

Box-Behnken设计-响应面法优化番石榴叶总黄酮提取工艺及总黄酮对糖尿病小鼠糖耐量的影响研究[△]

傅 予*,王 宏,张 岩,陶遵威#,刘洪斌(天津市医药科学研究所,天津 300020)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)01-0049-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.01.13

摘要 目的:优化番石榴叶总黄酮提取工艺,考察番石榴叶总黄酮对糖尿病模型小鼠糖耐量的影响。方法:在单因素试验的基础上,以提取时间、料液比、乙醇用量为自变量,金丝桃苷、槲皮素-3-O-β-D-吡喃阿拉伯糖苷、槲皮素-3-O-α-L-呋喃阿拉伯糖苷和浸出物得率的综合评分为因变量,采用Box-Behnken设计-响应面法优化番石榴叶总黄酮回流提取工艺并进行验证试验。取60只小鼠随机分为空白组、模型组、二甲双胍组(170 mg/kg)和番石榴叶总黄酮低、中、高剂量组(23.41、46.81、93.62 mg/kg,以总黄酮含量计),每组10只。除空白组小鼠外,其余各组小鼠复制糖尿病模型,成模后灌胃给药,每天1次,连续21 d,末次给药6 h后,灌胃葡萄糖2.0 g/kg,于给予葡萄糖后0、0.5、1.0、2.0 h测定血糖值,计算血糖变化曲线下面积(AUC)。结果:番石榴叶总黄酮最优工艺为提取2次,每次1.0 h,料液比1:17,乙醇体积分数56%,验证试验中金丝桃苷、槲皮素-3-O-β-D-吡喃阿拉伯糖苷、槲皮素-3-O-α-L-呋喃阿拉伯糖苷含量分别为2.57、3.38、2.26 mg/g(RSD<2%, n=3),浸膏得率为25.71%(RSD<1.19%, n=3),综合评分平均值为96.41(RSD=1.34%, n=3),与预测值99.98的相对误差为3.57%。与空白组比较,各组小鼠AUC显著升高;与模型组比较,二甲双胍组和番石榴叶总黄酮中、高剂量组AUC显著降低,差异均有统计学意义(P<0.05或P<0.01)。结论:优化的提取工艺稳定可行、质量可控;番石榴叶总黄酮可促进糖尿病小鼠血糖恢复正常。

关键词 番石榴叶;总黄酮;提取工艺;Box-Behnken设计-响应面法;糖尿病模型;糖耐量;小鼠

Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoids *Psidium guajava* Leaves by Box-Behnken Design-Response Surface Method and the Effects of Total Flavonoids on Glucose Tolerance in Diabetic Model Mice
FU Yu, WANG Hong, ZHANG Yan, TAO Zunwei, LIU Hongbin (Tianjin Institute of Medical Science, Tianjin 300020, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of total flavonoids from *Psidium guajava* leaves and investigate the effects of total flavonoids from *P. guajava* leaves on glucose tolerance in diabetic model mice. METHODS: Based on single factor test, using extraction time, solid-liquid ratio and the amount of ethanol as independent variables, comprehensive scores of the yield of hyperin, quercetin-3-O-β-D-arabinopyranoside, quercetin-3-O-α-L-furanarabino side ethyl acetate and extract as dependent variable, Box-Behnken design-response surface method was used to optimize the reflux extraction process of total flavonoids from *P. guajava* leaves, and validation test was also conducted. Sixty mice were randomly divided into blank group, model group, met-

- tegrating tablets: a review[J]. *Trop J Pharm Res*, 2011, 2 (4):81-88.
- [4] 曾富荣,程英.右佐匹克隆治疗脑卒中后焦虑抑郁伴失眠的临床疗效[J]. *中国现代医生*, 2012, 50(36):159-160.
- [5] 班春霞,郭本玉,陈青,等.住院精神病患者精神药物应用时点调查[J]. *临床心身疾病杂志*, 2014, 20(6):90-91.
- [6] 林伟豪,朱新华.阿司匹林口崩片的制备[J]. *华西药学杂志*, 2012, 27(5):547-549.
- [7] 国家药典委员会. *中华人民共和国药典:四部*[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社, 2015:通则0921.
- [8] 吴旖,谢敏.百部新碱口腔崩解片的制备[J]. *中国药房*, 2016, 27(16):2268-2271.
- [9] 田朋鑫,罗永煌,刘艳玲,等.甲磺酸普立地诺口腔崩解片的研制及质量评价[J]. *中国药房*, 2012, 23(1):48-51.
- [10] 张爱丽,邵杰,张庆芬.橘红痰咳口腔崩解片的制备[J]. *中成药*, 2015, 37(7):1462-1466.
- [11] 张招磊.右旋佐匹克隆片的制备工艺及质量评价[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2014.
- [12] 李标,蒲道俊.口腔崩解片的研究进展[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2010, 10(2):159-160.
- [13] U.S. Food and Drug Administration. *Guidance for industry orally disintegrating tablets*[EB/OL]. (2008-11)[2017-10-05]. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.

△ 基金项目:天津市卫生和计划生育委员会中医中西医结合项目(No.2015042)

* 助理研究员,硕士。研究方向:中药化学。电话:022-27236182。E-mail:fyyyyyy_82@126.com

通信作者:研究员。研究方向:药物化学。电话:022-27236182。E-mail:taozunweitj@163.com

(收稿日期:2017-08-11 修回日期:2017-10-30)
(编辑:邹丽娟)

formin group (170 mg/kg), *P. guajava* leaves total flavonoids low-dose, medium-dose and high-dose groups (23.41, 46.81, 93.62 mg/kg, by the content of total flavonoids), with 10 mice in each group. Except for blank group, diabetic model was induced in those groups, and then model mice were given relevant medicine intragastrically once a day for consecutive 21 d, 6 h after last medication given glucose 2.0 g/kg intragastrically. The levels of blood glucose were determined 0, 0.5, 1.0, 2.0 h after intragastric administration of glucose, and the area under the curve (AUC) of blood glucose was calculated. RESULTS: The optimal technology of *P. guajava* leaves total flavonoids was as follows as extracting twice, lasting for 1.0 h each time, solid-liquid ratio of 1:17, ethanol volume fraction of 56%. In validation test, the contents of hyperin, quercetin-3-*O*- β -*D*-arabinopyranoside and quercetin-3-*O*- α -*L*-furanarabino side ethyl acetate were 2.57, 3.38, 2.26 mg/g (RSD < 2%, n = 3); the yield of extract was 25.71% (RSD = 1.19%, n = 3); average comprehensive score was 96.41 (RSD = 1.34%, n = 3); relative error was 3.57% with the predicted value of 99.98. Compared with blank group, AUC of mice were increased significantly in each group; compared with model group, AUC of metformin group, *P. guajava* leaves total flavonoids medium-dose and high-dose groups were all decreased significantly, with statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: The optimal extraction technology is stable, feasible and controllable in quality. Total flavonoids from *P. guajava* leaves can promote the recovery to normal level of blood glucose.

KEYWORDS *Psidium guajava* leaves; Total flavonoids; Extraction technology; Box-Behnken design-response surface method; Diabetic model; Glucose tolerance; Mice

番石榴叶为桃金娘科番石榴属植物番石榴 (*Psidium guajava* L.) 的干燥叶及带叶嫩茎^[1], 别名鸡矢茶, 广泛种植于我国华南各地及四川西南部, 具有生津止渴、甘平养胃、涩敛固阴之功效。民间常用其治疗泻痢腹痛、疔疮肿毒等症。研究显示, 番石榴叶中的活性成分具有降血糖、降血脂、抗菌消炎、抗氧化等药理作用^[2], 具有较高的开发价值。本课题组前期研究表明, 番石榴叶中的总黄酮能较好地调节糖尿病小鼠肝糖代谢^[3]及促进胰岛细胞再生。本研究在单因素的基础上, 采用 Box-Behnken 设计-响应面法, 以番石榴叶中 3 个主要黄酮苷成分金丝桃苷、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃阿拉伯糖苷、槲皮素-3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖苷成分含量, 再结合浸出物得率为指标, 优化番石榴叶总黄酮回流提取工艺, 并进行放大验证试验; 同时考察了番石榴叶总黄酮对糖尿病小鼠糖耐量的影响, 为番石榴叶药材质量控制和进一步的药效学研究提供理论参考和数据支持。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity 高效液相色谱 (HPLC) 仪 (美国 Agilent 科技有限公司); AL204 十万分之一电子分析天平、ME203E 千分之一电子分析天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司); I 型 710 鱼跃血糖测试仪 (江苏鱼跃医疗设备股份有限公司)。

1.2 药材、对照品与试剂

番石榴叶 (天津市三潭医院提供, 批号: 13220042) 经天津中医药大学中药学院马琳教授鉴定为桃金娘科番石榴属植物番石榴的干燥叶; 槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃阿拉伯糖苷对照品、槲皮素-3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖苷对照品 (根据文献自提^[4-5], 纯度: $\geq 98\%$); 金丝桃苷对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 111521-200303, 供含量测定用); 盐酸二甲双胍片 (上海施贵宝制药有限公司, 批号: AAL7649, 规格: 0.5 g/片); 链脲佐菌素 (STZ,

美国 Sigma 公司); 甲醇为色谱纯; 乙醇、磷酸均为分析纯; 试验用水为娃哈哈纯净水。

1.3 动物

实验用 ICR 小鼠, SPF 级, δ , 体质量 (14 \pm 2) g, 北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物合格证号: SCXK (京) 2012-0001。

2 方法与结果

2.1 3 种黄酮苷含量的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇 (A)-0.2% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~20.00 min, 37% A; 20.01~35.00 min, 70% A); 流量: 1 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 检测波长: 360 nm; 进样量: 10 μ L。在上述色谱条件下, 取“2.1.2”“2.1.3”项下溶液进样测定, 色谱图见图 1。各成分分离度均大于 1.5。

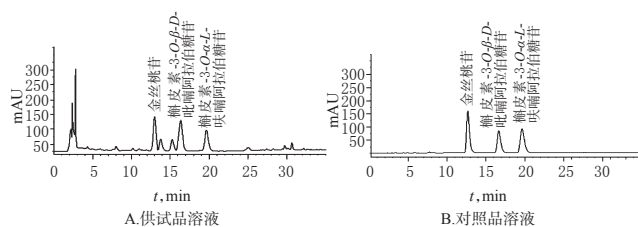


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃阿拉伯糖苷、槲皮素-3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖苷对照品适量, 分别加 50% 甲醇配制质量浓度为 0.155、0.159、0.180 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取过筛后的番石榴叶粉末 10 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 60% 乙醇 150 mL, 称定质量, 回流提取 1.0 h, 放冷, 复称质量, 以 60% 乙醇补足, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得。

2.1.4 线性关系考察 分别吸取金丝桃苷(310.04 $\mu\text{g/mL}$)、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃阿拉伯糖苷(318.20 $\mu\text{g/mL}$)、槲皮素-3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖苷(360.08 $\mu\text{g/mL}$)混合对照品溶液0.5、1、2.5、5、7.5、10 mL,分别置于10 mL量瓶中,加50%甲醇至刻度,摇匀,按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以峰面积积分值为纵坐标(y)、对照品进样量为横坐标(x),绘制标准曲线。结果,金丝桃苷回归方程为 $y=331.42x+13.374$ ($r=1.000\ 0$),进样量线性范围为0.155~3.100 μg ;槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃阿拉伯糖苷回归方程为 $y=318x+20.519$ ($r=0.999\ 8$),进样量线性范围为0.159~3.182 μg ;槲皮素-3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖苷回归方程为 $y=349.82x+16.257$ ($r=0.999\ 8$),进样量线性范围为0.180~3.601 μg 。

2.1.5 精密度试验 精密量取混合对照品溶液10 μL ,连续进样6次,得对照品金丝桃苷、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃阿拉伯糖苷、槲皮素-3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖苷峰面积值的RSD分别为0.23%、0.36%、1.41% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取6份番石榴叶粉末,精密称定,依照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液进样测定,结果金丝桃苷、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃阿拉伯糖苷、槲皮素-3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖苷含量的RSD分别为0.63%、1.14%、1.66% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液,室温放置,分别于0、2、4、6、8、10、12 h进样测定金丝桃苷、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃阿拉伯糖苷、槲皮素-3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖苷峰面积,结果,RSD分别为0.22%、0.56%、0.27% ($n=7$),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 取番石榴叶药材粉末6份,精密称定,分别精密加入金丝桃苷、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃阿拉伯糖苷、槲皮素-3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖苷对照品溶液,折合成3种黄酮苷的含量分别为0.920、1.289、0.851 mg,分别按“2.1.3”项下方法制备,进样测定并计算加样回收率。结果显示,3种黄酮苷的平均加样回收率分别为99.52%、98.61%、100.27%,RSD值分别为1.49%、0.80%、1.82% ($n=6$),表明方法准确度好。

2.2 总黄酮含量测定

精密吸取“2.1.3”项下供试品溶液10 μL ,按“2.1.1”项下色谱条件测定供试品溶液中金丝桃苷、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃阿拉伯糖苷、槲皮素-3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖苷峰面积,计算总黄酮含量,结合这3个成分色谱峰面积占总峰面积的百分比,折算供试品溶液中番石榴叶总黄酮的含量^[6-7]。

总黄酮含量(mg/g)=3种黄酮苷质量分数总和/3种黄酮苷色谱峰面积百分比总和 $\times 100\%$ 。

2.3 浸出物得率测定

分别提取各工艺下样品供试液,置于已干燥至恒质

量的蒸发皿中,水浴蒸干,置于105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干至恒质量,取出至干燥器内冷却0.5 h,迅速精密称定质量,计算浸出物得率^[8](浸膏得率=干燥后质量/药材质量 $\times 100\%$)。

2.4 单因素考察

以提取液中的总黄酮含量为评价指标,考察各因素对提取率的影响。(1)提取时间。精密称定番石榴叶药材粉末10 g,分别于料液比1:10,乙醇体积分数为60%,提取时间分别为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h条件下提取1次;(2)料液比。乙醇体积分数为60%,回流时间1.0 h,料液比分别为1:5、1:10、1:15、1:20、1:25条件下提取1次;(3)乙醇体积分数。料液比为1:10,回流时间1.0 h,乙醇体积分数分别为30%、40%、50%、60%、70%、80%条件下提取1次;(4)提取次数。料液比为1:10,回流时间1.0 h,乙醇体积分数为60%条件下提取1次、2次、3次、4次,测定提取液中的金丝桃苷、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃阿拉伯糖苷、槲皮素-3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖苷含量,折算总黄酮含量,筛选出各因素最优范围。

单因素试验结果显示,总黄酮的含量随着料液比的增加呈升高趋势,在料液比1:15时达到最大值;乙醇体积分数对总黄酮的提取影响较大,在乙醇体积分数为60%时总黄酮的含量最高;在对提取时间考察时发现,回流1 h后基本提取完全;提取次数以2次为宜。

2.5 Box-Behnken设计-响应面法优化提取工艺

2.5.1 试验设计与结果 以单因素试验的结果为基础,根据Box-Behnken设计原理,选取提取时间(X_1 ,h)、料液比(X_2 ,mL/g)以及乙醇体积分数(X_3 ,%)为自变量,采用Box-Behnken设计试验。Box-Behnken设计因素与水平见表1。

表1 Box-Behnken设计因素与水平

Tab 1 Factors and levels of Box-Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
X_1 (提取时间),h	0.5	1	1.5
X_2 (料液比),mL/g	1:10	1:15	1:20
X_3 (乙醇体积分数),%	50	60	70

将金丝桃苷量(Y_1)、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃阿拉伯糖苷量(Y_2)、槲皮素-3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖苷含量(Y_3),浸出物得率(Y_4)进行加权综合评分(OD),计算OD值^[9-10], $OD=(0.25Y_1/Y_{1\max}+0.25Y_2/Y_{2\max}+0.25Y_3/Y_{3\max}+0.25Y_4/Y_{4\max})\times 100$,其中 $Y_{1\max}$ 、 $Y_{2\max}$ 、 $Y_{3\max}$ 、 $Y_{4\max}$ 为相应指标量的最大值。Box-Behnken设计方案与结果见表2。

以综合评分OD值为响应值(Y),采用Design-Expert V7.0.0软件对数据进行多元回归分析。得到回归方程 $Y=96.49+3.71X_1+5.24X_2-16.80X_3-2.42X_1X_2-0.60X_1X_3-6.10X_2X_3-5.98X_1^2-9.62X_2^2-30.34X_3^2$,由方程可知,影响番石榴叶总黄酮提取因素的主次顺序为 $X_3>X_2>X_1$ 。各因素的方差分析结果见表3。

表2 Box-Behnken 设计方案与结果

Tab 2 Plan and result of Box-Behnken design

试验号	因素			指标						
	X_1 , h	X_2 , mL/g	X_3 , %	Y_1 , mg/g	Y_2 , mg/g	Y_3 , mg/g	Y_4 , %	总黄酮含量, mg/g	OD值	
1	0.5	1:10	60	1.92	2.52	1.78	17.50	8.52	71.44	
2	1.5	1:10	60	2.24	3.12	2.09	19.55	10.28	83.86	
3	0.5	1:20	60	2.10	2.79	1.92	24.09	9.19	82.75	
4	1.5	1:20	60	2.23	2.94	2.02	23.54	9.80	85.50	
5	0.5	1:15	50	2.07	2.54	1.70	19.02	8.61	73.57	
6	1.5	1:15	50	2.21	2.90	1.86	22.06	10.28	82.01	
7	0.5	1:15	70	0.75	0.82	0.54	22.08	3.44	39.54	
8	1.5	1:15	70	0.66	1.27	0.63	25.07	4.26	45.57	
9	1.0	1:10	50	1.63	1.99	1.36	16.10	6.55	59.17	
10	1.0	1:20	50	2.27	3.10	2.09	21.51	10.25	85.84	
11	1.0	1:10	70	0.79	0.80	0.61	20.94	3.55	39.41	
12	1.0	1:20	70	0.77	1.16	0.64	20.51	4.20	41.69	
13	1.0	1:15	60	2.50	3.44	2.25	26.32	11.12	96.68	
14	1.0	1:15	60	2.44	3.19	2.20	25.77	10.71	93.38	
15	1.0	1:15	60	2.63	3.49	2.40	26.40	11.66	99.90	
16	1.0	1:15	60	2.60	3.46	2.36	25.90	11.54	98.54	
17	1.0	1:15	60	2.47	3.25	2.13	26.51	10.53	93.96	

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

来源	平方和	自由度	均方差	F	P
模型	7 452.31	9	828.03	83.54	<0.000 1
X_1	109.82	1	109.82	11.08	0.012 6
X_2	219.45	1	219.45	22.14	0.002 2
X_3	2 257.25	1	2 257.25	227.74	<0.000 1
X_1X_2	23.38	1	23.38	2.36	0.168 5
X_1X_3	1.45	1	1.45	0.15	0.713 3
X_2X_3	148.72	1	148.72	15.00	0.006 1
X_1^2	150.56	1	150.56	15.19	0.005 9
X_2^2	390.05	1	390.05	39.35	0.000 4
X_3^2	3 875.79	1	3 875.79	391.04	<0.000 1
残差	69.38	7	9.91		
失拟差	37.44	3	12.48	1.56	0.329 8
纯误差	31.94	4	7.98		
总和	7 521.69	16			

$R^2=0.978 9$

由表3可知,模型 $P<0.01$,差异性极显著,具有统计学意义;模型决定系数 $R^2=0.978 9$,表明模型拟合度良好;模型的失拟项不显著($P=0.329 8>0.05$),表明误差导致模型拟合程度不佳的可能性较小,可以对不同条件下的总黄酮含量进行预测。同时,模型一次项 X_1 具有显著性差异($P<0.05$), X_2 、 X_3 具有极显著性差异;交互项差异中 X_2X_3 具有极显著性差异($P<0.01$),二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均具有极显著性差异($P<0.01$)。

由此预测最优提取工艺为提取时间1.08 h,料液比1:17.64,乙醇体积分数55.93%,在此条件下综合评分OD值为99.98。因考虑到实际操作的可行性,最优工艺确定为提取时间1.0 h,料液比1:17,乙醇体积分数56%。绘制不同变量间的响应图,详见图2。

2.5.2 验证试验 将最优工艺放大100倍进行3次验证试验。结果金丝桃苷提取量平均值为2.57 mg/g(RSD=1.47%, $n=3$);槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃阿拉伯糖苷量提取

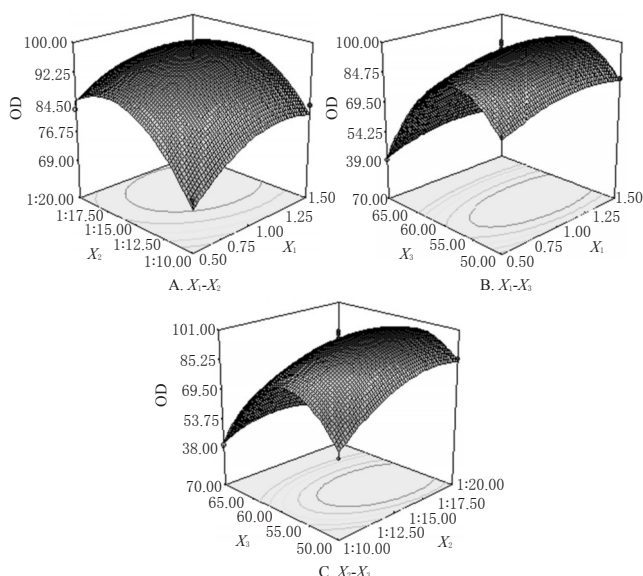


图2 各因素间的三维响应面图

Fig 2 3D response surface plot of various factors

量平均值为3.38 mg/g(RSD=1.33%, $n=3$);槲皮素-3-*O*- α -L-呋喃阿拉伯糖苷提取量平均值为2.26 mg/g(RSD=1.48%, $n=3$);浸膏得率平均值为25.71%(RSD=1.19%, $n=3$);总黄酮提取量平均值为11.23 mg/g(RSD=1.29%, $n=3$);计算OD平均值为96.41(RSD=1.34%, $n=3$),与预测值99.98的相对误差为3.57%。以上表明建立的模型预测性良好,优化工艺条件较稳定。

2.6 番石榴叶总黄酮对糖尿病小鼠糖耐量的影响

2.6.1 糖尿病小鼠模型的制备和给药 60只雄性ICR小鼠适应性饲养7 d后,高糖高脂饲料喂养4周。小鼠造模前禁食12 h,腹腔注射STZ柠檬酸缓冲液100 mg/kg,注射72 h后断尾取血测空腹血糖,空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L的选为糖尿病模型小鼠。结合前期预试验结果,将造模成功的小鼠随机分为模型组、二甲双胍组(170 mg/kg,为临床等效剂量的9倍)、番石榴叶总黄酮低、中、高剂量组(23.41、46.81、93.62 mg/kg,以总黄酮含量计,中剂量组为临床等效剂量的9倍),每组10只,另选10只不造模小鼠为空白组。浸膏以纯净水稀释,灌胃给药,每天1次,连续21 d。

2.6.2 糖耐量实验 末次给药后,小鼠禁食6 h,一次性灌胃葡萄糖2.0 g/kg,在0、0.5、1.0、2.0 h后断尾取血测血糖,按以下公式计算血糖变化曲线下面积(AUC): $AUC=0.25 \times \text{血糖值}_{0h} + 0.5 \times \text{血糖值}_{0.5h} + 0.75 \times \text{血糖值}_{1.0h} + 0.5 \times \text{血糖值}_{2.0h}$,结果见表4。

由表4可知,与空白组比较,各组给予葡萄糖0、0.5、1.0、2.0 h后血糖显著升高($P<0.01$),AUC显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,二甲双胍组和番石榴叶总黄酮高、中剂量组的AUC显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表4 各组大鼠AUC结果($\bar{x} \pm s, n=10$)Tab 4 AUC of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量, mg/kg	血糖值,mmol/L				AUC, mmol/(h·L)
		0 h	0.5 h	1.0 h	2.0 h	
空白组		9.10±1.03	16.57±5.81	10.44±1.50	8.96±0.73	22.76±4.04
模型组		22.73±3.35**	32.28±1.63**	30.44±2.26**	25.48±3.65**	58.01±4.44**
二甲双胍组	170	23.21±4.35**	27.36±4.45***	25.56±4.30***	20.14±2.31***	47.43±7.23***
番石榴叶总黄酮高剂量组	93.62	23.44±5.79**	29.04±3.30**	25.41±4.26***	20.59±5.12***	49.00±8.05***
番石榴叶总黄酮中剂量组	46.81	23.53±4.42**	28.80±3.78***	24.89±4.65***	20.85±4.18***	48.11±7.84***
番石榴叶总黄酮低剂量组	23.41	23.51±3.34**	30.72±3.25**	29.19±2.90**	24.41±3.29**	55.08±6.23**

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. blank group, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

0.01

3 讨论

3.1 样品量选择

本研究在选择药材样品量时,考虑到若样品量过大,则在前期单因素考察和正式试验时试剂消耗较大,耗时较长;样品量过少则会降低实际放大生产时的可参考性。结合前期预试验和文献参考最终确定以10 g药材粉末进行相关试验。

3.2 测定方法及指标成分选择

经查阅文献,植物总黄酮含量测定大都采用紫外分光光度法^[11-12],此种方法操作复杂、误差较大。以HPLC法测定番石榴叶总黄酮的报道较少,且主要以芦丁作为对照品进行测定,专属性较差^[13]。本课题前期对番石榴叶进行提取分离和HPLC分析,结果未在番石榴叶中检测到芦丁成分存在。因此,以芦丁为对照品测定番石榴叶中的总黄酮,无法真实反映总黄酮的含量。故本试验采用HPLC法,同时测定在番石榴叶总黄酮中含量较高的金丝桃苷、槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃阿拉伯糖苷、槲皮素-3-*O*- α -L-呋喃阿拉伯糖苷这3个成分含量,折算得到总黄酮的含量。并依据黄酮类化合物最大吸收波长集中在230~280 nm波长和330~350 nm波长两个区段的共同特征^[6],以二极管阵列检测器在200~400 nm波长范围内进行检测,最终选取检测波长为360 nm。结果表明,试验所采用的方法操作简便、专属性好、精确度高,可用于番石榴叶中总黄酮的测定。

本研究选取番石榴叶中3种主要黄酮苷为指标成分进行工艺评价,与预试验中以总黄酮含量为评价指标进行模型拟合相比较,结果一致,且更能综合反映工艺对总黄酮提取的影响。

此外,糖耐量实验结果显示,与模型组比较,优化条件下的番石榴叶总黄酮提取物给药组糖耐量曲线下面积

明显下降,表明番石榴叶总黄酮能明显促进糖尿病小鼠的血糖恢复正常,这其中中剂量组作用更为明显。

综上,本研究应用Box-Behnken设计-响应面法优化番石榴叶总黄酮提取工艺,测定番石榴叶中3个主要黄酮苷成分含量及浸出物得率,对所选取指标进行了合理的权重系数分配,以综合评分为参考指标,优选得到的工艺合理、预测性较好。本课题后续将进行番石榴叶总黄酮的药效学和作用机制的相关研究。

参考文献

- [1] 广西壮族自治区卫生厅.广西中药材标准[M].南宁:广西科学技术出版社,1990:88-89.
- [2] 刘美凤,谷灵灵,蒋利荣,等.番石榴叶抗糖尿病研究进展[J].中国新药杂志,2013,22(2):183-189.
- [3] 郭胜男,刘洪斌,李东华,等.番石榴叶总黄酮对糖尿病小鼠肝脏葡萄糖代谢及胰岛素信号通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(4):166-170.
- [4] 吴慧星,李晓帆,李荣,等.番石榴叶中抗氧化活性成分的研究[J].中草药,2010,41(10):1593-1597.
- [5] 郑晓红,孟大利,李铎.番石榴叶的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2014,31(7):518-520.
- [6] ZERAIK ML, YARIWAKE JH. Quantification of isoorientin and total flavonoids in Passiflora edulis fruit pulp by HPLC-UV/DAD[J]. Microchem J, 2010, 96(1):86-91.
- [7] 刘体云,卢艳花,魏东芝,等.淡竹叶中总黄酮和三种黄酮苷的同步HPLC检测[J].中成药,2009,31(1):96-100.
- [8] 田元春,李双蕾,杨婧,等.星点设计-响应面法优化壮骨方煮散的煎煮工艺[J].中国药房,2017,28(7):954-956.
- [9] 邓雪,李家铭,曾浩健,等.层次分析法权重计算方法分析及其应用研究[J].数学的实践与认识,2012,42(7):93-100.
- [10] 李慧,刘其南,张丽.基于层次分析法及多指标正交试验优选酒炖女贞子炮制工艺[J].中草药,2016,47(16):2832-2837.
- [11] 陈丽娟,柳福智,岳强兵.正交试验法优化微波协同双水相提取甘草中总黄酮的工艺[J].中国药房,2016,27(4):525-527.
- [12] 马聪,包永睿,孟宪生,等.基于层次分析和量效对比法优选荆芥总黄酮提取工艺[J].中药材,2015,38(2):384-388.
- [13] 何钢,颜军,王瑞雪,等.大孔树脂D101富集番石榴叶中总黄酮的研究[J].安徽农业科学,2009,37(18):8308-8309.

(收稿日期:2017-04-13 修回日期:2017-09-25)

(编辑:刘明伟)