

布渣叶总黄酮离子液体协同超声辅助提取工艺考察及其调血脂活性研究

黄志恒¹, 宋延秋², 闫东升³

1. 河南省中医药研究院附属医院 药学部, 河南 郑州 450004

2. 河南省南阳医学高等专科学校第二附属医院 药剂科, 河南 南阳 473000

3. 河南中医药大学第三附属医院 急诊科, 河南 郑州 450000

摘要: **目的** 探讨布渣叶总黄酮 (total flavones from *Microcos paniculata*, MPTF) 的高效绿色环保提取方法, 并考察其调血脂活性。 **方法** 采用离子液体协同超声辅助提取 MPTF, 对提取工艺进行单因素实验及正交试验考察; 采用高脂饲料造模, 将 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、阳性对照组 (瑞舒伐他汀钙片 5.2 mg/kg)、高脂模型组和 MPTF 低、中、高剂量组 (ig 给药 MPTF 300、600、900 mg/kg), 每组各 10 只, 测定总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、低密度脂蛋白 (LDL-C) 水平。 **结果** 离子液体超声辅助提取 MPTF 的最佳工艺条件: 离子液体为 [BMIM]Cl, 浓度为 0.30 mol/L, 料液比为 1:40, 提取溶剂为 60% 乙醇水溶液, 提取时间为 30 min, 提取温度为 50 °C; 验证实验结果表明, 该提取工艺所得总黄酮提取率高, 工艺稳定。调血脂实验结果表明, MPTF 各剂量组均能够降低 TC、TG、LDL-C 水平, 升高 HDL-C 水平 ($P < 0.05$), 且随着 MPTF 剂量增加各指标变化趋势明显, 具有一定的剂量依赖性。 **结论** 离子液体协同超声辅助提取 MPTF 工艺稳定可行, 为离子液体协同超声辅助提取中药中难溶性有效成分提供参考; MPTF 提取物具有较好的调血脂作用。 **关键词:** 布渣叶; 总黄酮; 离子液体; 超声提取; 调血脂活性; 总胆固醇; 三酰甘油; 高密度脂蛋白; 低密度脂蛋白

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)24-5995-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.012

Investigation of ion liquid combined with ultrasound-assisted extraction technology of total flavones from *Microcos paniculata* and study on its lipid regulation activity

HUANG Zhi-heng¹, SONG Yan-qiu², YAN Dong-sheng³

1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Henan Academy of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China

2. Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital of Nanyang Medical Vocational School, Henan Province, Nanyang 473000, China

3. Department of Emergency, The Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Abstract: **Objective** To explore the high-efficiency green environmental extraction method of total flavones from *Microcos paniculata* (MPTF), and investigate its lipid-lowering activity. **Methods** The ionic liquid was used to assist the ultrasonic extraction of MPTF, and the extraction process was investigated by single factor experiment and orthogonal test. Wistar rats were randomly divided into normal control group and positive control group (Resuvastatin Calcium Tablets 5.2 mg/kg) by high fat diet, high-fat model group and MPTF low, medium and high dose groups (ig dose MPTF 300, 600, 900 mg/kg), with 10 rats in each group. The total cholesterol (TC), glycerol lipid (TG), high density lipoprotein (HDL-C), low density lipoprotein (LDL-C) levels were determined. **Results** The optimum process conditions for ultrasonic-assisted extraction of MPTF by ionic liquid were as follow: ionic liquid was [BMIM]Cl at concentration of 0.30 mol/L; ratio of material to liquid was 1:40, extraction solvent was 60% ethanol aqueous solution with extraction time of 30 min at 50 °C. The verification test results showed that the extraction rate of total flavonoids obtained from the extraction process was high and the process was stable. The results of lipid-lowering test showed that the levels of TC, TG and LDL-C were decreased in all doses of MPTF groups, and the level of HDL-C was increased ($P < 0.05$). With the increase of MPTF dose, the indicators showed obvious trends in a dose-dependent manner. **Conclusion** The ionic liquid combined with ultrasonic-

收稿日期: 2019-07-10

作者简介: 黄志恒 (1973—), 男, 主管药师, 从事中药药效物质基础研究。Tel: 13938430177 E-mail: shccc1230@163.com

assisted extraction of MPTF is stable and feasible, which provides reference for ionic liquid synergistic ultrasound-assisted extraction of poorly soluble active ingredients in Chinese materia medica. MPTF extract has better lipid-lowering effect.

Key words: *Microcos paniculata* L.; total flavonoids; ionic liquid; ultrasonic extraction; hypolipidemic activity; total cholesterol; triglyceride; high-density lipoprotein; low-density lipoprotein

布渣叶 *Microcos paniculata* L. 为椴树科破布叶属植物破布树的叶, 是一种岭南习用草药, 其味甘、淡, 性微寒。其味淡、微酸, 性平、凉, 无毒, 归肝经、脾经、胃经^[1]。布渣叶具有清热消滞、清热去火、消食利滞、利湿退黄的功效, 可用于治疗感冒、湿热食滞之脘腹痛、食少泄泻、湿热黄疸等症^[2]。民间习惯用该品煎茶, 以作为夏季饮料, 具有解渴、开胃的作用^[4]。布渣叶中含有黄酮、生物碱、挥发油、有机酸、鞣质、酚类等有效成分, 其中黄酮类物质是其主要有效成分, 具有调血脂^[5]、降血糖、抗血栓、清除体内自由基、增强肌体免疫功能等功效, 黄酮类物质还可以改善糖脂代谢^[6]、保护肝肾组织、治疗心血管疾病, 并且具有抗氧化和延缓衰老的作用。

目前, 布渣叶中总黄酮 (total flavones from *Microcos paniculata*, MPTF) 的提取方法主要有索氏提取法、溶剂回流提取法、超声波提取法^[7]、微波辅助提取法以及酶辅助提取法^[4]、十二烷基硫酸钠辅助提取法^[8]、表面活性剂协同微波提取法^[9]等。这些方法具有提取率低、提取时间长、能耗大等缺点。室温离子液体具有结构可调控、不易挥发以及对目标物具有一定选择性等特点, 被认为是可替代传统溶剂的新型绿色溶剂, 近年来在中药及天然药物资源性化学成分研究中受到广泛关注^[10-14]。本实验尝试将超声提取与离子液体相结合, 以期采用绿色方式提取 MPTF 并提高 MPTF 的提取效率。

1 仪器与材料

1.1 仪器

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; 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; RHTQ-G-1 型实验室超声波提取罐, 处理能力为物料 1 kg/批, 设备有效容积 10 L, 超声功率 300~500 W, 超声频率 20 kHz, 济宁荣汇超声波设备有限公司。

1.2 材料

芦丁对照品, 批号 100080-201610, 质量分数 99.2%, 购于中国食品药品检定研究院; 布渣叶

Microctis Folium 药材为市售, 经河南省中医药研究院药剂科主管中药师黄志恒鉴定为椴树科布渣叶属植物破布树 *Microcos paniculata* L. 的干燥叶。无水乙醇、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、甲醇均为分析纯, 北京化工厂; 实验用水为三次蒸馏水, 0.45 μm 滤膜, 美国安捷伦公司。离子液体 1-乙基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ([EMIM][BF₄])、1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ([BMIM][BF₄])、1-丁基-3-甲基咪唑氯盐 ([BMIM]Cl)、1-丁基-3-甲基咪唑溴盐 ([BMIM]Br)、1-丁基-3-甲基咪唑硝酸盐 ([BMIM][NO₃])、1-丁基-3-甲基咪唑硫酸氢盐 ([BMIM][HSO₄]), 质量分数均 $\geq 98\%$, 上海思域化工科技有限公司。

阳性对照组采用瑞舒伐他汀钙片, 以药物说明书的临床日用量作为参考, 根据剂量换算方法“体表面积比”的换算形式, 换算动物实验剂量作为临床等效剂量, 瑞舒伐他汀片大鼠的药效剂量为 5.2 mg/kg, 实验用药均用水按剂量稀释后 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱进行保存, 每天 ig 前进行加热处理。基础饲料由河南省医学实验动物中心提供, 高脂饲料为 5%猪油、1%胆固醇、10%蛋黄粉、85%基础饲料混合配制。

SD 大鼠雌雄各半, 共 100 只, 体质量 180~250 g, 购自河南省医学实验动物中心, 动物合格证号 0094687。

2 方法与结果

2.1 总黄酮测定

总黄酮的测定参照文献方法^[4,15]进行。

2.1.1 芦丁对照品溶液的制备 精密称取在 120 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒定质量的芦丁对照品 6.85 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加乙醇适量, 超声使溶解, 放冷, 加乙醇至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 0.274 mg/mL 的芦丁对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取布渣叶药材粉末 (过四号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇溶液 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70%乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 吸取续滤液, 即得布渣叶供试品溶液。

取 MPTF 粉末约 50 mg, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇溶液 50 mL, 密塞, 称

定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70%乙醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 吸取续滤液, 即得 MPTF 供试品溶液。

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

2.1.4 线性关系考察 精密量取芦丁对照品溶液 1、3、5、7、9、11、13 mL, 分别置 50 mL 量瓶中, 分别加水至 13 mL, 加 5%亚硝酸钠溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 10%硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加氢氧化钠试液 10 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以相应试剂为空白, 按照紫外-可见分光光度法(《中国药典》四部 0401) 实验, 在 500 nm 波长处测定吸光度 (A), 以 A 值为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=0.7083X-0.0401$, $r=0.9998$, 结果表明芦丁在 5.48~71.24 $\mu\text{g/mL}$ 与 A 值呈良好线性关系。

2.1.5 样品测定 取“2.1.2”项下制备的布渣叶药材供试品溶液, 按照“2.1.4”项下方法操作并测定, 结果布渣叶药材中总黄酮为 179.06 mg/g。

总黄酮提取率=浸膏中总黄酮质量/药材质量

2.2 指标成分测定

参考文献方法同时测定布渣叶中牡荆苷、异牡荆苷和水仙苷 3 种成分^[16-19]。

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex Kinetex XB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.5%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~22 min, 16%~30%甲醇; 22~55 min, 30%~45%甲醇; 55~80 min, 45%~62%甲醇; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 332 nm; 进样量 10 μL 。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别取牡荆苷、异牡荆苷、水仙苷对照品 8.90、10.35、8.20 mg, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 制成含牡荆苷、异牡荆苷、水仙苷分别为 0.356、0.414、0.328 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取布渣叶药材粉末(过四号筛) 约 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞磨口锥

形瓶中, 精密加入 50%甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 (700 W, 40 kHz) 45 min, 放冷, 用 50%甲醇补足缺失的质量, 滤过, 取续滤液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得布渣叶供试品溶液。

取 MPTF 粉末(过四号筛) 约 100 mg, 精密称定, 置 50 mL 具塞磨口锥形瓶中, 精密加入 50%甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 (700 W, 40 kHz) 45 min, 放冷, 用 50%甲醇补足缺失的质量, 滤过, 取续滤液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得 MPTF 供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.2”项下配制的对照品溶液适量, 置 10 mL 量瓶内, 用甲醇分别制成系列质量浓度的混合对照品溶液, 分别精密吸取 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 以进样质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程分别为牡荆苷 $Y=4037.51X-9630.78$, $r=0.9996$; 异牡荆苷 $Y=3926X-8802.95$, $r=0.9999$; 水仙苷 $Y=1985.15X-9792.59$, $r=0.9995$, 结果表明牡荆苷在 3.56~35.60 $\mu\text{g/mL}$ 、异牡荆苷在 4.14~41.40 $\mu\text{g/mL}$ 、水仙苷在 3.28~32.80 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 样品测定 取“2.2.3”项下制备的布渣叶药材供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 结果布渣叶药材中牡荆苷、异牡荆苷和水仙苷分别为 0.688、1.492、5.873 mg/g。

指标成分提取率=浸膏中各指标成分质量/药材质量

2.3 离子液体协同超声辅助提取 MPTF

取布渣叶粗粉 50 g, 放入到超声波提取罐中, 加入适量的提取溶剂及离子液体(初次提取时多加 2 倍量溶剂), 在设定的温度和超声波功率下提取, 滤过, 测定提取液中 MPTF 和指标成分含量及浸膏得率(浸膏得率=浸膏质量/药材质量), 以 MPTF 和指标成分提取率(提取率=提取液中总黄酮或指标成分质量/药材质量)及浸膏得率的综合评分(综合评分=MPTF 提取率/MPTF 提取率之和×0.5+牡荆苷提取率/牡荆苷提取率之和×0.1+异牡荆苷提取率/异牡荆苷提取率之和×0.1+水仙苷提取率/水仙苷提取率之和×0.1+浸膏得率/浸膏得率之和×0.2)为考察指标, 分别考察离子液体种类、离子液体浓度、乙醇体积分数、提取温度、料液比、提取时间对 MPTF 提取的影响, 并在单因素实验基础上, 对主要影响因素进行正交试验。

2.4 单因素考察提取工艺参数

2.4.1 离子液体种类对 MPTF 提取的影响 取布渣叶粗粉 6 份, 每份 50 g, 放入超声波提取罐中, 加入浓度为 0.3 mol/L 的不同离子液体的 50%乙醇水溶液, 离子液体分别为[EMIM][BF₄]、[BMIM][BF₄]、[BMIM]Cl、[BMIM]Br、[BMIM][NO₃]、[BMIM][HSO₄], 水浴温度控制在 50 ℃, 料液比为 1:40, 超声波功率为 400 W, 提取 30 min, 滤过, 滤液回收溶剂后真空干燥, 得浸膏, 计算浸膏得率。分别按照“2.1”“2.2”项方法测定总黄酮提取率和 3 种指标成分提取率, 计算综合评分, 结果见表 1。可见离子液体为[BMIM]Cl 时, 综合评分最高, 所以选择[BMIM]Cl 离子液体进行后续实验。

2.4.2 离子液体浓度对 MPTF 提取的影响 取布渣叶粗粉 6 份, 每份 50 g, 放入超声波提取罐中, 加入浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mol/L 的[BMIM]Cl 的 60%乙醇水溶液, 其他操作同“2.4.1”项, 结果见表 2。当[BMIM]Cl 的浓度在 0.05~0.30 mol/L 时, 离子液体的浓度越高, 综合评分越大, 在其浓度提高到 0.30 mol/L 时, 综合评分达到了峰值。而其浓度高于 0.30 mol/L 时, 随着离子液体浓度的增加, 综合评分略有降低的趋势。因此选择离子液体[BMIM]Cl 浓度为 0.30 mol/L 进行后续实验。

表 1 离子液体种类对 MPTF 提取的影响

Table 1 Effect of ion liquid types on MPTF extraction

离子液体种类	提取率/(mg·g ⁻¹)				浸膏 得率/%	综合 评分
	总黄酮	牡荆苷	异牡荆苷	水仙苷		
[EMIM][BF ₄]	140.25	0.310	0.745	4.703	20.446	15.543
[BMIM][BF ₄]	146.58	0.589	1.247	5.201	23.059	18.484
[BMIM]Cl	158.23	0.601	1.064	5.782	22.908	19.070
[BMIM]Br	141.54	0.338	0.748	4.025	19.994	15.398
[BMIM][NO ₃]	143.79	0.395	0.927	2.940	20.263	15.688
[BMIM][HSO ₄]	147.11	0.337	0.897	3.193	21.008	15.813

表 2 离子液体浓度对 MPTF 提取的影响

Table 2 Effect of ion liquid concentration on MPTF extraction

离子液体浓度/ (mol·L ⁻¹)	提取率/(mg·g ⁻¹)				浸膏 得率/%	综合 评分
	总黄酮	牡荆苷	异牡荆苷	水仙苷		
0.05	140.68	0.485	0.779	4.062	20.825	14.937
0.10	148.83	0.536	0.853	4.418	21.458	15.874
0.20	155.54	0.566	1.119	4.691	22.093	16.967
0.30	162.24	0.601	1.201	4.997	22.447	17.733
0.40	158.79	0.614	1.094	5.064	22.661	17.459
0.50	157.17	0.606	0.868	5.182	22.809	17.030

2.4.3 提取溶剂乙醇体积分数对 MPTF 提取的影响 取布渣叶粗粉 6 份, 每份 50 g, 放入超声波提取罐中, 加入浓度为 0.30 mol/L 的[BMIM]Cl 的乙醇水溶液, 乙醇体积分数分别为 40%、50%、60%、70%、80%、90%, 其他操作同“2.4.1”项, 结果见表 3。当乙醇体积分数小于 60%时, 随着乙醇体积分数的上升, 综合评分不断增加的趋势非常明显, 当乙醇体积分数达到 60%时, 综合评分也达到了最高值。当乙醇体积分数高于 60%时, 随着乙醇体积分数的持续上升, 综合评分却表现出不断下降的趋势。因此选择 60%乙醇水溶液为后续实验的提取溶剂。

2.4.4 料液比对 MPTF 提取的影响 取布渣叶粗粉 6 份, 每份 50 g, 放入超声波提取罐中, 加入浓度为 0.30 mol/L 的[BMIM]Cl 的 60%乙醇水溶液, 料液比分别为 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70, 其他操作同“2.4.1”项, 结果见表 4。当料液比在 1:20~1:40 时, 随着料液比的增加, 综合评分显著增加, 当料液比在 1:40~1:70 时, 随着料液比的增加, 综合评分缓慢增加, 且从数据来看, 黄酮类成分量变化很小, 综合评分增加主要是因为浸膏得率的明显增加, 可能是因为料液比过高其他非黄酮类物质的溶出也越多, 杂质增加, 使得总黄酮纯度降低, 且后续回收溶剂等处理过程需要消耗

表 3 提取溶剂乙醇体积分数对 MPTF 提取的影响

Table 3 Effect of extracting volume fraction of solvent ethanol on MPTF extraction

乙醇/ %	提取率/(mg·g ⁻¹)				浸膏 得率/%	综合 评分
	总黄酮	牡荆苷	异牡荆苷	水仙苷		
40	149.58	0.471	0.980	4.503	23.670	16.008
50	158.23	0.573	1.064	4.899	22.908	16.920
60	162.24	0.601	1.201	5.182	22.447	17.449
70	155.69	0.614	1.156	4.865	22.513	16.964
80	148.79	0.617	1.217	4.906	22.074	16.634
90	140.11	0.596	1.204	4.974	21.561	16.027

表 4 料液比对 MPTF 提取的影响

Table 4 Effect of material to liquid ratio on MPTF extraction

料液比	提取率/(mg·g ⁻¹)				浸膏 得率/%	综合 评分
	总黄酮	牡荆苷	异牡荆苷	水仙苷		
1:20	139.88	0.452	0.719	3.994	18.785	13.929
1:30	154.06	0.513	1.031	4.659	20.794	15.855
1:40	162.24	0.601	1.201	4.997	22.447	17.162
1:50	162.39	0.606	1.209	5.021	23.625	17.374
1:60	162.79	0.610	1.214	5.003	25.077	17.618
1:70	163.01	0.613	1.198	4.986	28.237	18.063

更多能源、时间等资源,不符合生产实际,因此采用 1:40 的料液比进行后续的单因素实验。

2.4.5 提取温度对 MPTF 提取的影响 取布渣叶粗粉 6 份,每份 50 g,放入超声波提取罐中,加入浓度为 0.30 mol/L 的 [BMIM]Cl 的 60%乙醇水溶液,料液比为 1:40,设定提取温度分别为 30、40、50、60、70、80 °C,其他操作同“2.4.1”项,结果见表 5。随着提取温度的升高,综合评分逐渐提高,当提取温度达到 50 °C 时,综合评分也增加到了最大值。继续升高提取温度,综合评分却表现出不断降低的趋势,且从数据还可以看出,除了浸膏得率快速增加外,黄酮类成分提取率明显下降。可能是因为随着提取温度的不断上升,使提取溶剂的运动速度及频率不断增大,使之更容易渗透到布渣叶组织细胞中,加速物质溶出,从而增加综合评分。但温度过高,可能会导致部分黄酮类化合物的结构被破坏,其他成分溶出增多。因此,选择提取温度 50 °C 进行后续实验。

2.4.6 提取时间对 MPTF 提取的影响 取布渣叶粗粉 7 份,每份 50 g,放入超声波提取罐中,加入浓度为 0.30 mol/L 的 [BMIM]Cl 的 60%乙醇水溶液,料液比为 1:40,水浴温度控制在 50 °C,分别提取 10、20、30、40、50、60 min,其他操作同“2.4.1”项,结果见表 6。随着提取时间的不断延长,综合

评分也随着时间延长而升高,提取时间 50 min 时可使综合评分升高到极大值,再延长提取时间,黄酮类成分开始逐渐降低,但浸膏得率却明显增加。其原因为延长提取时间可以使布渣叶中的总黄酮的溶出增加,但如果提取时间过长会使黄酮类化合物的结构被破坏,从而使提取率下降,同时还使其他成分溶出增加。因此选择提取时间为 50 min 进行后续试验。

2.5 正交试验优化提取工艺参数

在上述单因素实验中,料液比达到 1:40 后对 MPTF 提取影响很小,且过多的溶剂用量会使后续处理变得困难,所以在正交试验中将料液比固定为 1:40,选择 [BMIM]Cl 离子液体浓度 (A)、提取溶剂乙醇的体积分数 (B)、提取时间 (C) 及提取温度 (D) 作为因素进行考察,以综合评分为考察指标,进行正交试验,进一步优化 MPTF 的提取工艺。

取布渣叶粗粉 9 份,每份 50 g,放入超声波提取罐中,按 4 因素 3 水平正交试验表进行试验设计,在此条件下对 MPTF 进行提取,并按照“2.1”“2.2”项方法测定,计算综合评分,实验设计与结果见表 7。正交试验结果表明,离子液体超声辅助提取 MPTF 各因素的影响大小为离子液体浓度影响最大,其次是提取时间,然后为提取温度,影响最小的是提取溶剂的乙醇体积分数。

方差分析结果 (表 8) 表明各因素对综合评分的影响均不具有显著性。因此,离子液体超声辅助提取 MPTF 的最佳工艺条件为 A₂B₂C₂D₂,即离子液体为 [BMIM]Cl,浓度为 0.30 mol/L,料液比为 1:40,提取溶剂为 60%乙醇水溶液,提取时间为 50 min,提取温度为 50 °C。

2.6 最佳提取工艺验证实验

取布渣叶粗粉 5 份,每份 50 g,放入超声波提取罐中,加入 2 000 mL 浓度为 0.35 mol/L 的 [BMIM]Cl 的 60%乙醇水溶液,水浴温度控制在 50 °C,提取时间为 50 min,其他操作同“2.4.1”项,结果见表 9。有数据可知,各考察指标的 RSD 均小于 5%,结果表明优选的 MPTF 离子液体超声辅助提取工艺比较稳定,具有实际应用价值。

2.7 MPTF 调血脂作用研究

2.7.1 分组及造模 高脂饲料造模的同时给予 MPTF 预防高血脂。基础饲料进行适应性喂养大鼠 5 d 后,将大鼠随机分为 5 组,每组大鼠 10 只,雌雄各半,雌雄分开,分别为正常对照组 (以基础饲料喂养),

表 5 提取温度对 MPTF 提取的影响

Table 5 Effect of extraction temperature on MPTF extraction

提取温度/°C	提取率/(mg·g ⁻¹)				浸膏得率/%	综合评分
	总黄酮	牡荆苷	异牡荆苷	水仙苷		
30	151.56	0.530	1.107	4.215	21.135	15.878
40	158.84	0.583	1.169	4.609	21.984	16.786
50	162.24	0.601	1.201	4.997	22.447	17.281
60	160.01	0.577	1.155	4.583	24.892	17.194
70	155.75	0.526	1.024	4.206	27.573	16.834
80	139.88	0.501	0.992	3.905	29.668	16.027

表 6 提取时间对 MPTF 提取的影响

Table 6 Effect of extraction time on MPTF extraction

提取时间/min	提取率/(mg·g ⁻¹)				浸膏得率/%	综合评分
	总黄酮	牡荆苷	异牡荆苷	水仙苷		
10	124.93	0.386	0.753	3.054	17.664	12.941
20	149.56	0.549	1.084	4.562	21.795	16.471
30	162.24	0.601	1.201	4.997	22.447	17.765
40	160.19	0.605	1.175	5.018	23.131	17.733
50	158.81	0.589	1.162	4.895	24.989	17.814
60	153.78	0.501	1.158	4.516	26.444	17.332

表 7 MPTF 提取的正交试验设计与结果

Table 7 Design and results of orthogonal test of MPTF extraction

试验号	A/(mol·L ⁻¹)	B/%	C/min	D/°C	提取率/(mg·g ⁻¹)				浸膏得率/%	综合评分
					总黄酮	牡荆苷	异牡荆苷	水仙苷		
1	0.25 (1)	55 (1)	45 (1)	45 (1)	155.70	0.516	1.023	4.794	20.703	10.624
2	0.25 (1)	60 (2)	50 (2)	50 (2)	161.94	0.573	1.133	4.885	21.837	11.087
3	0.25 (1)	65 (3)	55 (3)	55 (3)	160.55	0.544	1.118	4.828	21.695	10.975
4	0.30 (2)	55 (1)	50 (2)	55 (3)	161.72	0.605	1.199	4.997	22.460	11.293
5	0.30 (2)	60 (2)	55 (3)	45 (1)	162.45	0.589	1.204	5.019	22.451	11.295
6	0.30 (2)	65 (3)	45 (1)	50 (2)	162.06	0.612	1.191	4.982	22.024	11.263
7	0.35 (3)	55 (1)	55 (3)	50 (2)	160.27	0.577	1.202	5.006	22.525	11.200
8	0.35 (3)	60 (2)	45 (1)	55 (3)	161.04	0.551	1.195	4.923	22.139	11.111
9	0.35 (3)	65 (3)	50 (2)	45 (1)	160.49	0.586	1.186	4.951	22.083	11.152
K ₁	32.686	33.117	32.998	33.071						
K ₂	33.851	33.493	33.532	33.550						
K ₃	33.463	33.390	33.470	33.379						
R	1.165	0.376	0.534	0.479						

表 8 方差分析

Table 8 Analysis of variance

变异来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.234 6	2	9.321 7	$P>0.05$
B	0.025 2	2	1.000 0	
C	0.056 9	2	2.529 4	$P>0.05$
D (误差)	0.039 3	2	1.560 8	$P>0.05$
$F_{0.05}(2, 2)=19.00$				

表 9 最佳提取工艺验证实验

Table 9 Optimal extraction process validation test

实验号	提取率/(mg·g ⁻¹)				浸膏得率/%	综合评分
	总黄酮	牡荆苷	异牡荆苷	水仙苷		
1	163.05	0.610	1.193	5.004	22.668	20.094
2	161.06	0.591	1.184	4.862	22.075	19.731
3	162.51	0.606	1.201	4.990	22.457	20.018
4	162.17	0.598	1.215	5.022	22.931	20.091
5	163.78	0.615	1.208	4.835	22.414	20.067

高脂模型组 (采用高脂饲料喂养), MPTF 低、中、高剂量组 (给予高脂饲料的同时分别进行 300、600、900 mg/kg 的 MPTF ig 给药, 每天 1 次), 阳性对照组 (给予高脂饲料的同时 ig 给予瑞舒伐他汀钙片 5.2 mg/kg, 每天 1 次), 正常对照组和高脂模型组分别给予等量的饮水, 于第 4 周给药后, 禁食 12 h 后, 股动脉取血并分离血清。

2.7.2 检测指标和方法^[20-24] 于末次给药后, 禁食不禁水 12 h, 采用乙醚麻醉, 经腹主动脉采集血液, 7 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, -80 °C 待测,

采用全自动生化分析仪按照试剂盒说明书检测血清总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、低密度脂蛋白 (LDL-C) 水平。

2.7.3 统计学处理 数据均采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 正态分布资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 遵循正态分布而且方差齐性, 多组间的比较采用方差分析; 两两比较采用 SNK-q 法; $P<0.05$ 具有统计学意义。

2.7.4 MPTF 对血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 的影响 与正常对照组相比, 模型组显著升高 TC、TG、LDL-C 水平, 降低 HDL-C 水平 ($P<0.05$); 与模型组相比, 阳性药以及 MPTF 各剂量组均能够降低 TC、TG、LDL-C 水平, 升高 HDL-C 水平 ($P<0.05$), 且随着 MPTF 剂量增加各指标变化趋势明显, 具有一定的剂量依赖性, 结果见表 10。

3 讨论

本实验采用离子液体协同超声辅助提取法, 对布渣叶中总黄酮类物质的提取工艺进行了探究。离子液体协同超声辅助提取技术是将“绿色溶剂”离子液体与超声辅助提取技术相结合的一种新型提取方法, 不仅具有快速、高效的特点, 而且溶剂用量少、耗能低、可以广泛用于中药中有效成分的提取。本实验利用离子液体的增溶作用, 降低固-液相界面张力, 从而有利于提取水溶性差的有效成分。

实验测得离子液体协同超声辅助提取布渣叶中总黄酮的提取率较高, 与传统的热回流提取方法相比, 提取效率高, 避免了活性物质在高温的条件下失活, 也克服了传统提取方法中所存在的易碳化、

表 10 MPTF 对大鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平的影响

Table 10 Effect of MPTF on serum TC, TG, HDL-C and LDL-C levels in rats

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)
正常对照	0	1.980±0.404	0.535±0.254	1.219±0.329	2.255±0.497
高脂模型	0	8.290±1.660*	4.683±1.221*	1.104±0.261*	9.543±1.886*
阳性对照	5.2	5.949±2.765* ^Δ	3.298±0.923* ^Δ	1.809±0.966* ^Δ	6.231±1.624* ^Δ
MPTF	300	5.445±1.802* ^Δ	3.413±1.728* ^Δ	2.323±0.782* ^Δ	6.587±0.982* ^Δ
	600	5.214±1.507* ^Δ	2.975±1.599* ^Δ	2.508±1.377* ^Δ	6.304±2.377* ^Δ
	900	4.978±1.785* ^Δ	2.771±1.418* ^Δ	2.617±1.184* ^Δ	6.167±1.481* ^Δ

与正常对照组比较: **P*<0.05; 与模型组比较: ^Δ*P*<0.05**P*<0.05 vs normal control group; ^Δ*P*<0.05 vs model group

易水解、有机溶剂消耗量大、易燃、易爆的缺点。离子液体的极性可控,可以对中药中的复杂成分进行选择提取,然而该技术在中药有效成分提取中的应用还不够成熟,将来还需要进一步的探索。

本研究首先对提取工艺进行了考察,然后在单因素试验的基础上构建了正交试验,优化了布渣叶中总黄酮类物质的离子液体协同超声辅助提取工艺,该工艺能耗低、耗时短、操作简单、稳定性好,是布渣叶中黄酮类物质提取的有效方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 江苏新医学院编. 中药大辞典 (下册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [3] 广东中药材标准 (第一册) [S]. 2004.
- [4] 陈雪婷, 徐文杰, 李智勇. 酶解法辅助提取布渣叶总黄酮的工艺优选 [J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(10): 176-179.
- [5] 谭志灿. 广东地道药材布渣叶质量评价及调血脂物质基础研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [6] 刘昌乐. 布渣叶总黄酮苷的降脂活性及其芹菜素碳苷的定性定量分析 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [7] 李智勇, 孙冬梅, 王洛临. 布渣叶总黄酮大孔吸附树脂纯化工艺研究 [J]. 中医药信息, 2017, 34(5): 24-27.
- [8] 刘曦, 陈惠丹, 金凌洁, 等. 十二烷基硫酸钠辅助提取布渣叶中的黄酮类物质 [J]. 生物加工过程, 2012, 10(4): 42-46.
- [9] 韩伟, 马婉婉, 骆开荣, 等. 表面活性剂协同微波提取布渣叶总黄酮 [J]. 南京工业大学学报: 自然科学版, 2012, 34(2): 91-94.
- [10] 邵江娟, 吴昊, 赵雅秋, 等. 离子液体萃取技术及其在中药领域中的应用 [J]. 中草药, 2013, 44(24): 3561-3565.
- [11] 田刚, 潘文慧, 贺国旭, 等. 咪唑类离子液体在天然产物黄酮类成分提取中的应用 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1713-1718.
- [12] 钟方丽, 金龙哲, 王晓林, 等. 离子液体超声辅助提取香叶总黄酮及其抗氧化性研究 [J]. 中国调味品, 2018, 43(4): 69-74.
- [13] 李森林, 刘春明, 黄戩, 等. 离子液体提取白车轴草中黄酮工艺研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(7): 1445-1448.
- [14] 张定, 王承潇, 韩伟, 等. 咪唑类离子液体对三七中痕量成分人参皂苷 Rh₁ 的体外经皮促渗作用研究 [J]. 中草药, 2014, 45(20): 2917-2923.
- [15] 潘天玲, 李坤平, 贲永光, 等. 正交试验法优化布渣叶总黄酮提取工艺的研究 [J]. 广东药学院学报, 2008, 24(5): 454-456.
- [16] 陈秋谷, 孙冬梅, 江洁怡, 等. 布渣叶 HPLC 指纹图谱的建立和 5 种成分含量的同时测定 [J]. 中药材, 2018, 41(2): 373-377.
- [17] 孙冬梅, 陈雪婷, 谭志灿. HPLC 同时测定布渣叶提取物中 3 种黄酮苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 102-104.
- [18] 程青云. 布渣叶总黄酮调血脂谱效关系研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [19] 江洁怡, 李养学, 李素梅, 等. HPLC 同时测定布渣叶总黄酮提取物中 6 种黄酮类成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(9): 40-43.
- [20] 陈雪婷. 布渣叶总黄酮微丸的药学研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [21] 冯亮. 布渣叶总生物碱降血脂作用机制研究 [J]. 辽宁医学院学报, 2015, 36(5): 15-18.
- [22] 宿世震, 项东宇, 刘晓庆. 布渣叶对高脂血症大鼠血脂及抗氧化能力的影响研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(11): 1540-1543.
- [23] 冯亮, 罗文汇. 布渣叶总生物碱在高脂血症大鼠中的作用机制分析 [J]. 中国医学创新, 2016, 13(17): 26-29.
- [24] 孙冬梅, 江洁怡, 董玉娟, 等. 布渣叶不同提取物降血脂活性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(11): 5-7.