3 主要试剂。纯度为 99% 芦丁标准样品, 购自中国药品生物制品检定所; 无水乙醇, 氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、浓盐酸、四氯化二硼钠、镁粉、三氯化铝均为分析纯, 市售。

1.2 方法

1.2.1 样品的预处理。随机选取 20 株天仙果, 取根部, 水洗、晾晒后置 60 °C 烘箱中烘干, 粉碎, 混匀, 过 3 号筛, 装保鲜袋, 冷藏备用。

1.2.2 供试品溶液制备。精密称定天仙果根粉末 1.000 g, 置 100 ml 容量瓶中, 按设计的工艺条件 (乙醇浓度、料液比、提取时间和提取次数) 超声辅助 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 提取, 真空抽滤, 放冷, 用相同浓度的乙醇溶液定容至容量瓶刻度, 摇匀, 得供试品溶液。

1.2.3 对照品溶液的制备。精密称取 120 °C 干燥至恒重的芦丁对照品适量, 加浓度 70% 乙醇制成浓度为 0、0.10、0.20、0.30、0.40 和 0.50 mg/ml 的溶液, 即得。

1.2.4 线性关系的考察。精密量取对照品溶液 1.0 ml 分别

基金项目 浙江省科技厅公益项目 (2011C23128); 2010 年度丽水学院重点科研项目 (kz201018); 2011 年度丽水市科技局公益项目 (20111JYZB20)。

作者简介 王喜周 (1969 -), 男, 浙江缙云人, 讲师, 工程师, 硕士, 从事天然药物研究, E-mail: wangxizhou88w@sina.com。

收稿日期 2012-12-03

置 10 ml 容量瓶中,加 4.0 ml 浓度 70% 乙醇,再加 0.3 ml 浓度 5% 的 NaNO_2 溶液,摇匀静置 5 min,接着加 0.3 ml 浓度 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,摇匀静置 5 min,然后加 3.0 ml 浓度 4% 的 NaOH 溶液,最后用浓度 70% 的乙醇定至刻度,摇匀,放置 15 min,以不加对照品溶液为空白,在 510 nm 波长处测定吸光度。以芦丁溶液浓度 (C) 为横坐标,吸光度 (A) 为纵坐标,用最小二乘法作线性回归,计算线性回归方程。

1.2.5 总黄酮的测定^[11,21]。(1)总黄酮的检识^[21-22]。采用四氯化二硼钠反应、盐酸-镁粉反应、三氯化铝反应和浓氨水反应。(2)含量测定。采用分光光度法。黄酮类化合物在亚硝酸盐存在的碱性条件下与铝离子形成稳定的红色络合物。此络合物在 510 nm 处有吸收带,然后用分光光度法直接测定样品液中总黄酮的含量。精密量取供试品溶液 1.0 ml 加入 10 ml 容量瓶,按“1.2.4”项下方法测定其吸光度,根据回归方程计算出供试品溶液中总黄酮的含量。同样方法平行 3 次,求均值。

1.2.6 单因素试验^[9]。(1)乙醇浓度。称取天仙果根粉末 5 份,每份 1.000 g,加入 10 ml 的浓度分别为 30%、50%、70%、80% 和 95% 的乙醇,超声辅助提取 45 min,按“1.2.4”项下方法测定提取液中总黄酮的含量。(2)料液比。称取天仙果根粉末 5 份,每份 1.000 g,分别加入 5、10、20 和 25 ml 的浓度 70% 乙醇,并超声辅助提取 45 min,按“1.2.4”项下方法测定提取液中的总黄酮含量。(3)提取时间。称取天仙果根粉末 5 份,每份 1.000 g,加入 10 ml 的浓度 70% 乙醇,分别超声提取 15、30、45、60、75 和 90 min,按“1.2.4”项下方法测定提取液中总黄酮含量。(4)提取次数。称取天仙果根粉末 4 份,每份 1.000 g,用 10 ml 的浓度 70% 乙醇,分别超声提取 1、2、3 和 4 次,每次 45 min,按“1.2.4”项下方法测定提取液中总黄酮含量。

1.2.7 正交试验^[21-22]。为了综合考察影响因素,根据单因素试验结果,设置乙醇浓度、料液比、提取时间和提取次数共 4 个因素,每个因素 3 水平,即 $L_9(3^4)$ 进行正交试验。根据表 1 设定的工艺条件,超声辅助提取天仙果总黄酮,取 1.0 ml 滤液,测定总黄酮含量,每个试验重复 3 次,根据统计学处理结果确定最优提取工艺。

表 1 正交试验因素水平设计

水平	因素			
	A 料液比	B 提取	C 提取时间	D 乙醇
	g/ml	次数	min	浓度//%
1	1:20	2	45	60
2	1:25	4	75	50
3	1:15	3	60	70

1.2.8 正交试验最佳提取工艺的重复性验证。根据正交试验得出的最佳工艺,超声辅助提取天仙果根的总黄酮,并测定其含量,重复 3 次,取均值,检验最佳提取工艺的重复性。

1.2.9 统计方法。采用 SAS 数据处理软件和 Excel 软件处理,回归分析采用 t 检验,正交试验方差分析采用 F 检验,总黄酮含量均数采用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 供试液总黄酮的检识 试验结果表明,盐酸-镁粉反应显红色;四氢硼钠反应显红色;三氯化铝反应显黄色并有荧光;氨水反应呈黄褐色荧光,表明含有总黄酮成分。

2.2 线性关系的考察 计算得线性回归方程为: $Y = 1.3200X - 0.0071$ ($R = 0.9994$)。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。

2.3 单因素试验

2.3.1 乙醇浓度。图 1 表明,乙醇浓度在 30%~50% 时,黄酮的得率增加;当乙醇浓度超过 70% 时,黄酮的得率随乙醇浓度增加而下降。所以取浓度 50%~70% 乙醇作为提取溶剂较好。

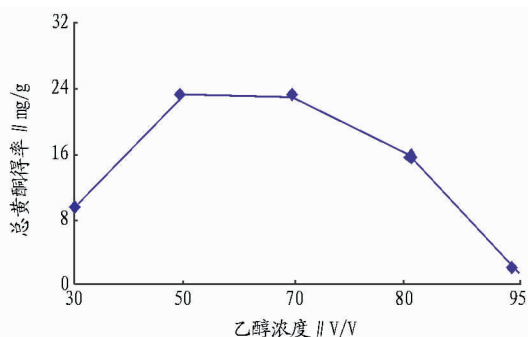


图 1 乙醇浓度对天仙果根部总黄酮得率的影响

2.3.2 料液比。图 2 表明,黄酮得率在料液比为 1:5~1:20 时呈上升趋势,但在 1:20~1:25 时变化不明显。从经济角度出发,选择料液比在 1:15~1:25 时较好。

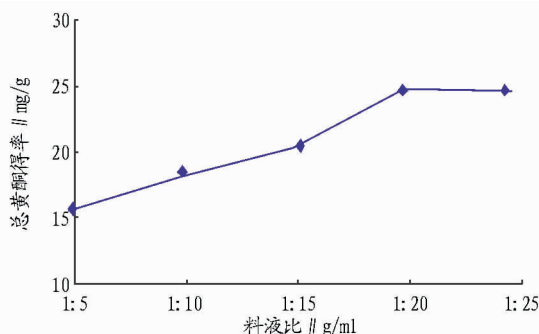


图 2 料液比对天仙果根部总黄酮得率的影响

2.3.3 提取时间。图 3 表明,提取时间在 15~75 min 时,总黄酮得率呈上升趋势,但在 75 min 后呈下降趋势。故时间以 45~75 min 较佳。

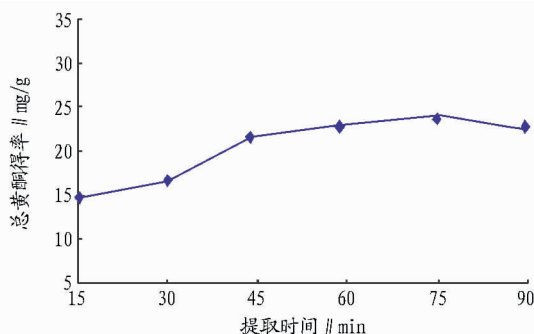


图 3 提取时间对天仙果根部总黄酮得率的影响

2.3.4 提取次数。图 4 表明,提取次数为与黄酮得率呈正相关,综合考虑成本及提取效率的因素,提取次数以 2 次较好。

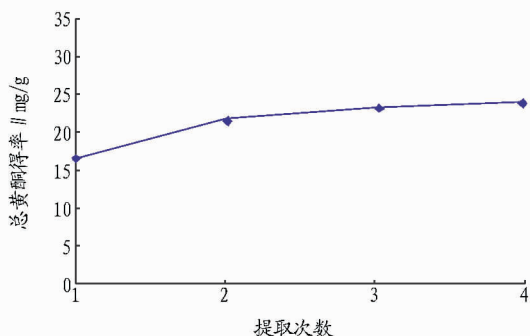


图 4 提取次数对天仙果根部总黄酮得率的影响

2.4 正交试验 由表 2 可知,料液比对天仙果根总黄酮提取得率的影响最大,其次是提取溶剂乙醇的浓度。4 个因素影响从大到小依次为:料液比 > 乙醇浓度 > 提取时间 > 提取次数。料液比与黄酮得率呈正相关,料液比越高,天仙果根内外的黄酮浓度差增高,所以黄酮得率增加;在乙醇浓度为 50% 时提取得率最大,其原因可能是天仙果根总黄酮中的苷类含量较高,提取溶剂乙醇的浓度超过 50% 时,黄酮的溶解性下降^[21];另外提取时间对总黄酮提取得率也有一定影响,随着提取时间的延长,提取得率略有提高。

根据单因素试验和正交试验的结果,参考经济经济因素,得到较优的提取工艺条件为: A₁B₁C₃D₂,即以天仙果根总黄酮得率为指标,超声辅助提取溶剂为浓度 50% 乙醇溶液,料液比 1:20,提取 2 次,每次 60 min。

表 2 正交试验结果

试验号	因素				天仙果总黄酮含量 / mg/g
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	20.46
2	1	2	2	2	24.41
3	1	3	3	3	23.25
4	2	1	2	3	23.01
5	2	2	3	1	21.59
6	2	3	1	2	23.12
7	3	1	3	2	20.75
8	3	2	1	3	18.71
9	3	3	2	1	16.04
k_1	22.71	21.40	20.43	19.36	
k_2	22.57	21.24	21.15	22.76	
k_3	18.17	20.80	21.86	21.32	
R	4.54	0.60	1.43	3.40	

注:以上试验结果均为 3 次重复的平均值,影响因素经 F 检验,没有明显差异。

2.5 天仙果根的总黄酮含量 以选择料液比 1:20、提取次数 2 次、提取时间 60 min、提取溶剂乙醇浓度 50% 为条件进行验证

试验,重复 3 次,测得天仙果根黄酮得率平均值为 27.83 mg/g,比 A₁B₂C₂D₂ 的得率(24.41 mg/g)提高 14.01%。

3 结论

试验利用超声波(功率 250 W,频率 40 kHz)辅助技术提取天仙果根中的总黄酮,其最佳工艺条件为:提取溶剂为浓度 50% 乙醇溶液,料液比 1:20,提取 2 次,每次 60 min;在此工艺条件下,天仙果根的总黄酮得率为 27.83 mg/g。按照研究的提取工艺条件从天仙果根中提取总黄酮,可以获得到较高的得率,值得进行进一步的研究。

参考文献

- [1] 雷后兴. 中国畲族医药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:307-308.
- [2] 陈泽远,关祥祖. 畲族医药学[M]. 昆明:云南民族出版社,1996:447.
- [3] 《浙南本草新编》编写组. 浙南本草新编[M]. 浙江省温州地区卫生局,1975:45-46.
- [4] (明)李时珍. 中国传统文化精华本草纲目上[M]. 长春:时代文艺出版社,2004:346.
- [5] 鄢连和,雷后兴,李水福,等. 浙江畲族医药研发概况[J]. 中国民族医药杂志,2006(5):91-93.
- [6] 福建省中医药研究院. 福建药物志[M]. 福州:福建科学技术出版社,1994:539.
- [7] 一鹤. 介绍几种具有滋补价值的野生植物[J]. 福建中医药,1962(3):41-44.
- [8] 徐德年. 草药治疗乏力症[J]. 福建中医药,1966(2):12.
- [9] 孙进柱. 中华野菜食谱[M]. 北京:人民出版社,1995:392-393.
- [10] 许丽丽,刘裕彬. 榕树叶黄酮含量及其抗氧化活性[J]. 贵州农业科学,2012,40(3):59-61.
- [11] 刘力恒,王立升,王天文,等. 小叶榕叶总黄酮含量测定、鉴别及其对羟自由基清除作用的研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(5):1078-1080.
- [12] PUOCI F, IEMMA F, SPIZZIRRI U G, et al. Antioxidant activity of a Mediterranean food product: "fig syrup"[J]. Nutrients,2011,3(3):317-329.
- [13] HUBERT D J, DAWA A, FLORENCE N T, et al. In vitro hepatoprotective and antioxidant activities of crude extract and isolated compounds from *Ficus gnaphalocarpa*[J]. Inflammopharmacology,2011,19(1):35-43.
- [14] AHMED F, SIDDESHA J M, UROOJ A, et al. Radical scavenging and angiotensin converting enzyme inhibitory activities of standardized extracts of *Ficus racemosa* stem bark[J]. Phytother Res,2010,24(12):1839-1843.
- [15] CHEN L W, CHENG M J, PENG C F, et al. Secondary metabolites and antimicrobial activities from the roots of *Ficus nervosa*[J]. Chem Biodivers,2010,7(7):1814-1821.
- [16] AO C, HIGA T, MING H, et al. Isolation and identification of antioxidant and hyaluronidase inhibitory compounds from *Ficus microcarpa* L. fil. bark[J]. J Enzyme Inhib Med Chem,2010,25(3):406-413.
- [17] DANIEL R S, DEVI K S, AUGUSTI K T, et al. Mechanism of action of antiatherogenic and related effects of *Ficus bengalensis* Linn. flavonoids in experimental animals[J]. Indian J Exp Biol,2003,41(4):296-303.
- [18] GACCHE R N, DHOLE N A. Profile of aldose reductase inhibition, anti-cataract and free radical scavenging activity of selected medicinal plants: an attempt to standardize the botanicals for amelioration of diabetes complications[J]. Food Chem Toxicol,2011,49(8):1806-1813.
- [19] GEETHA B S, MATHEW B C, AUGUSTI K T. Hypoglycemic effects of leucodelphinidin derivative isolated from *Ficus bengalensis* (Linn)[J]. Indian J Physiol Pharmacol,1994,38(3):220-222.
- [20] CHOO C Y, SULONG N Y, MAN F, et al. Vitexin and isovitexin from the Leaves of *Ficus deltoidea* with in-vivo α -glucosidase inhibition[J]. J Ethnopharmacol,2012,142(3):776-781.
- [21] 陈化,吴迎春. 超声波提取小叶榕总黄酮及鉴别[J]. 时珍国医国药,2008,19(7):1677-1678.
- [22] 应跃跃. 小香勾营养价值分析及黄酮研究[D]. 杭州:浙江大学,2012.