

超声辅助法提取白^①茎皮总黄酮的工艺研究^①

肖 杭^a 黎云祥^{②a} 蔡凌云^{a, b} 高 侠^a 何 理^a

^a(西华师范大学生命科学学院 四川省高校环境科学与生物多样性保护重点实验室 四川省南充市师大路 1 号 637002)

^b(凯里学院化学系 贵州省凯里市文化北路 22 号 556003)

摘 要 采用超声辅助法提取白^①茎皮中总黄酮化合物,通过单因素试验和正交试验,研究了超声提取条件(超声功率,乙醇浓度,料液比,时间)对其中总黄酮提取的影响。白^①茎皮总黄酮最佳提取工艺为:料液比 1:30,乙醇浓度 70%,超声功率 120W,提取时间 25min。在此工艺条件下提取,总黄酮含量为 53.0843mg/g。

关键词 白^①;总黄酮;超声波辅助提取;正交试验

中图分类号:O657.32

文献标识码:A

文章编号:1004-8138(2010)01-0197-05

1 前言

白^①(*A canthopanan trifoliatum* (L.) Merr.), 又称鹅掌^①、三加皮、三叶五加等,为五加科(*Araliaceae*)五加属(*A canthopanan*)攀援状灌木。白^①味苦、辛、凉,具有清热解毒、祛风利湿、舒筋活络、止咳平喘之功效^[1]。目前国外学者对白^①及五加属植物的研究多处于对其三萜皂苷的研究^[2-4],国内学者对白^①主要从其作为野生食用蔬菜方面进行研究^[5],对药用化学成分近 20 年来偶见对白^①叶中挥发油的研究^[6]。本课题组的前期实验结果表明白^①各部位中均含有黄酮。黄酮类化合物具有多种生物活性,主要表现为清除自由基、抗癌作用、抗突变作用、免疫增强等作用^[7],如何充分利用这一资源大量制备生物活性黄酮将会具有十分重大的经济价值和现实意义。

目前黄酮类化合物常用的提取方法有溶剂提取法、微波提取法、超声波提取法、酶解法、超临界流体萃取法等。超声提取原理是利用超声波在液体中产生“空穴作用”,破坏植物细胞和细胞膜结构,从而增加细胞内容物通过细胞膜的穿透能力,有助于黄酮类化合物的释放与溶出;超声波使提取液不断震荡,有助于溶质扩散,缩短了提取时间,提高了有效成分的提取率和原料的利用率^[8,9]。超声波提取操作简便快捷,无需加热,提取率高速度快,提取物的结构未被破坏,具有明显的优势^[10,11]。本研究采用超声波法提取白^①茎皮中总黄酮,通过试验确定出最佳提取工艺,力求寻找出一种高效的提取方法,为白^①的大规模开发利用提供技术保证。

2 实验部分

2.1 材料与试剂

白^①于 2007 年 8 月采于贵州省天柱县渡马乡,经西华师范大学生命科学学院秦自生教授鉴定

① 四川省教育厅重点项目(2006A 078);四川省重点学科项目(SZD0420)资助

② 联系人,手机:(0)13281952481;(0)13619055502;Email: yx_li@263.net

作者简介:肖杭(1985—),女,四川省自贡市人,在读研究生,主要从事天然产物研究工作。

收稿日期:2009-06-20;接受日期:2009-07-31

为五加属植物白_芍。标本保存于西华师范大学生命科学学院标本室。

芦丁标准品($\geq 98\%$, 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 编号: 1097-060918); 无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠均为分析纯。实验用水为蒸馏水。

2.2 仪器与设备

R-200 旋转蒸发仪, 配有蒸汽温度传感器(瑞士Buchi公司); Eppendorf Research 移液器(德国Eppendorf 公司); SHZ-II 循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂); 101A-2 电热鼓风恒温干燥箱(杭州蓝天化验仪器厂); JA 1003 电子天平(上海精科天平厂); UV-2102C 型紫外分光光度计配有标准的RS-232 双向通讯接口(上海龙尼柯仪器有限公司); KQ 3200DE 型数控超声清洗槽(昆山市超声仪器有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品处理和提取液的制备

称取自然干燥的白_芍茎皮粉末 50g, 过 40 目筛, 置于 500mL 锥形瓶中, 加 100mL 石油醚脱脂、脱色 2h, 重复几次, 至石油醚层几乎无色, 倾去浸提液, 样品置于通风处干燥备用。

准确称取上述白_芍茎皮粉末 2 000g, 置 100mL 锥形瓶中, 加 40% 乙醇, 超声间歇提取 2 次, 每次 30min, 超声功率 100W, 合并提取液, 减压蒸干, 用 40% 乙醇溶解并定容于 100mL 容量瓶, 待用。

2.3.2 最大吸收波长的确定

准确吸取芦丁标准溶液和提取液 1mL 分别置于 1、2 号两支 10mL 具塞试管中, 用体积分数为 30% 的乙醇补充至 5mL, 再分别加入 0.3mL 质量分数为 5% NaNO_2 溶液, 混匀, 放置 5min 后分别加入 0.3mL 质量分数为 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 混匀, 6min 后分别加入 4mL 浓度为 1mol/L 的 NaOH 溶液, 混匀, 用体积分数为 30% 的乙醇标定至刻度线, 放置 10min 后, 以 0 号试剂作为空白参照, 在波长 400—600nm 之间测定吸光度, 确定 510nm 为最大吸收波长。

2.3.3 芦丁校准曲线及回归方程的建立

2.3.3.1 芦丁标准溶液的制备

准确称取经 120℃减压干燥至恒重的芦丁标准品 10mg, 用 30% 的乙醇溶解, 并转入 50mL 容量瓶中, 再用 30% 的乙醇定容, 摇匀。即得质量浓度为 0.2mg/mL 的标准溶液。

2.3.3.2 校准曲线的绘制

准确吸取芦丁标准溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0mL, 分别置于 0、1、2、3、4、5 和 6 号共 7 支 10mL 具塞试管中, 用体积分数为 30% 的乙醇补充至 5mL, 再分别加入 0.3mL 质量分数为 5% NaNO_2 溶液, 混匀, 放置 5min 后分别加入 0.3mL 质量分数为 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 混匀, 6min 后分别加入 4mL 浓度为 1mol/L 的 NaOH 溶液, 混匀, 用体积分数为 30% 的乙醇标定至刻度线, 放置 10min 后, 于 510nm 处, 以 0 号试剂作为空白参照, 分别用比色皿测定其吸光度值。以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制校准曲线。用最小二乘法进行线性回归, 求得回归方程: $A = 11.893C - 0.0065$, $r^2 = 0.9935$ 。式中: C —— 芦丁浓度(mg/mL), A —— 吸光度, 表明在 0.01—0.06mg/mL 浓度范围内线性良好。

2.3.4 白_芍总黄酮含量的测定

准确吸取 1mL 的待测提取液于 10mL 容量瓶中, 按上述校准曲线进行以下操作, 分别比色测定其吸光度值, 再按下述公式求出黄酮含量。

$$\text{总黄酮}(\text{mg/g}) = (C \cdot V_1 \cdot V_2) / (W \cdot V_3)$$

式中: C —— 根据校准曲线得出的供试品液质量浓度 (mg/mL); V_1 —— 提取定容体积 (mL); V_2 —— 显色反应定容体积 (mL); W —— 样品重量 (g); V_3 —— 显色反应取样体积 (mL)。

3 结果与讨论

3.1 单因素实验

3.1.1 乙醇浓度对提取总黄酮含量的影响

以不同含量的乙醇浓度为提取剂, 在 2 000g 样品中, 按 1:25 的料液比分别加入 50mL 浓度为 40%、50%、60%、70%、80% 和 90% 的乙醇, 在超声波清洗槽中, 30℃ 条件下超声提取 30min, 抽滤, 减压浓缩, 定容, 按照 2.3.3.2 项下方法测其吸光度 A 值, 分别计算出黄酮的含量。结果如图 1 可知, 总黄酮含量随着乙醇浓度的增加先上升后下降, 本实验中乙醇浓度为 70% 时最佳。

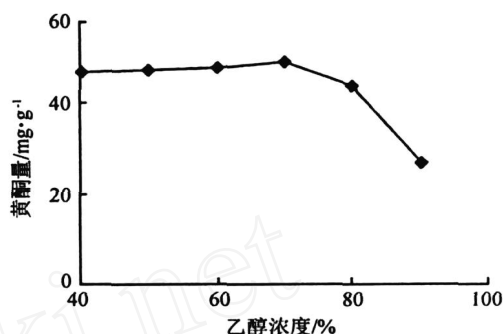


图 1 乙醇浓度对总黄酮含量的影响

3.1.2 料液比对提取总黄酮含量的影响

在 2 000g 样品中, 分别按 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 和 1:40 的料液比加入 70% 的乙醇, 在 30℃ 条件下超声提取 30min, 减压, 浓缩, 定容至 100mL, 按照 2.3.3.2 项下方法测其吸光度 A 值, 分别计算出黄酮的含量。结果如图 2 可知, 总黄酮含量随着料液比的增加先上升后下降, 本实验中料液比为 1:25 时最佳。

3.1.3 超声时间对提取总黄酮含量的影响

在 2 000g 样品中, 在料液比为 1:25、乙醇浓度为 70% 的情况下, 在 30℃ 条件下分别超声提取 10、15、20、25、30 和 35min, 抽滤, 减压浓缩, 定容, 按照 2.3.3.2 项下方法测其吸光度 A 值, 分别计算出黄酮的含量。结果如图 3 可知, 总黄酮含量随着超声时间的增加先上升, 30min 后, 黄酮的含量逐渐下降, 这可能是由于超声具有较强的机械效应与热效应, 长时间的作用会破坏黄酮, 在后处理过程中损失增大而影响黄酮的提出率, 造成负面影响。本实验中超声时间为 30min 时最佳。

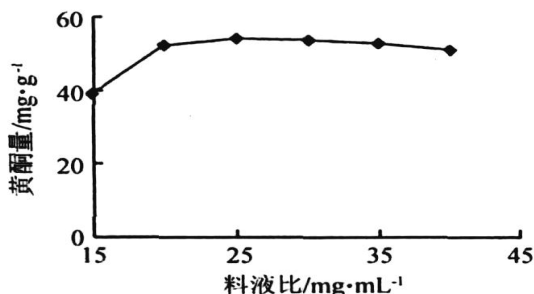


图 2 料液比对总黄酮含量的影响

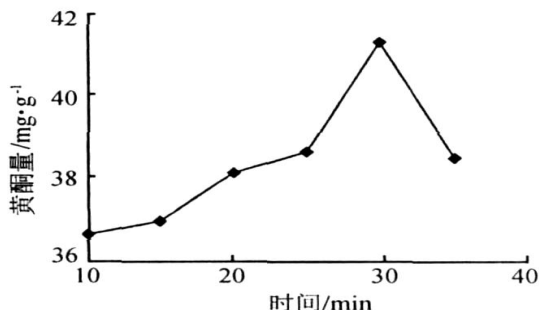


图 3 时间对总黄酮含量的影响

3.1.4 超声功率对提取总黄酮含量的影响

在 2 000g 样品中, 在料液比为 1:25、乙醇浓度为 70% 的情况下, 分别在 80、100、120、140 和 160W 功率的条件下超声提取 30min, 抽滤, 减压浓缩, 定容, 按照 2.3.3.2 项下方法测其吸光度 A 值, 分别计算出黄酮的含量, 结果如图 4 可知, 总黄酮含量随着超声功率的增加先上升后下降, 当提取功率为 120W 时, 黄酮的含量最大, 而后随功率的增加黄酮的含量呈现降低的趋势, 这是由于超声波对植物细胞的破碎作用, 加速有效成分的溶解, 从而影响了黄酮的提取效果, 因此本实验中超

声功率为 120W 时最佳。

3 2 正交实验

根据单因素实验结果, 选择乙醇浓度, 提取时间, 料液比, 提取功率四个因素, 采用超声辅助法提取白芍茎皮中的黄酮, 然后按 $L_9(3^4)$ 表条件对白芍黄酮含量进行分析, 以提取的总黄酮含量为评判指标。

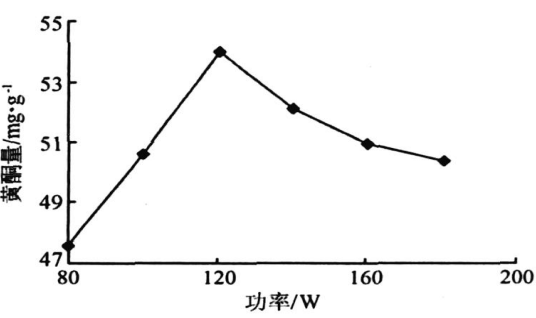


图 4 功率对黄酮含量的影响

表 1 正交试验因素及水平

水平	因素			
	A 乙醇浓度(%)	B 提取时间(min)	C 功率(W)	D 料液比(mg/mL)
1	60	25	100	1 : 20
2	70	30	120	1 : 25
3	80	35	140	1 : 30

表 2 正交试验结果

所在列	1	2	3	4	实验结果(mg/g)
因素	A	B	C	D	
实验 1	1	1	1	1	42 0206
实验 2	1	2	2	2	40 5130
实验 3	1	3	3	3	43 2667
实验 4	2	1	2	3	52 4919
实验 5	2	2	3	1	48 7892
实验 6	2	3	1	2	44 6270
实验 7	3	1	3	2	41 1796
实验 8	3	2	1	3	44 4589
实验 9	3	3	2	1	44 9634
均值 1	41 933	45 231	43 702	45 258	
均值 2	48 636	44 587	45 989	42 107	
均值 3	43 534	44 286	44 412	46 739	
极差	6 703	0 945	2 287	4 632	

表 3 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
乙醇浓度(%)	73 518	2	52 588	19 000	*
时间(min)	1 398	2	1 000	19 000	
功率(W)	8 224	2	5 883	19 000	
料液比(mg · mL ⁻¹)	33 586	2	24 024	19 000	*
相对误差	1 40	2			

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$

根据表 3(表 1 和表 2 分析得出表 3)数据结果分析, 4 种因素影响的主次顺序是: $A > D > C > B$ 。白芍茎皮总黄酮的最佳提取工艺为 $A_2B_1C_2D_3$, 即选用 70% 的乙醇, 在 120W 的功率下超声提取 25min, 料液比采用 1 : 30, 间歇提取 2 次, 总黄酮含量为 53 0843mg/g。

4 结论

(1) 目前, 采用超声辅助法对白芍茎皮中总黄酮的提取研究未见报道, 本文采用石油醚除脂除色素, 以乙醇为提取剂, 利用超声辅助法提取白芍茎皮中的黄酮类化合物。通过 $L_9(3^4)$ 正交试验确

定了提取的最佳工艺条件, 方差分析表明, 超声辅助提取白芍茎皮总黄酮的最佳工艺条件为: 超声时间 25min, 料液比 1:30, 功率 120W, 乙醇浓度为 70%。该提取工艺具有稳定性好, 操作简便, 生产成本较低的优点。表明本研究为开发白芍黄酮资源提供了理论参考。

(2) 总黄酮含量的测定方式一般有分光光度法和高效液相色谱法^[12], 高效液相色谱法虽然重现性、稳定性等指标均较好, 但仪器设备昂贵, 操作复杂, 费用较高。分光光度法测定黄酮含量, 不但操作简单方便, 而且结果准确可靠。本实验用芦丁作标准品, 在 510nm 处测定吸光度, 所得校准曲线线性良好, 回归方程为: $A = 11.893C - 0.0065$, $r^2 = 0.9935$ 稳定性良好, 紫外分光光度法(以芦丁作标准品), 操作简便, 结果准确, 重复性好, 为白芍总黄酮含量测定的一种简便可行的方法。

参考文献

- [1] 江苏新医学院 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977. 1266—1267.
- [2] Ty P D, L ischew ski M, Phiei H V et al Two Triterpenoid Carboxylic Acids from A canthopanax trifoliatu s[J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(12): 2889—2891.
- [3] Ty P D, L ischew ski M, Phiei H V et al 3 α , 11 α , 20 α -Hydroxy-23-Oxo-20(29)-En-28-Oic Acid from A canthopanax Trifoliatu s[J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(4): 867—869.
- [4] Yook C S, Kim I H, Hahn D R et al A Lupane-Triterpene Glycoside from Leaves of A canthopanax[J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(3): 839—843.
- [5] 王勤 美味野蔬白芍[J]. 特种经济动植物, 2003, 11(35): 281—283.
- [6] 纳智 白芍叶挥发油的化学成分[J]. 广西植物, 2005, 25(3): 261—263.
- [7] Park S Y, Chang S Y, Oh O J et al Noroleanene Type Triterpene Glycosides from the Leaves of A canthopanax Japonicu s[J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(4): 379—384.
- [8] 霍丹群, 张文, 李奇琳等 超声波法与热提取法提取山楂总黄酮的比较研究[J]. 中成药, 2004, 26(12): 1063—1065.
- [9] Wei L Y, Wang J H, Zheng X D et al Studies on the Extracting Technical Conditions of Inulin from Jerusalem Artichoke Tubers[J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 79(3): 1087—1093.
- [10] 李凤林, 李青旺, 高大威等 超声波法提取甘薯叶总黄酮的工艺研究[J]. 江苏调味副食品, 2008, 25(3): 13—15.
- [11] 耿岩玲, 李福伟, 王晓等 罗布麻中黄酮的超声波强化提取及高速逆流色谱分离纯化[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 47—49.
- [12] 严赞开 紫外分光光度法测定植物黄酮含量的方法[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(9): 164—167.

Research on the Ultrasonic Extraction of Total Flavones from Stem Bark of Acanthopanax Trifoliatu s

XIAO Hang^a LI Yun-Xiang^a CAI Ling-Yun^{a,b} GAO Xia^a HE Li^a

^a(College of Life Science, Key Laboratory of Environmental Science and Biodiversity Conservation of Sichuan Higher Education, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637002, P. R. China)

^b(Department of Chemistry, Kaili University, Kaili, Sichuan 556003, P. R. China)

Abstract Total flavones were extracted from the stem bark of Acanthopanax trifoliatu s by means of ultrasonic extraction technique. The operation condition, such as power of ultrasonic, the content of ethanol, ultrasonic time and the ratio of sample weight to solvent volume were studied by single factor and orthogonal test. The optimal extraction conditions were obtained as extraction solvent of 70% ethanol, power of ultrasonic 120W, ultrasonic time in 25min and the ratio of sample weight to solvent volume at 1:30. Under the optimized conditions, the extraction percent of total flavones from stem bark of Acanthopanax trifoliatu s is 53.0843mg/g.

Key words Acanthopanax Trifoliatu s; Total Flavones; Ultrasonic Extraction; Orthogonal Test