

文章编号 2095-7335(2017)04-0108-05

DOI:10.16375/j.cnki.cn45-1395/t.2017.04.018

碱溶酸沉与超声相结合法提取柿叶总黄酮的工艺改进

陈丽,韦运东,颜晓婷,高祥云,李锦霞,高雨桐

(广西科技大学 医学院,广西 柳州 545006)

摘要:为了解决碱溶酸沉与超声相结合法提取柿叶总黄酮中的乳化问题,采用正交设计试验优选石油醚在索氏提取器中对柿叶进行萃取的工艺,再用碱溶酸沉与超声相结合的方法提取柿叶总黄酮。实验结果表明,经正交设计筛选索氏提取的最佳工艺为:液料比15:1,石油醚萃取次数为2次,柿叶粉碎粒度为0.355 mm~0.180 mm(40目~80目)。改进的提取工艺能有效避免石油醚萃取的乳化现象,提高柿叶黄酮的提取含量和得率。

关键词:柿叶;黄酮;索氏提取;正交设计

中图分类号: TQ028 **文献标志码:**A

0 引言

柿叶为柿科植物柿(*diospyros kaki* L. f.)的干燥或新鲜叶,主要含有黄酮类、萜类、萘醌萘酚类、香豆素类、甾醇类、有机酸、脂肪酸、挥发油等成分。柿叶黄酮具有降血脂^[1]、降血压^[2]、抗炎抗氧化^[3]、抗菌^[4]等作用。目前柿叶总黄酮的提取方法很多,主要有溶剂提取法、超声波或光波辅助提取法、酶法和半仿生提取法等^[4-5],不同的提取方法获得柿叶总黄酮的得率和纯度也不同。课题组曾用“碱溶酸沉与超声相结合的方法”^[6]提取柿叶总黄酮,但发现用石油醚萃取时乳化现象严重,造成总黄酮得率下降。用加热、搅拌、过滤、加无机盐等常规方法无法解决,用超声、离心等方法效果不明显。乳化产生的原因可能与萃取时溶液中同时含有水相(70%乙醇)、油相(石油醚)和乳化剂(柿叶中的甾醇类)有关。为解决这个问题,设计将石油醚萃取的步骤提前进行,先用石油醚在索氏提取器中对柿叶进行萃取,再用碱溶酸沉与超声相结合的方法提取柿叶总黄酮,避免水相、油相、乳化剂同时存在达到乳化条件而引起的乳化。由于在之前设计的“碱溶酸沉及超声波相结合法”中已经确定了酸与碱调整溶液的pH值范围,而改进的工艺运用了索氏提取,所以改进工艺需要考察的重点是索氏提取对柿叶总黄酮含量和得率的影响。结果表明,改进的提取工艺不仅有效避免了乳化现象,而且提高了总黄酮的得率及含量。

1 材料

1.1 药品与试剂

柿叶(安国市药源商贸有限公司,批号:161011);芦丁标准品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-201409);石油醚(西陇化工有限责任公司,批号:160323 2);乙酸乙酯(西陇化工有限责任公司,批号:151015 1);其余试剂为分析纯。

1.2 仪器

RE-52旋转蒸发仪(上海安亭实验仪器有限公司);KQ-100DB数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);T6新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

收稿日期:2017-05-06

基金项目:2015年国家级大学生创新创业训练计划项目(201510594021);广西自然科学基金项目(2016GXNSFBA380080)资助。

作者简介:陈丽,硕士,副教授,研究方向:天然药物有效成分筛选及药效学研究,E-mail: chenlilzyz@163.com.

2 方法与结果

2.1 柿叶总黄酮的提取

2.1.1 改进的柿叶总黄酮提取方法

石油醚(60 ℃~90 ℃)与一定粉碎粒度的柿叶 20 g 按一定的液料比浸泡 12 h,用索氏提取器在一定温度下回流萃取数次,萃取后的柿叶粗粉挥干石油醚,用 70%乙醇按液料比为 10:1 在 30 ℃下超声 30 min,回流提取 3 次,合并提取液并减压浓缩至无醇味,浓缩液用 20% NaOH 调 pH 值至 10,离心($3\ 000\ r\cdot\text{min}^{-1}$)15 min,上清液用 15%HCl 调 pH 值至 6 后离心($3\ 000\ r\cdot\text{min}^{-1}$)15 min,用乙酸乙酯反复萃取至乙酸乙酯相为无色,合并乙酸乙酯相,浓缩干燥后得柿叶总黄酮。

2.1.2 碱溶酸沉及超声相结合法提取柿叶总黄酮^[6]

取过 40 目~80 目筛的干燥柿叶 20 g,用 70%乙醇按液料比为 10:1 浸泡 12 h,自“在 30 ℃下超声 30 min”起同 2.1.1 项同法操作。

2.1.3 正交设计筛选索氏提取条件

影响索氏提取的主要因素是物料的粒度、提取溶剂用量和提取时间等,所以本次工艺研究以 L₉(3⁴)正交表安排试验,以总黄酮含量和总黄酮得率为考察指标,以索氏提取的液料比(石油醚:柿叶)(A)、石油醚萃取次数(B)、柿叶粉碎粒度(C)为考察因素,因素与水平表见表 1。

总黄酮含量为主要检测指标,设总黄酮含量权重为总黄酮得率的 4 倍,采取综合加权评分法,总分 $Y=|\text{黄酮含量} \times 4 + \text{黄酮得率}|$,得分高者为最优,实验数据的结果及方差分析结果见表 2 和表 3。从表 2 的直观分析可知,各因素对柿叶黄酮的含量和得率的影响是一致的,影响程度都是 A>C>B,最佳处方均为 A3B2C1,但 B 和 C 的影响程度相差不大;表 3 的方差分析结果表明 A 因素有显著性意义,而 B 和 C 因素

表 1 正交设计因素水平表
Tab.1 Factors and levels of orthogonal design

水平	A	B	C/目
1	5:1	3	40~80
2	10:1	2	10~40
3	15:1	1	80~120

表 2 正交设计及结果
Tab.2 Arrangement and results of orthogonal design

实验序号	因素				黄酮含量/ (mg·mL ⁻¹)	得率/%	总分 Y
	A	B	C	D(空白)			
1	1	1	1	1	1.996	0.893	8.875
2	1	2	2	2	1.364	0.636	6.093
3	1	3	3	3	1.134	0.537	5.089
4	2	1	2	3	4.145	1.552	18.131
5	2	2	3	1	5.981	1.898	25.823
6	2	3	1	2	5.318	1.774	23.045
7	3	1	3	2	5.461	1.947	26.290
8	3	2	1	3	6.182	2.015	28.035
9	3	3	2	1	5.495	1.806	23.784
含量均值 1	1.498	3.867	4.499	4.491			
含量均值 2	5.148	4.509	3.668	4.048			
含量均值 3	5.713	3.982	4.192	3.820			
含量极差	4.215	0.642	0.831	0.671			
最优方案	A3	B2	C1				
得率均值 1	0.689	1.464	1.561	1.532			
得率均值 2	1.741	1.516	1.331	1.452			
得率均值 3	1.939	1.372	1.461	1.368			
含量极差	1.234	0.144	0.230	0.164			
最优方案	A3	B2	C1				

表 3 黄酮含量和得率方差分析
Tab.3 Analysis of variance

因素	偏差平方和 (SS)		自由度 (f)		F 比		显著性 (P)	
	黄酮含量	黄酮得率	黄酮含量	黄酮得率	黄酮含量	黄酮得率	黄酮含量	黄酮得率
A	31.405	2.664	2	2	45.057	64.976	<0.05	<0.05
B	0.702	0.032	2	2	1.007	0.780		
C	1.059	0.079	2	2	1.519	1.927		
误差	0.700	0.040	2	2				

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

无显著性意义,即石油醚与柿叶的液料比对黄酮的含量和得率影响显著.通过正交设计,确定索氏提取时最佳工艺为:石油醚与柿叶的液料比是 15:1,萃取次数是 2 次,柿叶粉碎粒度是 40 目~80 目.

2.2 总黄酮的含量与得率

2.2.1 总黄酮的得率计算

将不同工艺条件下提取的柿叶总黄酮真空干燥后称重,计算得率,结果见表 2.

2.2.2 标准品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的芦丁标准品 10.2 mg 于 50 mL 容量瓶中,加 70%乙醇溶解并定容,即得 0.204 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦丁标准品溶液.

2.2.3 供试品溶液的制备

精密称取各工艺提取的柿叶黄酮 50 mg 于 50 mL 容量瓶中,加 70%乙醇溶解并定容,超声(100 W,40 kHz,30 °C)30 min,冷却至室温,即得供试品溶液.

2.2.4 芦丁标准曲线的制备^[7-9]

采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠法显色,具体操作如下:分别精密吸取标准品溶液 0.0 mL,0.5 mL,1.0 mL,1.5 mL,2.0 mL,2.5 mL,3.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,先后加 5% NaNO_2 溶液 0.3 mL,摇匀,放置 10 min,加 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.3 mL,摇匀,放置 10 min,加 4 mL 1% NaOH 溶液,加 70%乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15 min,在 510 nm 波长处测定吸光度.以吸光度(a)为纵坐标,质量浓度(c)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $a=15.599 4c+0.015 4$ ($r=0.999 3$, $n=7$),芦丁标准曲线见图 1.结果表明,芦丁质量浓度在 $0.010 2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 0.061 2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系.

2.2.5 供试品含量测定

按 2.2.3 项方法制备供试品溶液,用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠法显色,分别测定吸光度,根据芦丁标准曲线计算柿叶总黄酮的含量.

2.2.6 稳定性试验

取柿叶 20 g,按改进的最佳工艺条件提取柿叶总黄酮,按 2.2.3 项方法制备供试品溶液,用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠法显色,分别在 0 h,0.5 h,1.0 h,1.5 h,2.0 h,4.0 h,6.0 h 进行含量测定,结果 RSD 为 2.19%,表明黄酮供试品溶液显色后在 6 h 内显色稳定.

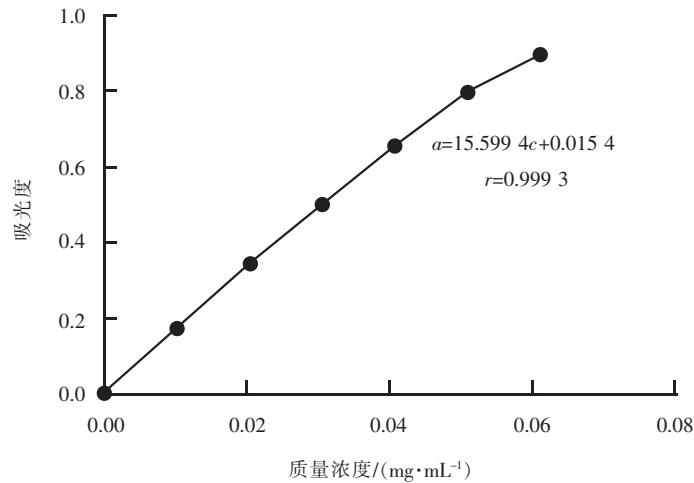


图 1 芦丁标准曲线

Fig.1 Standard curve of Rutin

2.2.7 加样回收率试验^[10]

将最佳工艺制备的柿叶总黄酮按 2.2.3 项方法制备成供试品溶液,精密量取 9 份,每份 5 mL(质量浓度为 0.032 3 mg·mL⁻¹),置于 50 mL 容量瓶中,分别加入供试品溶液中芦丁含量 120%,100%,80% 的芦丁对照品溶液,各 3 份,用 70%乙醇定容至刻度.采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠法显色,在 510 nm 波长处测定吸光度,测定含量,计算加样回收率.结果见表 4,平均回收率为 97.01%,RSD 为 1.79%.

表 4 加样回收率试验结果(*n=9*)
Tab.4 Results of recovery test (*n=9*)

序号	柿叶总黄酮/ (mg · mL ⁻¹)	芦丁对照品/ (mg · mL ⁻¹)	测得量/ (mg · mL ⁻¹)	回收率/ %	平均回收率/ %	SD	RSD/%
1	0.032 3	0.038 8	0.070 0	97.32			
2	0.032 3	0.038 8	0.069 4	95.79			
3	0.032 3	0.038 8	0.071 5	101.24			
4	0.032 3	0.032 3	0.063 9	97.89			
5	0.032 3	0.032 3	0.063 1	95.45	97.01	1.74	1.79
6	0.032 3	0.032 3	0.063 4	96.35			
7	0.032 3	0.025 8	0.057 3	96.87			
8	0.032 3	0.025 8	0.056 9	95.01			
9	0.032 3	0.025 8	0.057 4	97.21			

2.2.8 提取工艺的验证

取柿叶 20 g,按改进的最佳工艺条件提取柿叶总黄酮,按 2.2.3 项方法制备供试品溶液,按照 2.2.5 项方法进行含量测定.结果 RSD 为 2.43%(n=6),表明最佳工艺重复性良好.

2.2.9 与碱溶酸沉及超声相结合法比较

取柿叶 20 g,6 份,分别按索氏提取的最佳工艺和碱溶酸沉及超声相结合的方法提取柿叶总黄酮,结果如表 5 所示.结果说明改进的工艺能有效提高柿叶总黄酮的提取得率与含量.

表 5 正交设计的索氏提取法与碱溶酸沉及超声相结合法的比较(*n=6*)
Tab.5 Comparison of Soxhlet extraction with orthogonal design and alkali extraction-acid precipitation combined with ultrasound (*n=6*)

提取方法	柿叶总黄酮含量/(mg · g ⁻¹)	RSD/%	柿叶总黄酮得率/%	RSD/%
索氏提取法	6.465	2.17	2.082	2.68
碱溶酸沉及超声相结合法	5.437	2.31	1.610	2.09

3 讨论

溶液乳化产生需要 3 个条件:1)提供乳化所需的能量;2)具有适宜的乳化剂;3)水相与油相具有适当的相容积比,相容积比在 25%~50%时乳剂稳定性好^[11].在碱溶酸沉与超声相结合提取柿叶总黄酮的方法中,先用 70%乙醇回流提取总黄酮,再用石油醚对乙醇提取液进行萃取,萃取时很容易发生乳化,因为此时具备了以上溶液乳化所需的 3 个条件:1) 萃取时需晃动萃取瓶,而晃动提供了溶液乳化时所需的能量;2)乙醇提取时将柿叶中的甾醇类化合物提取到了乙醇溶液中,而甾醇类化合物是常见的乳化剂,所以石油醚对乙醇提取液进行萃取时,甾醇类化合物就发挥了乳化剂的作用;3)石油醚对乙醇提取液进行萃取时,70%乙醇为水相,石油醚为油相,水相:油相=1:3~1:4,相容积比在 25%~50%范围内.综上所述,原工艺在石油醚对乙醇提取液进行萃取时易发生乳化现象.在改进的工艺中,将石油醚萃取的步骤提前进行,放在 70%乙醇提取前,此时萃取溶液中只有油相(石油醚),没有水相(70%乙醇)和乳化剂(甾醇类化合物),不满

足溶液乳化所需的第 2 个和第 3 个条件,从而避免了乳化的产生。

索氏提取利用了溶剂的回流及虹吸原理,物料每次都被冷凝回流的新溶剂萃取,使物料内外保持浓度差,实现了动态提取,与一般静态提取装置相比,其提取效率显著提高^[12].但由于柿叶粉末包在滤纸桶内,萃取不完全,故每次萃取至抽提桶内的石油醚无色后需要取出滤纸桶,翻动柿叶粉末后再次萃取,正交实验结果表明萃取 2 次效果最好,萃取 3 次的效果和萃取 2 次的区别不大.索氏提取的液料比和柿叶粉碎粒度也是影响萃取效果的主要因素,经正交设计筛选最优液料比为 15:1,柿叶粉碎粒度为 40 目~80 目,这与碱溶酸沉法及超声相结合法的工艺结果一致.实验结果表明,改进的提取工艺不仅有效避免了乳化现象,还能提高总黄酮的得率及含量。

但是本法也有其缺点,最主要的缺点是索氏提取时间长,每次萃取至抽提桶内的石油醚至无色需要 4 h ~5 h.这是因为一次虹吸完成后,抽提筒内溶液清空,需等石油醚蒸汽沿抽提筒侧管上升至冷凝管,冷凝为液体,慢慢滴入抽提筒中浸泡筒中柿叶粉末,柿叶粉末被重新浸渍需要一定的时间.所以,较碱溶酸沉法及超声相结合法,本法的主要缺点是耗时,今后将继续探寻更有效率的提取方法.

参考文献

- [1] CHEN L, MA X B, LIANG Y H, et al. Effects of persimmon leaf total flavonoid on enzyme of lipoprotein metabolism and antioxidation in hyperlipidemia rats[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2011, 9(1): 74–77.
- [2] 邓海英, 赖为国.柿叶黄酮对肾性高血压大鼠血管紧张素、醛固酮、降钙素基因相关肽的影响[J].中成药, 2016, 38(3): 680–682.
- [3] 马莹娟, 尚玉莹, 王德杰, 等.柿叶黄酮类化合物对 D-半乳糖致衰老小鼠的抗炎抗氧化神经保护作用[J].复旦学报(医学版), 2015, 42(1): 7–12, 30.
- [4] 孙彩云, 柳鑫华, 王庆辉, 等.半仿生提取柿叶黄酮及其抗氧化和抗菌作用[J].食品研究与开发, 2014, 35(10): 115–118.
- [5] 卫静莉, 薛笑莉, 陈玉章, 等.提取柿叶黄酮类化合物工艺研究[J].食品研究与开发, 2013, 34(13): 29–32.
- [6] 陈丽, 韦敏.均匀设计法优选柿叶总黄酮的提取工艺[J].中国药房, 2012, 23(7): 606–608.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社, 2010.
- [8] 杨帆, 张轩, 丁红.柿叶中总黄酮的鉴别与含量测定[J].中国医药指南, 2013, 11(8): 435–436.
- [9] 廖春燕, 黄瑶, 黄丽丹.鸡骨草总黄酮提取方法的比较[J].广西科技大学学报, 2014, 25(2): 82–85, 94.
- [10] 陈君, 裴世成, 吴钢.不同采收期倒地铃总黄酮及芦丁的含量变化[J].广西科技大学学报, 2015, 26(4): 6–8, 16.
- [11] 崔福德.药剂学[M].7 版.北京:人民卫生出版社, 2011.
- [12] 关雅琼, 张曜武, 杨浩.索氏提取器的起源与发展[J].天津化工, 2011, 25(3): 17–20.

Improvement on the extraction process of total flavonoids from persimmon leaves by the combination of alkali extraction–acid precipitation and ultrasound

CHEN Li, WEI Yundong, YAN Xiaoting, GAO Xiangyun, LI Jinxia, GAO Yutong
(Medical School, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China)

Abstract: To solve the problem of emulsification in the extraction of total flavonoids from persimmon leaves by the combination of alkali extraction–acid precipitation and ultrasound, orthogonal design was used to optimize the petroleum ether extraction of persimmon leaves in a Soxhlet extractor. Next, total flavonoids of persimmon leaves were extracted by the combination of alkali extraction–acid precipitation and ultrasound. The optimal process of Soxhlet extraction was as follows: the liquid–material ratio was 15:1, the number of extraction using petroleum ether was two times, and the smash granularity for persimmon leaves was 40 mesh~80 mesh. The improved extraction process can effectively avoid the emulsification of petroleum ether extraction and improve the extraction content and yield of total flavonoids from persimmon leaves.

Key words: persimmon leaves; flavonoids; soxhlet extraction; orthogonal design

(学科编辑:黎 娅)