

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.02.004

山东肿足蕨总黄酮的提取工艺优化^{*}

高桂花 朱 军 张华丽

(济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

摘 要 **目的** 研究山东肿足蕨总黄酮的最佳提取方法。**方法** 以山东肿足蕨总黄酮的含量为考察指标, 通过单因素试验和正交试验的方法确定山东肿足蕨总黄酮的最佳提取方法。**结果** 最佳提取工艺确定为用 20 倍量的 70% 乙醇, 超声提取 3 次, 每次 60 min。**结论** 优选的工艺稳定可行, 可作为山东肿足蕨中总黄酮的提取工艺。

关键词 山东肿足蕨, 总黄酮, 提取工艺

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-9760(2011)04-088-03

Process optimization for extraction of total flavonoids from hypodematium sinense iwatuki.

GAO Gui-hua, ZHU Jun, ZHANG Hua-li

(Pharmaceutical college, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: **Objective** To explore the extraction process of total flavones from Hypodematium sinense Iwatuki. **Methods** Using single factor experiment and orthogonal test the optimal extraction condition was determined from total flavones of Hypodematium sinense Iwatuki. **Results** The optimal condition of extraction process was as following: adding 20 folds of 70% aqueous ethanol and ultrasonic extracting for 60 min $\times$ 3 times. **Conclusion** The extraction technics is feasible and can be used as extraction process of total flavones from Hypodematium sinense Iwatuki.

Key words: Hypodematium sinense Iwatuki.; Total flavonoids; Extraction technics

山东肿足蕨(Hypodematium sinense Iwatuki)为金星蕨科肿足蕨属植物, 分布于山东地区, 民间用于治疗头晕、恶心、呕吐, 为济宁医学院于 20 世纪 70 年代发现的新药用植物。凌秀珍等对其药理作用进行了初步探讨^[1], 并有报道称其对美尼尔氏综合症有较好的治疗作用^[2], 并具有抗生育作用^[3]。其化学成分主要有对苯二甲酸二甲酯^[4]、肿足蕨碱^[5]等, 并证明其中含有大量的黄酮类化合物^[6]。现代医学对植物中广泛存在的黄酮化化合物的研究表明, 黄酮类化合物具有明显的抗溃疡、解痉、抗炎、抗菌、抗氧化、抗衰老、增强免疫力、软化血管、降血糖及降血脂等生理活性作用^[7-8]; 山东肿足蕨中含有大量的黄酮类化合物, 因此有必要对山东肿足蕨的黄酮类化合物提取工艺进行研究。本文采用单因素和正交试验的方法对山东肿足蕨药

材中的总黄酮的提取工艺进行优化, 为以后深入研究山东肿足蕨的总黄酮打下基础。

1 材料与仪器

药材: 山东肿足蕨, 产于山东嘉祥, 经济宁医学院中药学教研室王建安老师鉴定为山东肿足蕨(Hypodematium sinense Iwatuki.)。

所用试剂: NaNO_2 , $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, NaOH 等均为分析纯; 对照品芦丁(批号 F20020428)中国医药上海化学试剂公司; 乙醇为 95% 医用酒精; 蒸馏水。KQ-50 超声仪(昆山市超声仪器有限公司), TU1901 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), TB-215D 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

2 方法与结果

^{*} 济宁医学院 2008 年青年基金课题

2.1 标准溶液的制备

精密称取芦丁对照品 14.9 mg,置 50 ml 量瓶中,用 70%乙醇溶解,并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 标准曲线的制备

精密量取上述标准溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 ml,分别置 25 ml 量瓶中,各加 70%乙醇至 5 ml;分别加 5% NaNO₂ 溶液 1 ml,摇匀,放置 6 min;分别加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1 ml,摇匀,放置 6 min;然后分别加 4% NaOH 溶液 10 ml 并分别加 70%乙醇至刻度;摇匀、静置 15 min,以空白试剂为参比,于 510 nm 测定吸光度。以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标进行回归处理,得方程 $A = 0.0133C - 0.0108$ ($r = 0.9995$),芦丁在 11.92~59.60 μg/ml 范围内线性关系良好。

2.3 不同提取方法比较

取山东肿足蕨药材粉末 1.0 g,共 6 份,精密称定,置 100 ml 三角瓶和圆底烧瓶中,各加入 10 ml 70%乙醇,分别超声、冷浸、70℃回流提取 1 次,每次 1 h。过滤,滤液置 100 ml 量瓶中,用 70%乙醇稀释至刻度。分别精密量取上述各溶液 2 ml,置 25 ml 量瓶中,按“2.2”项下测定吸光度,按标准曲线法计算药材中总黄酮的含量。超声、冷浸和 70℃回流提取所得总黄酮含量的平均值分别为 17.23 mg/g、12.42 mg/g 和 16.88 mg/g,可知超声与 70℃回流提取效果无明显差异,但均明显好于冷浸提取,故采用超声方法提取。

2.4 不同提取时间比较

取山东肿足蕨药材粉末 1.0 g,共 9 份,精密称定,置 100 ml 三角瓶中,各加入 70%乙醇 10 ml,分别超声 30 min、60 min 和 90 min。过滤,合并滤液,置 100 ml 量瓶中,用 70%乙醇稀释至刻度。分别精密量取上述各溶液 2 ml,置 25 ml 量瓶中,按“2.2”项下测定吸光度,按标准曲线法计算药材中总黄酮的含量。结果超声提取 30 min、60 min 和 90 min 所得总黄酮含量的均值分别为 17.17 mg/g、23.32 mg/g 和 23.59 mg/g,可知超声 60 min 和 90 min 相差不大,考虑到节约时间,故选择超声 60 min。

2.5 正交试验

因素及水平的选择:选用 L₉(3⁴) 正交表,因素水平的选择见表 1。

取山东肿足蕨药材粉末 1.0 g,精密称定,按正交表设计方案进行实验,提取液均定容于 100 ml 量瓶中。取样品溶液 2 ml,按“2.2”项下测定吸光

度,按标准曲线法计算药材中总黄酮的含量,实验结果及直观分析见表 2,方差分析结果见表 3。

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素			
	A(乙醇浓度)	B(料液比)	C(提取次数)	D
1	70%	1:30	1	
2	90%	1:20	3	
3	50%	1:10	2	

表 2 正交试验结果分析

因素	A (乙醇浓度)	B (料液比)	C (提取次数)	D	总黄酮含量 (mg/g)
1	1	1	1	1	26.97
2	1	2	2	2	34.82
3	1	3	3	3	29.63
4	2	1	3	3	21.37
5	2	2	1	1	19.91
6	2	3	2	2	18.28
7	3	1	2	2	29.18
8	3	2	3	3	22.97
9	3	3	1	1	21.29
均值 1	30.473	25.840	22.740	22.723	
均值 2	19.853	25.900	25.827	27.427	
均值 3	24.481	23.067	26.240	24.657	
极差	10.620	2.833	3.500	4.704	

表 3 正交试验方差分析结果

指标	方差来源	F 值	P
总黄酮含量(mg/g)	A	5.073	>0.05
	B	0.469	>0.05
	C	0.655	>0.05

$F_{0.05}(2,2) = 19.00$

由以上数据可知,以山东肿足蕨总黄酮含量为指标,三因素 A(乙醇浓度)、B(料液比)和 C(提取次数)的影响大小依次为 $A > C > B$,最优条件为 A₁B₂C₂,即 20 倍量的 70%乙醇,提取 3 次。

2.6 结果验证实验

取山东肿足蕨药材粉末 1.0 g,共 5 份,精密称定,按最佳条件提取制备样品,按“2.2”项下测定吸光度,按标准曲线法计算药材中总黄酮的含量,其平均含量为 34.98 mg/g,RSD 为 0.9%。

3 讨论

对于山东肿足蕨总黄酮的提 (下转第 101 页)

殖功能显著降低($P < 0.01$),说明红细胞免疫功能状态可能直接或间接影响到淋巴细胞的功能,这与文献报道一致^[2]。有研究^[7]认为红细胞对淋巴细胞功能的调控可能是通过分泌多种细胞因子实现的,其形式之一就是红细胞分泌的细胞因子与淋巴细胞表面的相应受体结合,从而影响淋巴细胞的效能。除淋巴细胞外,Telen 等^[8]发现红细胞免疫功能受损,可能会影响整个血液中特异性和非特异性免疫反应,所以调整和维持红细胞的正常免疫功能状态对 PV 患者内环境改善可能具有积极意义。

本研究显示,PV 患者血清 CIC 含量明显高于正常人($P < 0.01$),进一步分析与红细胞免疫功能各指标之间的相关关系,血清 CIC 水平与 RBC-C3bRR 呈正相关趋势,但无统计学意义;与 RBC-ICRR 呈正相关关系,说明血清 CIC 的浓度是影响 EIF 的重要因素,免疫复合物水平持续增高,超过红细胞处理能力,就会导致 EIF 降低。CIC 水平与红细胞免疫调节因子具有相关性,与 RFIR 呈显著正相关,与 RRER 呈负相关,提示 CIC 可能能够促进免疫抑制因子的产生,降低免疫促进因子水平,间接降低 EIF,但目前其具体作用机制尚不明确。另外,PV 患者血清 CIC 浓度与淋巴细胞增殖功能呈负相关趋势,提示可能 CIC 在一定程度上影响淋巴细胞的增殖功能,但由于影响淋巴细胞增殖功能的因素较多,CIC 水平只是诸因素中的一个方面,故这种相关关系不是十分明显。

(上接第 89 页)取,超声提取法和加热回流提取法并没有显著的差异,但考虑到与加热回流提取法比较,超声提取法具有选择性高。快速高效、溶剂消耗少、活性成分提取率高和适用于热不稳定物质的特点,因而在实验中选择了超声提取法。

本文通过单因素试验和正交试验对提取方法、提取时间、乙醇浓度、料液比和提取次数进行了全面综合的考察。虽然正交试验结果表明试验中的 3 个因素对山东肿足蕨总黄酮的提取没有显著性影响,但通过试验得到了最佳的提取条件。并且通过试验可看出乙醇的浓度对试验结果的影响最大,综合文献^[9-10],表明 70% 的乙醇对于黄酮类化合物的提取效率较高,是常用且合适的浓度。

参考文献:

[1] 凌秀珍,张洪祺,刘善庭,等. 山东肿足蕨药理作用的初步研究[J]. 济宁医学学报,1978,1(1):31-43.

总之,PV 患者 EIF 低下,且与患者血清 CIC 水平有一定相关性,降低患者血清 CIC 浓度,改善红细胞免疫功能,可能有助于整个免疫系统的功能恢复和病情改善。

参考文献:

[1] 安符臣,唐爱霞,党小军,等. 慢性阻塞性肺疾病红细胞免疫功能检测和 T 淋巴细胞亚群变化及相关性研究[J]. 陕西医学杂志,2005,34(1):19-22.
[2] 栗群英,李素华. 肺癌患者后果细胞促外周血淋巴细胞增殖能力的实验研究[J]. 西南国防医药,2008,18(2):214-215.
[3] 董泮亮,范萍,马金栋. 宫颈癌患者红细胞免疫功能检测的临床意义[J]. 潍坊医学院学报,2006,28(6):443-444.
[4] 邱元芝,胡坚,曹平良,等. 老年冠心病患者红细胞免疫功能与 BNP、CD62P 的临床意义[J]. 中国老年保健医学,2009,7(3):8-9.
[5] 苏赞妍,袁土兴,罗雄伟. 尖锐湿疣患者红细胞免疫功能的变化[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期杂志,2007,6(1):14-15.
[6] 郭峰,钱宝华,张乐之,等. 现代红细胞免疫学[M]. 上海:第一军医大学出版社,2002:22-182.
[7] 方辉,谭诗云,罗和生,等. 十二指肠肠球部溃疡患者红细胞免疫功能与 T 细胞亚群的变化[J]. 基础医学与临床,2005(1):74-77.
[8] Telen MJ. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease[J]. Semin Hematol,2000,37(2):130-142.

(收稿日期 2011-03-10)

[2] 王家英,张其祺. 山东肿足蕨对美尼尔氏综合症与胃神经官能症的治疗研究[J]. 济宁医学学报,1978,1(1):24-30.
[3] 山东肿足蕨抗生育作用研究协作组. 山东肿足蕨抗生育作用实验研究[J]. 济宁医学学报,1981,4(1):1-6.
[4] 陈亚民,王宁,魏莉莉,等. 山东肿足蕨化学成分研究(I)[J]. 中草药,1986,18(3):18.
[5] 陈亚民,王宁,卢英华,等. 山东肿足蕨化学成分研究[J]. 济宁医学院学报,1991,14(2):10-12.
[6] 高桂花,朱军,张华丽. 山东肿足蕨中总黄酮的含量测定[J]. 济宁医学院学报,2010,33(1):11-12.
[7] 国家医药管理局中草药中心情报站. 药物有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1986.
[8] 李旗卿. 天然食用抗氧化物的研究进展[J]. 食品与发酵工业,1990,31(4):17-23.
[9] 苏秀芳,陈明兰,农克良. 超声波辅助提取人面子叶总黄酮的工艺研究[J]. 中药材,2010,33(12):1962-1964.
[10] 李根林,魏术会,张振凌,等. 正交法优选卷柏炭中总黄酮的提取工艺研究[J]. 河南中医,2011,31(1):83-84.

(收稿日期 2011-03-22)