

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.01.010

正交试验优选铁力木花蕾总黄酮提取工艺*

马俊鹏¹,周美霞²,李晓倩²,王晓梅^{2△},王新玲²,胡君萍²,依明·尕哈甫²

(1. 新疆维吾尔自治区人民医院,新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆医科大学药学院,新疆 乌鲁木齐 830011)
摘要:目的 优化铁力木花蕾总黄酮的提取工艺。方法 采用单因素法考察铁力木花蕾总黄酮提取方法,以提取时间、提取次数、溶剂量为考察因素,以黄酮含量及浸膏得率为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优选铁力木花蕾总黄酮的最佳提取工艺,并进行验证。结果 最佳提取工艺为,药材样品 1 g,加 60% 乙醇 30 mL 回流提取,每次 1.5 h,提取 3 次;提取的总黄酮平均含量为 221.97 mg/g。结论 该提取工艺操作简便、稳定可靠,可用于铁力木花蕾总黄酮的提取。

关键词:铁力木;花蕾;总黄酮;提取工艺;优化;正交试验

中图分类号:R932;R283

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)01-0038-04

Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from the Buds of *Mesua Ferrea*

MA Junpeng¹, ZHOU Meixia², LI Xiaoqian², WANG Xiaomei², WANG Xinling², HU Junping², Yiming · GAHAFU²

(1. People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang, China 830000; 2. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China 830011)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of the total flavonoids from the buds of *Mesua ferrea*. **Methods** The single factor test was used to investigate the extraction process of the total flavonoids from the buds of *Mesua ferrea*. The optimal extraction process of the total flavonoids from the buds of *Mesua ferrea* was optimized and verified by $L_9(3^4)$ orthogonal design with the extraction time, extraction times and solvent amount as the factors, and with the content of flavonoids and the yield of the extract as the indexes. **Results** The optimum extraction process of the total flavonoids from the buds of *Mesua ferrea* were as follows: 1 g buds of *Mesua ferrea* were extracted by reflux with 30 mL 60% ethanol for 3 times, each time for 1.5 h. Under the conditions, the average content of total flavonoids was 221.97 mg/g. **Conclusion** The extraction process is simple, stable and reliable, which can be used for the extraction of the total flavonoids from the buds of *Mesua ferrea*.

Key words: *Mesua ferrea*; buds; total flavonoids; extraction process; optimization; orthogonal test

铁力木 *Mesua ferrea* L. 为藤黄科铁力木属常绿乔木,主要分布于印度、斯里兰卡及中国云南、广东、广西等地^[1]。铁力木的树皮、叶子、花和果实均有药用价值,在民间主要用于治疗蛇毒咬伤、出血和脚部灼伤等^[2],具有抗炎、抗抑郁、抗肿瘤等多种药理活性^[3-6]。铁力木花蕾作为新疆常用药材收录于《中华本草》等医药著作^[7],具有抗肿瘤、抗菌、抑制血小板聚集等作用^[8-10],主要化学成分有香豆素类、黄酮类、三萜类、莽草酸类等^[11-14]。铁力木花蕾,且含有较丰富的黄酮类成分,不同极性部位黄酮

含量不同^[15]。本研究中在单因素试验基础上采用正交试验优化了铁力木花蕾总黄酮的提取工艺。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

T6 型紫外可见分光光度仪(北京普析通用仪器有限公司);AB104-N 型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);EYELA N-1001 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司);KQ-700DV 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH-S4 型数显恒温

*基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金[2018D01C169]。

第一作者:马俊鹏,男,硕士研究生,主要从事药物分析及药事管理,(电子信箱)326890743@qq.com。

△通信作者:王晓梅,女,博士研究生,副教授,主要从事天然药物活性成分研发工作,(电子信箱)30886750@qq.com。

[13] REDDY YNV, AL - HIJJI M, BEST PJ, et al. Diagnosis of Free - Wall Rupture by Left Ventricular Angiogram After Inferior ST - Segment - Elevation Myocardial Infarction[J]. Circulation, 2015, 132(5):e31 - e33.
[14] 童重新,李军霞,何瑞芝. 两种促胎肺成熟药物治疗早期未足月胎膜早破疗效观察[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(14): 2797 - 2799.
[15] 徐漫飞,周洋,赵岩. 外周血促肾上腺皮质激素释放激素浓度与先兆早产的相关性及其影响因素[J]. 中国医科大学学报, 2015, 44(4): 342 - 345.

[16] 周健,段涛,严晓玲. 沐舒坦和地塞米松对未足月胎膜早破产前预防 NRDS 的对照研究[J]. 中华围产医学杂志, 2006, 9(3): 157 - 160.
[17] 陈晓妮,刘艳彬,宋艳. 孕妇血清炎症因子水平与胎膜早破及其合并绒毛膜羊膜炎的相关性分析[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(8): 1756 - 1758.
[18] 王伟,刘静. 炎症细胞因子检测在胎膜早破合并绒毛膜羊膜炎诊断中的作用[J]. 安徽医药, 2018, 22(9): 1686 - 1689.

(收稿日期:2020-07-07)

水浴锅(金坛市医疗仪器厂)。

1.2 试药

芦丁对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号为B20771,纯度 > 98%);其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

铁力木花蕾购自新疆维吾尔自治区维吾尔医医院药剂科,由新疆医科大学药学院王晓梅副教授鉴定为正品。将药材粉碎,过40目筛,备用。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 溶液制备

对照品溶液:取芦丁对照品10 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,以60%乙醇超声(功率100 W,频率40 kHz)处理,并定容,即得质量浓度为0.4 mg/mL的芦丁对照品溶液。

供试品溶液:取铁力木干燥花蕾粉末1 g,精密称定,置50 mL锥形瓶中,加60%乙醇30 mL,回流提取2.0 h,提取3次。合并3次提取液,以60%乙醇定容至25 mL,即得。

2.1.2 方法学考察

检测波长选择:取对照品溶液,在200~600 nm波长范围内扫描。结果芦丁在510 nm波长处有最大吸收,故选择510 nm作为测定波长。

线性关系考察:分别精密量取2.1.1溶液制备项下对照品溶液0.4,0.8,1.2,1.6,2.0 mL,置10 mL容量瓶中,加60%乙醇定容,摇匀,制成系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液适量,在选定波长处进样测定,记录吸光度(A),以芦丁质量浓度(C, μg/mL)为横坐标、A为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $A = 15.38C - 0.028$, $r = 0.9990$ ($n = 5$)。结果表明,芦丁质量浓度在0.01~0.08 mg/mL范围内与吸光度线性关系良好。

精密度试验:取上述对照品溶液适量,在选定波长处测定6次,记录吸光度。结果芦丁吸光度的RSD为0.51% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液适量,分别于室温下放置0,2,4,8,10,12 h时在选定波长处测定,记录吸光度。结果总黄酮吸光度的RSD为2.55% ($n = 6$),表明供试品溶液在室温放置12 h内基本稳定。

重复性试验:取样品适量,精密称定,按2.1.1溶液制备项下方法制备供试品溶液,在选定波长处测定6次,记录吸光度并计算含量。结果总黄酮含量平均值的RSD为1.96% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品适量,共9份,分别

加入低、中、高质量浓度的对照品溶液,依法制备供试品溶液,在选定波长处测定,记录吸光度并计算回收率。结果见表1。

表1 芦丁加样回收试验结果($n = 9$)

Tab.1 Results of recovery tests($n = 9$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
0.2500	18.3	16.3	35.0	102.45		
0.2500	18.3	16.3	34.9	101.84		
0.2500	18.3	16.3	34.8	101.23		
0.2501	19.2	19.0	38.8	103.16		
0.2501	19.2	19.0	39.1	104.74	102.30	1.65
0.2501	19.2	19.0	38.4	101.05		
0.2502	19.4	22.6	41.8	99.12		
0.2502	19.4	22.6	42.8	103.54		
0.2502	19.4	22.6	42.8	103.54		

2.2 含量测定和出膏率测定

取样品适量,分别依法制备供试品溶液,在选定波长处测定,平行测定3次,记录吸光度并计算样品含量。精密吸取供试品溶液适量,置蒸发皿中,蒸干,冷却后称定质量,计算出膏率。出膏率(%) = [(蒸发皿质量 + 浸膏质量) - 蒸发皿质量] / 药材质量 × 100%。

2.3 总黄酮测定方法权衡

采用综合评分法,设定药材中总黄酮含量的权重为0.7,出膏率的权重为0.3。综合评分(Y) = 总黄酮含量 × 0.7 + 出膏率 × 0.3。

2.4 单因素试验

提取方法:取样品1 g,精密称定,分别以超声法、回流提取法提取总黄酮。结果超声法、回流提取法综合评分分别为45.72分,59.90分,故选择回流提取法。

提取溶剂:取样品1 g,精密称定,置50 mL圆底烧瓶中,分别加水及20%,40%,60%,80%,100%乙醇25 mL,回流提取2.0 h。结果以60%乙醇提取时,总黄酮综合评分最高,故选择60%乙醇作提取溶剂。详见图1。

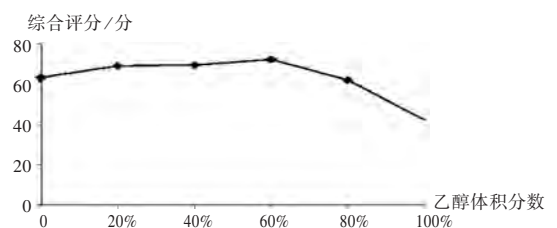


图1 提取溶剂筛选

Fig.1 Selection of extraction solvent

提取时间:取样品1 g,精密称定,置50 mL圆底烧瓶中,加60%乙醇25 mL,分别回流提取0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 h。结果,回流提取2.0 h时,总黄酮综合评

分最高,故选择提取 2.0 h。详见图 2。

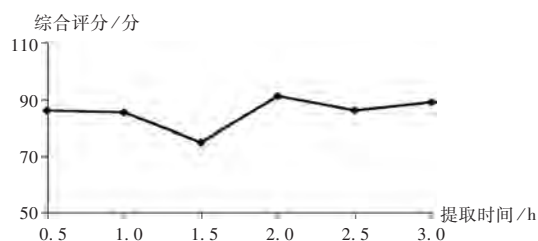


图2 提取时间筛选

Fig. 2 Selection of extraction time

溶剂量:取样品 1 g,精密称定,置 50 mL 圆底烧瓶中,分别加 60% 乙醇 10,15,20,25 mL,回流提取 2.0 h。结果以 25 mL 乙醇进行回流提取时,总黄酮综合评分最高,故选择溶剂量为 25 mL。详见图 3。

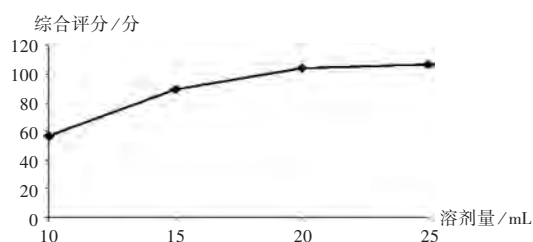


图3 溶剂量筛选

Fig. 3 Selection of solvent amount

2.5 正交试验

根据单因素试验结果,以提取时间(A)、提取次数(B)、溶剂量(C)为考察因素,以浸膏得率为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优选铁力木花蕾总黄酮提取工艺。因素与水平见表 2,试验设计与结果见表 3,方差分析结果见 4。由表 3、表 4 可知,铁力木花蕾总黄酮提取效率的影响大小依次为提取次数(B) > 溶剂量(C) > 提取时间(A),其中提取次数为主要影响因素,其次为溶剂量。故确定最优提取工艺为 $A_1B_3C_3$ 。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验因素与水平表

Tab. 2 Factors and their levels

水平	因素 A(h)	因素 B(次)	因素 C(mL)
1	1.5	1	20
2	2.0	2	25
3	2.5	3	30

2.6 验证试验

取样品 5.0 g,精密称定,依法制备供试品溶液,取适量,在选定波长处测定吸光度,并计算含量。结果样品中总黄酮的平均含量为 221.97 mg/g,综合评分为 155.49 分,表明该提取工艺合理,结果见表 5。

3 讨论

本研究中,采用单因素试验考察了铁力木花蕾总黄酮的提取方法、提取溶剂、提取时间、提取次数、溶剂量等因素,在此基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优选铁力木花蕾总黄酮的提取工艺。结果显示,铁力木花蕾总

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果 ($n=9$)

Tab. 3 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test ($n=9$)

序号	因素				含量(mg/g)	浸膏(g/g)	综合评分
	A	B	C	D(空白)			
1	1	1	1	1	66.94	0.32	46.96
2	1	2	2	2	163.66	0.36	114.67
3	1	3	3	3	254.12	0.67	178.08
4	2	1	2	3	84.77	0.27	59.42
5	2	2	3	1	181.05	0.36	126.84
6	2	3	1	2	185.49	0.37	136.95
7	3	1	3	2	131.92	0.31	92.44
8	3	2	1	3	200.67	0.47	140.61
9	3	3	2	1	157.09	0.30	110.06
K_1	484.72	283.63	453.10				
K_2	451.31	545.38	405.52				
K_3	489.68	596.70	567.09				
$R_{\text{含量}}$	4.96	313.07	161.57				
K_1	1.35	0.90	1.16				
K_2	1.00	1.19	0.93				
K_3	1.08	1.34	1.34				
$R_{\text{浸膏}}$	0.27	0.44	0.41				
K_1	339.71	198.82	324.52				
K_2	323.21	382.12	284.15				
K_3	343.11	425.09	397.36				
$R_{\text{综合评分}}$	19.90	226.27	113.21				

表 4 方差分析结果

Tab. 4 Results of ANOVA

因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	P
A	75.536	2	37.768	0.050	>0.05
B	9 627.047	2	4 813.524	6.340	<0.05
C	2 194.656	2	1 097.328	1.445	<0.05
D(空白)	8.422	2	4.211	1.000	

注: $F_{0.01}(2,2) = 99.00$, $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

Note: $F_{0.01}(2,2) = 99.00$, $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

表 5 验证试验结果

Tab. 5 Results of verification test

序号	药材(g)	黄酮含量(mg/g)	平均含量(mg/g)	浸膏得率(%)	综合评分(分)	平均评分(分)
1	4.9998	234.00		38.54	163.92	
2	5.0002	206.90	221.97	37.07	144.94	155.49
3	5.0000	225.00		37.62	157.61	

黄酮提取效率的主要影响因素为提取次数,其次是提取溶剂量。按此最佳提取工艺得到的铁力木花蕾 60% 乙醇提取物中总黄酮含量较高,达 221.97 mg/g。表明该方法提取效率较高,同时操作简便,成本较低,可为铁力木花蕾的进一步开发利用提供可靠依据。

参考文献

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: