

叉枝鸦葱黄酮类化合物提取工艺的研究^①

马国财^{a,b} 陈义磊^{a,b} 王小强^b 白红进^{②a,b}

^a(新疆生产建设兵团塔里木盆地植物资源保护与利用重点实验室 新疆阿拉尔市虹桥南路 705 号 843300)

^b(塔里木大学生命科学学院 新疆阿拉尔市 843300)

摘 要 采用均匀实验设计对叉枝鸦葱总黄酮的提取工艺进行了研究。主要考察乙醇浓度、提取时间、料液比及提取次数等 4 个因素对提取率的影响, 优选出合理的提取工艺。结果表明水浴回流提取法最佳提取工艺为: 15% 乙醇、料液比为 1:34、提取时间为 45min、提取次数为 3 次; 超声-微波协同提取法最佳提取工艺为: 30% 乙醇、料液比为 1:36、提取时间为 41min、提取次数为 3 次。通过比较两种提取方法, 超声-微波协同提取法具有省时、节能、操作方便等优点。

关键词 叉枝鸦葱; 总黄酮; 提取工艺

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)01-0286-06

1 引言

叉枝鸦葱系菊科鸦葱属植物(*Scorzonera diwaricata*), 多生于草原、半荒漠和荒漠地带, 能够固定沙丘、戈壁和干河床。全草入药, 能清热解毒, 治疗毒恶疮^[1]。目前, 鸦葱属植物化学成分的研究文献较多, 其主要化学成分可分为挥发油、无机物质、氨基酸、萜类、甾体类、鞣质、黄酮类化合物等^[2-9]。文献对叉枝鸦葱的研究报道较少, 陶大勇^[2]等采用分光光度法测定塔里木盆地叉枝鸦葱中鞣质的含量, 陈瑛^[3]等对叉枝鸦葱有机溶剂提取物中生物碱进行测定, 二者都没有对其所含的鞣质和生物碱单体化合物进行进一步的分离与检测。

利用紫外-可见分光光度法对叉枝鸦葱全草中总黄酮的提取工艺进行研究, 为叉枝鸦葱的合理开发和利用提供了科学依据。

2 实验部分

2.1 材料、仪器与试剂

2.1.1 材料

叉枝鸦葱于 2009 年 5 月, 采集于四十五团, 自然阴干, 粉碎, 过 60 目筛, 待用。经塔里木大学植物科学学院刘艳萍老师鉴定为菊科叉枝鸦葱(*Scorzonera diwaricata*)。

2.1.2 仪器

KQ-400KDE 台式通用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); CW-2000 超声微波协同萃

① 自治区群体创新项目(No. XJEDU2005G07); 塔里木大学校长基金重点项目(TDZKZD05002)

② 联系人, 手机: (0) 13199742439; E-mail: bhjwcyby@sina.com

作者简介: 马国财(1978—), 男, 辽宁省朝阳市人, 硕士, 研究方向为天然产物活性成分及功能研究。

收稿日期: 2010-05-26; 接受日期: 2010-07-15

取仪(中山大学-上海新拓联合研制);JA1203 电子天平(上海恒平科学仪器有限公司);RE-50B 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);电子恒温不锈钢水浴锅(余姚市亚星仪器仪表有限公司);CARY-100 紫外可见光分光光度计(澳大利亚 Varian 公司)。

2. 1. 3 试剂

乙醇, 硝酸铝, 氢氧化钠, 亚硝酸钠, 三氯化铝等, 均为国产分析纯; 芦丁对照品(德国 Dr. Ehrdnstorfer GmbH 公司, 批号: 60922)。实验室用水为蒸馏水。

2. 2 实验方法与结果

2. 2. 1 芦丁对照品溶液的制备

准确称取 120℃干燥至恒重的芦丁对照品 13.60mg, 用 65%乙醇 20mL 超声使其完全溶解并转移至 50mL 容量瓶中, 加 65%乙醇至刻度, 摇匀即得。芦丁对照品浓度为 0.272mg/mL, 备用。

2. 2. 2 叉枝鸦葱总黄酮的提取

2. 2. 2. 1 超声波提取法

准确称取叉枝鸦葱粉末 1.000g, 加入 65%乙醇 20mL, 超声波功率 100W, 超声提取 20min, 过滤, 残渣再加入 65%乙醇 20mL 提取 20min, 过滤, 将残渣再提取一次, 过滤, 合并滤液, 用 65%乙醇定容于 100mL 容量瓶中, 备用。

2. 2. 2. 2 冷浸振荡提取法

准确称取叉枝鸦葱粉末 1.000g, 加入 65%乙醇 20mL 冷浸振荡提取 20min, 过滤, 残渣再加入 65%乙醇 20mL 提取 20min, 过滤, 将残渣再提取一次, 过滤, 合并滤液, 用 65%乙醇定容于 100mL 容量瓶中, 备用。

2. 2. 2. 3 微波提取法

准确称取叉枝鸦葱粉末 1.000g, 加入 65%乙醇 20mL, 微波功率 40W, 微波提取 20min, 过滤, 残渣再加入 65%乙醇 20mL 提取 20min, 过滤, 将残渣再提取一次, 过滤, 合并滤液, 用 65%乙醇定容于 100mL 容量瓶中, 备用。

2. 2. 2. 4 超声-微波协同提取法

准确称取叉枝鸦葱粉末 1.000g, 加入 65%乙醇 20mL, 微波功率 40W, 协同提取 20min, 过滤, 残渣再加入 65%乙醇 20mL 提取 20min, 过滤, 将残渣再提取一次, 过滤, 合并滤液, 用 65%乙醇定容于 100mL 容量瓶中, 备用。

2. 2. 2. 5 热回流提取法

准确称取叉枝鸦葱粉末 1.000g, 加入 65%乙醇 20mL, 在 60℃下回流提取 20min, 过滤, 残渣再加入 65%乙醇 20mL 提取 20min, 过滤, 将残渣再提取一次, 过滤, 合并滤液, 用 65%乙醇定容于 100mL 容量瓶中, 备用。

3 结果与讨论

3. 1 黄酮类化合物的定性鉴别

通过显色反应和纸层析的方法来鉴别黄酮类化合物^[10]。

3. 1. 1 显色反应结果

表 1 显色反应结果

显色反应	紫外光	浓氨水	盐酸-镁粉	氢氧化钠溶液
现象	灰褐色荧光斑点	紫外光下黄褐色荧光斑点	泡沫呈紫红色	深黄色

由表 1 可知, 样品液中含有黄酮类化合物。

3.1.2 纸层析

取样品溶液 10 μ L 点在滤纸上, 用正丁醇-冰醋酸-水 = 4 : 1 : 5 (体积比) 为展开剂, 上行展开 5h, 取出晾干。喷 1% 氯化铝-乙醇溶液, 吹干。紫外灯下观察, 有黄色荧光斑点。结果表明, 样品液中含有黄酮类化合物。

3.2 显色条件的考察^[11]

3.2.1 显色系统的筛选

方法 1: 分别准确吸取 0.5mL 的芦丁标准溶液和 2mL 样品溶液于 10mL 容量瓶中, 加 0.1mol/L 的 AlCl_3 溶液 2mL, 摇匀, 放置 6min, 再加入 1mol/L 的 NaAc 溶液 3mL, 用 65% 乙醇溶液定容, 摇匀, 放置 10min, 测定。

方法 2: 分别准确吸取 0.5mL 的芦丁标准溶液和 2mL 的样品溶液于 10mL 容量瓶中, 加 5% NaNO_2 溶液 0.4mL 摇匀, 放置 6min, 加 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.4mL, 摇匀, 放置 6min, 再加 4% NaOH 溶液 4mL, 用 65% 乙醇溶液定容, 摇匀, 放置 10min, 测定。

方法 3: 分别准确吸取 0.5mol 的芦丁标准溶液和 2mL 的样品溶液于 10mL 容量瓶中, 加 5% NaNO_2 溶液 0.4mL, 摇匀, 放置 6min, 加 10% AlCl_3 溶液 0.4mL, 摇匀, 再加 4% NaOH 溶液 4mL, 65% 乙醇溶液定容, 摇匀, 放置 10min, 测定。

测定结果表明: 方法 2 显色灵敏、稳定, 故采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 为显色系统。

3.2.2 最大吸收波长的确定

准确移取芦丁对照品溶液 0.5mL 和 “2.2.2.3” 项下样品溶液 2mL 分别置于 10mL 容量瓶中, 加 65% 乙醇至 2mL、5% 的 NaNO_2 0.4mL, 摇匀, 放置 6min, 加 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.4mL, 摇匀, 放置 6min, 再加 4% NaOH 4mL, 用 65% 乙醇溶液定容, 摇匀、放置 10min。以 65% 乙醇平行实验为空白参比, 在分光光度计上 400—800nm 波长范围内扫描 (见图 1), 结果对照品和样品溶液均在 501nm 波长处有最大吸收峰, 故以 501nm 为测定波长。

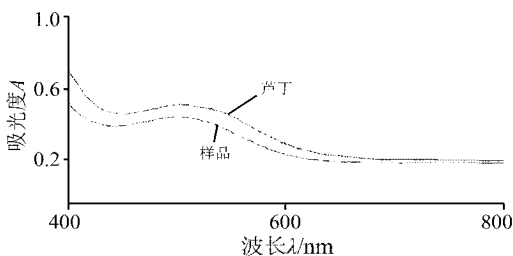


图 1 芦丁和样品扫描光谱

3.3 校准曲线的绘制^[12]

准确吸取芦丁对照品溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mL, 分别置于容量瓶中, 按 “3.2.2” 项下操作, 以第一份溶液为空白, 在 501nm 波长处测定吸光度。吸光度 (A) 为纵坐标, 浓度 (C) 为横坐标, 绘制校准曲线。得线性回归方程 $A = 0.0124C - 0.0322$ ($r = 0.9996$) (见图 2), 表明样品检测浓度在 27.2—163.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸光度线性关系良好。

3.4 样品含量测定^[11]

分别准确吸取 “2.2.2.1—2.2.2.4” 项下的样品溶液 2.0mL 分别置于 10mL 容量瓶中, 用 65% 乙醇定容至刻度, 测定吸光度。根据回归方程计算样品中总黄酮含量。结果见表 2。

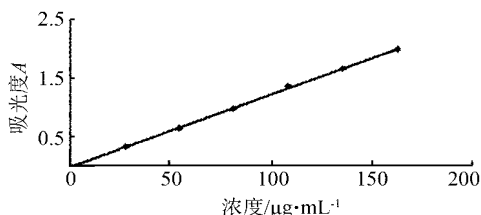


图 2 芦丁校准曲线

表 2 样品提取结果

序号	提取方法	吸光度	提取率(%)
1	微波提取	0. 6621	2. 79
2	超声-微波协同提取	0. 6749	2. 84
3	超声波提取	0. 6671	2. 81
4	冷浸震荡	0. 6840	2. 88
5	水浴回流	0. 8694	3. 63

由表 2 可知: 通过比较各种提取方法的提取率, 传统方法中水浴回流法总黄酮提取率高于冷浸震荡提取, 故采用水浴回流提取法; 在现代提取方法中, 超声-微波协同法提取率高于超声波提取法和微波提取法, 故采用超声-微波协同提取法。

3. 5 均匀实验

3. 5. 1 实验设计与结果

选择对提取影响较大的 4 个因素^[13]: 乙醇浓度(x_1)、料液比(x_2)、提取时间(x_3) 和提取次数(x_4) 进行 9 次均匀设计实验^[14]。均匀设计实验结果及数据处理与分析, 结果见表 3。

表 3 $U_9(9^5)$ 均匀设计实验结果 ($n= 3$)

序号	乙醇浓度 x_1 (%)	料液比 x_2 (g/mL)	提取时间 x_3 (min)	提取次数 x_4	回流提取率 (%)	协同提取率 (%)
1	15	1 : 15	20	3	2. 94	1. 91
2	25	1 : 21	40	3	3. 18	2. 61
3	35	1 : 27	15	2	3. 38	2. 71
4	45	1 : 33	35	2	3. 80	3. 09
5	55	1 : 12	10	2	2. 58	1. 86
6	65	1 : 18	30	1	2. 06	1. 37
7	75	1 : 24	5	1	1. 44	2. 42
8	85	1 : 30	25	1	2. 38	1. 25
9	95	1 : 36	45	3	2. 14	0. 84

3. 5. 2 水浴回流工艺的筛选

由 DPS 统计软件处理数据, 求得 10 余个逐步回归方程, 根据各回归方程的回归系数、 F 值及其显著性检验, 结合实验原理和经验, 选出优化方程 $y= 4. 063- 0. 127x_2+ 0. 008x_3+ 0. 784x_4- 1. 555x_1x_1+ 0. 004x_2x_2- 0. 362x_1x_3$ 最高指标时各个因素组合: $y= 4. 6031; x_1= 0. 15; x_2= 34; x_3= 45; x_4= 3$; 显著水平 $P= 0. 0001$, 统计量值 $F= 807. 9375$, 相关系数 $r= 0. 9996$, 调整后的相关系数 $ra= 0. 9990$, 表明方程拟合度良好, 因素显著。因此以叉枝鸦葱中总黄酮的提取率为指标, 最佳醇提工艺为: 15% 乙醇、料液比为 1 : 34、提取时间为 45min、提取次数为 3 次。

3. 5. 3 超声-微波协同工艺的筛选

由 DPS 统计软件处理数据, 求得 10 余个逐步回归方程, 根据各回归方程的回归系数、 F 值及其显著性检验, 结合实验原理和经验, 选出优化方程 $y= - 3. 769+ 8. 955x_1+ 0. 186x_2+ 0. 0004x_3+ 0. 908x_4- 6. 586x_1x_1+ 0. 075x_4x_4- 0. 138x_1x_2- 0. 031x_2x_4$ 最高指标时各个因素组合: $y= 3. 5977; x_1= 0. 30; x_2= 36; x_3= 41; x_4= 3$; 显著水平 $P= 0. 025$, 统计量值 $F= 946. 478$, 相关系数 $r= 0. 9999$, 调整后的相关系数 $ra= 0. 9994$, 表明方程拟合度良好, 因素显著。因此以叉枝鸦葱中总黄酮的提取

率为指标, 结合实际情况, 最佳醇提工艺为: 30% 乙醇、料液比为 1 : 36、提取时间为 41min、提取次数为 3 次。

3.5.4 验证实验

(1) 水浴回流提取法验证实验

取叉枝鸦葱样品 1.000g, 以 34 倍量 15% 乙醇水浴回流提取 3 次, 每次提取 45min。结果叉枝鸦葱中总黄酮提取率为 4.16%。验证结果与均匀设计实验预测结果较接近。

(2) 超声-微波协同提取法验证实验

取叉枝鸦葱样品 1.000g, 以 36 倍量 30% 乙醇超声-微波协同提取 3 次, 每次提取 41min。结果叉枝鸦葱中总黄酮提取率为 3.28%。验证结果与均匀设计实验预测结果较接近。

4 结论

(1) 黄酮类化合物易溶于甲醇、乙醇等溶剂, 甲醇毒性很大, 而且浸透能力强, 提取范围广, 杂质较多, 故采用乙醇提取叉枝鸦葱中的总黄酮。通过比较冷浸振荡提取、微波提取、水浴回流提取和超声-微波协同提取, 结果表明在同等条件下水浴回流提取法和超声-微波协同提取法提取率高。将超声微波-协同提取法和水浴回流提取法进行均匀实验。

(2) 用 DPS 软件处理后水浴回流法提取叉枝鸦葱中黄酮类化合物的最佳条件为: 15% 乙醇、料液比为 1 : 34、提取时间为 45min、提取次数为 3 次; 超声微波协同法提取叉枝鸦葱中黄酮类化合物的最佳条件为: 30% 乙醇、料液比为 1 : 36、提取时间为 41min、提取次数为 3 次。验证实验的结果显示, 提取条件中乙醇体积分数占重要因素。

(3) 叉枝鸦葱分布广泛, 全草入药具有清热解毒, 治疗毒恶疮的作用, 具有广泛的发展前景。本文对叉枝鸦葱中总黄酮类化合物的提取方法进行了研究, 为叉枝鸦葱的开发及综合利用提供科学依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 13—36.
- [2] 陶大勇, 李树伟, 任道泉等. 塔里木盆地叉枝鸦葱中鞣质含量的测定[J]. 塔里木农垦大学学报, 2004, 16(4): 5—8.
- [3] 陈瑛, 陶大勇, 蒋涛等. 四种沙漠植物生物碱的测定[J]. 塔里木大学学报, 2005, 17(1): 19—21.
- [4] 王斌, 李国强, 管华诗. 蒙古鸦葱挥发油及无机元素的 GC-MS 和 ICP-MS 分析[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2364—2365.
- [5] 武全香. 藏药鸦葱成分的化学研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2002.
- [6] 李娟. 菊科茜叶著及鸦葱化学成分的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- [7] Li J, Wu Q X, Shi Y P et al. A New Sesquiterpene Lactone from *Scorzonera Austriaca*[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2004, 15(11): 1309—1310.
- [8] 何自伟. 葵花大蓟和鸦葱的化学成分[D]. 兰州: 兰州大学, 2004.
- [9] Menichini F, Statti G, Monache D F. Flavonoid Glycosides from *Scorzonera Columna*[J]. *Fitoterapia*, 1994, 64(6): 555—556.
- [10] 高锦明. 植物化学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [11] 周桂芬, 张涵, 吕圭源. 苦苣菜中黄酮类化合物的测定[J]. 中华医药学刊, 2008, 26(1): 218—220.
- [12] 范玉奇. 复方天麻滴丸的工艺制备及质量标准的制定[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2006.
- [13] 李文兰, 任晓蕾, 赵稷等. 均匀设计发优选金匱肾气丸中苷类成分的提取工艺[J]. 中草药, 2008, 39(2): 199—202.
- [14] 李云雁, 胡传荣. 试验设计与数据处理[M]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2005. 217.

Study on Extraction Technique of Total Flavonoids from *Scorzonera Divaricata*

MA Guo-Cai^{a,b} CHEN Yi-Lei^{a,b} WANG Xiao-Qiang^b BAI Hong-Jin^{a,b}

a(Key Laboratory of Protection & Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production and Construction Corps, Alar, Xinjiang 843300, P. R. China)

b(College of Life Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, P. R. China)

Abstract The extraction technique of total flavonoids from *Scorzonera divaricata* by uniform design was studied. The effects of ethanol concentration, extraction time, the ratio of material to solvent and extraction number were observed. The result showed that the best extraction technique of water bath reflux method was as follows: 15% ethanol, the ratio of material to solvent of 1: 34, extraction time of 45min, and extraction for 3 times. The best extraction technique of ultrasonic-microwave synergistic was as follows: 30% ethanol, the ratio of material to solvent of 1: 36, extraction time of 41min, and extraction for 3 times. By comparison, ultrasonic-microwave method has advantages of saving time, lower energy consumption and facility of manipulation.

Key words *Scorzonera Divaricata*; Total Flavonoids; Extraction Technique

欢迎参观 《北京天科邮票展览馆》

《北京天科邮票展览馆》由《科学家纪念邮票展览馆》、《陆达纪念馆》和《卢嘉锡纪念馆》等 3 部分组成, 是科普类别的公益性展览馆, 免费参观。在北京市工商行政管理局注册号为: 110229009367903; 北京市质量技术监督局颁发的组织机构代码为: 78616185X; 北京市国家税务局和北京市地方税务局颁发的税务登记证号为: 11022978616185X; 中国人民银行颁发的开户许可证核准号为: J1000047864702; 开户行为: 北京市农村商业银行夏都支行, 账号: 1403000103000010416。中华人民共和国国有土地使用证的证号为: 京延国用(2002 出)字第 283 号; 中华人民共和国房屋所有权证的证号为: 京房权证延私字第 09140 号。

《科学家纪念邮票展览馆》展品内容: 古今世界各国发行的、有关科学家或他们的发明创造的纪念邮票(复印件), 大小为 210×297mm(A4 纸), 共有 529 件。其中 190 位科学家为诺贝尔奖得主。每件展品均附有本馆编辑的有关科学家的简介, 并如实叙述一些科学家的学术观点, 仅供参考。

《陆达纪念馆》展品内容: 1. 纪念陆达同志(代序, 王鹤寿); 2. 陆达传略; 3. 《陆达纪念馆》照片目录; 4. 《陆达纪念馆》照片(共 35 张); 5. 《陆达纪念馆》(后语, 周开亿)。

《卢嘉锡纪念馆》展品内容: 1. 伟人已逝 风范长存——纪念卢嘉锡先生(章振乾); 2. 卢嘉锡生平; 3. 《卢嘉锡纪念馆》照片目录; 4. 《卢嘉锡纪念馆》照片(共 65 张); 5. 《卢嘉锡纪念馆》(后语)(《光谱实验室》编辑部)。

3 馆展品内容已分别在《光谱实验室》2007 年第 1 期、2008 年第 1 期和 2009 年第 1 期刊登并出有单行本。

参观须知: 1. 参观者应当具有高中(含)以上文化程度; 2. 地址: 北京市延庆县刘斌堡乡刘斌堡村东, 刘斌堡乡中心小学东侧; 3. 展厅面积 300 平方米; 绿化面积 3000 平方米; 4. 馆内禁止吸烟, 禁止触摸展品; 保持清洁卫生, 爱护花木和陈设; 每人入馆时间不得超过 2 小时; 5. 赴馆乘车路线: 北京德胜门乘 919 路公交车到终点站(延庆站, 快车 12 元, 1 小时 30 分; 慢车 8 元, 有“一卡通”者 4 折), 再乘 920 路公交车或小面包车到“刘斌堡东”站, 下车即到(5 元, 25 分钟); 6. 参观者请 1-3 日前电话预约登记, 联系电话: (010) 62183031; 52513126; 13716729706。

注: 陆达, 钢铁研究总院前院长; 卢嘉锡, 中国科学院前院长; 王鹤寿, 原冶金工业部部长, 第一届中共中央纪律检查委员会副书记; 章振乾, 福建省民盟名誉主委、厦门大学原教务长。

《光谱实验室》编辑部