

· 论著 ·

白子草总黄酮及总多糖降血糖有效部位的提取工艺研究

曾令军,柯小温,宋洪涛(原南京军区福州总医院药学科,福建福州350025)

[摘要] **目的** 研究建立白子草总黄酮及总多糖降血糖有效部位的提取工艺。**方法** 在单因素试验的基础上,考察提取次数、药材粒径、浸泡时间、料/液比、乙醇浓度、提取时间对白子草总黄酮提取率的影响,并通过 $L_9(3)^4$ 正交试验优化总黄酮最佳提取工艺;以前期研究为基础,结合 $L_9(3)^4$ 正交试验,优化总多糖最佳提取工艺。**结果** 白子草总黄酮最佳提取工艺为:药材最粗粉加20倍80%乙醇,浸泡0.5 h,回流提取2次,每次1.0 h;总多糖最佳提取工艺为:醇提后药渣加20倍纯净水,80℃回流提取2次,每次1.0 h。该条件下白子草总黄酮及总多糖提取率均大于80%。**结论** 本研究建立的白子草总黄酮及总多糖降血糖有效部位提取工艺稳定、重复性好,为白子草降血糖活性研究奠定了实验基础。

[关键词] 白子草;总黄酮;总多糖;提取工艺

[中图分类号] R284.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)06-0516-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.06.009

Study on extraction technology of blood glucose-lowering components of total flavonoids and polysaccharides from *Gynura divaricata* (L.) DC.

ZENG Lingjun, KE Xiaowen, SONG Hongtao (Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China)

[Abstract] **Objective** To study and establish the extraction technology of hypoglycemic components of total flavonoids and polysaccharides from *Gynura divaricata* (L.) DC. **Methods** Based on the single factor test, the influences of extracting times, diameter of drug powder, soaking time, solid-liquid ratio, ethanol concentration, and extracting time on extraction ratio of total flavonoids were studied. The best extraction technology of total flavonoids from *Gynura divaricata* (L.) DC. was established through $L_9(3)^4$ orthogonal tests. On the base of previous studies combine with $L_9(3)^4$ orthogonal tests, the best extraction technology of total polysaccharides from *Gynura divaricata* (L.) DC. was established. **Results** The optimized extraction technology of total flavonoids was confirmed as follows: drug powder of less than 10 mesh diameter were soaking 0.5 hour with 80% ethanol, and solid-liquid ratio 1:20, and extracting twice, each time one hour. The optimized extraction technology of total polysaccharides was confirmed as follows: add 20 times water to the residue of ethanol, extraction temperature 90℃, and extracting twice, each time one hour. The extraction rate of both total flavonoids and polysaccharides were more than 80%. **Conclusion** The extraction technology of hypoglycemic components of total flavonoids and polysaccharides from *Gynura divaricata* (L.) DC. established in this study is stable, reproducible, and lays a foundation for the further studies on hypoglycemic components in *Gynura divaricata* (L.) DC.

[Key words] *Gynura divaricata* (L.) DC.; total flavonoids; total polysaccharides; extraction technology

白子草 *Gynura divaricata* (L.) DC. 为菊科三七草属植物,又名白背三七、白子菜、大救驾、大肥牛、厚面皮等,主要分布于我国台湾及华南、西南地区,多见于潮湿的阴地。其性寒,味咸、微辛,有清热舒筋、止血、祛瘀之功效,用于百日咳、风湿痛、骨折、

创伤出血、痈肿疮疖等病症^[1]。白子草的地上部分在民间为药食两用部位,其茎、叶冲茶煮水服用,可有效控制血糖及糖尿病并发症。现行糖尿病的治疗多为一种或几种化学药联用,由于化学药存在靶点单一、毒副作用多、易产生耐药等缺点,促使人们将注意力重新转移到传统中药上来。白子草具有较高含量的黄酮和多糖类成分,且现代药理学研究表明白子草中的黄酮和多糖类化合物具有显著的降血糖活性^[2-6]。为进一步有效开发、利用白子草降血糖活性成分,本研究优化、建立白子草中总黄酮和总多糖降血糖有效部位的提取工艺,以期为后续相关研究

[基金项目] 福建省自然科学基金(2012J01400)

[作者简介] 曾令军,硕士,药师.研究方向:中药活性成分研究.
Tel: (0591)22859169; E-mail: 875276534@qq.com

[通讯作者] 宋洪涛,博士,主任药师,教授,博士生导师. Tel: (0591)22859459; E-mail: sohoto@vip.163.com

奠定基础。

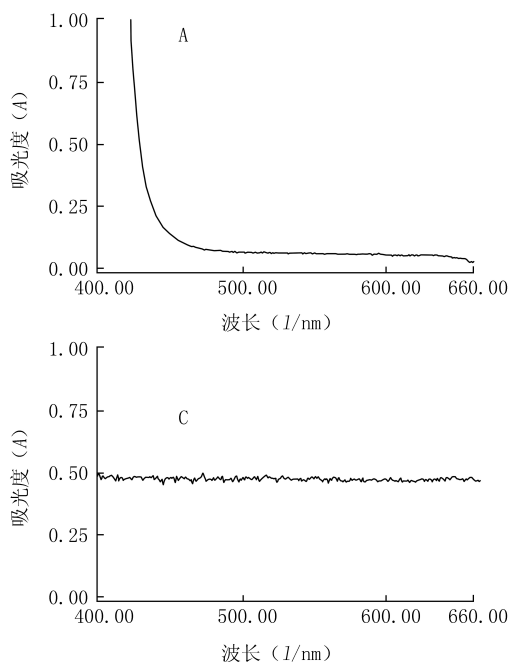
1 材料与仪器

AL204 型分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用有限公司);FW-100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。无水葡萄糖对照品(批号:110833-201304,中国食品药品检定研究院);芦丁(批号:100080-201207,中国食品药品检定研究院);95%乙醇(福建省莆田市医药酒精有限公司);硫酸、蒽酮、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、甲醇均为分析纯;白子草种植于福州市郊区,经第二军医大学郑汉臣教授鉴定为菊科三七属植物白子菜。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定

2.1.1 溶液的制备 对照品溶液:取芦丁对照品约



10 mg,精密称定,置 25 ml 量瓶,加甲醇适量超声溶解,甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

供试品溶液:取白子草醇提取物约 1.0 g,精密称定,置 25 ml 量瓶,加甲醇适量超声溶解,甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 最大吸收波长的选择 分别精密量取对照品溶液和供试品溶液 2.0 ml,置 25 ml 量瓶,加甲醇至 6.0 ml,加入 1.0 ml 5% NaNO_2 溶液,摇匀,放置 6 min 后,加入 1.0 ml 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,6 min 后再加入 5.0 ml 4% NaOH 溶液,摇匀,用水定容至 25 ml。20 min 后,以不加标准溶液或供试液的相应溶液为空白对照,于 400~600 nm 波长范围内扫描。结果供试品溶液与芦丁对照品溶液显色后最大吸收波长均在 509 nm 处,供试品溶液显色前和空白对照溶液显色后在 509 nm 处均无吸收,故选择 509 nm 为检测波长。结果见图 1。

2.1.3 标准曲线的绘制与线性关系考察 分别精

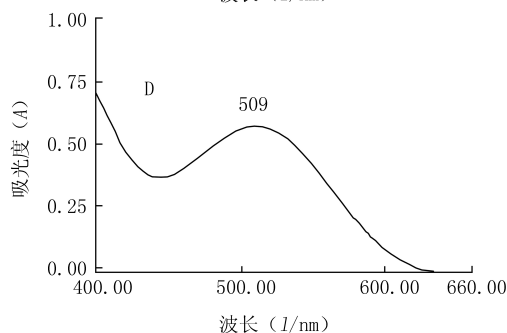
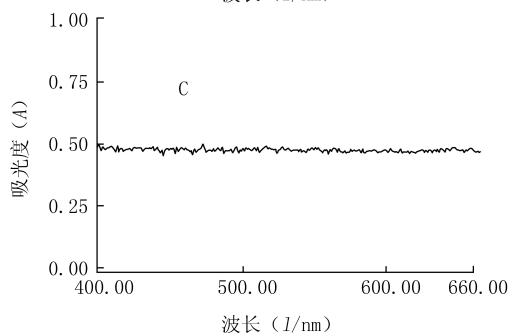
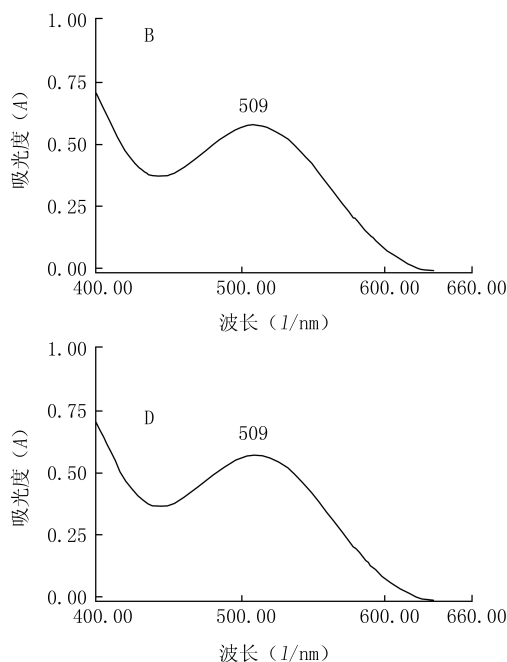


图 1 供试品溶液显色前(A)与显色后(B)及空白对照溶液显色后(C)与芦丁对照品溶液显色后(D)紫外扫描图

密度量取对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 ml 置 25 ml 量瓶中,加甲醇至 6.0 ml,按“2.1.2”项下方法操作,于 509 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标(A),浓度为横坐标(C, $\mu\text{g}/\text{ml}$)绘制标准曲线。得回归方程: $A = 0.0091C + 0.0675$, $r = 0.9996$,表明芦丁在 16.43~98.58 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内,吸光度与浓度线性关系良好。

2.1.4 精密度试验 精密量取对照品溶液 4.0 ml,按“2.1.3”项下方法重复测定 6 次。结果显示,RSD

为 0.48%,表明该法精密度良好。

2.1.5 重复性试验 取白子草醇提取物 1.0 g,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液 6 份,精密吸取供试品溶液 2.0 ml,按“2.1.3”项下方法操作,测定总黄酮含量,计算 RSD。结果 RSD 为 1.84%,表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液,于显色 20 min 后每隔 10 min 测定一次吸光度,计算 RSD。结果 RSD 为 1.25%,表明供试品溶液在显色

20 min 后于 60 min 内基本稳定。

2.1.7 加样回收率试验 精密称取已知总黄酮含量的白子草醇提取物 9 份, 每份各 0.5 g, 置 25 ml 量瓶中, 每 3 份依次加入芦丁对照品 4.0、5.0、6.0 mg, 用甲醇溶解、稀释至刻度。精密量取样品溶液 2.0 ml, 按“2.1.3”项下方法操作, 计算加样回收率及 RSD。结果平均加样回收率为 98.25%, RSD 为 2.59%, 表明该法准确可靠。

2.1.8 样品中总黄酮含量测定 精密称取白子草醇提取物 1.0 g, 按“2.1.1”项下制备供试品溶液, 取供试品溶液 2.0 ml, 加甲醇至 6 ml, 按“2.1.3”项下同法操作, 计算总黄酮含量。

2.2 总多糖含量测定

2.2.1 溶液的制备 对照品溶液: 取葡萄糖对照品约 60 mg, 精密称定, 置 25 ml 量瓶中, 加水适量超

声溶解, 用水稀释至刻度, 摇匀即得。

供试品溶液: 取白子草水提取物约 0.2 g, 精密称定, 置 25 ml 量瓶中, 加水适量超声溶解, 用水稀释至刻度, 摇匀即得。

2.2.2 最大吸收波长的选择 取葡萄糖对照品溶液 0、0.5 ml 置具塞试管内, 分别加入水 1.0、0.5 ml, 加入新鲜配制的蒽酮试剂(0.2% 的硫酸蒽酮溶液) 8.0 ml, 摇匀, 置沸水浴中加热 10 min, 迅速置冰水浴冷却 10 min。以首管为空白对照, 于 500~700 nm 波长范围内扫描。结果供试品溶液与葡萄糖对照品溶液显色后最大吸收波长均在 626 nm 处, 供试品溶液显色前及空白对照溶液显色后在 626 nm 处均无吸收, 故选择 626 nm 为检测波长。结果见图 2。

2.2.3 标准曲线的绘制与线性关系考察 分别精

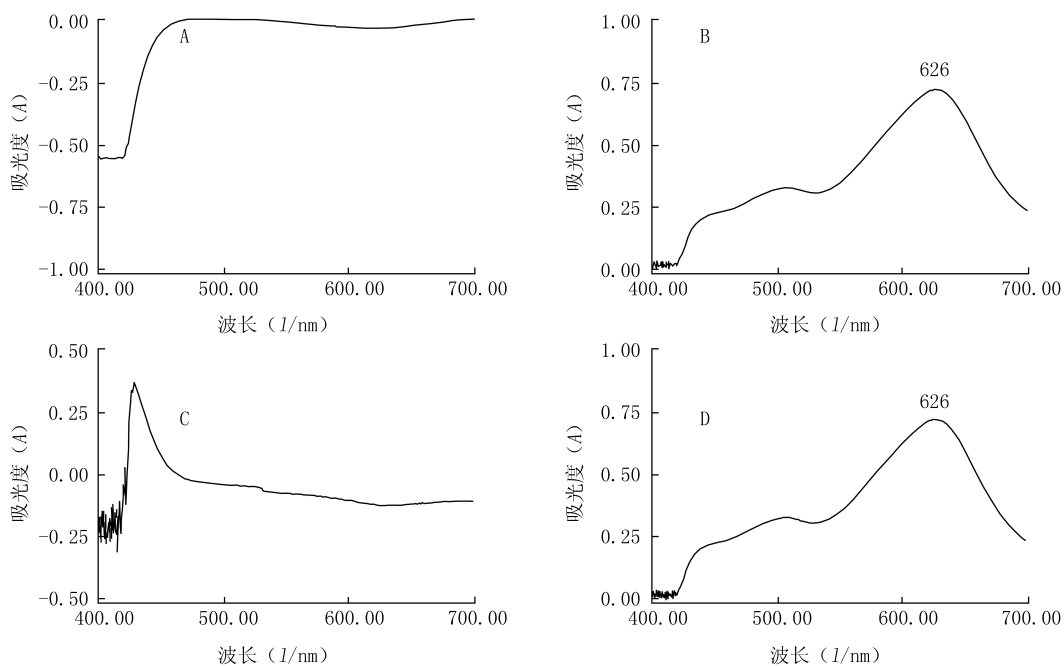


图 2 供试品溶液显色前(A)与显色后(B)及空白对照溶液显色后(C)与葡萄糖对照品溶液显色后(D)紫外扫描图

精密量取葡萄糖对照品溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml 置于具塞试管内, 加水至 1.0 ml, 摇匀, 按“2.2.2”项下方法操作, 以首管为空白对照, 于 626 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标(A), 浓度为横坐标(C, $\mu\text{g/ml}$) 绘制标准曲线。得回归方程: $A=0.0038C+0.0823$, $r=0.9996$, 表明葡萄糖在 27.03~270.30 $\mu\text{g/ml}$ 范围内, 吸光度与浓度呈良好的线性关系。

2.2.4 精密度试验 精密量取对照品溶液 0.4 ml, 按“2.2.3”项下方法操作, 连续测定 6 次, 计算 RSD。结果 RSD 为 1.11%, 表明该法精密度良好。

2.2.5 重复性试验 精密称取白子草水提取物 0.2 g, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液 6 份, 精密量取供试品溶液 0.4 ml 置于具塞试管内, 按“2.2.3”项下方法操作, 测定总多糖含量, 计算 RSD。结果 RSD 为 2.16%, 表明该法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 自显色 20 min 后每隔 10 min 测定一次吸光度, 计算 RSD。结果 RSD 为 2.06%, 表明供试品溶液在显色 20 min 后于 60 min 内基本稳定。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取已知总多糖含量的白子草水提取物 9 份, 每份各 0.1 g, 置 25 ml

量瓶中,每3份依次加入葡萄糖对照品20.8、26.0、31.2 mg,用水溶解、稀释至刻度。精密吸取样品溶液0.4 ml,按“2.2.3”项下方法操作,计算加样回收率及RSD。结果平均加样回收率为99.54%,RSD为1.97%,表明该法准确可靠。

2.2.8 样品含量测定 取白子草水提取物0.2 g,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,取供试品溶液0.4 ml,按“2.2.3”项下方法操作,计算总多糖含量。

2.3 总黄酮的提取工艺研究

2.3.1 提取次数的考察 精密称取白子草药材最粗粉(过1号筛)15 g,加20倍80%乙醇浸泡0.5 h,分别考察提取1次、2次、3次的总黄酮提取率,平行实验3次,取平均值。结果见图3。

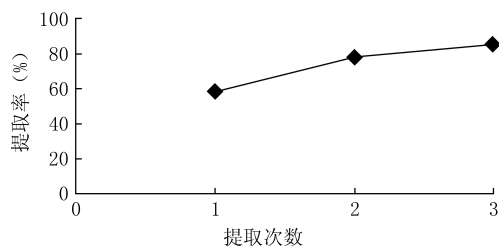


图3 提取次数对总黄酮提取率的影响

总黄酮提取率随提取次数的增加而增大,但提取3次与2次相比,总黄酮提取率增幅不大,考虑到工业生产中节约能源和资源,确定提取次数为2次。同时,由于提取次数对有效成分提取率的影响较为显著,易掩盖其他因素的影响,所以将正交试验中提取次数定为2次。

2.3.2 药材粒径的考察 精密称取5种不同粒径的白子草药材15 g(饮片,1、2、3、4号筛),其余同“2.3.1”项。结果见图4。

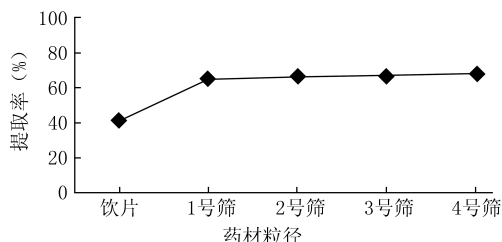


图4 药材粒径对总黄酮提取率的影响

白子草粉碎后比饮片提取率更高,粉碎后的不同粒度提取率差别不明显。鉴于药材太细易导致提取罐管路堵塞,最终确定粒径为过1号筛。

2.3.3 药材浸泡时间的考察 调整不同浸泡时间0、0.5、1.0、1.5、2.0 h,其余同“2.3.1”项,结果见图5。

药材浸泡后提取率明显提高,而0.5 h以上的浸泡时间对总黄酮提取率影响很小。因此,浸泡时

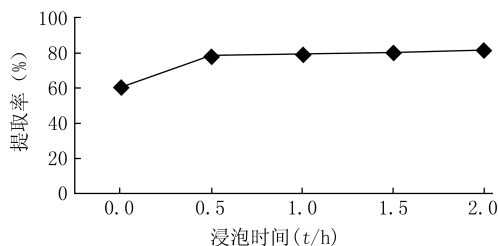


图5 浸泡时间对总黄酮提取率的影响

间定为0.5 h。

2.3.4 料/液比的考察 调整不同料液比1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30,其余同“2.3.2”项。结果见图6。

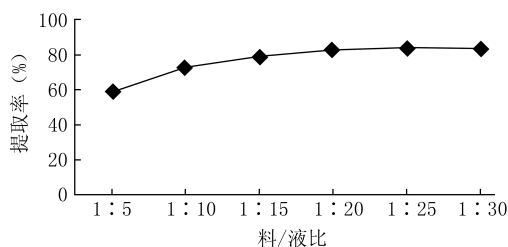


图6 料/液比对总黄酮提取率的影响

总黄酮提取率随料/液比的增加而增大,20倍量以上时提取率未见显著提高,故正交试验中溶剂量的水平选择10、15、20倍量。

2.3.5 乙醇浓度的考察 调整不同乙醇浓度50%、60%、70%、80%、90%作为提取溶剂,其余同“2.3.1”项。结果见图7。

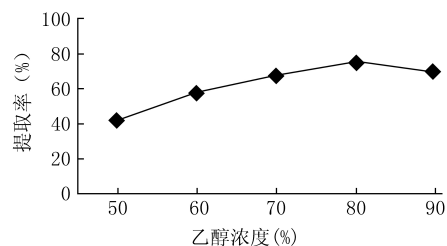


图7 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

总黄酮提取率随乙醇浓度的提高而升高,乙醇浓度高于80%后提取率又有下降趋势,因此,选择60%、70%、80%作为正交试验乙醇浓度水平。

2.3.6 提取时间的考察 总黄酮提取率随提取时间的增加而逐渐增大,但2.0 h后上升趋势逐渐平稳,故正交试验中提取时间选择1.0、1.5、2.0 h(图8)。

2.3.7 正交试验设计及结果 根据单因素实验结果,考察料/液比(A)、乙醇浓度(B)、提取时间(C)3个因素对总黄酮提取率的影响,选用L₉(3³)正交表进行正交试验,再进行方差分析,最终确定白子草总黄酮的最佳提取工艺,见表1、2。

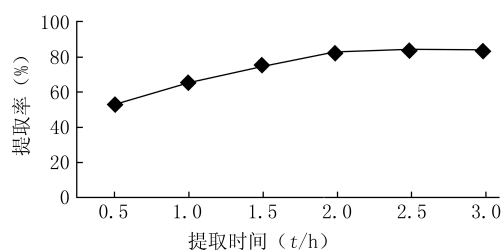


图8 提取时间对总黄酮提取率的影响

表1 正交试验因素水平表

试验序号	料/液比	乙醇浓度 (%)	提取时间 (t/h)
1	1:10	60	1.0
2	1:15	70	1.5
3	1:20	80	2.0

表2 正交试验结果 (n=3)

试验序号	A 因素	B 因素	C 因素	D(误差)	总黄酮提取率 (%)
1	1	1	1	1	64.46
2	1	2	2	2	74.91
3	1	3	3	3	80.10
4	2	1	2	3	78.45
5	2	2	3	1	81.72
6	2	3	1	2	83.33
7	3	1	3	2	80.58
8	3	2	1	3	81.03
9	3	3	2	1	88.19
K_1	73.157	74.497	76.273	78.123	
K_2	81.167	79.220	80.517	79.607	
K_3	83.267	83.873	80.800	79.860	
R	10.110	9.376	4.527	1.737	

表3 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	170.782	2	32.345	$P < 0.05$
B	131.885	2	24.978	$P < 0.05$
C	38.577	2	7.306	$P > 0.05$
D	5.280	2	1.000	

由表2、3可知, $R_A > R_B > R_C$, 各因素对总黄酮提取率的影响从大到小依次为: 料/液比 > 乙醇浓度 > 提取时间。由于A因素列: $K_3 > K_2 > K_1$; B因素列: $K_3 > K_2 > K_1$; C因素列: $K_3 > K_2 > K_1$, 且C因素无显著性差异 ($P > 0.05$)。因此, 综合考虑到工业生产, 最终确定方案为 $A_3B_3C_1$ 。即白子草总黄酮的提取方案为: 料/液比 1:20, 乙醇浓度 80%, 浸泡时间 0.5 h, 提取时间 1.0 h, 提取次数 2 次, 药材粒径为最粗粉。

2.3.8 工艺验证 精密称取白子草药材最粗粉 15 g, 以优化的总黄酮提取工艺平行进行 3 组试验, 结果总黄酮提取率分别为 88.53%、88.49%、88.60%, 表明本研究建立的总黄酮提取工艺稳定、可靠, 可用于工业化生产。

2.4 总多糖的提取工艺研究

2.4.1 正交试验设计及结果

参照文献[4]确定正

交试验各因素及水平。以水为提取溶剂, 考察料/液比(A)、提取温度(B)、提取时间(C)3个因素对总多糖提取率的影响, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验, 再进行极差分析, 得出白子草总多糖的最佳提取工艺, 见表4、5。

表4 正交试验因素水平表

试验序号	料/液比	提取温度 (t/°C)	提取时间 (t/h)
1	1:10	80	1.0
2	1:15	90	1.5
3	1:20	100	2.0

由表5、6可知, $R_A > R_B > R_C$, 各因素对总多糖提取率的影响从大到小依次为: 料/液比 > 提取温度 > 提取时间。由于A因素列: $K_3 > K_2 > K_1$; B因

素列: $K_2 > K_1 > K_3$; C 因素列: $K_2 > K_3 > K_1$, 且 B 和 C 因素均无显著性差异 ($P > 0.05$)。因此, 综合考虑工业生产的需求, 最终确定方案为 $A_3 B_1 C_1$ 。白子草总多糖的提取方案为: 提取溶剂为水, 乙醇醇提后的药渣以料/液比 1:20, 提取温度 80 °C, 提取时间 1.0 h, 提取次数 2 次。

表 5 正交试验结果 ($n=3$)

试验序号	A 因素	B 因素	C 因素	D(误差)	总多糖提取率(%)
1	1	1	1	1	71.65
2	1	2	2	2	74.32
3	1	3	3	3	70.45
4	2	1	2	3	77.53
5	2	2	3	1	81.79
6	2	3	1	2	76.68
7	3	1	3	2	80.71
8	3	2	1	3	83.65
9	3	3	2	1	81.68
K_1	72.14	76.63	77.33	78.38	
K_2	78.67	79.92	77.84	77.24	
K_3	82.01	76.27	77.65	77.21	
R	9.87	3.65	0.52	1.16	

表 6 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	151.28	2	57.173	$P < 0.05$
B	24.28	2	9.175	$P > 0.05$
C	0.41	2	0.155	$P > 0.05$
D	2.65	2	1.000	

2.4.2 工艺验证 取白子草药材 80% 乙醇提取后的药渣, 以优化的总多糖提取工艺平行进行 3 组试验, 结果总多糖提取率分别为 83.75%、83.51%、83.62%, 表明本研究建立的总多糖提取工艺稳定、可靠, 可用于工业化生产。

3 讨论

本课题组前期比较了超声法、微波法及回流法对白子草总黄酮提取率的影响, 结果表明超声法总黄酮提取率最高, 其次是回流法^[5]。但超声法不适合工业化生产, 故本研究采用回流法对白子草总黄酮提取工艺进行了系列研究。此外, 本研究也是首次对白子草中总黄酮及总多糖成分同时进行提取工艺研究, 充分开发利用了白子草中的降血糖活性成分, 以白子草中总黄酮和总多糖为组方的降血糖制剂有望比单一组分制剂作用更强, 后续研究将进行相关药效试验。

采用回流提取法, 通过正交试验设计最终优化, 建立了白子草中总黄酮及总多糖的提取工艺: 药材最粗粉, 以 20 倍量 80% 乙醇浸泡 0.5 h, 回流提取 2 次, 每次 1.0 h; 醇提后药渣加入 20 倍量纯净水, 80 °C 回流提取 2 次, 每次 1.0 h。所得总黄酮及总多糖提取率均大于 80%, 工艺稳定、可靠, 可用于工业化生产。

【参考文献】

- [1] 黄有霖. 福建省中药材标准[S]. 福建: 海风出版社, 2006: 70-73.
- [2] 胡勇, 李维林, 林厚文, 等. 白背三七地上部分降血糖作用研究[J]. 西南林学院学报, 2007, 27(1): 54-58.
- [3] 姜曼花, 胡剑卓, 邱文高, 等. 白背三七多糖和黄酮降血糖及耐缺氧作用[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(13): 1074-1076.
- [4] 马正东, 陈磊, 宋洪涛, 等. 白背三七水提取物对 2 型糖尿病大鼠的降血糖作用及其机制[J]. 中草药, 2010, 41(4): 623-626.
- [5] 俞浩, 毛斌斌, 周国梁, 等. 白背三七总黄酮对糖尿病大鼠的降血糖作用[J]. 食品科学, 2013, 34(15): 295-298.
- [6] 张钱钱. 白子草多糖的分离纯化及其降血糖作用研究[D]. 福建: 福建中医药大学, 2014.
- [7] 王津江, 陈磊, 宋洪涛, 等. 白背三七总黄酮的提取工艺研究[J]. 中国药师, 2009, 12(2): 146-149.

[收稿日期] 2015-10-20 [修回日期] 2016-04-28

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 506 页)

- [23] Fujimoto K, Fukagawa K, Sakata T, et al. Suppression of food intake by apolipoprotein A-IV is mediated through the central nervous system in rats[J]. J Clin Invest, 1993, 91(4): 1830-1833.
- [24] Hollander P, Maggs DG, Ruggles JA, et al. Effect of pramlintide on weight in overweight and obese insulin-treated type

2 diabetes patients[J]. Obes Res, 2004, 12(4): 661-668.

- [25] Obici S, Feng Z, Morgan K, et al. Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake[J]. Diabetes, 2002, 51(2): 271-275.

[收稿日期] 2016-06-02 [修回日期] 2016-07-19

[本文编辑] 李睿旻