

柿叶中总黄酮的提取和纯化工艺优化及鲜、干柿叶中总黄酮的含量比较

刘少静*, 赵旭, 张颖, 刁颖博, 杨黎彬[#](西安医学院药学院, 西安 710021)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3572-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.38

摘要 目的:优化柿叶中总黄酮的提取和纯化工艺参数,并对鲜、干柿叶中总黄酮的含量进行对比。方法:以总黄酮得率为考察指标,通过单因素及正交试验考察液料比、乙醇体积分数、超声提取时间对提取效果的影响;以总黄酮纯度为考察指标,比较石油醚脱脂结合乙酸乙酯萃取法、醇沉法、大孔吸附树脂纯化法对提取液的纯化效果;采用最优提取工艺提取鲜、干柿叶中总黄酮并比较二者含量。结果:最优提取工艺为液料比25:1(ml/g)、乙醇体积分数70%、超声提取时间30 min、提取温度30℃;验证试验中总黄酮含量平均值为1.75%(RSD=2.00%, $n=3$);3种纯化工艺所得提取液中总黄酮纯度分别为24.92%、15.94%和35.52%,其中大孔吸附树脂纯化法中以石油醚脱脂结合AB-8树脂纯化法最优。鲜柿叶中总黄酮量(1.75%)为干柿叶含量(0.87%)的2倍左右。结论:优化的提取和纯化工艺操作简单、效果较好,适合于大规模生产;应采收新鲜柿叶用作提取黄酮类化合物的原料。

关键词 柿叶;总黄酮;正交试验;提取;纯化;鲜、干品

Optimization of the Extraction and Purification Technologies of Total Flavonoids from *Diospyros kaki* Thunb. Leaves and Comparison of the Contents of Total Flavonoids in Fresh and Dried *Diospyros kaki* Thunb. Leaves

LIU Shao-jing, ZHAO Xu, ZHANG Ying, DIAO Ying-bo, YANG Li-bin (College of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the parameters of the extraction and purification technologies of total flavonoids from *Diospyros kaki* Thunb. leaves, and then to compare the contents of flavonoids in fresh and dried *D. kaki* Thunb. leaves. METHODS: Taking the yield of total flavonoids as the investigated index, the influences of liquid-solid ratio, the volume fraction of ethanol and ultrasonic extraction time on the extraction effect were discussed by single-factor and orthogonal test. With the purity of total flavonoids as the investigated index, the purification effects of such three kinds of methods as ethyl acetate extraction method, alcohol deposition method and macroporous resin purification method combined with petroleum ether degreasing on the extracted solution were compared. The optimal extraction technology was adopted to extract the total flavonoids from fresh and dried *D. kaki* Thunb. leaves and their contents were compared. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as liquid-solid ratio of 25:1 (ml/g), volume fraction of ethanol of 70%, ultrasonic extraction time of 30 min, extraction temperature of 30℃. The results of the verification tests showed the average content of total flavonoids was 1.75% (RSD=2.00%, $n=3$). The total flavonoids in the extracted solution purified by the above-mentioned three purification methods had a purity of 24.92%, 15.94% and 35.52% respectively, in which the macroporous resin purification method with petroleum ether degreasing combined with AB-8 resin purification was optimal. The content of flavonoids in fresh *D. kaki* Thunb. leaves (1.75%) was about twice as much as that in dried leaves (0.87%). CONCLUSIONS: The optimal extraction and purification technologies are simple with good effect, and suitable for large-scale production. Fresh *D. kaki* Thunb. leaves should be used as raw materials for extracting flavonoids.

KEYWORDS *Diospyros kaki* Thunb. leaves; Total flavonoids; Orthogonal test; Extraction; Purification; Fresh and dried leaves

柿叶为柿树科柿树属植物柿(*Diospyros kaki* Thunb.)的新鲜或干燥叶,味苦、性寒,具有下气平喘、生津止渴、清热解毒、镇咳止血、抗癌防癌等作用^[1-2]。柿叶中主要有效成分为有机酸类、黄酮类、三萜类、香豆素类、植物甾醇类、挥发性成分及必需氨基酸等多种营养物质和生理活性物质^[3-4]。近年来,大量药理试验研究表明,黄酮类化合物有抗血栓、抗氧化、抗过敏、抗衰老、抗肿瘤、清除自由基、抗心律失常等作用;对心血

管系统有增加冠脉流量、降低血压、降低心肌耗氧量、改善全身血液循环等作用^[5-7]。因而柿叶在医药用品、食用保健品和美容护肤品等行业具有广泛的开发应用前景。我国柿树资源丰富,但柿叶很少被有效利用,包括新鲜柿叶与干柿叶中总黄酮含量的对比等报道较少。因此,笔者以总黄酮的得率及纯度为考察指标,采用单因素及正交试验对柿叶中黄酮的提取纯化工艺进行了优化,并对鲜、干柿叶中黄酮的含量,以更好地开发和利用柿叶提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UV-160A型紫外分光光度计(日本岛津公司);SHZ-D

* 讲师,硕士。研究方向:天然产物。E-mail: liushaojingbmgw@163.com

[#] 通信作者:副教授,博士。研究方向:天然产物。E-mail: yangoyang@sina.com

(Ⅲ)型循环水式真空泵、RE-2000A型旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司);FA1004B型电子天平(上海越平科学仪器有限公司);KQ5200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);L-550型台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);DZF6020型真空干燥箱(上海琅轩实验设备有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

柿叶,于2012年10月12日采于西安医学院图书馆门前,由西安医学院药学院生药教研室冯永辉教授鉴定为柿树科柿属柿(*Diospyros kaki L.f.*);芦丁对照品(西安旭煌生物技术有限公司,批号:20080317,纯度:>98%);AB-8、DM130、HPD100、D101大孔吸附树脂(安徽三星树脂科技有限公司);无水乙醇、石油醚均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 芦丁标准曲线的建立及方法学考察^[8]

精密称取干燥至恒质量的芦丁对照品适量,用70%乙醇溶解,转入50 ml量瓶中,用70%乙醇定容,摇匀,得质量浓度为100 μg/ml的芦丁标准母液。精密量取芦丁标准母液2、3、3.5、4、5、6 ml分别置于10 ml量瓶中,加5%亚硝酸钠溶液0.3 ml,摇匀,放置6 min;加10%硝酸铝溶液0.3 ml,摇匀,放置6 min;加4%氢氧化钠溶液4 ml,再加水稀释至刻度,摇匀,放置15 min。另以不加对照品溶液的试剂为空白对照。用分光光度法在509 nm波长处测吸光度(A),以A为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $A=0.0086c+0.0854$ ($r=0.9994$),得芦丁线性范围为20~60 μg/ml。按相关方法进行方法学考察,精密密度、重复性试验吸光度的RSD分别为0.93% ($n=5$)、1.85% ($n=6$);24 h内稳定性试验含量的RSD为1.72% ($n=8$);芦丁的平均回收率为98.7% ($RSD=2.03%$, $n=9$)。

2.2 提取纯化工艺流程及结果计算

采用70%乙醇将柿叶冷浸30 min,超声(功率:80 W)提取30 min,过滤,提取2次,合并2次滤液,减压浓缩,加适量水溶解,用石油醚萃取除去脂溶性杂质。进一步采用大孔吸附树脂纯化,所得接收液减压浓缩、干燥,得到柿叶总黄酮提取物。精密称取产品适量,用70%乙醇溶解,于509 nm波长处测定其吸光度,代入“2.1”项下的回归方程,计算提取物中总黄酮质量浓度,换算出提取物纯度。纯度(x)计算公式: $x=(c_1 \times v) / m \times 100\%$ 。式中: c_1 为试样溶液中总黄酮质量浓度(mg/ml); v 为试样定容体积(ml); m 为产品质量(mg)。总黄酮得率计算公式: $Y=(c_2 \times V) / M \times 100\%$ 。式中: Y 为总黄酮得率(%); c_2 为提取的滤液中总黄酮质量浓度(mg/ml); V 为2次提取所得滤液的体积(ml); M 为称取的柿叶质量(mg)。

2.3 提取工艺的优化

试验初期通过单因素试验考察了乙醇体积分数、液料比及超声提取时间等对总黄酮得率的影响,基于此设计了3因素3水平的正交试验,以确定柿叶中黄酮的最优提取工艺。

2.3.1 单因素试验 在超声提取时间20 min、液料比20:1、提取温度30℃条件下,乙醇体积分数对提取效果的影响见图1A;在乙醇体积分数70%、超声提取时间20 min、提取温度30℃条件下,液料比对提取效果的影响见图1B;在乙醇体积分数70%、液料比25:1、提取温度30℃条件下,超声提取时间对提取效果的影响见图1C。

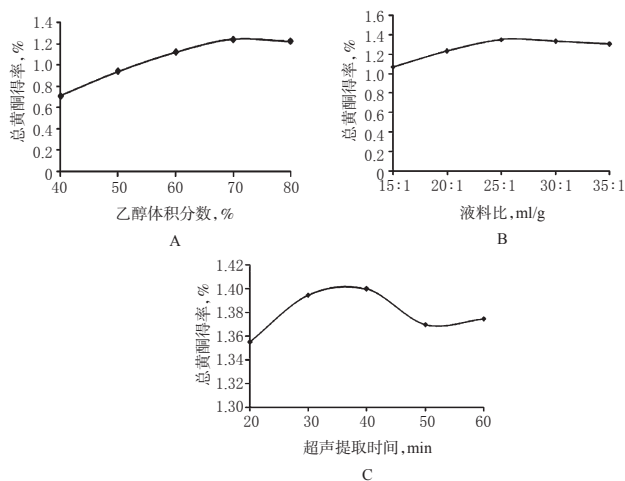


图1 各因素对总黄酮得率的影响

A.乙醇体积分数;B.液料比;C.超声提取时间

Fig 1 Influences of factors on the extraction effect

A. volume fraction of ethanol; B. liquid-solid ratio; C. ultrasonic extraction time

从图1可见,乙醇体积分数在65%~75%、液料比在20:1~30:1、超声提取时间在30~40 min时提取效果较好。

2.3.2 正交试验 根据单因素试验结果,以液料比为因素A、超声提取时间为因素B、乙醇体积分数为因素C、黄酮得率为指标,设计 $L_9(3^3)$ 正交试验。因素与水平见表1,正交试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(液料比), ml/g	B(超声提取时间), min	C(乙醇体积分数), %
1	20:1	30	65
2	25:1	35	70
3	30:1	40	75

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Orthogonal test design and its results

序号	因素			总黄酮得率, %
	A	B	C	
1	1	1	1	0.96
2	1	2	2	1.25
3	1	3	3	1.17
4	2	1	2	1.75
5	2	2	1	1.23
6	2	3	3	1.42
7	3	1	3	1.26
8	3	2	1	1.18
9	3	3	2	1.38
K_1	1.127	1.323	1.187	
K_2	1.467	1.220	1.460	
K_3	1.273	1.323	1.220	
R	0.340	0.103	0.273	

由表2及表3可以看出,3个因素对柿叶黄酮提取效果影响程度大小依次为液料比(A)>乙醇体积分数(C)>超声提取时间(B)。得最优提取工艺条件为 $A_2B_1C_2$,即:液料比25:1,30℃下用70%乙醇超声(功率:80 W)提取30 min。

2.3.3 验证试验 为了考察最优提取工艺的重复性,平行称

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F比	F临界值	P
A	0.174	2	0.087	3.551	19.00	>0.05
B	0.021	2	0.011	0.429	19.00	>0.05
C	0.133	2	0.067	2.714	19.00	>0.05
误差	0.05	2				

注: $\alpha=0.05$ Note: $\alpha=0.05$

取柿叶3份,采用最优提取工艺处理样品,测定吸光度,计算总黄酮得率。结果得率分别为1.72%、1.79%、1.75%,平均值为1.75%(RSD=2.00%, $n=3$),表明该工艺合理可行。

2.4 纯化工艺的优化

分别采用石油醚脱脂结合乙酸乙酯萃取、醇沉法及大孔吸附树脂纯化等方法对柿叶黄酮提取液进行处理,优选纯化工艺。

称取粉碎柿叶30.0 g,采用最优提取工艺提取柿叶黄酮,黄酮提取液减压浓缩,加水溶解、定容至1 000 ml,每次吸取100 ml进行分离纯化工艺试验。

2.4.1 乙酸乙酯萃取法(工艺1) 量取100 ml样液,加入石油醚(1:1, V/V)萃取2次脱脂,水层用乙酸乙酯(1:1, V/V)萃取3次,乙酸乙酯液减压浓缩,用70%乙醇溶解并定容,测定吸光度,计算纯度,结果见表4。

表4 乙酸乙酯萃取法、醇沉法的纯化结果

Tab 4 The purification effects of ethyl acetate extraction method and alcohol deposition method

方法	样品编号	总黄酮纯度, %	平均值, %
乙酸乙酯萃取法	样品1	24.61	24.92
	样品2	25.34	
	样品3	24.81	
醇沉法	样品1	15.61	15.94
	样品2	16.34	
	样品3	15.87	

由表4可见,柿叶黄酮提取液采用石油醚脱脂结合乙酸乙酯萃取法进行处理,所得产品纯度可达24.92%。

2.4.2 醇沉法(工艺2) 量取100 ml样液,加入石油醚(1:1, V/V)萃取2次脱脂,水层液适当浓缩后加入适量乙醇使醇体积分数达到80%,快速搅动药液,密闭冷藏24 h,过滤,滤液减压回收乙醇,用70%乙醇定容,测定吸光度,计算纯度,结果见表4。

由表4可见,柿叶黄酮提取液采用石油醚脱脂结合醇沉法进行处理,所得产品纯度可达15.94%。

2.4.3 大孔吸附树脂纯化(工艺3) (1)树脂的筛选。准确称取经过预处理的4种湿树脂(D101、HPD100、DM130及AB-8)各约2.0 g置于100 ml具塞锥形瓶中,分别加入已知质量浓度(c_0)的柿叶黄酮提取液50 ml,在25℃下振荡吸附12 h,测其上清液中的黄酮质量浓度(c_3);用去离子水洗涤树脂,滤出吸附平衡的树脂,分别加入70%乙醇溶液50 ml,在同样条件下解吸12 h,测得解吸液中黄酮质量浓度(c_4)。以树脂的吸附率、解吸率为考察指标,综合考察各树脂的性能,结果见表5。计算公式:吸附率= $[(c_0 - c_3)/c_0] \times 100\%$,解吸率= $[c_4/(c_0 - c_3)] \times 100\%$ 。

由表5可见,4种树脂的吸附率均较高,但其中AB-8树脂的解析率明显优于其余3种树脂,达到80%以上,对柿叶黄酮

表5 4种树脂的吸附与解吸结果比较

Tab 5 Result comparison of adsorption and desorption in 4 resins

指标	D101	HPD-100	DM130	AB-8
吸附率, %	62.61	67.39	70.19	75.87
解吸率, %	54.47	70.99	75.85	80.36

具有良好的吸附和解吸性能。故本试验采用AB-8树脂对黄酮提取液进行纯化。

(2)AB-8树脂纯化。量取100 ml样液,加入石油醚(1:1, V/V)萃取2次脱脂,水层液上AB-8大孔吸附树脂。先用蒸馏水洗去糖、色素等杂质,再分别用30%、50%、70%、90%乙醇以2 ml/min的流速洗脱,按照乙醇体积分数分段收集洗脱液。检测并计算不同体积分数洗脱液中总黄酮纯度。结果分别为14.61%、23.34%、35.52%、13.60%,即70%乙醇洗脱部分所得柿叶总黄酮提取物纯度最高,可达35.52%,可以实现纯化柿叶黄酮的目的。

综合上述试验,3种工艺即工艺1、工艺2、工艺3所得柿叶总黄酮纯度分别为24.92%、15.94%、35.52%;其中工艺3即石油醚脱脂结合AB-8树脂纯化效果最好,提取物中总黄酮纯度最高。

2.5 鲜、干柿叶中总黄酮含量的对比

精密称取鲜柿叶6份,每份各约5.0 g,其中3份晒干(放置3 d)后作为干叶,采用最优提取工艺对6份样品进行处理。比较鲜、干柿叶中总黄酮含量的差异,结果见表6。

表6 鲜、干柿叶中总黄酮含量比较(%)

Tab 6 Comparison of the contents of flavonoids between fresh and dried *D. kaki* Thunb. leaves (%)

样品	样品编号	总黄酮含量		
		测得值	平均值	RSD
鲜柿叶	样品1	1.71	1.75	2.62
	样品2	1.74		
	样品3	1.80		
干柿叶	样品4	0.86	0.87	3.04
	样品5	0.85		
	样品6	0.90		

由表6可见,鲜柿叶中总黄酮含量约为1.75%,干柿叶中总黄酮含量约为0.87%。鲜柿叶中总黄酮含量为干柿叶中总黄酮含量的2倍左右。

3 讨论

我国柿树资源丰富,但柿叶很少被有效利用。本文研究结果表明,对柿叶中总黄酮进行超声提取,并采用石油醚脱脂结合大孔吸附树脂(工艺3)进行纯化,提取物中总黄酮纯度可达35.52%。同时,含量测定结果表明:鲜柿叶中总黄酮含量为干柿叶的2倍左右,提示应尽可能采收新鲜柿叶用作提取黄酮类化合物的原料,使其产生良好的经济效益。

超声波是频率大于20 Hz以上、人的听觉阈以外的声波。超声波提取法是利用空穴作用、热效应及机械效应破坏植物细胞及膜结构,增加内容物穿透力,利于中药有效成分的释放和溶出,具有效率高、能耗低、物质活性不易被破坏和操作简单等优点。

大孔吸附树脂是一类有机高分子聚合物吸附剂,其性质稳定、吸附选择性强、易于解吸和再生,被广泛用于中药中间体的纯化。树脂的极性和结构是影响其吸附性能的重要因

阿苯达唑纳米混悬液的冻干工艺优化

任洁如^{1,2*}, 马运芳², 王建华^{2#a}, 陈迹^{2#b}(1.新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830054; 2.新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830054)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3575-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.39

摘要 目的:优化阿苯达唑纳米混悬液的冻干工艺,制备阿苯达唑纳米微粉。方法:采用冷冻干燥法,以粒径、Zeta电位为指标,对预冻温度和冻干保护剂的种类、配比及质量分散进行单因素试验考察及验证,将液相沉淀法制备的阿苯达唑纳米混悬液,制备成阿苯达唑纳米微粉。结果:预冻温度为-20℃、冻干保护剂为4%葡萄糖-甘露醇(3:7)时,所制纳米微粉的平均粒径为(208.03±2.13)nm,平均Zeta电位为(-15.53±0.18)mV。结论:该冻干工艺可制得粒径、电位较优的阿苯达唑纳米微粉。

关键词 阿苯达唑;纳米混悬液;冻干保护剂;冷冻干燥

Optimization of Freeze-drying Technology of Albendazole Nanosuspension

REN Jie-ru^{1,2}, MA Yun-fang², WANG Jian-hua², CHEN Ji²(1.Basic Medical Sciences School of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2.The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize freeze-drying technology of albendazole nanosuspension so as to prepare albendazole nanometer powder. METHODS: By adopting freeze-drying method, with particle size and Zeta potential as the indexes, single factor test and verification were made on pre-freezing temperature and the type, ratio and mass fraction of cryoprotectants, and then the albendazole nanosuspension prepared by liquid phase precipitation method was made into albendazole nanometer powder. RESULTS: When the pre-freezing temperature was -20℃ and the cryoprotectant was 4% glucose-mannitol (3:7), the average particle size of the prepared nanometer powder was (208.03±2.13) nm, and average Zeta potential was (-15.53±0.18) mV. CONCLUSIONS: Albendazole nanometer powder with better particle size and potential can be prepared by freeze-drying technology.

KEYWORDS Albendazole; Nanosuspension; Cryoprotectant; Freeze-drying

阿苯达唑(Albendazole)是一种广谱抗寄生虫药,被世界卫生组织(WHO)推荐为抗包虫病的主要药物之一,近年来越来越多地使用于临床,其疗效得到了较为广泛的认可^[1]。但是阿苯达唑的水溶性差,肠道吸收率、体内血药浓度、生物利用度均较低,因此严重制约了阿苯达唑的推广应用^[2]。本课题组前期通过液相沉淀法制备了阿苯达唑纳米混悬液,但纳米混悬液长期贮存稳定性不佳,即药物长期在液体环境中可发生

沉降、聚集、降解、变性等各种不稳定现象。为提高其贮存稳定性,笔者采用冷冻干燥技术对纳米混悬液进行干燥制得阿苯达唑纳米微粉,显著提高了其常温放置稳定性。但在冻干过程中,预冻温度、冻干保护剂的种类与质量分数会对其稳定性产生影响。为此,本研究主要以阿苯达唑纳米微粉的粒径、Zeta电位为评价指标对上述因素进行考察,旨在确定最佳冻干工艺。

素。柿叶总黄酮具有多酚结构和糖苷键,显弱极性,有利于弱极性树脂的吸附,而AB-8树脂是弱极性树脂,比表面积大,因此对柿叶总黄酮有较好的吸附性能。

参考文献

- [1] 孙化鹏,钟晓红,陆英,等.柿叶黄酮化合物分离制备[J].食品科学,2011,32(2):57.
- [2] 王莲,米沙,庞文悦,等.比色法测定柿叶中总黄酮的含量[J].食品研究与开发,2012,33(6):122.

* 硕士研究生。研究方向:临床药学。电话:0991-4363438。E-mail:happyrenjieru@163.com

#a 通信作者:副教授,主任药师,硕士生导师。研究方向:临床药学。E-mail:jhw716@163.com

#b 通信作者:主任药师,硕士生导师。研究方向:临床药学。E-mail:13899877490@163.com

- [3] 傅建敏,梁晋军,周道顺.柿叶有效成分研究综述[J].中南林业科技大学学报,2013,33(11):1757.
- [4] 韦宾,周吴萍,容元平. AB-8大孔树脂分离纯化柿叶总黄酮的研究[J].中国药业,2012,21(11):34.
- [5] 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.
- [6] 张秀梅,曾祖平,王永红.柿叶总黄酮提取工艺的研究[J].时珍国医国药,2008,19(1):35.
- [7] 王兰,赵麟.响应面分析法优化柿叶总黄酮提取工艺[J].安徽农业科学,2011,39(3):1370.
- [8] 李永杰,马秀琴,冷爱晶,等.不同采收期山楂叶中总黄酮含量测定[J].辽宁中医药大学学报,2011,13(1):54.

(收稿日期:2014-10-30 修回日期:2015-04-23)

(编辑:刘洋)