

· 中药工业 ·

番石榴果实中总黄酮的提取及含量测定[△]白丽丽¹, 周紫梦¹, 戴华^{2*}

(1. 海南医学院药学院, 海南 海口 571199; 2. 海南医学院公共卫生学院, 海南 海口 571199)

[摘要] 目的: 采用正交试验法优选番石榴果实中总黄酮的提取工艺。方法: 以提取的总黄酮含量为评价指标, 选择醇的体积分数、料液比、提取时间和提取次数为考察因素, 用正交试验法确定黄酮的最佳提取工艺。通过分光光度法测定总黄酮的含量, 检测波长为 508 nm。结果: 最佳工艺为醇的体积分数 60%, 料液比 1:25, 提取时间 2.5 h, 提取 3 次。芦丁在 8.24~50.42 mg·L⁻¹ 具有良好的线性关系 ($r=0.999\ 9$), 平均回收率为 98.23% (RSD = 1.36%)。总黄酮含量可达到 1.54%。结论: 确定的提取工艺简单、易于操作, 提取率高。建立的定量方法可用于番石榴总黄酮的测定。

[关键词] 番石榴; 总黄酮; 提取; 正交试验法

Study on Extraction Process and Determination of Total Flavonoids in Fruits of *Psidium guajava*BAI Lili¹, ZHOU Zimeng¹, DAI Hua²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Hainan Medical University, Haikou 571199, China;

2. School of Public Health, Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

[Abstract] **Objective:** To study the optimum extraction process of total flavonoids in fruits of *Psidium guajava*. **Methods:** An orthogonal experiment was designed to obtain the best extraction conditions, in which 4 factors (alcohol concentration, fruits; ethanol ratio, reflux time and extraction times) were examined, with the extraction rate of total flavonoids as the final indicator. The content of total flavonoids was determined by spectrophotometry at 508 nm. **Results:** The optimum extraction technology was identified as follows: extraction solvent, 60 percent ethanol; fruits; ethanol ratio, 1:25; reflux time, 2.5 h; extraction times, 3 times. The linear ranges of the total flavonoids was 8.24-50.42 mg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$). The average recovery was 98.23% (RSD = 1.36%). The total flavonoids were 1.54%. **Conclusion:** The process proved to be simple and reasonable, with high extraction rate and feasibility. The determination method was easy and accurate which can be used for the study of total flavonoids in *P. guajava*.

[Keywords] *Psidium guajava*; total flavonoids; extraction; orthogonal test

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.2.021

番石榴 *Psidium guajava* L., Guava. 属于桃金娘科番石榴属, 常绿多年生的灌木植物, 在我国海南、广东、广西、福建等地区有栽种。番石榴叶子、果实均有药用价值, 我国传统医药用来治疗轻、中度糖尿病, 已经引起越来越多学者的关注^[1-4]。番石榴叶中含有多种化学成分, 具有抗糖尿病活性的主要有黄酮类、多酚和鞣质类、萜类、甾体类等化学成分。黄酮类化合物广泛存在于自然界, 主要以黄酮苷的形式存在, 具有毒性低、来源广泛等优点。已

经从番石榴叶中分离出的黄酮类化合物包括芦丁、槲皮素、杨梅素、番石榴苷、槲皮素糖苷、无色花青素等。现代药理研究表明, 番石榴提取物中降血糖有效成分可能是黄酮苷类及多糖类化合物, 因此, 对番石榴中黄酮的研究作为开发抗糖尿病的新药将具有广泛的前景和意义^[5-8]。目前, 对番石榴中黄酮的研究主要集中在叶子上, 但对番石榴果实中黄酮的研究鲜有报道^[9-11]。本研究探讨番石榴果实中黄酮提取的影响因素, 通过正交试验筛选最优提

[△] [基金项目] 海南省自然科学基金(214033)

* [通信作者] 戴华, 讲师, 研究方向: 食品卫生学研究, E-mail: daiborn@126.com

取工艺,为研究开发番石榴中的化学成分提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UV1600 型紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司);B210S 分析天平(北京赛多利斯有限公司);R 系列旋转蒸发器(上海申生科技有限公司);KQ-200KDE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 试药

芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100080-201408);其他试剂均为分析纯;水为蒸馏水。

番石榴果实采自海南文昌,经海南医学院药学院杨卫丽副教授鉴定为桃金娘科番石榴属番石榴。将其清洗,70℃烘干至恒重,粉碎过40目筛后备用。

2 方法及结果

2.1 方法学考察

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取在105℃条件下干燥至恒重的芦丁对照品10.5 mg,置于50 mL容量瓶中,加60%乙醇适量,超声5 min至溶解,定容,得质量浓度为0.21 mg·mL⁻¹的芦丁对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取番石榴粉末2.0 g共5份,分别置于圆底烧瓶中,用60%乙醇溶液加热回流2 h,过滤后于50 mL容量瓶中用60%乙醇溶液定容,摇匀,得供试品溶液。

2.1.3 检测波长的选择 精密量取芦丁对照品溶液、供试品溶液以及空白溶液各4.0 mL于25 mL容量瓶中,精密加入5%亚硝酸钠溶液1 mL,摇匀,放置6 min,加入10%硝酸铝溶液1 mL,摇匀,放置6 min,加入4%氢氧化钠溶液8 mL,然后加入60%乙醇溶液定容,摇匀,放置15 min,照分光光度法于200~600 nm进行扫描,芦丁与供试品溶液的最大吸收波长在508 nm处,故选用508 nm作为检测波长。

2.1.4 标准曲线的绘制 分别精密量取芦丁对照品溶液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL置于25 mL容量瓶中,操作同2.1.3项下方法,照分光光

度法在508 nm处测定其吸光度。以浓度(X)为横坐标,吸光度(Y)为纵坐标,进行线性回归,得到回归方程为 $Y=0.0119X+0.0270$, $r=0.9999$,表明芦丁在8.24~50.42 mg·L⁻¹线性关系良好。

2.1.5 稳定性考察 精密吸取供试品溶液4 mL,操作同2.1.3项下方法,在室温和室内光照条件下密闭放置,分别在0、15、30、60、90、120 min测定其吸光度,RSD为2.3%($n=6$),结果表明,供试品溶液在2 h之内较稳定,满足实验的要求。

2.1.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液4 mL,操作同2.1.3项下方法,连续5次测定其吸光度,RSD为0.11%($n=5$),结果表明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性试验 称取6份番石榴果实药材粉末,每份约5 g,精密称定,按2.1.2项方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液,操作同2.1.3项下方法,分别测定其吸光度值,RSD为0.60%($n=6$),结果表明该分析方法重复性良好。

2.1.8 加标回收试验 精密吸取6份供试品溶液2 mL,分别加入芦丁对照品溶液2.6 mL,操作同2.1.3项下方法,在508 nm处测定吸光度。见表1。

表1 加标回收试验结果($n=6$)

测量次数	样品含量/ mg	加标量/ mg	测得总量/ mg	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
1	0.686	0.546	1.231	99.82	98.23	1.36
2	0.686	0.546	1.229	99.45		
3	0.686	0.645	1.225	98.72		
4	0.686	0.546	1.214	96.70		
5	0.686	0.546	1.214	96.70		
6	0.686	0.546	1.221	97.99		

由表1可知,平均回收率98.23%,RSD为1.36%,结果表明回收率较好,符合实验要求。

2.2 总黄酮的提取工艺优选

2.2.1 因素及水平考察 以提取的总黄酮含量作为评价指标,通过单因素试验选择乙醇体积分数(50%、60%、70%、80%)、料液比(1:15、1:20、1:25、1:30)、回流时间(1、1.5、2、2.5 h)、提取次数(1次、2次、3次)等因素和水平进行试验。确定较好的提取因素与水平:醇体积分数为60%,料液比为1:25,回流2 h,提取次数为3次。然后确定醇的体积分数为60%,选择提取次数、料液比、提取时间3个因素,每个因素3个水平,设定因素水平表,见表2。

表 2 正交试验因素及水平表

水平	因素		
	A 提取次数	B 料液比	C 提取时间/h
1	1	1:15	1.5
2	2	1:20	2.0
3	3	1:25	2.5

2.2.2 正交试验结果及分析 称取番石榴粉末 5.0 g, 设计正交试验, 加入 60% 乙醇溶液加热回流, 过滤、浓缩, 用 60% 乙醇定容至 50 mL, 采用分光光度法测定其含量, 正交试验结果见表 3, 方差分析见表 4。

表 3 正交试验结果

序号	提取次数(A)	料液比(B)	提取时间(C)	总黄酮含量(%)
1	1	1	1	0.73
2	1	2	2	0.86
3	1	3	3	0.98
4	2	1	2	0.99
5	2	2	3	1.15
6	2	3	1	1.16
7	3	1	3	1.30
8	3	2	1	1.24
9	3	3	2	1.34
K ₁	0.86	1.01	1.04	
K ₂	1.10	1.08	1.06	
K ₃	1.29	1.16	1.14	
R	0.436	0.153	0.10	

表 4 方差分析

因素	偏差平方和 SS	自由度 DF	F	显著性
A	0.287	2	143.5	*
B	0.035	2	17.5	
C	0.017	2	8.5	
误差	0.002	2		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ 。

对表 3 进行直观分析可知, 极差大小显示各因素的影响作用依次为 $A > B > C$ 。表 4 表明, A 因素对番石榴总黄酮的提取有显著影响意义, B、C 两因素无显著影响意义。为此, 结合表 3 又做了 2 组加水平试验, 确定提取次数为 3 次, 乙醇浓度为 60%, 见表 5。结果再次验证 B、C 两因素为无显著影响效应。综合直观分析和方差分析的结果, 确定番石榴果实中总黄酮的最优提取工艺为 $A_3B_3C_3$, 即乙醇体积浓度为 60%, 提取 3 次, 料液比 1:25, 回流 2.5 h。

表 5 加水平试验结果

提取次数	提取时间/h	料液比	含量(%)
3	2.5	1:25	1.51
3	3.0	1:25	1.54
3	2.5	1:30	1.52
3	3.0	1:30	1.52

2.2.3 工艺验证性试验 为考察上述优选提取工艺的稳定性, 按上述最优工艺条件 $A_3B_3C_3$ 进行了 3 次重复性试验, 番石榴果实中总黄酮的含量分别为 1.54%、1.55%、1.54%, 平均含量达到 1.54%, 表明本正交试验设计的工艺路线稳定, 具有良好的可重复性。

3 讨论

3.1 料液比和时间的确定

通过加标试验, 当料液比增加至 30 倍量时, 总黄酮的提取含量反而稍有下降; 当提取时间延长至 3 h 后, 总黄酮的含量未见明显增加。因此, 从经济和效率等方面考虑, 确定最佳料液比为 1:25, 提取时间为 2.5 h。

3.2 提取次数的确定

通过正交试验直观分析发现, A 因素即提取次数对总黄酮的提取影响最为显著。当其他水平相同的条件下, 提取次数增至为 3 次时总黄酮的含量有明显增加, 因此确定最佳提取次数为 3 次。

番石榴叶中总黄酮含量因提取方法不同含量有所不同, 如彭珊珊等^[3]采用乙醇浸提与超声法相结合得总黄酮 1.27%; 林燕如等^[10]采用微波结合回流法得到总黄酮浓度高达 9.91%。产地不同含量亦有所不同^[11]。本研究通过正交试验法对番石榴果实中总黄酮的提取条件进行优化, 确定了最佳提取工艺, 总黄酮收率达到 1.54%。结果表明, 该方法工艺简单、易于操作、提取率高, 为番石榴果实中黄酮类活性成分的进一步研究与开发提供参考。

参考文献

- [1] 庄东红, 雷琦, 杨培奎, 等. 番石榴果实粗蛋白提取液的抗糖尿病作用研究[J]. 韩山师范学院学报, 2011, 6(3): 68-72.
- [2] 钟方丽, 祝波, 王慧竹. 番石榴叶总黄酮提取工艺的优选[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(7): 567-570.
- [3] 彭珊珊, 肖峰. 无花果叶、番石榴叶中黄酮类化合物的提取与测定[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 300-302.

(下转第 265 页)

溶液,按 2.1 色谱条件进样 20 μL ,计算各组分平均回收率。见表 1。

表 1 加样回收试验 ($n=6$)

编号	取样量 /g	样品含 量/mg	对照品加 入量/mg	测得量 /mg	回收率 率(%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
1	0.808 2	3.366	3.764	7.069	98.38	97.79	0.75
2	0.809 8	3.373	3.764	7.026	97.05		
3	0.812 4	3.384	3.764	7.059	97.64		
4	0.803 5	3.346	3.764	7.068	98.88		
5	0.806 8	3.360	3.764	7.041	97.79		
6	0.807 0	3.361	3.764	7.013	97.02		

结果表明,平均回收率均介于 95%~105%,符合要求。

2.12 样品含量测定

取 1.2 项下 3 个批次的六味颈康胶囊,按 2.3 项下供试品的制备方法,按 2.1 项下色谱条件测定,用外标法计算川续断皂苷 VI 的含量。结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果(含量 mg/粒, $n=3$)

批号	含量
151102	1.686
150713	1.624
141226	1.657

3 讨论

3.1 定量分析目标的确定

六味颈康胶囊是河北省深州市医院经过多年临床经验积累研制的医院制剂,续断为君药,具活血化瘀、消肿止痛之功能,近年对续断化学成分研究^[4]日益加深,现选取其主要成分川续断皂苷 IV 作为控制制剂质量的首选目标,根据《中华人民共和国药典》

2015 版规定^[3],川续断药材按干燥品计算,含川续断皂苷 IV 不得少于 2.0%,依据六味颈康胶囊处方,建议含量标准定为不得低于 1.26 mg/粒。

3.2 溶剂与提取方法的确定

比较了甲醇超声 30 min^[5]、乙腈超声 30 min、50% 乙醇水浴回流 1 h 等,发现本文采用的提取方法可有效去除杂质,基线平直,同时也能获得较大提取量,较其他方法提高 10% 以上。

3.3 检测波长的确定

利用 DAD 检测器,发现川续断皂苷 VI 在靠近 200 nm 处有较大吸收,由于 190~200 nm 处于紫外吸收末端,基线不稳,因而选择 206 nm 作为检测波长。

3.4 流动相的选择

实验过程中,采用甲醇-水、乙腈-0.05% 磷酸水溶液、乙腈-水^[5-6]等作为流动相进行洗脱,峰形对称性较差,采用甲醇-0.1% 盐酸水溶液(68:32),与相邻杂质分离良好,色谱峰峰形对称,操作简便。

参考文献

- [1] 吴帅,刘二伟,张祎,等.川续断中化学成分的研究[J].天津中医药大学学报,2010,29(3):147-150.
- [2] 韦英杰,贾晓斌,樊宏伟,等.续断的色谱指纹及 LC-ESI-MS 分析[J].中国中药杂志,2011,36(2):169-174.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [4] 王云华,刘继华,陈凡波,等.川续断中三萜皂苷类成分的研究概况[J].特产研究,2015(2):74-78.
- [5] 周平兰,余辉,蒋孟良,等.HPLC 法测定跌打促愈片中川续断皂苷 VI 的含量[J].中国药师,2014,17(10):1770-1772.
- [6] 单秀明,王瑾,吴爱英.HPLC 测定跌打片中川续断皂苷 VI 的含量[J].中国药师,2013,16(3):388-390.

(收稿日期 2016-04-08)

(上接第 262 页)

- [4] 邵萌,王英,翦雨青,等.番石榴叶乙醇提取物的化学成分研究[J].中国中药杂志,2014,39(6):1024-1029.
- [5] 桂永洪,陈良坚.番石榴汤治疗 II 型糖尿病 14 例[J].福建中医药,1996,30(3):32-33.
- [6] 郭翔宇,刘铜华,朱寅荻,等.番石榴叶化学成分及其治疗 2 型糖尿病研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2014,16(5):1029-1034.
- [7] 刘美凤,蒋利荣,刘华鼎,等.番石榴叶抗 II 型糖尿病活性成分的虚拟筛选[J].华南理工大学学报,2011,39

(3):28-31.

- [8] 蔡丹昭.番石榴叶总黄酮提取及其降血糖机制研究[D].南宁:广西医科大学,2008.
- [9] 张云竹,常刚,章程辉.番石榴黄酮提取工艺的优化研究[J].轻工科技,2012(6):3-12.
- [10] 林燕如,丁利君.番石榴叶中黄酮类物质提取及其抗氧化性研究[J].现代食品科技,2007,23(10):58-61.
- [11] 梁杰豪,裴志强.广西不同产地番石榴叶总黄酮含量测定[J].蛇志,2015,27(2):106-107.

(收稿日期 2016-04-30)