

星点设计 - 效应面法优选湖北海棠叶总黄酮的提取工艺

郭东艳 王 幸 唐志书 汪鋈植

摘 要 **目的** 优选湖北海棠叶总黄酮的提取工艺。**方法** 采用星点设计 - 效应面法对湖北海棠叶有效部位的提取工艺进行优化,以乙醇浓度、溶剂用量、提取时间为自变量,以总黄酮和根皮苷含量的综合评分为因变量,将各数据输入软件中,从而从图上的较佳区域直接读出最佳的工艺条件。**结果** 湖北海棠叶总黄酮的提取工艺条件为:用 8 倍量 70% 乙醇,回流提取 2 次,每次 150 min。**结论** 优选的工艺参数合理、可行。

关键词 湖北海棠叶 总黄酮 提取

[中图分类号] R284 [文献标识码] A

Optimization of Extraction Technology for Total Flavone of Malus Hupehensis Leaves by Central Composite Design/response Surface Methodology. Guo Dongyan, Wang Xing, Tang Zhishu, Wang Junzhi. The Medicine College of Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi 712046, China

Abstract Objective To optimize the extraction process of total flavones of Malus hupehensis leaves. **Methods** The central composite design/response surface methodology was used. The independent variables were ethanol concentration, solvent usage, and reflux time, and the dependent variables were the content of total flavones and phlorizin. Data were input into the software. The optimum extraction conditions was fetched directly from the preferable area of the chart. **Results** The optimum conditions of extraction process were 70% ethanol, reflux for 150 minutes, 8 - fold solvent and 2 times for extraction. **Conclusion** This optimized extraction process parameter was convenient and feasible.

Key words Malus hupehensis leaves; Total flavones; Extraction

湖北海棠 [Malus hupehensis (Pamp.) Rehd.] 别名甜茶果、泰山海棠,为蔷薇科 (Rosaceae) 苹果属 (Malus) 植物^[1,2]。原产湖北省西部神农架林区、宜昌、恩施等地,湖北海棠叶是湖北人常饮用的凉茶,也是土家族常用的药物,收载于《湖北省中药材质量标准》(2009 年版),具有养肝和胃、生津止渴、消积化滞等功效,用于急慢性肝损伤、慢性肝炎、脂肪肝治疗^[3,4]。有关湖北海棠叶总黄酮文献报道较少,因此本研究采用星点设计 - 效应面法优选湖北海棠总黄酮的提取工艺,以期今后的开发研究奠定基础。

材料与方法

1. 仪器:Agilent 1260 Infinity 高效液相色谱仪 (G1311C 型四元泵, G1329B 型进样器, G4212B 型二极管阵列检测器); UV - 1102 型紫外可见分光光度计 (上海天美科学仪器有限公司);

司); GB - 204 型电子天平 (瑞士); HH - 2 型恒温水浴锅 (北京科伟永兴仪器有限公司)。

2. 试药:湖北海棠叶 [购自湖北神农架,经陕西中医学院王继涛老师鉴定为苹果属 (Malus Mill.) 湖北海棠 (Malus hupehensis (Pamp.) Rehd)] 的干燥叶。根皮苷对照品 (自制,经 HPLC 检测含量 > 98%); 甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

3. 湖北海棠叶中根皮苷的含量测定^[6] 色谱条件: Diamonsil C₁₈ (250.0 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 乙腈 - 0.05% 磷酸水 (25:75) 为流动相; 检测波长为 287 nm; 流速为: 1.0 ml/min; 温度为 30℃。(1) 对照品溶液的制备:精密称取根皮苷对照品,加入 50% 甲醇溶解制成每 1 ml 含 0.015 mg 的溶液,备用。(2) 供试品溶液的制备:精密移取湖北海棠叶提取液 0.5 ml 于蒸发皿中于水浴上蒸干,加 50% 甲醇溶解并定容至 10 ml 量瓶中,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。线性关系的考察:精密移取根皮苷对照品溶液 2、4、6、8、10、12 μl,依色谱条件进行测定,以根皮苷的含量 (μg) 为横坐标,以测得的峰面积为纵坐标,计算回归方程。(3) 含量测定:精密吸取对照品溶液与供试品溶液 10 μl,注入液相色谱仪,记录峰面积,外标一点法计算根皮苷含量。

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81202905); 陕西省教育厅基金资助项目 (11JS036)

作者单位:712046 咸阳,陕西中医学院药学院 (郭东艳、王幸、唐志书); 443002 宜昌,天然产物研究与应用湖北省重点实验室 (汪鋈植)

4. 湖北海棠叶中总黄酮的含量测定^[6]: (1) 对照品溶液的制备: 精密称取根皮苷对照品适量, 加入 50% 甲醇溶解制成每 1ml 含 0.1mg 的溶液, 备用。供试品溶液的制备: 精密移取湖北海棠叶提取液 1ml 蒸干, 加 50% 甲醇溶解并定容至 10ml 量瓶中, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。(2) 检测波长的确定: 分别取根皮苷对照品溶液和供试品溶液, 按照紫外 - 可见分光光度法, 空白试剂为 50% 甲醇, 在选定的 200 ~ 400nm 波长范围内, 分别对对照品溶液和供试品溶液进行全波长扫描。结果两者均在 287nm 有最大吸收, 因此将检测波长定为 287nm。

5. 提取次数的考察: 称取 4 份湖北海棠叶约 10.0g, 分别加入 10 倍量 70% 的乙醇, 水浴中回流提取 1、2、3、4 次, 每次 1h, 滤过, 将各滤液分别合并。以湖北海棠叶中根皮苷及总黄酮的含量为评价指标筛选提取次数。

6. 星点设计 - 效应面法优化提取工艺: 采用星点设计 - 效应面法以回流提取法提取湖北海棠叶, 以总黄酮及根皮苷的含量作为评价指标, 对影响提取效果的主要因素乙醇浓度 (X_1)、溶剂用量 (X_2)、提取时间 (X_3) 进行考察, 从而确定回流提取的较佳工艺条件。

7. 统计学方法: 用 SPSS 14.0 统计软件, 数据资料用效应面分析法及方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 湖北海棠叶中根皮苷线性范围的考察结果: 以根皮苷的含量 (μ g) 为横坐标, 以测得的峰面积为纵坐标, 计算回归方程为: $Y = 1745X + 1.4467$ ($R^2 = 0.9999$), 结果表明, 根皮苷在 0.03 ~ 0.18 μ g 的范围内线性关系良好。

2. 湖北海棠叶中总黄酮的含量测定: (1) 检测波长的确定: 通过对对照品溶液和供试品溶液进行全波长扫描, 结果两者均在 287nm 有最大吸收, 因此将检测波长定为 287nm。(2) 线性关系考察: 分别精密吸取根皮苷对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0ml 并移至 10ml 量瓶中, 加入 50% 甲醇稀释至刻度, 即得。按紫外 - 可见分光光度法, 以 50% 甲醇为空白, 在 287nm 波长处测定吸收度。吸收度 (Y) 为纵坐标, 根皮苷的浓度 (X) 为横坐标, 得回归方程为 $Y = 30.274X + 0.0055$, $R^2 = 0.9993$ 。结果表明, 对照品溶液在 0.005 ~ 0.03mg/ml 浓度范围内与吸收度呈现良好的线性关系。

3. 提取次数的考察结果: 以湖北海棠叶中根皮苷及总黄酮的含量为评价指标筛选提取次数, 结果见表 1。

表 1 提取次数的考察 (%)

提取次数	1	2	3	4
根皮苷含量	1.23	1.20	1.23	1.17
总黄酮含量	12.99	12.98	13.10	13.11

结果表明, 提取 1 次湖北海棠叶中总黄酮及根皮苷已基本提取完全, 但为了避免试验中因误差造成总黄酮及根皮苷提取不完全, 因此确定提取次数为 2 次。

4. 星点设计 - 效应面法优化提取工艺^[7]: (1) 以乙醇浓度 (X_1)、溶剂用量 (X_2)、提取时间 (X_3) 为自变量, 以湖北海棠叶中根皮苷 (W_1) 及总黄酮百分含量 (W_2) 的综合评分为因变量, 根据星点设计的原理, 进行试验设计。因素水平见表 2, 试验设计及结果见表 3。(2) 模型拟合: 采用 Design - Expert 8.0.6 软件, 以根皮苷及总黄酮百分含量的综合评分对自变量进行回归和拟合, 结果表明, $r = 0.9974$, 各项方差分析结果见表 4, 简化后的二项式方程为: $Y = 0.86 + 0.044X_1 - 0.012X_2 + 0.013X_3 - 0.030X_1X_2 + 3.750 \times 10^{-3}X_1X_3 + 0.015X_2X_3 - 0.047X_1^2 + 0.017X_2^2 + 4.020 \times 10^{-3}X_3^2$, $r = 0.9956$ 。说明 99.56% 总黄酮及根皮苷提取率的变差归因于 3 个因素的变化, 即只有 0.44% 的变差不被此方程所解释。由表 4 的各个 P 值可以看出 3 个因素的线性效应都有较高的显著性 ($P < 0.01$)。拟合回归方程的方差分析结果见表 4。(3) 工艺优化与预测: 固定其中一个因素值, 绘制其中两个因变量曲面图 (图 1 ~ 图 3)。在图上选取较佳的工艺为: X_1 : 68.88%, X_2 : 8.54 倍量, X_3 : 148.2min。但考虑到实际的可操作性, 修正工艺参数为乙醇浓度 (X_1): 70%, 溶剂用量 (X_2): 8 倍量, 提取时间 (X_3): 150min, 并对其进行重复试验。称取湖北海棠叶 50.0g, 共 3 份, 各加 8 倍量 70% 乙醇, 提取 2 次, 每次 150min, 平行制样。依法测定, 结果见表 5。结果表明, 经优化后的工艺提取所得实测值与理论值接近, 偏差在 3% 以内。因此可将该提取工艺修订为加入 8 倍量 70% 乙醇, 提取 2 次, 每次 150min。(4) 验证试验: 根据最优工艺提取湖北海棠叶 3 份 (每份 500g), 依法测定总黄酮及根皮苷的含量, 结果见表 6。

表 2 湖北海棠中总黄酮提取工艺星点设计因素水平表

水平	X_1	X_2	X_3
	乙醇浓度 (%)	溶剂用量 (倍)	提取时间 (min)
- α	10	6	30
-1	26.91	8.54	61.8
0	50	12	105
1	73.09	15.46	148.2
α	90	18	180

表 3 星点试验设计与结果表

实验号	X_1	X_2	X_3	根皮苷含量(%)	总黄酮含量(%)	综合评分
1	-1	-1	-1	1.2807	13.8982	0.7452
2	1	-1	-1	1.6115	16.1659	0.9090
3	-1	1	-1	1.3549	15.1781	0.7986
4	1	1	-1	1.3016	13.1834	0.7369
5	-1	-1	1	1.4255	14.6983	0.8127
6	1	-1	1	1.5486	16.0980	0.8857
7	-1	1	1	1.4826	14.6301	0.8310
8	1	1	1	1.5920	15.4339	0.8863
9	-1.732	0	0	1.0923	10.8833	0.6145
10	1.732	0	0	1.7327	10.8787	0.8362
11	0	-1.732	0	1.5433	18.4259	0.9344
12	0	1.732	0	1.5347	17.2210	0.9053
13	0	0	-1.732	1.5556	16.0918	0.8880
14	0	0	1.732	1.4864	16.6437	0.8760
15~20	0	0	0	1.4862±0.0300	15.7367±0.4800	0.8563±0.0100

15~20 号为重复实验,实验结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示

表 4 拟合回归方程的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F	$P(F > F_\alpha)$
Model	0.086	9	9.563×10^{-3}	251.47	<0.01
X_1	0.027	1	0.027	716.50	<0.01
X_2	2.079×10^{-3}	1	2.079×10^{-3}	54.68	<0.01
X_3	2.547×10^{-3}	1	2.547×10^{-3}	66.97	<0.01
$X_1 X_2$	7.092×10^{-3}	1	7.092×10^{-3}	186.50	<0.01
$X_1 X_3$	1.125×10^{-3}	1	1.125×10^{-3}	2.96	0.1162
$X_2 X_3$	1.916×10^{-3}	1	1.916×10^{-3}	50.38	<0.01
X_1^2	0.036	1	0.036	933.65	<0.01
X_2^2	4.752×10^{-3}	1	4.752×10^{-3}	124.95	<0.01
X_3^2	2.545×10^{-4}	1	2.545×10^{-4}	6.69	0.0271
残差	3.803×10^{-4}	10	3.803×10^{-4}		
失拟性	4.452×10^{-5}	5	8.904×10^{-6}	0.13	0.9776
纯误差	3.358×10^{-4}	5	6.715×10^{-5}		
总差	0.086	19			

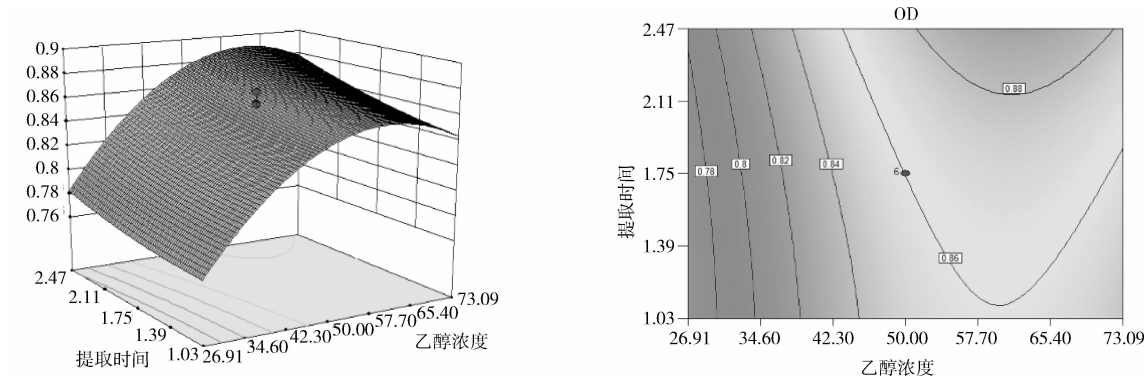


图 1 乙醇浓度与提取时间对提取效果的影响

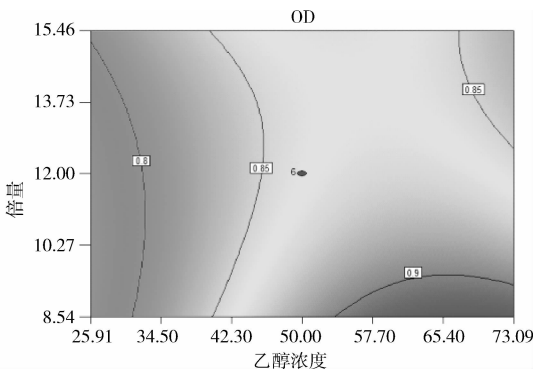
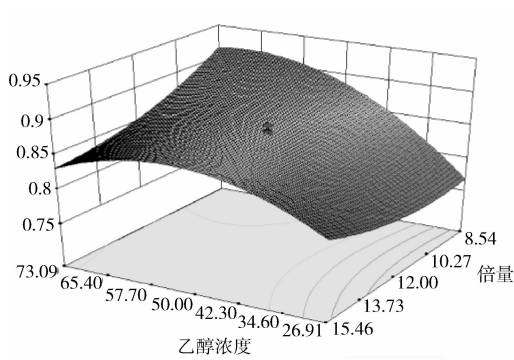


图 2 乙醇浓度与溶剂倍量对提取效果的影响

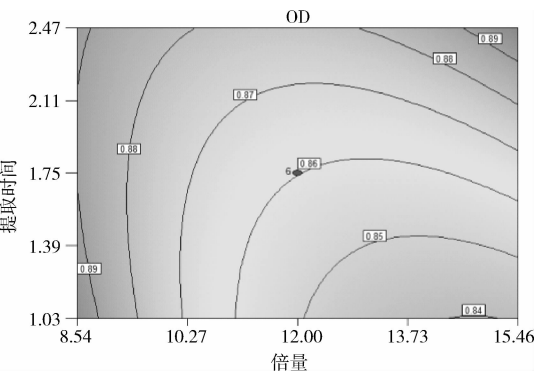
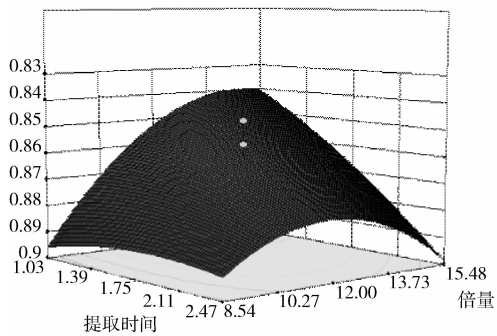


图 3 溶剂倍量与提取时间对提取效果的影响

表 5 工艺优化结果表

次数	总黄酮 含量(%)	根皮苷 含量(%)	理论值	实测值	偏差率 (%)
1	17.3945	1.6167	0.9236	0.9517	
2	17.5967	1.7582	0.9236	1.0047	2.60
3	17.6805	1.4060	0.9236	0.8864	

表 6 验证试验结果(%)

含量	1	2	3	平均值	RSD
总黄酮含量	17.78	18.38	17.93	18.03	1.73
根皮苷含量	1.60	1.69	1.67	1.65	2.85

讨 论

近年研究表明,湖北海棠叶中主要含有茶多酚、黄酮、Zn、Cr、Mn 等多种矿物质等,其中黄酮类以根皮苷含量高,且易于提取分离。文献[5~12]报道,湖北海棠叶中的总黄酮及根皮苷具有多种药理活性,因此以总黄酮及根皮苷的含量作为湖北海棠叶提取工艺的评价指标,具有一定的科学性。

本试验通过星点设计-效应面法优选所得的最佳提取工艺为加入 8 倍量 70% 乙醇回流提取 150min,提取 2 次。与笔者前期通过正交试验优选的

结果稍有差异^[5](8 倍量 70% 的乙醇,回流提取 3 次,每次 1h)。为了验证提取工艺的可行性,实验中分别采用优选的两种工艺条件进行提取,并进行总黄酮及根皮苷的含量测定比较,结果两种工艺提取出的总黄酮及根皮苷含量接近,8 倍量 70% 的乙醇回流提取 3 次,每次 1h 所得总黄酮及根皮苷含量较 8 倍量 70% 乙醇回流提取 150min,提取 2 次的分别高 3.2% 和 2.4%。关于大生产中工艺条件的选择有待于通过总黄酮与根皮苷的提取率及生产成本进行综合评价选择。

参考文献

- 1 方志先,廖朝林. 湖北恩施药用植物志[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2006:446-447
- 2 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1974:379-380
- 3 朱靖静,刘呈雄. 湖北海棠质量标准研究[J]. 中药材,2010;33(5):707-710
- 4 冯天艳,方荣,邓改改,等. 根皮苷对小鼠 CCl₄ 急性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理临床,2010,26(5):47-49
- 5 王幸,师延琼,覃鸿恩,等. 多指标综合评价法优选湖北海棠叶中总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):46-49
- 6 李瑾. 太白槲木保肝活性部位的制备及其制剂前研究[D]. 西安:

陕西中医学院, 2012

- 7 冯天艳, 汪望植, 周继刚, 等. 湖北海棠叶总黄酮抗 CCl_4 所致大鼠肝纤维化作用研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(2): 71 - 74
- 8 杜幼芹, 冯天艳, 邓改改, 等. 湖北海棠叶总黄酮对日本血吸虫感染小鼠肝纤维化的抑制作用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011, 23(5): 551 - 554
- 9 冯天艳, 方荣, 邓改改, 等. 根皮苷对小鼠 CCl_4 急性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理临床, 2010, 26(5): 47 - 49
- 10 Jun ZW, Mi HC, BingJie X, *et al.* Estrogenic and Ant - iestrogenic activities of phloridzin[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(4): 592 - 597
- 11 曹丹, 薛冰洁, 黄文峰, 等. 湖北海棠总黄酮对去势大鼠骨质疏松的影响[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(5): 56 - 59
- 12 薛冰洁, 曹丹, 周继刚, 等. 湖北海棠总黄酮对成骨细胞增殖分化及破骨细胞活性的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(5): 12 - 14 (收稿日期:2013 - 08 - 20) (修回日期:2013 - 09 - 03)

线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的研究及体会

张亚敏 徐 虹 孙 华 陈素辉 王富明

摘 要 **目的** 探索用线栓法制作稳定、可重复的大鼠大脑中动脉闭塞脑缺血/再灌注模型。**方法** 采用数字表法将 SD 大鼠随机分为两组, 组 1 体重控制为 230 ~ 249g; 组 2 体重控制为 250 ~ 269g, 每组 10 只。以改良的 Longa 法使用特定型号栓线制作大鼠大脑中动脉闭塞模型, 缺血 2h 后拔出栓线实现再灌注, 并评估两组大鼠的神经功能缺损情况, 再灌注 24h 时取脑行 2,3,5 - 氯化三苯基四氮唑染色, 计算并比较两组大鼠的死亡率, 神经功能评分和相对脑梗死体积。**结果** 两组大鼠的死亡率均为 10%, 组 1 神经功能评分相对稳定, 个体差异小, 显著高于组 2 ($P < 0.05$); 组 2 的脑相对梗死体积小于组 1, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** $238 \pm 6\text{g}$ (230 ~ 249g) 的 SD 大鼠采用沙东 2636 - 4A 型号的栓线可得到稳定的大鼠大脑中动脉闭塞脑缺血再灌注模型。

关键词 线栓法 脑缺血再灌注模型 大脑中动脉 大鼠

[中图分类号] R743 [文献标识码] A

Research and Experience on Making Rat Model of Middle Cerebral Artery Occlusion/ Reperfusion by the Thread Occlusion Method Zhang Yamin, Xu Hong, Sun Hua, Chen Suhui, Wang Fuming. Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Department of Traditional Chinese Medicine of Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China

Abstract Objective To explore making stabilized rat model of middle cerebral artery occlusion/ reperfusion (MCAO/R) by using suture - occluded method. **Methods** Sprague - Dawley (SD) rats were randomly divided into two groups according to a random digits table. Ten rats were placed in each group. The weight of rats in each group was controlled as 230 - 249g and 250 - 269g, respectively. The rat model of MCAO/R was established by specific thread occlusion method as described previously by Longa with slight modifications. Neurological deficit scores were evaluated 2h after MCAO. The brain sections were stained by 2,3,5 - Triphenyltetrazolium chloride (TTC). The mortality, neurological deficit scores and the relative infarct volume were compared in both groups. **Results** The mortality of both group was 10%. The neurological deficit scores and the relative infarct volume in group 1 were significantly higher than in group 2 ($P < 0.05$). The neurological deficit scores and the relative infarct volume in group 1 were stable. **Conclusion** SD rat weight 230 - 249g [$238 \pm 6\text{g}$] could be maked stabilized models of MCAO/R by the 2636 - 4A thread occlusion method.

Key words Thread - occluded method; Middle cerebral artery occlusion/ reperfusion model; Middle cerebral artery; Rat

缺血性脑血管疾病的高发生率、高致残率严重威

胁人类生命健康, 建立稳定性强、可重复性高的缺血性脑卒中动物模型是研究急性脑缺血后脑组织损伤的生理病理变化的基础。Longa 等^[1]以改良线栓法制备了大鼠中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型, 随后该模型便被广泛应用于脑梗

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273850)

作者单位: 100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院中医科

通讯作者: 孙华, 电子邮箱: sunhuahe@vip.sina.com