

酶解法辅助提取布渣叶总黄酮的工艺优选

陈雪婷, 徐文杰, 李智勇

(广东省第二中医院/广东省中医药工程技术研究院, 广东 广州, 510095)

[摘要] 目的: 优选酶解法辅助提取布渣叶总黄酮的工艺条件。方法: 以总黄酮提取率为指标, 采用单因素试验、正交试验法, 分别考察酶种类、酶用量、pH值、酶解时间及乙醇浓度对提取工艺的影响。结果: 最佳工艺条件为复合酶(纤维素酶: 果胶酶 = 1: 1) 用量 1%, 乙醇浓度 60%, 酶解 1h, 总黄酮提取率为 20.90%, 较未经酶解法提高了 4.85%。结论: 优选的工艺简单高效, 为布渣叶总黄酮的开发利用提供了实验依据。

[关键词] 布渣叶; 总黄酮; 复合酶; 实验研究

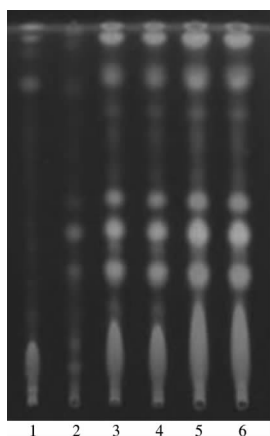
[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.10.076

Optimization of the process of enzymolysis in assisting the extraction of total flavonoids from *Microcos paniculata*

CHEN Xue-ting, XU Wen-jie, LI Zhi-yong

(Guangdong Second Provincial Traditional Chinese Medicine Hospital/Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine Manufacturing Technology, Guangzhou 510095, Guangdong, China)

Abstract: Objective: To optimize the process conditions for enzymolysis in assisting the extraction of total flavonoids from *Microcos paniculata*. Methods: With the extraction rate of total flavonoids as an index, the single-factor experiment or orthogonal test was used to assess the influence of type of enzyme, amount of enzyme used, pH value,



1—阴性对照 2 μ L
2—龙血竭对照药材 2 μ L
3—供试品 20170426 2 μ L
4—供试品 20170904 2 μ L
5—供试品 20170426 5 μ L
6—供试品 20170904 5 μ L
T: 26.0 $^{\circ}$ C RH: 65.0% 展距: 13cm
薄层板: 硅胶 G 板
展开剂: 二氯甲烷-甲醇(99:1)
检视: 紫外光灯(365nm)

图5 龙血竭的薄层色谱鉴别图

3 讨论

本试验对方中防风、杜仲、虻虫、独活、当归 5 味药也进行了薄层鉴别方法的研究, 但均存在阴性对照有干扰或特征斑点不明显等情况, 故未列入质量标准。

薄层色谱展开剂为混合溶剂时, 应在临用前新鲜配制, 而且不能重复使用。白芍、延胡索薄层鉴别样品处理过程中, 所用溶剂为乙醚, 沸点低, 超声处理时应注意温度的控制, 可以在超声波清洗器中加冰袋, 以防止乙醚

挥发。

在选择白芍薄层鉴别的展开剂实验中, 对三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)与二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)进行实验对比, 结果二氯甲烷组易产生“边缘效应”, 三氯甲烷组比二氯甲烷组的薄层效果好, 考虑到三氯甲烷对人体危害较大, 故采用二氯甲烷组。为避免“边缘效应”, 薄层板在层析缸内先预饱和 15min 后再展开。

结果表明全蝎、虻虫、白芍显微鉴别特征明显; 白芍、延胡索、威灵仙、龙血竭薄层色谱相应主斑点清晰, 分离度好, 且阴性无干扰。本试验所建立的方法专属性强、重复性好, 可用于骨刺胶囊的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 19, 105, 139, 151, 143, 251, 1221.
- [2] 余晓玲, 袁小淋, 李争艳, 等. 参威骨痹片的定性鉴别研究[J]. 云南中医中药杂志, 2017, 38(9): 62-64.
- [3] 毕娜, 詹立晶, 杨思广. 正骨百健散质量标准的研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 5(14): 142-145.

(收稿日期: 2018-07-28)

time of enzymolysis, and alcohol concentration on extraction process. Results: The optimal process conditions were compound enzyme (cellulose:pectinase = 1:1) with an amount of 1%, an alcohol concentration of 60%, and a duration of enzymolysis of 1 hour. The extraction rate of total flavonoids was 20.90%, which was 4.85% higher than the extraction rate obtained by unenzymatic hydrolysis. Conclusion: The optimized process is simple and efficient and provides an experimental basis for the exploitation and utilization of total flavonoids from *Microcos paniculata*.

Key words: *Microcos paniculata*; total flavonoids; compound enzyme; experimental study

布渣叶 *Microcos paniculata* L 为椴树科 (Tiliaceae) 布渣叶属 (*Microcos* L.) 植物的叶, 属于广东道地药材, 亦称为破布叶。近代药理研究显示布渣叶具有清热解毒、消食导滞、保护心血管、降脂等作用。随着对布渣叶药材研究的深入, 发现其主要含有黄酮、生物碱、三萜、挥发油类等成分, 其中黄酮类化合物含量较高, 为其主要活性成分^[1-4], 本试验研究复合酶法对布渣叶中黄酮类化合物提取率的影响, 为其开发应用及深入研究提供实验依据。

1 仪器与试剂

UV 2550 型紫外分光光度计 (日本岛津公司); Sartorius BP211D 电子分析天平 (德国赛多利斯公司); pH 计 (梅特勒-托利多上海有限公司); KQ5200 DE 型数控超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Waters e2695-2998 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司)。

芦丁对照品 (批号: 100080-201610) 购于中国药品生物制品检定所, 布渣叶药材为广东省市售, 经广东省中医药工程技术研究院王洛临主任中药师鉴定为椴树科布渣叶属植物的干燥叶。纤维素酶 (10000U/g)、果胶酶 (30000U/g) 均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 无水乙醇、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝均为分析纯, 实验用水为蒸馏水。

2 方法与结果

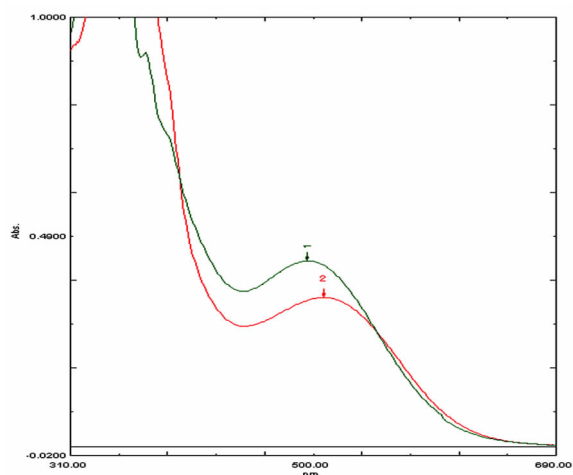
2.1 总黄酮的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取在 120℃ 干燥至恒重的芦丁对照品 7.65mg, 置 25mL 量瓶中, 加乙醇适量, 超声使溶解, 放冷, 加乙醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取布渣叶药材粉末约 0.5g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇溶液 50mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 30min, 放冷, 再称定重量, 用乙醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 吸取续滤液, 即得。

2.1.3 检测波长的选择 取芦丁对照品溶液 2mL, 布渣叶供试品溶液 1mL, 分别置 25mL 量瓶中, 加水至 6.0mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1mL, 摇匀, 放置 6min; 加 10% 硝酸铝溶液 1mL, 摇匀, 放置 6min; 加氢氧化钠试液 5mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15min, 以相应的试剂为空白, 在 200~700nm 波长范围内扫描, 结果二者在 (500±2) nm 处有最大吸收, 故选择 500nm 作为检测波长。(见图 1)

2.1.4 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 1、2、3、4、5、6mL, 分别置 25mL 量瓶中, 分别加水至 6mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1mL, 摇匀, 放置 6min, 加 10% 硝酸铝溶液 1mL, 摇匀, 放置 6min, 加氢氧化钠试液 10mL, 再加水至刻度, 摇匀,



1 - 供试品溶液; 2 - 对照品溶液

图 1 对照品、供试品紫外吸收光谱图

放置 15min, 以相应试剂为空白, 照紫外-可见分光光度法 (《中国药典》四部 0401) 试验, 在 500nm 波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标做线性回归, 得回归方程为: $Y = 0.51120X - 0.02248$ ($r = 0.99989$)。结果表明芦丁在 0.306~1.836mg 浓度范围内与吸收度呈良好线性关系。

2.2 单因素考察

2.2.1 酶种类对布渣叶总黄酮提取率的影响 取布渣叶药材粉末 5 份, 每份 0.5g, 精密称定, 分别加入 1% 的纤维素酶、果胶酶、复合酶 1 (纤维素酶: 果胶酶 = 2:1)、复合酶 2 (纤维素酶: 果胶酶 = 1:1)、复合酶 3 (纤维素酶: 果胶酶 = 1:2), 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇溶液 50mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 30min, 放冷, 再称定重量, 用 70% 乙醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 吸取续滤液 0.5mL, 按“2.1.3”项下方法显色、测定吸光值, 根据标准曲线计算总黄酮含量, 结果显示, 同等工艺条件下, 复合酶 2 的提取率较高。(见图 2)

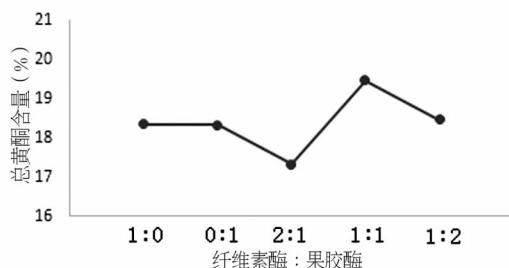


图 2 酶种类对总黄酮提取率的影响

2.2.2 酶用量对布渣叶总黄酮提取率的影响 取布渣叶药材粉末 6 份,每份 0.5g,精密称定,分别加入 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 的复合酶(纤维素酶:果胶酶 = 1:1),置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇溶液 50mL,密塞,称定重量,超声处理 30min,放冷,再称定重量,用 70% 乙醇溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,吸取续滤液 0.5mL,按“2.1.3”项下方法显色、测定吸光值,根据标准曲线计算总黄酮含量,结果显示,酶用量为 1.0%、3.0% 条件下,布渣叶总黄酮得率较高。(见图 3)

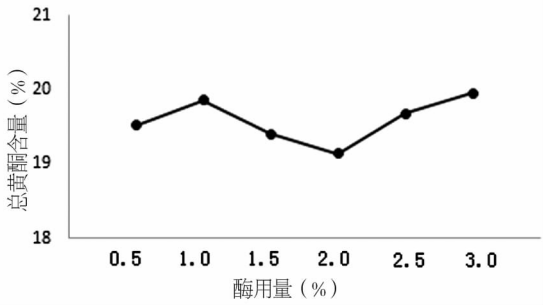


图 3 酶用量对总黄酮提取率的影响

2.2.3 pH 值对布渣叶总黄酮提取率的影响 取布渣叶药材粉末 6 份,每份 0.5g,精密称定,加入 3% 复合酶(纤维素酶:果胶酶 = 1:2)、70% 乙醇 50mL,用 1mol/L HCl 溶液和 1mol/L NaOH 溶液调节各溶液的 pH 值分别为 4.0、4.5(原溶液)、5.0、5.5、6.0、6.5,密塞,称定重量,在 45℃~50℃ 温度下超声酶解 30min,放冷,再称定重量,用 70% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液 0.5mL,按“2.1.3”项下方法显色、测定吸光值,根据标准曲线计算总黄酮含量,结果显示,溶液 pH=4.5 即原溶液时总黄酮得率较高。(见图 4)

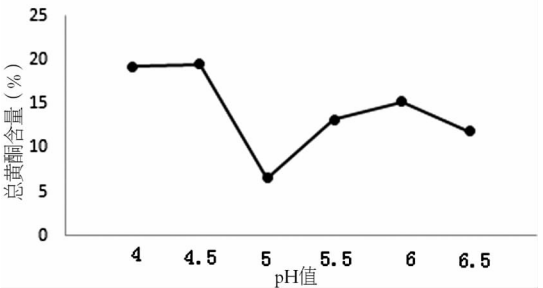


图 4 pH 值对总黄酮含量的影响

2.2.4 酶解时间对布渣叶总黄酮提取率的影响 取布渣叶药材粉末 6 份,每份 0.5g,精密称定,置 50mL 具塞锥形瓶中,分别加入 3% 复合酶(纤维素酶:果胶酶 = 1:2)、70% 乙醇 50mL,密塞,称定重量,在 45℃~50℃ 温度下分别超声酶解 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0h,放冷,再称定重量,用 70% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液 0.5mL,按“2.1.3”项下方法显色、测定吸光值,根据标准曲线计算总黄酮含量,结果显示,酶解 1.5h 时,总黄酮含量较高。(见图 5)

2.2.5 乙醇浓度对布渣叶总黄酮提取率的影响 取布渣叶药材粉末 6 份,每份 0.5g,精密称定,置 50mL 具塞锥形瓶中,加

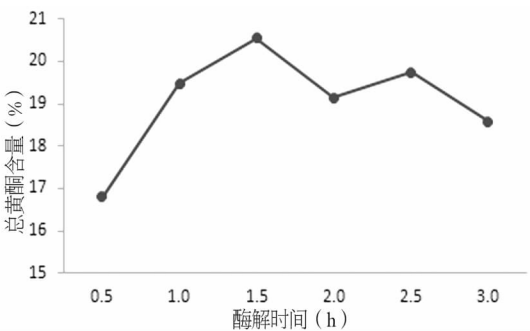


图 5 酶解时间对总黄酮含量的影响

入 3% 复合酶(纤维素酶:果胶酶 = 1:2),分别加入 30%、40%、50%、60%、70%、80% 乙醇 50mL,密塞,称定重量,在 45℃~50℃ 温度下超声酶解 1.5h,放冷,再称定重量,用不同浓度乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液 0.5mL,按“2.1.3”项下方法显色、测定吸光值,根据标准曲线计算总黄酮含量,结果显示,乙醇浓度为 60% 时,总黄酮含量较高。(见图 6)

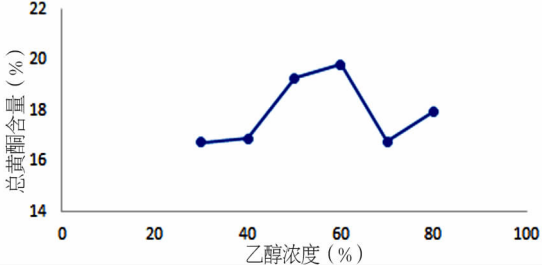


图 6 乙醇浓度对总黄酮含量的影响

2.3 正交试验 根据上述单因素试验结果,采用正交设计,对 3 个主要影响因素(酶用量、提取时间、乙醇浓度)进行优选,筛选最佳提取工艺,因素水平设计及结果见表 1、2,方差分析见表 3。由直观分析可知,影响提取效果的因素顺序为:乙醇浓度>酶用量>酶解时间,由此得出的最佳工艺组合为 A2B3C2,由方差分析可知,乙醇浓度(C)对总黄酮提取率影响显著,而酶用量、酶解时间对提取率影响不明显,综合考虑,确定最佳酶提取工艺为 A1B1C2,即复合酶(纤维素酶:果胶酶 = 1:1)用量为 1%,乙醇浓度为 60%,酶解 1h。

2.4 验证试验 精密称取同一批布渣叶粉末 3 份,每份 0.5g,按优选的工艺进行酶解提取;另取同等质量的药材粉末 3 份,不加入复合酶直接提取,分别测定总黄酮提取率。结果显示,经酶解提取,总黄酮提取率为 20.90%,而未经酶解处理的总黄酮提取率为 16.05%,酶解法与未经酶解法相比,总黄酮提取率提高了 4.85%。

表 1 正交试验因素水平表

水平	A 酶用量 (%)	B 酶解时间 (h)	C 乙醇浓度 (%)
1	1	1.0	50
2	2.0	1.5	60
3	3	2.0	70

表 2 正交试验安排及结果

实验号	因素				结果
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	18.46
2	1	2	2	2	21.58
3	1	3	3	3	19.90
4	2	1	2	3	21.01
5	2	2	3	1	20.40
6	2	3	1	2	19.77
7	3	1	3	2	19.93
8	3	2	1	3	17.93
9	3	3	2	1	20.88
K1	59.94	59.40	56.16	59.74	
K2	61.18	59.91	63.47	61.28	
K3	58.74	60.55	60.23	58.84	
R	2.44	1.15	7.31	2.44	
SS	0.99	0.22	8.94	1.02	

表 3 方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.99	2	4.48	>0.05
B	0.22	2	1.00	>0.05
C	8.94	2	40.41	<0.05
D	1.02	2	4.59	
SMIN	0.11			

3 讨 论

文献研究^[5-9]显示,果胶酶作用 pH 值为 2.5~6.0,最适 pH 值为 3.5,作用温度为 15℃~55℃,最适作用温度为 50℃,纤维素酶的最适 pH 值一般在 4.5~6.5,单因素试验显示,溶液 pH 值为 4~4.5 时总黄酮得率较高,原溶液的 pH 值接近 4.5,因此不需要对溶液 pH 值进行调节,酶解温度则

控制在 45℃~50℃。
前期相关研究^[10]显示,布渣叶总黄酮有显著降低高脂血症小鼠模型血清中总胆固醇和三酰甘油含量的作用,且无明显的肝肾损伤等不良反应,显示其安全且调脂作用明确,具有广泛的开发利用价值。本试验采用复合酶法辅助提取布渣叶总黄酮,较同等条件下不加酶处理提取率提高了 4.85%,说明该方法具有显著的优势,为进一步开展布渣叶药用及保健方面的研究奠定了基础,同时为总黄酮类化合物规模化生产提供了一种新工艺。

参考文献

[1] 罗集鹏. 布渣叶黄酮类成分的研究[J]. 中药材,1990,13(3):33.
[2] 冯世秀,刘梅芳,魏孝义,等. 布渣叶中三萜和黄酮类成分的研究[J]. 热带亚热带植物报,2008,16(1):51-56.
[3] 杨茵,李硕果,叶文才,等. 布渣叶的化学成分研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(11):2790-2792.
[4] 毕和平,韩长日,王芳,等. 分光光度法测定破布叶中总黄酮[J]. 广东化工,2006,33(3):43-45.
[5] 隋晓璠,王超,李永吉,等. 均匀设计优化纤维素酶解提取三七工艺的研究[J]. 中医药学报,2005,33(4):8-12.
[6] 高霞,刘聪燕,陈彦,等. 酶技术在中药黄酮类成分研究中的应用[J]. 中草药,2014,45(16):2142-2146.
[7] 彭晓青,程轩轩,张旭红,等. 复合酶法提取龙眼核总黄酮的工艺研究[J]. 中国医药用药评价与分析,2014,14(2):135-138.
[8] 李慕春,阿力浦,阿不都,等. 戈宝红麻总黄酮酶法提取工艺研究[J]. 中南药学,2015,13(3):270-273.
[9] 周大寨,朱玉昌,黄卫,等. 复合酶法提取板党多糖的研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(8):1928-1930.
[10] 曾巧煌,陈玉兴,曾晓会,等. 布渣叶总黄酮分散片对不同高脂血症模型调血脂作用研究[J]. 江西中医药,2016,47(1):63-65.
(收稿日期:2018-03-28)

调治便秘(二)

按揉肾俞穴 肾俞穴位于第2腰椎棘突下,旁开1.5寸处,左右各一。坐位,两手叉腰,拇指向前按于同侧肋端,中指按于肾俞穴,适当用力按揉30~50次。有益肾助阳、强腰通便的作用,适用于体虚便秘,尤其适用于中老年各种便秘。

按揉支沟穴 支沟穴位于前臂背侧,腕背横纹上3寸,尺骨与桡骨之间的空隙处。坐位或仰卧位,用对侧拇指按揉支沟穴,以穴位处有酸胀感为宜,持续约1min。有宣通气机,促使津液畅通,大肠传导功能复常的作用,适用于便秘,尤其以热秘、气秘最为适宜。

按揉三阴交 三阴交穴位于小腿内侧,足内踝尖上3寸,胫骨内侧缘后方。坐于床上,双膝微曲,以一侧拇指指腹按住对侧三阴交穴,轻轻揉动,以局部有酸胀感为宜,每侧1min,共2min。有健脾益血、调肝补肾的作用,适用于血虚秘、阴虚秘。

按揉内庭穴 内庭穴位于足背,第2、3趾间缝纹端。坐于床上,双膝微曲,以一侧拇指指腹按住内庭穴,轻轻揉动,以局部有酸胀感为宜,每侧1min,共2min。有清泻胃火的作用,适用于热秘,尤其适用于年轻人或体质壮实者因过食酒肉辛辣所致的便秘。

揉搓涌泉穴 涌泉穴位于足底部,足趾跖屈时,约当足底(不包括足趾)前三分之一凹陷处。盘腿坐于床上,用两拇指揉搓两足心涌泉穴,朝足趾方向来回搓,各100次。有滋补肾精、调补五脏、润肠通便的作用,适用于各类虚性便秘,特别适用于阴虚秘。(http://www.cntcm.com.cn/yskp/2018-06/29/content_46341.htm)