

正交实验优化小叶榕气生根总黄酮提取工艺

王绍龙¹, 蒋伟哲¹, 巫玲玲¹, 诸葛明丽², 付书婕^{1*}, 陈源^{3*}

¹广西医科大学药学院, 南宁 530021; ²柳州市工人医院, 柳州 545005; ³南宁市中医医院, 南宁 530012

摘要: 优选小叶榕气生根总黄酮的提取工艺。以料液比、提取时间、提取次数为考察因素, 以总黄酮含量为测定指标, 采用正交试验优化小叶榕气生根总黄酮的最佳提取工艺。小叶榕气生根总黄酮的最佳提取工艺为液料比 1:15、提取时间 2 h、提取次数为 3 次。该提取工艺稳定, 适合小叶榕气生根总黄酮的提取。

关键词: 小叶榕; 气生根; 总黄酮; 正交实验; 提取工艺

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

The Extraction Selection of Total Flavonoids from the Aerial Roots of *Ficus microcarpa* by Orthogonal Test

WANG Shao-long¹, JIANG Wei-zhe¹, WU Ling-ling¹, ZHUGE Ming-li², FU Shu-jie^{1*}, CHEN Yuan^{3*}

¹Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; ²Liuzhou worker's hospital, Liuzhou 545005, China; ³Nanning Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530012, China

Abstract: To optimize the extraction process of total flavones in the aerial roots of *Ficus microcarpa*. Orthogonal experiment was designed with the content of total flavonoids as index, and with the ratio of material and solvent, extracting time and frequency as factors. The optimal extraction technology was the ratio of material to solvent of 1:15, extraction for 2h and 3 times. The extraction technology is steady and suitable for extracting total flavonoids from the aerial roots of *Ficus microcarpa*.

Key words: *Ficus microcarpa*; aerial roots; total flavonoids; orthogonal test; extraction process

榕树须为桑科榕属植物小叶榕 *Ficus microcarpa* L. f. 的气生根, 主产于广东、江西、云南、广西等地。其味苦性平, 具有祛风清热, 活血散瘀, 解毒之功效, 民间用于治疗流感、百日咳、麻疹不透、扁桃体炎、眼结膜炎、痧气腹痛、风湿骨痛、鼻衄、血淋、跌打损伤等。临床治疗效果良好, 受到广大患者好评。研究表明^[1-8], 榕树中含有黄酮、三萜类、酸性树脂和甾体化合物等。其中黄酮类等有效成分对治疗冠心病、老年性痴呆、脑血栓、神经系统疾病和消除自由基、抗炎、抑菌、抗癌等方面有显著效果, 无毒副作用, 并以此开发出多种药品和保健食品^[9,10]。

当前国内外对于榕树须中黄酮类化合物的研究还相对匮乏, 对其水提取物中总黄酮的提取研究报道少之又少, 本研究系统考察榕树须总黄酮提取, 为开

发广西优势资源药材提供依据, 为实际生产中榕须水提取物质量控制标准的建立提供一份可靠的参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

KF0002 电子天平(凯丰集团有限公司); XS205DU-METTLER TOLEDO 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); KQ-500DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Uvmini1240 紫外-可见分光光度计(SHIMADZU)等。

1.2 试剂

小叶榕气生根(自采); 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 10080-200707); 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定方法学研究

2.1.1 对照品溶液的制备

取干燥至恒重的芦丁对照品 25 mg(标示量为

收稿日期: 2013-11-13 接受日期: 2014-02-17

基金项目: 广西壮族自治区中医药管理局课题(GZY1118); 广西教育厅校地校企共建科技创新平台项目(2011-9); 广西教育厅校地校企共建科技创新平台项目(2013-8-3)

* 通讯作者 Tel: 86-771-5358272; E-mail: fsj99331785@126.com; chen2801@163.com

92.5%, 即含 23.125 mg 芦丁), 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加稀乙醇适量, 超声使溶解, 加稀乙醇至刻度, 摇匀。精密量取 20 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 既得(每 1 mL 中含芦丁 0.37 mg)。

2.1.2 标准曲线的制备

精密量取对照品溶液 1、2、3、4、5 与 6 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 各加水至 6 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 分钟, 加 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 分钟, 加氢氧化钠试液 10 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 分钟, 以相应的试剂为空白, 照紫外-可见分光光度法, 在 510 nm 的波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程: $C = 0.012A - 0.0328$, $r = 0.9998$, 表明在 0.0148 ~ 0.0888 mg/mL 之间呈现良好的线性关系。

2.1.3 供试品溶液的制备

取小叶榕气生根 200 g, 精密称定, 加入规定倍量水, 煎煮一定时间, 纱布过滤, 重复提取相应次数, 合并滤液, 放冷, 既得供试品溶液。

2.1.4 稳定性实验

精密吸取供试品溶液 1 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 照标准曲线的制备项下的方法, 自“加水至 6 mL”起制备样品后, 分别于 0、10、20、30、40 时依法测定吸光度, 结果 RSD 为 0.9%, 表明显色后: 0 ~ 50 min 内, 其吸光度稳定。

2.1.5 精密度试验

精密量取对照品溶液 6 份, 每份 2, 置 25 mL 量瓶中, 照标准曲线的制备项下的方法, 自“加水至 6 mL”起, 依法测定吸光度, 结果 RSD 为 1.56%。

2.1.6 重复性试验

平行取同一批批次供试品 6 份, 精密称定, 照供

试品溶液的制备项制备供试品溶液, 各精密量取 0.5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 照标准曲线的制备项下的方法, 自“加水至 6 mL”起, 依法测定吸光度, 结果 RSD 为 1.73%。

2.1.7 加样回收试验

精密量取重复性试验已配置好的 6 份供试品溶液各 0.5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 分别加入对照品溶液 2.0 mL, 照标准曲线的制备项下的方法, 自“加水至 6 mL”起, 依法测定吸光度, 结果平均回收率为 99.99%, RSD 为 2.43%。

2.1.8 样品测定

精密吸取供试品溶液 0.5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 各加水至 6 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 分钟, 加 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 分钟, 加氢氧化钠试液 10 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 分钟, 以相应的试剂为空白, 照紫外-可见分光光度法, 在 510 nm 的波长处测定吸光度。

2.2 小叶榕气生根总黄酮提取单因素考察

为保证正交实验中各因素水平设置的科学性, 用单因素实验确定正交实验各因素的水平范围。各因素水平实验条件如下:

液料比: 1:8、1:10、1:12、1:15, 分别提取 1 次, 每次 1 h, 期间每半小时补足损失重量。

提取时间: 1 h、1.5 h、2 h, 分别提取 1 次, 选取料液比为 1:12, 期间补足失重。

提取次数: 1、2、3 次, 每次提取 2 h, 选取料液比为 1:12, 期间补足失重。

以因素中各水平为横坐标, 总黄酮含量为纵坐标, 绘制曲线, 结果如下:

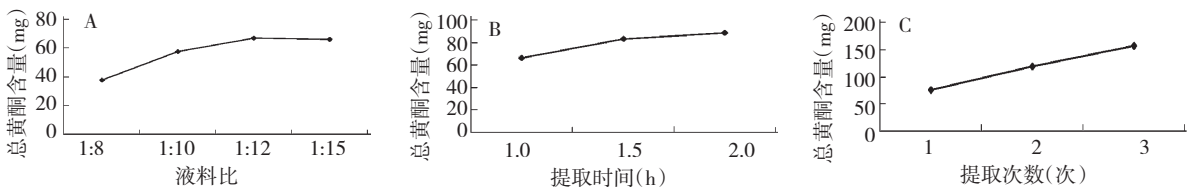


图 1 正交试验直观分析图: (A) 液料比, (B) 提取时间, (C) 提取次数

Fig. 1 the Orthogonal experiment analysis plot for the effect of independent variables on total flavones in the Aerial Roots of *Ficus Microcarpa*: (A) Material/liquid, (B) Extraction time, (C) Extraction times

2.3 正交优化总黄酮提取

通过单因素考察, 结合实际生产需要, 初步选择料液比为 1:10、1:12、1:15, 提取时间为 1、2、3 h, 提

取次数为 1、2、3 次作为正交实验设计表中各因素的水平。表头设计如下:

表 1 榕须提取总黄酮正交实验表

Table 1 the orthogonal experiment table of extraction of total flaonoids from Aerial roots of Ficus microcarpa

水平 Level	因素 Factor			
	料液比(A)倍量 Material/Liquid Ratio(W/V)	提取时间(B) Extraction time(h)	提取次数(C) Extraction times(T)	D
1	1:10	1	1	1
2	1:12	1.5	2	2
3	1:15	2	3	3

结果见表 2,同时对结果进行方差分析,结果见表 3。

表 2 正交实验结果

Table 2 the results of orthogonal experiment

试验号 No.	因素 Factor				空白 Gap	总黄酮含量 Total flavones mg/g
	料液比(A)倍量 Material/Liquid Ratio(W/V)	提取时间(B) Extraction time(h)	提取次数(C) Extraction times(T)			
1	1:10	1	1	1	4.00	
2	1:10	1.5	2	2	7.69	
3	1:10	2	3	3	10.71	
4	1:12	1	2	3	7.84	
5	1:12	1.5	3	1	11.48	
6	1:12	2	1	2	5.16	
7	1:15	1	3	2	10.87	
8	1:15	1.5	1	3	4.85	
9	1:15	2	2	1	10.27	
K1	7.467	7.570	4.670	8.583		
K2	8.160	8.007	8.600	7.907		
K3	8.663	8.713	11.020	7.800		
R	1.196	1.143	6.350	0.783		

表 3 方差分析结果

Table 3 The results of variance analysis

因素 factor	偏差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 Degree of freedom	F 比 Sum of mean square	F _{0.05} 临界值 F ratio	显著性 significance
料液比 Material/Liquid	2.166	2	2.000	19.000	
提取时间 Extraction time	1.997	2	1.844	19.000	
提取次数 Extraction times	61.624	2	56.901	19.000	*
误差 Error	1.08	2			

由表 2、表 3 可知,各因素影响程度依次为 C > A > B,即提取次数 > 料液比 > 提取时间;提取次数(C)对提取率有显著影响。因此,选择最佳提取工艺条件为 A₂B₃C₃,即液料比为 1:12、提取时间为 2

h、提取次数为 3 次。

分别称取 3 批榕树须各 200 g,按上述最佳提取工艺条件提取,按 2.1.8 项下测定方法测定总黄酮含量。结果 3 批榕树须总黄酮含量分别为 13.44、

14. 11、13. 80 mg/g, 表明提取工艺合理、稳定、可行。

3 讨论

通过单因素考察和正交实验, 以榕树须中总黄酮含量为指标。得到最佳提取工艺为: 液料比为 1 : 12、提取时间为 2 h、提取次数为 3 次。通过工艺验证, 表明该工艺重复性好、提取率高。

在总黄酮含量测定方法学研究中, 稳定性试验除了考察显色后一段时间内的稳定情况外, 还考察了在显色前供试品溶液的稳定性, 即照供试品溶液的制备项下制备好的供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 3, 4, 10 h, 各精密量取供试品溶液 1. 0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 照标准曲线的制备项下的方法, 自“加水至 6 mL”起, 依法测定吸光度, 计算得 RSD 为 1%, 说明本供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

正交实验得出液料比 1 : 12 与 1 : 15 均值相近, 考虑成本, 选择 1 : 12 为最佳液料比。

参考文献

1 Higa Matsutake, Yogi seiichi, Hokama Kozo. Studies on the constituents of *Ficus of microcarpa* I. L. f. *Bull Coll Sci Univ Ryukyus*, 1987, 44: 75.

2 Higa, Matsutake; Yokota, Keijiro; Ogihara, Kazuhito; Yogi, seiichi (Japan). studies on the constituents of *Ficus of microcarpa* II. L. f. *Bull Coll Sci Univ Ryukyus*, 1996, 62: 45.

3 Li YC, Kuo YH. Two new isoflavones from the bark of *Ficus microcarpa*. *J Nat Prod*, 1997, 60: 292.

4 Li YC, Kuo YH. A monoterpene and two simple phenols from heartwood of *Ficus microcarpa*. *Phytochemistry*, 1998, 49: 2417.

5 Li YC, Kuo YH. Novel triterpenoids from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *J Org Chem*, 2002, 67: 7656.

6 Chiang YM, Kuo YH. Novel triterpenoids from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *J Org Chem*, 2002, 67: 7656.

7 Chiang YM, Kuo YH. Two novel alpha-tocopheroids from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *Tetrahedron Lett*, 2003, 44: 5125.

8 Chiang YM, et al. Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *Phytochemistry*, 2005, 66: 495.

9 Wei JB, et al. 小叶榕水提取物和醇提取物止咳平喘作用的比较研究. *广西中医药*, 2006, 29(4): 58.

10 Baglin I, et al. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. *Mini Rev Med Chem*, 2003, 3: 525.

(上接第 283 页)

16 Zhao GJ(赵国建), Chen XD(陈晓丹), Gao HT(高海涛), et al. Shmp-assisted extraction of polyphenols from eggplant and its antioxidation in vitro. *J Chin Inst Food Sci and Tech* (中国食品学报), 2012, 12(10): 57-61.

17 Yuan C, Jin ZY, Xu XM. Inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl-β-cyclodextrin: UV, FTIR, 1H NMR and molecular modeling studies. *Carbohydr. Polym*, 2012, 89:

492-496.

18 Lu YP(陆亚鹏), Zhao Y(赵育). Preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl-β-cyclodextrin. *J. Jiangsu Univ MS* (江苏大学学报, 医学版), 2008, 18: 477-483.

19 Huang H(黄海). Application of DSC in food. *Food & Mach* (食品与机械), 2002, (88): 6-9.