

海巴戟总黄酮提取工艺的研究

楚冬海^{1, 2}, 许又凯², 高锦明^{1*}, 纳智²

(1. 西北农林科技大学 生命科学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 中国科学院 西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303)

摘要: 研究了海巴戟总黄酮最佳提取工艺。采用正交试验, 以提取物中总黄酮的得率作为考察指标, 优选出最佳提取工艺。试验设计的四因素中, 提取时间对结果有极显著的影响, 乙醇浓度对结果有显著的影响, 提取温度和乙醇用量对结果影响不显著。海巴戟总黄酮的最佳提取工艺条件为: 提取时间 1.5 h, 乙醇浓度 90%, 提取温度 60~ 65℃, 乙醇用量 1: 20 (g/ mL), 按照最佳提取工艺条件提取海巴戟果实中的总黄酮, 得率可达 2.936%。

关键词: 正交试验; 海巴戟; 总黄酮; 紫外分光光度法

中图分类号: S789 文献标识码: A 文章编号: 1001-7461(2008)04-0160-03

Studies on the Extraction of Total Flavonoids from *Morinda citrifolia*

CHU Dong-hai^{1, 2}, XU You-kai², GAO Jin-ming^{1*}, NA Zhi²

(1. College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, CAS, Mengla, Yunnan 666303, China)

Abstract: The conditions of the extraction of total flavonoids from *Morinda citrifolia* were studied by the orthogonal experimental design. Among the four factors of tested, the most significant one was the time of extraction, the second one is the concentration of alcohol. The volume of alcohol and the temperature of extraction are not significant. The optimum conditions for the extraction was that extraction time 1.5 h. Solvent 20 times of 90% alcohol to the herbs and temperature 60~ 65℃

Key words: orthogonal experiment; *Morinda citrifolia* L.; total flavonoids; ultraviolet spectrophotometry

海巴戟 (*Morinda citrifolia*)^[1-2], 别名印度桑树, 诺丽, Noni, 茜草科巴戟天属植物, 为热带常绿灌木至小乔木^[3-4]。原产于南太平洋热带诸岛, 我国海南岛、西沙群岛和台湾岛有分布^[5], 为波利尼西亚土著民族重要传统药用植物^[5-7]。海巴戟的主要化学成分有黄酮、香豆素、萜类、生物碱、蒽醌类等, 具有抗菌、抗 HIV、驱虫止痛、降血压、增强免疫、抗癌等功效^[8]。海巴戟果实中总黄酮提取工艺的研究尚未报道。本研究采用正交试验设计, 对影响海巴戟总黄酮提取的因素进行了研究, 为获得其最佳提取工艺条件提供试验依据。

1 料与方法

1.1 材料

海巴戟 (*Morinda citrifolia* L.) 果实由中国科学院西双版纳热带植物园药厂提供。自然风干, 粉碎并过 50 目筛备用。

1.2 仪器与试剂

主要仪器: TU-1810DSPC 型紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司)、旋转蒸发器 (Buchi, 瑞士)、SHZ-D 循环水式真空泵 (河南巩义市英峪豫华仪器厂)、电热恒温水浴锅 HH. S1+2 (北京长安科学仪器厂)。

试剂: 芦丁对照品 (中国药品生物制品检定所); 无水乙醇、NaNO₂、Al(NO₃)₃、NaOH 等试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 样品提取 精密称取海巴戟果实粉末 2 g,

① 收稿日期: 2007-12-09 修回日期: 2008-05-06

基金项目: 教育部“新世纪优秀人才支持计划(NCET-05-0852)”

作者简介: 楚冬海, 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物资源化学。E-mail: chuwinter@gmail.com

* 通讯作者: 高锦明, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 天然产物化学。E-mail: jinminggao@soku.com; 029-87092335.

共计 9 份, 参照文献^[9, 11], 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计(表 3, 4) 回流提取, 固定提取次数为 3 次, 抽虑, 合并 3 次滤液, 减压蒸馏, 回收乙醇, 将提取液用无水乙醇定容于 100 mL 容量瓶中, 摇匀, 作为待测原溶液。

各取上述待测原溶液 5 mL, 精密测定, 置 25 mL 容量瓶中, 加适量无水乙醇超声溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 静置。取上清夜 5.0 mL 置蒸发皿中, 加入 2.0 g 聚酰胺粉吸附, 于 50 ℃ 水浴中挥去乙醇, 然后转入层析柱, 先用 25 mL 石油醚洗脱, 弃去洗脱液, 再用无水乙醇洗脱, 收集洗脱液(至盐酸- 镁粉反应为阴性), 置 25 mL 容量瓶中, 加无水乙醇至刻度, 作为待测样品溶液。

1.3.2 标准曲线的绘制^[10] 精密称取在 120 ℃ 干燥至恒重的芦丁标准品 5.0 mg, 用无水乙醇溶解, 定容至 100 mL, 得浓度为 50 μg/mL 的标准液。

分别精密吸取上述芦丁标准液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 分别加 5% 亚硝酸钠 0.3 mL, 放置 6 min, 再加 10% 硝酸铝 0.3 mL, 放置 6 min, 加 4% 氢氧化钠 4 mL, 加蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 放置 15 min 后, 在分光光度计上于 510 nm 处测定其吸光度, 无水乙醇为空白参比。以吸收度 A 为纵坐标, 浓度 C 为横坐标, 进行回归分析, 绘制回归曲线。结果在 0~ 5 μg/mL 的范围内, 浓度与吸光度有良好的线性关系。得出回归方程: $A = 0.0277C + 0.001$ (C : μg/mL), $r = 0.9998$ 。

1.3.3 样品总黄酮含量测定^[10] 精密吸取上述待测样品溶液 1.0 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中, 按照“标准曲线的绘制”项下的方法, 在 510 nm 下测定其吸光度 A , 按回归方程计算出提取物中的总黄酮含量。

1.4 方法学考察

1.4.1 精密度考察 精确称取样品质粉末约 2 g, 按照待测样品制备方法制备待测样品溶液, 准确吸取待测溶液 1.0 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容至 10 mL, 按“标准曲线的绘制”项下的方法, 在 510 nm 下测定其吸光度 A , 5 次测定的平均吸光度为 0.057 2, RSD 为 0.67%, 说明仪器的精密度良好。

1.4.2 稳定性研究 将上述溶液每隔 10 min 测定一次吸光度, 5 次测定的平均吸光度为 0.056 1, RSD 为 1.34% ($n = 5$), 表明待测样品溶液在 1 h 内稳定。

1.4.3 重现性考察 将上述溶液平行制备 5 份待测溶液, 测定其吸光度, 5 次测定的总黄酮得率平均为 2.936%, RSD 为 0.883%, 说明方法的重现性

好。

1.4.4 加样回收率试验 分别精密吸取一定量的待测样品溶液置于 10 mL 容量瓶中, 按照上述方法测定其吸光度, 计算回收率, 平均回收率为 100.64% (表 1), 表明方法的回收率较好。

表 1 加样回收率试验

Table 1 Recovery test

已知样品 含量/g	加入对照品 含量/g	测定量 /g	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
0.030 9	0.006	0.037 02	102		
0.0463 6	0.004	0.050 31	98.75		
0.041 82	0.002	0.043 83	100.50	100.64	1.35
0.028 46	0.006	0.034 42	99.33		
0.041 42	0.004	0.045 49	101.75		
0.043 62	0.002	0.045 65	101.50		

2 结果与分析

2.1 总黄酮提取方法的选择

考虑到同属植物巴戟天总黄酮在乙醇中溶解度较好, 提取时间为 1 h 的条件下溶出量较大^[9], 故考察了海巴戟的 2 种提取方法:

浸泡法: 取海巴戟果实粉末 3 g, 用 15 倍量的 95% 乙醇浸泡 3 次, 每次 1 h, 抽虑, 合并 3 次滤液。

回流法: 取海巴戟果实粉末 3 g, 用 15 倍量的 95% 乙醇提取 3 次, 每次 1 h, 抽虑, 合并 3 次滤液。

用以上 2 种提取方法提取海巴戟总黄酮, 依次测定其中总黄酮得率, 得出回流法提取总黄酮的含量最高, 其次是浸泡法(表 2)。故选用回流法作为海巴戟总黄酮的提取方法, 并通过下面正交试验选择最佳提取条件。

表 2 不同提取方法中总黄酮的含量比较

Table 2 Comparison of contents of flavonoids between two extraction methods

	提取方法	
	回流法	浸泡法总
黄酮得率/%	1.960 2	1.325 8

表 3 因素水平表

Table 3 Factors and levels

水平	因素			
	A (乙醇浓度 /%)	B (乙醇用量 /g · mL ⁻¹)	C 提取温度 /℃)	D (提取时间 /h)
1	85	1: 15	60~ 65	0.5
2	90	1: 20	70~ 75	1.0
1.5	3	95	1: 25	80~ 85

表 4 L₉(3⁴) 正交实验设计以及结果

序号	A	B	C	D	总黄酮得率/%
1	1	1	1	1	1.986 0
2	1	2	2	2	2.119 2
3	1	3	3	3	2.316 0
4	2	1	2	3	2.444 4
5	2	2	3	1	2.097 6
6	2	3	1	2	2.330 4
7	3	1	3	2	2.112 0
8	3	2	1	3	2.404 8
9	3	3	2	1	1.994 4
K ₁	6.421 2	6.542 4	6.721 2	6.078	
K ₂	6.872 4	6.621 6	6.558	6.561 6	
K ₃	6.511 2	6.640 8	6.525 6	7.165 2	
k ₁	2.140 4	2.180 8	2.240 4	2.026	
k ₂	2.290 8	2.207 2	2.186	2.187 2	
k ₃	2.170 4	2.213 6	2.175 2	2.388 4	
R	0.150 4	0.032 8	0.065 2	0.362 4	

2.2 总黄酮提取的正交试验

在选择回流作为提取方法的基础上, 拟定乙醇浓度、乙醇用量、提取温度、提取时间作为考察因素, 每个因素取 3 个水平, 固定提取次数为 3 次, 选用 L₉(3⁴) 正交表进行实验。因素水平见表 3, 以提取物中总黄酮的得率为考察指标, 结果见表 4。

对于总黄酮的提取, 通过直观分析, B 因素影响不显著, 故以 B 因素作为误差进行方差分析(表 5)。

根据表 3 表 4 可看出乙醇用量、提取温度对指标影响不显著, 乙醇浓度对指标有显著性影响, 极显著的因素为提取时间。由极差计算可知 RD> RA> RC> RB, 因此, 影响海巴戟中总黄酮的各因素主次顺序为 D> A> C> B。分析各因素对总黄酮的综合影响, 并考虑到提取成本, 最佳提取方案为 A₂B₂ C₁D₃。

表 5 方差分析表

方差来源	离差平方和 SS	自由度 f	方差 S	F	P
A	0.012 672 107	2	0.006 336 053	20.959 950 6	< 0.05*
B(误差)	0.000 604 587	2	0.000 302 293		
C	0.002 442 347	2	0.001 221 173	4.039 696 542	> 0.05
D	0.065 933 547	2	0.032 966 773	109.055 575 2	< 0.01

注: * F_{0.05}(2, 2) = 19.0, F_{0.01}(2, 2) = 99.0

2.3 最佳提取条件的验证

按照上述确定的最佳条件, 做 5 次平行试验, 得出总黄酮的含量比正交实验中的任何一次实验的得率都高, 平均得率为 2.936%, RSD 为 0.883%, 与正交表中的实验结果相当。这就进一步说明了正交实验所得到的上述最佳条件确实为海巴戟总黄酮提取的最佳工艺。

3 结论与讨论

基于回流提取方法, 设计了较为合理的四因素三水平的正交试验, 选用了四种因素, 研究对海巴戟果实中总黄酮提取的影响, 实验结果表明回流提取技术与传统的浸泡相比较具有提取时间短、总黄酮得率高等优点。根据试验结果, 最终确定提取工艺如下: 取粉碎的海巴戟粉末适量, 提取时间为 1.5 h, 乙醇浓度为 90%, 提取温度为 60~ 65℃, 乙醇用量为 1: 20(g/mL)。

本研究选用正交试验法优化实验条件, 大大提高了海巴戟中总黄酮的提取效率。同时, 海巴戟果实粉末中含有黄酮类物质, 为天然黄酮类化合物的获得提供另一种可利用资源, 同时也为海巴戟药用成分的进一步开发利用提供依据。

参考文献:

[1] Will Mc Clatchey. From Polynesian Healers to Health Food Stores: Changing Perspectives of Morinda Citrifolia (Rubiaceae) [J]. Integrative Cancer Therapies, 2002, 1(2): 110-120.

[2] WANG M F, KIKUZAKI H, JIN Y, et al. Novel glycosides from Noni (*Morindacitrifolia*) [J]. Journal of Natural Products, 2000, 63: 1182-1183.

[3] KAMIYA K, TANAKA Y, ENDANG H, et al. Chemical constituents of *Morindacitrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(19): 5843-5848.

[4] ZIN Z M, HAMID A A, OSMAN A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf[J]. Food Chemistry, 2002, 78(2): 227-231.

[5] WANG M Y, SU C. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni) [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2001, 952: 161-168.

[6] LIU G, BODE A, MA W Y, et al. Two novel glycosides from the fruits of *Morinda citrifolia* (noni) inhibit AP-1 transactivation and cell transformation in the Mouse Epidermal JB6 Cell line [J]. Cancer Research, 2001, 61: 5749-5756.

[7] SANG S M, CHENG X F, ZHU N Q, et al. Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(9): 4478-4481.

[8] WANG M Y, WEST B J, JENSEN C J, et al. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2002, 23(12): 1127-1141.

[9] 孙中亮, 林强, 裴重华, 等. 中药巴戟天超细粉体主要有效成分溶出特性的研究[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2004, 22(2): 164-166.

[10] 王晋黄, 池汝安, 苏国清. 甘草总黄酮提取的优化条件研究[J]. 化学与生物工程, 2005, 22(11): 45-46.

[11] 汪洪武, 鲁湘鄂, 刘艳清, 等. 菠萝蜜叶中总黄酮提取工艺的研究[J]. 广东化工, 2006, 33(8): 26-29.