

酸杨桃叶中总黄酮的提取工艺研究

Study on Optimum Extracting Conditions of Total Flavonoids from Sour Carambola Leaves

刘卫兵, 陈翠, 朱秋燕

LIU Wei-bing, CHEN Cui, ZHU Qiu-yan

(玉林师范学院化生系, 广西玉林 537000)

(Department of Biocheical, Yulin Teacher College, Yulin, Guangxi, 537000, China)

摘要: 利用甲醇浸提, 通过单因素试验和正交试验探讨从酸杨桃叶中提取黄酮的最佳工艺条件, 为酸杨桃叶中黄酮类化合物的提取提供实验数据。实验结果表明, 酸杨桃叶中含有丰富的黄酮类化合物, 酸杨桃叶中黄酮的最佳提取工艺条件为: 提取时间 3h, 料液比 1: 80, 提取温度 70℃。在该最佳提取条件下, 以芦丁为参照品, 测量波长为 359nm, 所得的总黄酮平均回收率为 98.84%, 精密度为 1.04%。

关键词: 黄酮 酸杨桃叶 提取工艺 正交试验

中图分类号: S66 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2008)01-0064-03

Abstract In this paper, The author extraction of flavone by methanol from sour carambola leaves by single factor test and orthogonal design test was studied. The results showed that the sour carambola leaves have enough flavone and the best optimal extraction process of flavone from sour carambola leaves by methanol at 70℃ for 3h when the ratio of carambola leave to methanol was 1: 80. On this optimum extracting conditions, the contrast sample of UV Spectrophotometry was rutin and the analytical wavelength was 359nm. The average recovery was 98.84% and RSD was 1.04%.

Key words flavinoids, sour carambola leaves, extracting technology, orthogonal design test

杨桃 (*Averrhoa carambola* L) 为酢浆草科植物, 原产我国华南及东南亚各国, 在我国迄今已有 150 多年栽培史, 其叶、果、根均可药用, 叶利尿, 外敷能止痛, 能散热毒, 止血, 拔毒生肌, 治疮疖^[1]。杨桃叶中黄酮类物质含量为 4.5% 左右^[2]。黄酮类化合物是植物次生代谢产物, 广泛地存在于自然植物中, 不仅数量种类繁多, 而且结构类型复杂多样, 表现出多种多样的药理活性, 能防治心脑血管系统的疾病和呼吸系统的疾病, 具有抗炎抑菌, 降血糖, 降血脂, 降血压, 抗氧化, 抗辐射, 抗癌, 抗肿瘤以及增强免疫能力等药理作用^[3]。本文利用甲醇浸取, 通过单因素试验和正交试验探讨从酸杨桃叶中提取黄酮的最佳工艺条件, 为酸杨桃叶中黄酮类化合物的提取提供实验依据。

1 实验部分

1.1 实验材料

酸杨桃叶采集于广西玉林市博白县

芦丁是中国医药(集团)上海化学试剂公司产品(生化试剂)

无水甲醇(AR)洛阳市化学试剂厂产品

1.2 仪器设备

分析天平; 电热恒温水浴锅; 722 光栅分光光度计; 101A-2 型数显电热鼓风干燥箱; 高速万能粉碎机

1.3 实验方法

1.3.1 原料的预处理

把新鲜采集回来的酸杨桃叶放入干燥箱中, 用 60℃ 的温度干燥 3h, 然后再用粉碎机粉碎, 干燥至恒重后冷却备用。

1.3.2 黄酮类化合物含量的测定方法

1.3.2.1 分光光度法

收稿日期: 2006-12-22

修回日期: 2007-01-12

作者简介: 刘卫兵 (1980-), 男, 在读博士, 主要从事天然产物的研究与开发以及药物的合成研究

黄酮类化合物具有特定的紫外吸收带,其结构中的肉桂酰环产生的I带在300~400nm内,由苯甲酰环产生的II带在240~285nm内,不同类型的黄酮类化合物在这两个吸收带的吸收强度不同。对照品芦丁在这两个吸收带都有强吸收,含黄酮类化合物的原料经提取纯化后,可直接于最大吸收波长处测定其吸光度,以芦丁为对照品对照计算其含量^[4]。由于在紫外低波长区容易会有溶剂干扰,可能引起误差,故选择芦丁在I带的最大吸收波长359nm作为测量酸杨桃叶中总黄酮含量的波长。

1.3.2.2 工作曲线回归方程的建立

准确称取标准芦丁对照品97.0mg,用无水甲醇溶解,转移到100ml容量瓶中,用无水甲醇定容,摇匀。精确移取10.00ml置于100ml容量瓶中,用无水甲醇定容,摇匀。此时芦丁对照品溶液浓度为0.0970g/ml,准确吸取浓度0.0970g/ml芦丁对照品溶液0.00ml 1.00ml 2.00ml 3.00ml 4.00ml 5.00ml 6.00ml,分别置于25ml容量瓶中,用无水甲醇定容,在359nm波长处测其吸光度。根据吸光度,用最小二乘法作线性回归,得出芦丁标准浓度C与吸光度A的回归方程为 $A = 0.008640 + 0.02642C$, $r = 0.9997$

用相关系数法和方差检验法^[5]对所求得的回归方程进行显著性检验。相关系数法计算得到的相关系数 $r = 0.9997 > r_{0.001} = 0.9510$,置信水平在99.9%以上,回归方程的A和C之间存在显著的线性关系,说明芦丁浓度在3.88~23.28mg/L范围内线性关系显著。方差检验法计算得到的方差 $F = 7354.25 > F_{0.001}(1, 5) = 47.2$,因此也可以证明所建立的回归方程是有效的,或者说A与C之间有显著的线性关系。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

以无水甲醇作为提取溶剂,探讨提取温度、提取时间、溶剂用量对总黄酮提取率的影响。

2.1.1 温度对总黄酮提取率的影响

准确称取0.5000g样品6份,加入无水甲醇40ml,分别在30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃下进行水浴回流提取2h,然后抽滤,定容,测定吸光度的结果见图1。

由图1可见总黄酮的提取率随温度的升高而增大,当温度超过70℃时总黄酮的提取率随温度升高的幅度相对较小。从高温对总黄酮的提取所带来的有效成分易被破坏、溶剂易挥发等缺点考虑,选择温度在70℃左右为宜。

2.1.2 时间对总黄酮提取率的影响

准确称取0.5000g样品5份,在70℃下分别进行水浴回流1h 2h 3h 4h 5h,然后抽滤,定容,测定吸光度的结果见图2。由图2可知,随着水浴回流时间的增加,提取率逐渐增大,但3h后增加的幅度相对较小,显然采用3~5h作为提取时间比较合适。

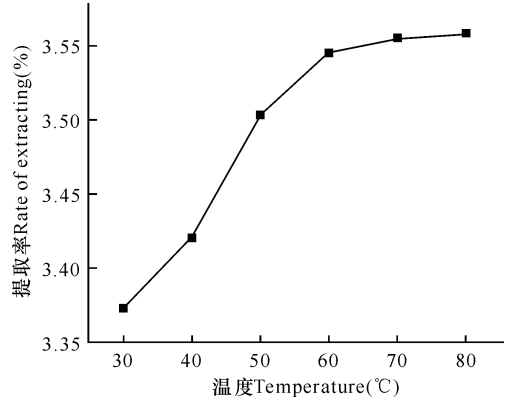


图1 温度对总黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effects of the temperature on the rate of extracting flavonoids

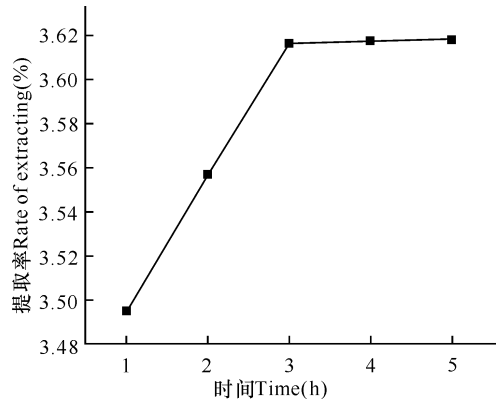


图2 时间对总黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effects of the time on the rate of extracting flavonoids

2.1.3 溶剂用量对总黄酮提取率的影响

准确称取0.5000g样品5份,在70℃下分别加入10ml 20ml 30ml 40ml 50ml的无水甲醇,进行水浴回流3h,然后抽滤,定容,测定吸光度的结果见图3。由图3可见总黄酮提取率随溶剂用量的增加而提高,当溶剂用量大于40ml时,即当溶剂用量与酸杨桃叶质量之比大于80倍时,总黄酮提取率增加的幅度相对较小,但从经济方面考虑,宜选取溶剂用量为酸杨桃叶质量的80倍左右。

2.2 正交实验

由于实际操作受温度、溶剂用量、提取时间的交叉影响,我们选用三因素、三水平进行正交试验来考察各因素对总提取效果的影响。因素水平设计见表1,各实验处理及总黄酮的提取率见表2。

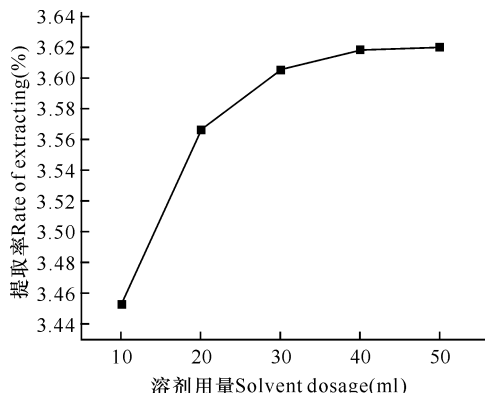


图3 溶剂用量对总黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effects of the solvent dosage on the rate of extracting flavonoids

表1 正交实验因素水平

Table 1 The different levels of the factors in orthogonal experiments

编号 Number	提取温度 Extraction temperature (A, °C)	溶剂用量 Volume of solvent (B, ml)	提取时间 Extraction time (C, h)
1	60	30	2
2	70	40	3
3	80	50	4

表2 正交实验结果

Table 2 The results of the orthogonal experiments

实验号 Entry	A	B	C	样品质量 Sample quality (g)	吸光度 Absorbance	总黄酮含量 Flavonoid content (%)
1	A ₁	B ₁	C ₁	0.5003	0.3780	3.493
2	A ₁	B ₂	C ₂	0.5009	0.3800	3.508
3	A ₁	B ₃	C ₃	0.5018	0.3870	3.568
4	A ₂	B ₁	C ₁	0.5099	0.3910	3.612
5	A ₂	B ₂	C ₂	0.5010	0.3920	3.620
6	A ₂	B ₃	C ₃	0.5007	0.3850	3.556
7	A ₃	B ₁	C ₁	0.5008	0.3790	3.490
8	A ₃	B ₂	C ₂	0.5003	0.3870	3.578
9	A ₃	B ₃	C ₃	0.5005	0.3720	3.435
K ₁	10.57	10.6035	10.64			
K ₂	10.79	10.7061	10.56			
K ₃	10.51	10.5586	10.67			
k ₁	3.523	3.535	3.543			
k ₂	3.596	3.569	3.518			
k ₃	3.504	3.520	3.562			
R	0.09210	0.04930	0.04410			

从表2结果可知,各实验因素及其因素水平对酸杨桃叶中总黄酮的提取率大小的影响表现出一定的差异性。三因素的R值大小排列为A>B>C,说明三个因素中影响总黄酮提取率大小的主次顺序为:提取温度>溶剂用量>提取时间。

在本试验中最大的k值为最好值。各平均结果k的最好值对应的水平为最好水平。把各因素的最好水平组合在一起,就是选出的较优水平组合。因此从表2可以得出,酸杨桃叶中总黄酮提取的最佳工艺条件为

A₂B₂C₃,即用无水甲醇为溶剂,以1:80的料液比在70℃的恒温水浴中回流4h

2.3 最优条件重复性验证实验

以提取温度为70℃,料液比为1:80,水浴提取时间为4h的样品液,按总黄酮提取率的计算方法进行平行3次测定的结果如表3所示。从表3可以看出,用紫外分光光度法测定酸杨桃叶中的总黄酮平均含量为3.619%,其相对标准偏差为0.043%。

表3 重复性实验结果(n=3)

Table 3 The results of repetitive experiments (n=3)

处理 Processing	总黄酮提取率 Extraction rate of flavonoids (%)
1	3.617
2	3.620
3	3.618
平均 Average	3.619

2.4 回收率实验

准确称取6份已知总黄酮含量的酸杨桃叶0.5000g,加入一定量的芦丁对照品,制得提取液,用无水甲醇稀释提取液,提取温度为70℃,溶剂用量为酸杨桃叶质量的80倍,水浴提取时间为4h,在359nm处测吸光度,由回归方程计算总黄酮含量,按公式(回收率=(实测总黄酮含量-样品所含的总黄酮含量)÷加入的芦丁量×100%)计算总黄酮的回收率结果(表4)显示,总黄酮的回收率和精密度均符合定量分析的要求。

表4 回收率实验结果(n=5)

Table 4 The results of recovery rate's experiments (n=5)

实验编号 Entry	总黄酮含量 Total flavonoid content (mg)	加入芦丁量 Rutin of accession (mg)	测定值 Measured value (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
1	0.3523	0.0970	0.4479	98.56	98.84	1.040
2	0.3571	0.0970	0.4536	99.48		
3	0.3533	0.0970	0.4508	100.5		
4	0.3467	0.0970	0.4422	98.45		
5	0.3486	0.097	0.4432	97.53		
6	0.3533	0.097	0.4498	98.48		

3 结论

酸杨桃叶中含有丰富的黄酮类化合物。酸杨桃叶中总黄酮最佳提取工艺条件为:料液比1:80,提取时间4h,提取温度70℃。在该最优条件下进行平行实验,得出平均提取率为3.618%,其相对标准偏差为0.043%;在同样的实验条件下,得出的平均回收率为98.84%,其相对标准偏差为1.04%。由此可以看出,

(下转第74页 Continue on page 74)

6 有害物质的测定

取野生抚育猫爪草样品适量,按行业标准^[7]方法,分别测定铅、镉、砷、汞、铜五种重金属元素含量的结果见表4

表4 野生抚育猫爪草中重金属元素测定结果

Table 4 The determination results of heavy metals in cultivated *Radix Ranunculus ternatus*

检测元素 Elements	检测结果 The determination results (mg/kg)	重金属总量 Total content of heavy metals (mg/kg)
铅 Pb	3.61	17.205
镉 Cd	0.072	
汞 Hg	0.013	
铜 Cu	12.86	
砷 As	0.65	

取野生抚育猫爪草样品适量,按行业标准^[7]方法,采用气相色谱法(中国药典2005年版一部附录IV Q有机氯农药残留测定法),分别测定农药六六六(BHC)、滴滴涕(DDT)、五氯硝基苯(PCNB)、艾氏剂(Aldrin)残留量的结果见表5

表5 猫爪草中有机氯农药残留测定结果*

Table 5 The determination results of organochlorine pesticide residues in *Radix ranunculus ternatus*

检测项目 Test items	检测结果 Results (mg/kg)
BHC	未检出 Not detected
DDT	未检出 Not detected
PCNB	未检出 Not detected
Aldrin	未检出 Not detected

* 方法最低检出限:六六六 0.20^μg/kg;滴滴涕 0.32^μg/kg;五氯硝基苯 0.035^μg/kg;艾氏剂 0.036^μg/kg

The lowest detection limit BHC 0.20^μg/kg; DDT 0.32^μg/kg; PCNB 0.035^μg/kg; Aldrin 0.036^μg/kg.

取野生抚育猫爪草样品适量,按行业标准^[7]方法,采用液相色谱法测定黄曲霉毒素 B1的结果为 0.50^μg/kg

上述野生抚育猫爪草有害物质的检测结果,符合

(上接第6页 Continue from page 66)

其回收率和精密度均符合定量分析的要求。从而也说明了该方法能够直接测定总黄酮的含量,不需用硝酸铝显色,且方法操作简便,是测定酸杨桃叶总黄酮含量较佳的方法。

参考文献:

[1] 黄成就,徐朗然.中国植物志:第4卷.[M].北京:科学出版社,1998 4-6.

WM/T 2-2004《药用植物及制剂外经贸绿色行业标准》的规定

7 结论

野生与野生抚育猫爪草的主要成分基本一致。在多糖含量上,野生猫爪草的多糖含量为 14.1%,比野生抚育猫爪草的 10%左右含量略高,野生与野生抚育猫爪草的氨基酸种类基本一致,在含量上略有差异,野生猫爪草的总氨基酸含量为 7.19%,比野生抚育的 9%~10%稍低。野生猫爪草与野生抚育猫爪草基本一致,无明显差异,野生抚育猫爪草的有害物质检测符合规定。

致谢:

广西分析测试研究中心代测氨基酸和有害物质,谨此致谢。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中国药典.2005年版:一部[S].北京:化学工业出版社,2005:223.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第28卷[M].北京:科学出版社,1979:302.
- [3] 全山丛,郑汉臣.中药猫爪草的商品鉴定及资源调查[J].中国中药杂志,1997,22(7):390-392.
- [4] 杨今祥.抗癌中草药制剂[M].北京:人民卫生出版社,1981:173.
- [5] 李嘉玉,刘道矩,刘济宽,等.中药猫爪草治疗颈淋巴结结核18例的分析[J].天津医药杂志,1964,6(11):958-962.
- [6] 王爱武,田景奎,袁久荣,等.不同产地猫爪草中多糖含量的比较[J].中国中医药信息杂志,2005,12(1):51-52.
- [7] 中华人民共和国商务部.中华人民共和国外经贸行业标准:药用植物及制剂外经贸绿色行业标准 WM/T 2-2004[S].北京:中国标准出版社,2005.

(责任编辑:邓大玉)

- [2] 周燕芳.超声波协同提取杨桃叶中黄酮的工艺研究[J].现代食品科技,2006,22(3):161-162.
- [3] 郑建仙.功能性食品:第2卷[M].北京:中国轻工业出版社,1999:429-434.
- [4] 梁生旺.中药制剂分析[M].北京:中国中医药出版社,2003:131.
- [5] 才让加.化学数据的一元线性回归分析[J].青海师范大学学报,2005,2:14-15.

(责任编辑:邓大玉)