

# 人面果叶总黄酮的提取工艺研究

杨光忠<sup>1</sup> 符元泽<sup>1</sup> 刘慧<sup>2</sup> 徐晓诗<sup>1</sup> 陈玉<sup>2</sup>

(1 中南民族大学 药学院 武汉 430074; 2 中南民族大学 化学与材料科学学院 武汉 430074)

**摘要** 目的: 优化人面果叶总黄酮的提取工艺. 方法: 利用单因素和正交实验法, 以干膏得率和总黄酮得率为评价指标, 考察了乙醇浓度、料液比和提取温度等因素对提取效果的影响. 结果: 乙醇浓度 70% 提取温度 80 °C 料液比 1 : 6 提取时间 0.5 h, 为人面果叶总黄酮的最优提取参数. 按该工艺提取次数 1 次, 总黄酮得率可达 4.96%. 结论: 该工艺优化了人面果叶总黄酮的提取过程, 并验证了其重现性.

**关键词** 人面果叶; 总黄酮; 提取工艺; 正交实验

中图分类号 TQ460.6; R284.2 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2019)01-0067-04

DOI 10.12130/znmzdk.20190112

引用格式 杨光忠, 符元泽, 刘慧, 等. 人面果叶总黄酮的提取工艺研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2019, 38(1): 67-70.

YANG Guangzhong, FU Yuanze, LIU Hui, et al. Study on the extraction of total flavonoids from the leaves of *Garcinia xanthochymus* [J]. Journal of South-Central University for Nationalities (Natural Science Edition), 2019, 38(1): 67-70.

## Study on the extraction of total flavonoids from the leaves of *Garcinia xanthochymus*

YANG Guangzhong<sup>1</sup>, FU Yuanze<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>2</sup>, XU Xiaoshi<sup>1</sup>, CHEN Yu<sup>2</sup>

(1 College of Pharmaceutical Science, South Central University for Nationalities, Wuhan 430074;

2 College of Chemistry and Materials Science, South Central University of Nationalities, Wuhan 430074)

**Abstract** Objective: To optimize the extraction of total flavonoids from the leaves of *Garcinia xanthochymus*. Methods: Single-factor and orthogonal test were employed by using the yields of dry extract and the total flavonoids as evaluating indices, and the effects of ethanol concentration, solid-liquid ratio and extraction temperature were investigated. Results: The optimal extraction parameters of total flavonoids was determined as follows: ethanol concentration 70%, extraction temperature 80 °C, solid-liquid ratio 1 : 6, extracting time 0.5 h. The total flavonoid yield could reach 4.96% with one extraction under such condition. Conclusion: The extraction of total flavonoids from the leaves of *Garcinia xanthochymus* was optimized, and the reproducibility of the process was verified.

**Keywords** *Garcinia xanthochymus*; total flavonoids; extraction technology; orthogonal experiment

人面果(*Garcinia xanthochymus*) ,也称大叶藤黄、岭南倒捻子、歪脖子果等,为藤黄科藤黄属植物,主要分布于我国云南和广西,长在沟谷和丘陵地潮湿的密林之中<sup>[1]</sup>.作为一种传统傣药,人面果的茎、叶和种子具备清火退热、驱虫、解食物中毒的功效<sup>[2]</sup>,具有抗菌、抗 HIV 病毒、抗糖尿病和抗细胞毒素等广泛的生物活性,多用于治疗腹泻、痢疾及肝胆疾病<sup>[3,4]</sup>.近期研究发现,人面果叶的乙酸乙酯提取物显示出良好的

抗糖尿病和抗氧化活性<sup>[5,6]</sup>.植物化学研究表明,其主要化学成分为黄酮类化合物,以双黄酮类化合物含量最大,具有明显的 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性<sup>[7]</sup>和糖原合成酶 GSK-3 抑制活性<sup>[8]</sup>,有降低血糖的功效.本文以人面果叶为实验材料,通过单因素和正交实验法,考察乙醇浓度、料液比和提取温度等因素对总黄酮提取的影响,以干膏得率和总黄酮得率为评价指标,优选最佳提取工艺,以期为后续抗糖尿病有效部位的纯化和富集奠定基础.

收稿日期 2018-09-16

作者简介 杨光忠(1968-)男,教授,博士,研究方向:天然药物化学, E-mail: yanggz888@126.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(31370379);国家重大新药创制科技重大专项(2017Z09301060)

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

人面果叶采自云南勐养,经云南西双版纳民族医药研究所赵应红主任药师鉴定为藤黄科藤黄属植物人面果(*Garcinia xanthochymus*)叶。藤黄双黄酮(fukugetin)对照品自制(纯度 $\geq 98\%$ ,其结构经过 $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ -NMR和ESIMS确定),水为超纯水,其他试剂均为分析纯(国药集团化学试剂)。

电热恒温水浴锅(DK-98-II,天津市泰斯特仪器);循环水式多用真空泵(SHB-I A,上海卫凯仪器设备);万分之一电子天平(CP224C,上海奥豪斯仪器)。

### 1.2 人面果叶总黄酮的提取

精密称取2 g人面果叶干燥粉末(过二号筛)置于圆底烧瓶中,采用不同浓度的乙醇,在预先设定的提取次数、提取温度、料液比及提取时间下,加热回流提取,趁热过滤,减压浓缩,回收溶剂后,定容至50 mL,得到人面果叶提取液。

### 1.3 提取工艺考察指标的测定

#### 1.3.1 对照品溶液的制备

取藤黄双黄酮对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,配制成0.1 mg/mL的对照品溶液。

#### 1.3.2 标准曲线的绘制

精密吸取对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL置于10 mL容量瓶中,依次加入0.1 mol/L  $\text{AlCl}_3$ 乙醇溶液2 mL、pH 5.2的 $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 缓冲液3 mL,用无水乙醇定容至刻度,摇匀,室温下放置15 min,以相应试剂为空白,在波长415 nm处测定吸光度。以对照品质量( $X$ )为横坐标、吸光度( $Y$ )为纵坐标绘制标准曲线。

#### 1.3.3 总黄酮得率的测定

精密量取1 mL供试品溶液置于10 mL容量瓶中,加入2 mL的0.1 mol/mL  $\text{AlCl}_3$ 乙醇溶液、3 mL的1 mol/mL pH为5.2的 $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 缓冲溶液,用无水乙醇定容至刻度,摇匀,室温下放置15 min,以相应试剂为空白,在415 nm波长处测定吸光度,根据标准曲线计算总黄酮质量。人面果叶总黄酮得率( $\%$ ) = 总黄酮质量/人面果叶质量 $\times 100\%$ 。

#### 1.3.4 干膏得率的测定

精密量取25 mL人面果叶提取液,置恒重的蒸发皿中,水浴上蒸干,于105  $^{\circ}\text{C}$ 干燥3 h,置干燥器中冷却30 min,恒重,称定质量,计算总固形物质量,即为干膏质量,干膏质量比总药材质量即为干膏得率。

### 1.4 单因素实验

#### 1.4.1 乙醇浓度对总黄酮得率的影响

精密称取2 g人面果叶粉末,共5份,置于100 mL圆底烧瓶,按料液比1:20,分别加入不同浓度的乙醇溶液(60%、70%、80%、90%、100%),于80  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热回流提取1次,提取1 h,趁热过滤,减压浓缩,定容至50 mL量瓶中,取25 mL干燥恒重,称重,计算干膏得率,同时取1 mL用甲醇稀释至10 mL,测定吸光度,计算总黄酮得率。

#### 1.4.2 料液比对总黄酮得率的影响

精密称取2 g人面果叶粉末,共5份,置于100 mL圆底烧瓶,更改料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25),加入70%的乙醇溶液,于80  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热回流提取1次,提取1 h,趁热过滤,减压浓缩,定容至50 mL量瓶中,取25 mL干燥恒重,称重,计算干膏得率,同时取1 mL用甲醇稀释至10 mL,测定吸光度,计算总黄酮得率。

#### 1.4.3 提取温度对总黄酮得率的影响

精密称取2 g人面果叶粉末,共7份,置于100 mL圆底烧瓶,按料液比1:20加入70%的乙醇溶液,改变提取温度,分别于常温、24、40、50、60、70、80、90  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热回流提取1次,提取1 h,趁热过滤,减压浓缩,定容至50 mL量瓶中,取25 mL干燥恒重,称重,计算浸膏得率,同时取1 mL用甲醇稀释至10 mL,测定吸光度,计算总黄酮得率。

#### 1.4.4 提取时间对总黄酮得率的影响

精密称取2 g人面果叶粉末,共4份,置于100 mL圆底烧瓶,按料液比1:20加入70%的乙醇溶液,于80  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热回流提取1次,分别提取0.5、1、2、3 h,趁热过滤,减压浓缩,定容至50 mL量瓶中,取25 mL干燥恒重,称重,计算浸膏得率,同时取1 mL用甲醇稀释至10 mL,测定吸光度,计算总黄酮得率。

### 1.5 正交实验法优选最佳提取工艺

根据单因素实验的结果,选择对总黄酮得率影响显著的因素和水平设计正交实验,优选人面果叶总黄酮的提取工艺。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线

标准曲线的线性回归方程为 $Y = 3.2436X - 0.0024$ , $r = 0.9999$ ,总黄酮含量测定的线性范围为0.0461~0.2766 mg。

### 2.2 单因素实验

#### 2.2.1 乙醇浓度对提取效果的影响

乙醇浓度对提取效果的影响结果见图1。由图1

可知: 干膏得率随着乙醇浓度的增加而明显减小, 总黄酮得率随着乙醇浓度的增加变化不显著。乙醇浓度为 70% 时干膏得率较多为 35.76%, 且总黄酮得率为 4.84%。在乙醇浓度减小到 60% 时, 人面果叶中的水溶性成分如鞣质、多糖等被提取出来, 使干膏质量明显增大; 随着乙醇浓度增加, 一些醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分溶出量也增加, 导致总黄酮得率下降。因此, 本实验选取的乙醇浓度为 60%、70%、80%。

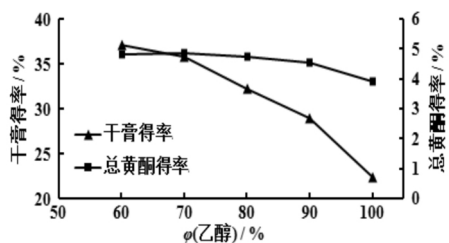


图 1 乙醇浓度对提取效果的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on extraction efficiency

### 2.2.2 料液比对提取效果的影响

料液比对提取效果的影响结果见图 2。由图 2 可知: 料液比对干膏得率和总黄酮得率的影响不明显, 但料液比过大, 后期溶剂回收时耗时较长且造成较大的能源损耗。因此, 料液比选择尽量较低为好, 本实验选取的料液比为 1:6, 1:9, 1:12。

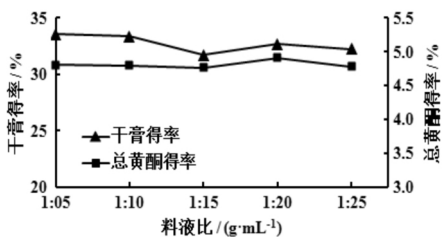


图 2 料液比对提取效果的影响

Fig.2 Effect of solid-liquid ratio on extraction efficiency

### 2.2.3 提取温度对提取效果的影响

提取温度对提取效果的影响结果见图 3。由图 3 可知: 随着温度逐渐增高, 干膏得率和总黄酮得率均逐渐上升, 干膏得率随温度的变化比总黄酮变化的幅度更大。由于温度升高, 分子运动速度加快, 渗透、扩散、溶解速度也随之加快。随着提取温度的升高, 黄酮浸膏得率升高, 总黄酮扩散达到一定程度时, 变化本文选取的提取温度为 60, 70, 80℃。

### 2.2.4 提取时间对提取效果的影响

提取时间对提取效果的影响结果见图 4。由图 4 可知: 提取时间 0.5~1 h, 总黄酮得率和干膏得率变化不明显; 提取时间超过 1 h 后, 随着提取时间的增加, 总黄酮得率和干膏得率均逐渐降低。为节约成本, 缩

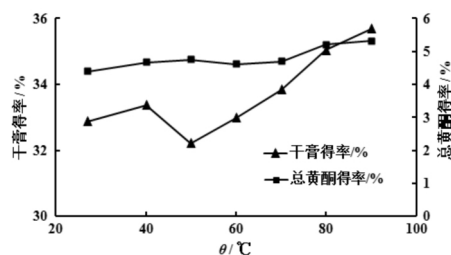


图 3 提取温度对提取效果的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on extraction efficiency

短时, 选择较短的回流时间 0.5 h。

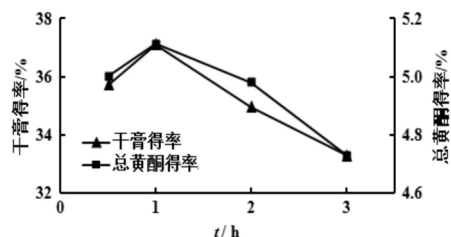


图 4 提取时间对提取效果的影响

Fig.4 Effect of extraction time on extraction efficiency

### 2.2.5 提取次数对提取效果的影响

提取次数对提取效果的影响结果见图 5。由图 5 可知: 随着提取次数的增多, 总黄酮得率先增加后降低, 干膏得率先降低后增加, 且升降幅度不显著。考虑到大规模生产节约成本原则, 本文选取的提取次数为 1 次。

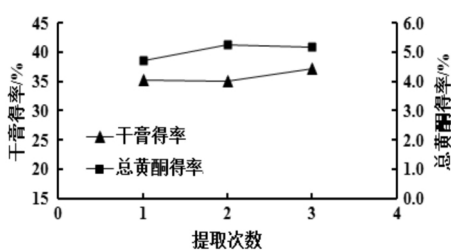


图 5 提取次数对提取效果的影响

Fig.5 Effect of extraction times on extraction efficiency

## 2.3 正交实验法优选最佳提取工艺

根据以上实验结果, 确定提取时间为 0.5 h, 提取次数为 1 次。在单因素实验的基础上, 选取乙醇浓度 (A)、料液比 (B)、提取温度 (C) 作为影响因素, 以人面果叶总黄酮得率为考察指标, 设计  $L_9(3^3)$  的正交实验, 确定人面果叶总黄酮最佳提取工艺<sup>[9,10]</sup>。其因素水平见表 1, 正交实验结果见表 2。根据表 2 正交实验结果可知: 影响人面果叶总黄酮得率的因素按影响程度由大到小排列为乙醇浓度 (A) > 料液比 (B) > 提取温度 (C), 并得到最佳提取工艺为  $A_2B_3C_3$ , 即为提取温度 80℃, 料液比 1:12, 乙醇浓度 70%。由方差分析可见, 乙醇浓度 (A)、料液比 (B)、提取温度 (C) 对总黄酮提取率均无显著性影响 ( $P < 0.05$ )。

在综合节能、省时、省力原则之后,最优提取工艺为:提取时间为 0.5 h,乙醇浓度为 70%,提取温度为 80 ℃,料液比 1:6,提取 1 次。

表 1 正交实验因素水平表

Tab.1 Factors and levels of orthogonal design

水平	影响因素		
	A(乙醇浓度)	B(料液比)	C(提取温度)
1	60%	1:6	60℃
2	70%	1:9	70℃
3	80%	1:12	80℃

表 2 正交试验表  $L_9(3^3)$  及结果Tab.2 Orthogonal test table  $L_9(3^3)$  and results

编号	A	B	C	总黄酮得率/%
1	1	1	1	4.71
2	2	2	1	4.83
3	3	3	1	4.75
4	2	1	2	4.74
5	1	3	2	4.76
6	3	2	2	4.64
7	3	1	3	4.90
8	2	3	3	4.86
9	1	2	3	4.55
$K_1$	4.67	4.78	4.76	
$K_2$	4.81	4.67	4.71	
$K_3$	4.76	4.79	4.77	
R	0.14	0.12	0.06	

表 3 方差分析结果

Tab.3 Variance analysis results

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	0.029	2	0.014	0.841	$P>0.05$
B	0.026	2	0.013	0.748	$P>0.05$
C	0.006	2	0.003	0.167	$P>0.05$
误差	0.034	2	0.017		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19$$

#### 2.4 工艺验证实验

按照上述最优提取工艺进行提取,平行 3 次,结果见表 4。由表 4 可知:人面果叶干膏得率平均为 36.55%,总黄酮得率平均可达 4.96%,重现性良好,表明该工艺稳定可行。因此,确定人面果叶总黄酮最优提取工艺参数为:乙醇浓度为 70%,提取温度为 80 ℃,料液比为 1:6,提取时间为 0.5 h,提取次数为 1 次。

表 4 验证实验结果

Tab.4 Results of validation experiment

编号	干膏得率/%	总黄酮得率/%
1	35.88	4.93
2	36.73	4.96
3	37.03	5.00

### 3 结语

人面果叶总黄酮得率的影响因素依次为:乙醇浓度>料液比>提取温度。人面果叶总黄酮的最优提取工艺参数为:乙醇浓度为 70%,提取温度为 80 ℃,料液比为 1:6,提取时间为 0.5 h,提取次数为 1 次。该提取工艺重现性良好,稳定可行,总黄酮得率可达到 4.96%。

#### 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:第 50 卷[M].北京:科学出版社,1990:91.
- [2] 林艳芳,依专,赵应红.中国傣医药彩色图谱[M].云南:云南民族出版社,2003:6.
- [3] PERRY L M, METZGER J. Medicinal plants of east and southeast Asia: attributed properties and uses [M]. Cambridge: MIT Press, 1980.
- [4] AMBASTA S P. The useful plants of India [M]. New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research publications, 1986: 231.
- [5] 付蒙,胡鑫,徐婧,等.人面果叶、根部、果实提取物体外抗糖尿病活性成分研究[J].天然产物研究与开发, 2014, 26(2): 255-259.
- [6] 刘流,李芸芳,甘飞,等.人面果叶子的化学成分研究[J].中国中药杂志, 2016, 41(11): 2098-2104.
- [7] LI Y, CHEN Y, XIAO C et al. Rapid screening and identification of  $\alpha$ -amylase inhibitors from *Garcinia xanthochymus* using enzyme-immobilized magnetic nanoparticles coupled with HPLC and MS [J]. J Chromatogr B, 2014, 960: 166-173.
- [8] LI Y F, XU J, CHEN Y, et al. Screening of inhibitors of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  from traditional Chinese medicines using enzyme-immobilized magnetic beads combined with high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2015, 1425: 8-16.
- [9] 刘虹,肖敏,覃瑞,等.皱皮木瓜总酚酸提取工艺研究[J].中南民族大学学报(自然科学版), 2017, 36(2): 49-52.
- [10] 王少兵,田兵,操冰冰,等.龙血竭总黄酮提取工艺的优化[J].中南民族大学学报(自然科学版), 2015, 34(4): 58-61.

(责任编辑 刘 钊)