

大叶白麻总黄酮超声提取工艺的优化

滕旭^{1,2}, 史俊友^{1,2}, 王洪伦¹, 索有瑞¹, 刘永军^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 [目的] 优化青海大叶白麻 [*Poacynum hendersonii* (Hook f) Woodson] 总黄酮超声提取工艺。[方法] 通过单因素试验研究不同乙醇体积分数、提取温度、提取时间、料液比、提取次数、样品目数、超声功率、溶剂 pH 值对大叶白麻总黄酮超声提取的影响; 在此基础上, 采用正交试验对大叶白麻总黄酮超声提取工艺进行了优化。[结果] 大叶白麻总黄酮超声提取的最佳工艺为: 乙醇体积分数 75%, 提取温度 50, 提取时间 2 h, 料液比 1:15 (W/V), 提取次数 3 次, 样品目数 20 目, 超声功率 100 W, 溶剂 pH 值 9, 在此条件下总黄酮提取率最高。[结论] 该研究为进一步开发利用大叶白麻资源提供了基础数据。

关键词 大叶白麻叶; 总黄酮; 超声波; 提取工艺

中图分类号 R 284.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2010)17-09204-04

Optimization on Extraction Process of Total Flavonoids in *Poacynum hendersonii* (Hook f) Woodson

TENG Xu et al (Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001)

Abstract [Objective] The research aimed to optimize the extraction process of total flavonoids in the leaves of *Poacynum hendersonii* (Hook f) Woodson from Qinghai [Method] The extracting technology of total flavonoids in *Poacynum hendersonii* (Hook f) Woodson leaves was studied by ultrasonic wave through single factor experiments and orthogonal experiments [Result] The results showed the optimal conditions for the extraction of total flavonoids in *Poacynum hendersonii* (Hook f) Woodson Leaves were as follow: Ethanol concentration 65%, extraction temperature 50, treatment time 2 h, ratio of material to solvent 1:15, extraction times 3, mesh 20, ultrasonic power 100 W and pH value 9. Under the optimized conditions, the extraction rate of total flavonoids was the highest [Conclusion] The study can provide the base data for deep exploration and utilization of *Poacynum hendersonii* (Hook f) Woodson resources

Key words *Poacynum hendersonii* (Hook f) Woodson; Total flavonoids; Ultrasonic wave; Extraction technology

大叶白麻 [*Poacynum hendersonii* (Hook f) Woodson] 为夹竹桃科 (Apocynaceae) 白麻属 (*Poacynum*) 野生药用植物, 别名大花罗布麻、大花白麻、野麻, 为多年生直立草本或灌木, 广泛分布于我国西北内陆荒漠地区及东部沿海等省区, 野生在盐碱荒地、沙漠边缘、河流和湖泊周围。大叶白麻属于罗布麻药材的一种, 其根、茎、叶、花、全草均可以入药。

对大叶白麻化学成分的分析表明, 其叶的黄酮类成分非常丰富, 主要为槲皮素 (Quercetin)、异槲皮素 (Isoquercetin)、新异芸香苷 (Neoisorutin)、金丝桃苷 (Hyperin)、槲皮素 3-O-槐糖苷 (Quercetin 3-O-sophoroside)、芦丁 (Rutin)、山奈酚 (Kaempferol)、三叶豆苷 (Trifolin)、北美圣草素 7-O-葡萄糖苷 (Eriodictyol 7-O-glucoside)、紫云英苷 (Astragaloside)、槲皮素 3-O-(2G-葡萄糖芸香香叶苷) [Quercetin 3-O-(2G-glucose glycosyl rutinoside)] 和异鼠李素 3-O-葡萄糖苷 (Isohamnetin 3-O-glucoside)^[1]。大量研究表明, 黄酮类化合物具有清除自由基、抗氧化、抗突变、抗肿瘤和免疫调节等功能^[2-4], 而药理研究则表明大叶白麻黄酮类成分具有延缓衰老、降压、降脂、抗感冒、镇静安神等功效^[5-9]。因此, 研究大叶白麻黄酮类成分的优化提取工艺具有重要的现实意义。

超声波提取是通过控制一定的超声频率和强度, 利用超声波的空化效应、热效应和机械效应, 造成植物细胞壁及整个生物体瞬间破裂, 加快细胞内物质的释放、扩散及溶解, 提高植物成分的提取效率。超声波破碎过程是一个物理过程, 浸提过程中无化学反应, 被浸提的生物活性物质在短时间内保持不变, 生物活性不减, 同时提高了破碎速度, 缩短了破碎

时间, 可极大地提高提取效率^[10]。为此, 笔者利用超声波提取技术, 通过单因素试验和正交试验优化了青海省大叶白麻总黄酮的最佳提取工艺, 以期为进一步开发利用大叶白麻资源提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。大叶白麻叶, 于 2008 年 8 月采自青海省托拉海地区, 由中国科学院西北高原生物研究所索有瑞研究员鉴定。阴干后取大叶白麻叶片, 用清水冲洗干净, 再用蒸馏水冲洗 3 遍, 放入烘箱 60 烘干, 粉碎, 备用。

1.1.2 主要试剂。芦丁, 购自中国药品生物制品检定所; 分析型乙醇、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝。

1.1.3 主要仪器。101 型电热鼓风干燥箱, 由北京市永光明医疗仪器厂生产; Fw-100 型高速万能粉碎机, 由北京市永光明医疗仪器厂生产; ALC-110 4 型电子天平, 由德国 ACCU-LAB sartorius group 生产; KQ-250DE 型数控超声波清洗器, 由昆山市超声仪器有限公司生产; UV-1801 紫外可见分光光度计, 由北京瑞利分析仪器公司生产。

1.2 方法

1.2.1 芦丁标准曲线的绘制。精密称取芦丁对照品 50 mg 于 100 ml 容量瓶中, 加入 40% 乙醇约 60 ml, 于水浴锅上微热溶解, 放冷, 加入 40% 乙醇定容至刻度后摇匀, 即得芦丁对照品溶液。精密量取对照品溶液 0、1、2、3、4、5、6 ml, 分别置于 7 支 25 ml 容量瓶中, 均加水至 6 ml; 然后分别加入质量分数为 5% 的亚硝酸钠溶液 1 ml, 摇匀, 静置 6 min; 再加入质量分数为 10% 的硝酸铝溶液 1 ml, 摇匀, 静置 6 min; 最后加入质量分数为 4% 的氢氧化钠溶液 10 ml, 加蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 静置 15 min; 显色, 之后以第 1 支容量瓶作空白对照, 在波长 510 nm 处测定吸光度, 以吸光度 (A) 为纵坐标, 芦丁浓度 (C) 为横坐标绘制标准曲线。

基金项目 中国科学院百人计划资助项目。

作者简介 滕旭 (1981 -), 女, 辽宁朝阳人, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学。* 通讯作者, 教授, E-mail: yongjunliu_1@sdu.edu.cn

收稿日期 2010-03-08

1.2.2 提取方法。精密称取同一目数的大叶白麻叶粉末 5.000 0 g 于 150 ml 三角瓶中,根据不同提取条件,分别加入适量乙醇溶液,超声提取一定时间后过滤,滤渣再加入适量乙醇溶剂提取,合并滤液,得到提取物,定容后用紫外分光光度法进行分析,测定吸光度。3次重复,取平均值。

1.2.3 单因素试验。

1.2.3.1 乙醇体积分数的选择。在料液比为 1:15 (W/V,下同),提取温度为 50 ℃,超声功率为 100 W,提取时间为 2 h,提取次数为 1 次、样品目数为 120 目的条件下,分别比较不同体积分数 (55%、65%、75%、85%、95%) 的乙醇对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响。

1.2.3.2 提取温度的选择。在料液比为 1:15,超声功率为 100 W,提取时间为 2 h,提取次数为 1 次、乙醇体积分数为 65%、样品目数为 120 目的条件下,分别比较不同提取温度 (40、50、60、70、80 ℃) 对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响。

1.2.3.3 提取时间的选择。在料液比为 1:15,超声功率为 100 W,提取次数为 1 次、乙醇体积分数为 65%、提取温度为 50 ℃、样品目数为 120 目的条件下,分别比较不同提取时间 (1、2、3、4、5 h) 对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响。

1.2.3.4 料液比的选择。在超声功率为 100 W,提取次数为 1 次、乙醇体积分数为 65%、提取温度为 50 ℃、提取时间为 2 h,样品目数为 120 目的条件下,分别比较不同料液比 (1:6、1:8、1:10、1:15、1:20) 对青海大叶白麻叶总黄酮提取率的影响。

1.2.3.5 提取次数的选择。在料液比为 1:15,超声功率为 100 W,乙醇体积分数为 65%、提取温度为 50 ℃、提取时间为 2 h,样品目数为 20 目的条件下,分别比较不同提取次数 (1、2、3、4、5 次) 对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响。

1.2.3.6 样品目数的选择。在料液比为 1:15,超声功率为 100 W,乙醇体积分数为 65%、提取温度为 50 ℃、提取时间为 2 h 的条件下,分别比较不同样品目数 (20、40、60、80、100、120 目) 对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响。

1.2.3.7 超声功率的选择。在料液比为 1:15,乙醇体积分数为 65%、提取温度为 50 ℃、提取时间为 2 h,提取次数为 1 次、样品目数为 20 目条件下,分别比较不同超声功率 (60、70、80、90、100 W) 对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响。

1.2.3.8 溶剂 pH 值的选择。在料液比为 1:15,乙醇体积分数为 65%、提取温度为 50 ℃、提取时间为 2 h,提取次数为 1 次、样品目数为 20 目的条件下,分别比较不同溶剂 pH 值 (4、5、6、7、8、9、10、11) 对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响。

1.2.4 正交试验。在单因素试验基础上,选取乙醇体积分数、提取温度、料液比、溶剂 pH 值 4 个因素,每个因素 3 个水平,采用 $L_9(3^4)$ 表进行正交试验,对大叶白麻叶总黄酮提取工艺进行优化。具体因素与水平设计见表 1。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制 由图 1 可知,芦丁浓度 (C) 对吸光度 (A) 的线性回归方程为 $C = 4.9524A + 0.0802$, $r = 0.999$ 。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 乙醇体积分数的选择。由图 2 可知,当乙醇体积分数低于 75% 时,大叶白麻叶总黄酮提取率随着乙醇体积分数的增大而升高,而当乙醇体积分数大于 75% 时,提取率的变化趋

于稳定;但体积分数为 65%、75% 的乙醇对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响相对较小。考虑到生产成本及后期处理等因素,乙醇体积分数以 65% 为宜。

表 1 大叶白麻叶总黄酮提取正交试验因素与水平设计

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	乙醇体积分 数 A % Ethanol volume fraction	提取温 度 B Extraction temperature	料液比 C (W/V) Solid-liquid ratio	溶剂 pH 值 Solvent pH value
1	65	40	1:8	9
2	75	50	1:10	10
3	85	60	1:15	11

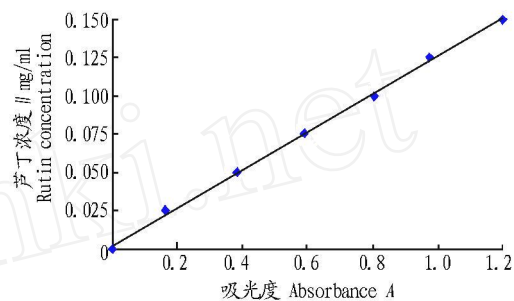


图 1 芦丁标准曲线

Fig 1 Standard curve of rutin

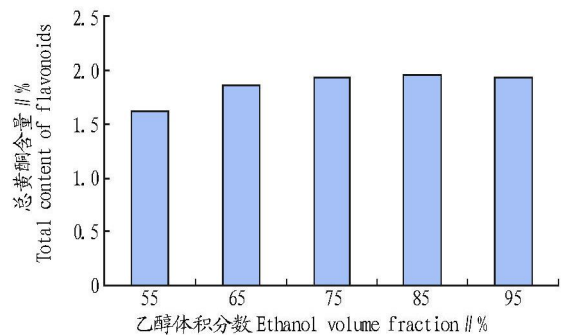


图 2 乙醇体积分数对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响

Fig 2 Effects of ethanol volume fraction on the extraction yield of total flavonoids in the leaves of *P. hendersonii*

2.2.2 提取温度的选择。由图 3 可知,当提取温度低于 50 ℃ 时,大叶白麻叶总黄酮提取率随着提取温度的升高而增大,而当提取温度高于 50 ℃ 时,大叶白麻叶总黄酮提取率变化不大。考虑到能耗及有效物质的活性问题,提取温度以 50 ℃ 为宜。

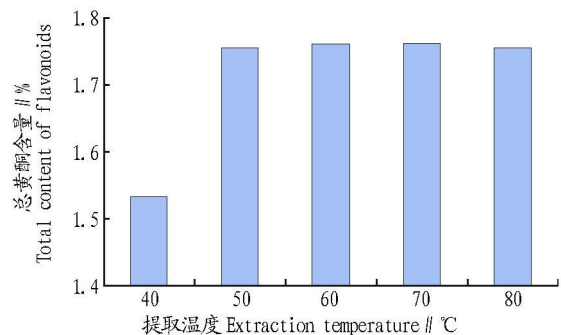


图 3 提取温度对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响

Fig 3 Effects of extraction temperature on the extraction yield of total flavonoids in the leaves of *P. hendersonii*

2.2.3 提取时间的选择。由图 4 可知,当提取时间大于 2 h

时,大叶白麻叶总黄酮提取率基本保持不变。因此,提取时间以 2 h 为宜。

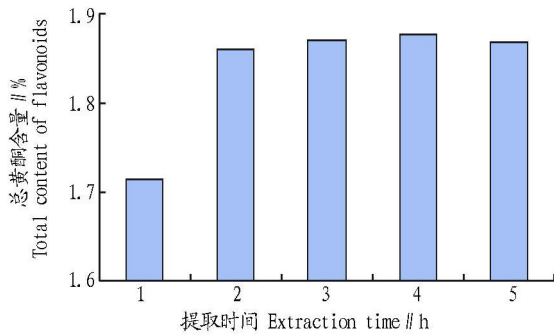


图 4 提取时间对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响

Fig 4 Effects of extraction time on the extraction yield of total flavonoids in the leaves of P. hendersonii

2 2 4 料液比的选择。由图 5可知,当料液比低于 1:15时,大叶白麻叶总黄酮的提取率随着溶剂量的增大而升高,当料液比超过 1:15时,大叶白麻叶总黄酮提取率的变化趋于稳定,这说明料液比在 1:15时已经能够将样品中的黄酮类成分提取完全。鉴于节约成本和后续处理等综合因素的考虑,料液比以 1:15为宜。

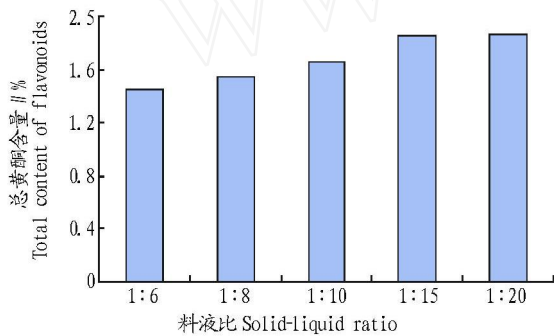


图 5 料液比对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响

Fig 5 Effects of solid-liquid ratio on the extraction yield of total flavonoids in the leaves of P. hendersonii

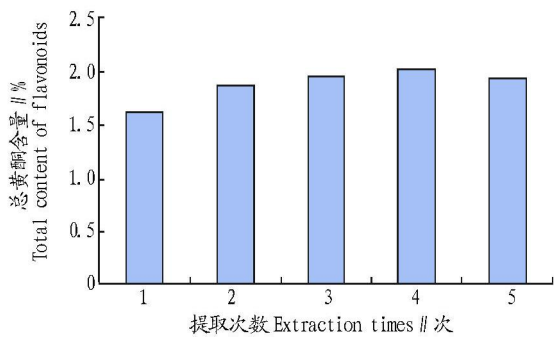


图 6 提取次数对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响

Fig 6 Effects of extraction times on the extraction yield of total flavonoids in the leaves of P. hendersonii

2 2 5 提取次数的选择。由图 6可知,当提取次数大于 3次时,大叶白麻叶总黄酮的提取率趋于稳定。故提取次数以 3次为宜。

2 2 6 样品目数的选择。由图 7可知,样品目数为 20目的样品与其他目数的样品的总黄酮提取率差别不大,而且过滤起来比高目数的容易。故样品目数以 20目为宜。

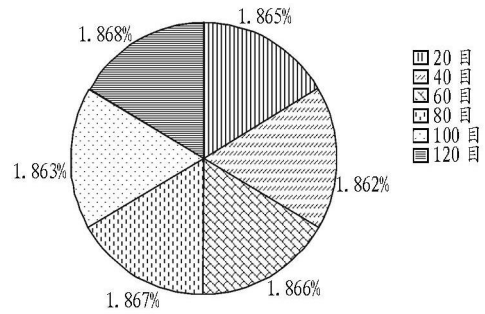


图 7 样品目数对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响

Fig 7 Effects of sample mesh on the extraction yield of total flavonoids in the leaves of P. hendersonii

2 2 7 超声功率的选择。由图 8可知,当超声功率为 100 W 时,总黄酮基本提取完全。故超声功率以 100 W 为宜。

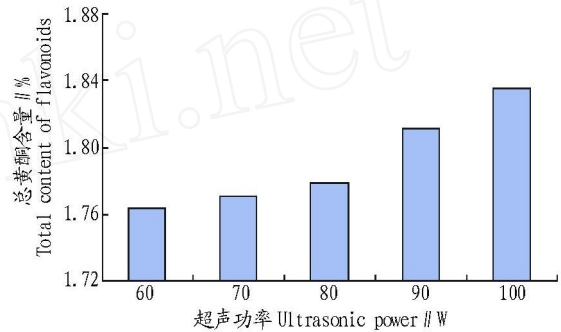


图 8 超声功率对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响

Fig 8 Effects of ultrasonic power on the extraction yield of total flavonoids in the leaves of P. hendersonii

2 2 8 溶剂 pH 值的选择。由图 9可知,当溶剂 pH 值为 10 时,大叶白麻叶总黄酮提取率最高。故溶剂 pH 值以 10 为宜。

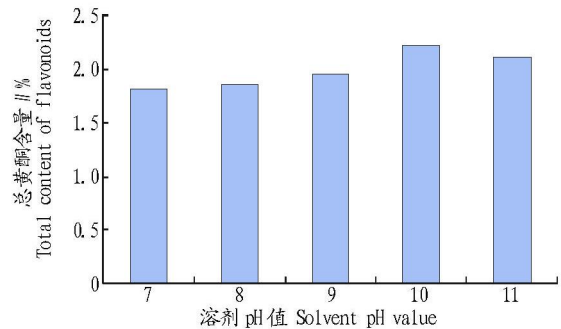


图 9 溶剂 pH 值对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响

Fig 9 Effects of solvent pH value on the extraction yield of total flavonoids in the leaves of P. hendersonii

2 3 正交试验结果 由表 2可知,各提取因素对大叶白麻叶总黄酮提取率的影响为:提取温度 >溶剂 pH 值 >料液比 >乙醇体积分数,最优组合为 A₂B₂C₃D₁,即提取温度为 50 ,溶剂 pH 值为 9,料液比为 1:15,提取溶剂为 75%乙醇。

3 结论与讨论

3 1 结论 该研究确定了青海大叶白麻叶总黄酮提取的最佳工艺为:大叶白麻叶片粉碎至 20 目,加入 15 倍量 65%乙醇 (pH 值 9),于 50 水浴锅中回流提取 3 次,每次 2 h,超声功率为 100 W。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果Table 2 $L_9(3^4)$ orthogonal test result

试验号 Test No	A	B	C	D	总黄酮含量 %
					Content of total flavonoids
1	1	1	1	1	2.7008
2	1	2	2	2	2.1075
3	1	3	3	3	1.9197
4	2	1	2	3	1.9909
5	2	2	3	1	3.7124
6	2	3	1	2	1.8847
7	3	1	3	2	2.2798
8	3	2	1	3	2.2824
9	3	3	2	1	1.8575
k_1	2.243	2.324	2.289	2.757	
k_2	2.529	2.701	1.985	2.091	
k_3	2.140	1.887	2.637	2.064	
R	0.389	0.814	0.652	0.693	

3.2 讨论 大叶白麻资源丰富,有极大的开发利用前景,而超声波技术易于控制,容易应用,所以该研究为今后大叶白麻叶的药用成分研究提供了基础数据。

参考文献

[1] 魏锦萍. 大叶白麻叶化学成分的研究 [D]. 太原:山西医科大学, 2006: 23

(上接第 9145 页)

同的吸附时间测得的吸附剂吸附 $\text{Cr}(\text{VI})$ 的量见图 3。由图 3 可知,絮凝剂的吸附容量随着 $\text{Cr}(\text{VI})$ 初始浓度的增加,达到吸附饱和的速度加快,吸附量最大为 $4.2 \text{ mg}(\text{Cr}(\text{VI}))/\text{g}$ (絮凝剂)。

3 结论

(1)以啤酒和味精废水为主要原料培养枯草芽孢杆菌 ASI-296 产絮凝剂,通过正交试验,确定最佳培养条件为:葡萄糖添加量 20 g/L 、谷氨酸浓缩液 30 ml/L 、 KH_2PO_4 2.0 g/L 、pH 值 7、温度 32°C 。同时对絮凝剂进行红外光谱分析,表明絮凝剂主要是由 β -PGA 和多糖组成。

(2)对枯草芽孢杆菌产的絮凝剂进行明胶-戊二醛交联固定处理,并对 $\text{Cr}(\text{VI})$ 进行吸附研究。结果表明,交联固定后的絮凝剂比非固定的絮凝剂吸附能力强,最大 $\text{Cr}(\text{VI})$ 吸附容量为 $4.2 \text{ mg}(\text{Cr}(\text{VI}))/\text{g}$ (絮凝剂),最佳 $\text{Cr}(\text{VI})$ 吸附 pH 值为 4。

参考文献

[1] 王国惠. 板栗壳对重金属 $\text{Cr}(\text{VI})$ 吸附性能的研究 [J]. 环境工程学报, 2009, 3(5): 791 - 794.
 [2] 杨剑梅,高慧,李庭,等. 稻草秸秆对水中六价铬去除效果的研究 [J]. 环境科学与技术, 2009, 32(10): 78 - 82.
 [3] 李军强. 活性污泥对重金属 Cr^{6+} 和 Cu^{2+} 的吸附研究 [J]. 山西化工,

[2] 陈秀敏,李西平. 对 15 种黄酮类化合物清除自由基活性的理论评价 [J]. 云南大学学报, 2008, 30(1): 68 - 74.
 [3] 赵保路. 自由基和天然抗氧化剂 [M]. 北京:科学出版社, 1999.
 [4] 何燕清. 黄酮类化合物对肿瘤细胞信号转导通路的影响 [J]. 中国药师, 2008, 11(4): 466 - 467.
 [5] 顾振纶,钱曾年,王兆铨,等. 大花罗布麻叶的药理学研究——1. 对血小板凝集的影响 [J]. 中成药, 1989, 11(11): 28 - 29.
 [6] YOKOZAWA T. 罗布麻对加速衰老小鼠抗氧化防御能力降低的改善作用 [J]. 国外医学:中医中药分册, 2002, 24(3): 178.
 [7] YOKOZAWA T, NAKAGAWA T. Inhibitory effects of Luobuma tea and its components against glucose-mediated protein damage [J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(6): 975 - 981.
 [8] 钱曾年,顾振纶,方几希,等. 大花罗布麻叶的药理学研究——2. 大花罗布麻叶延缓衰老作用的实验观察 [J]. 中成药, 1990, 12(3): 28 - 30.
 [9] 钱曾年,顾振纶,金黎清,等. 大花罗布麻叶的药理学研究——3. 对心血管系统的影响 [J]. 中成药, 1991, 13(7): 27 - 29.
 [10] 牛波,邱海霞,田景振,等. 超声强化提取技术 [J]. 山东中药杂志, 2000, 19(10): 629 - 630.
 [11] YANG P Z, JIANG S T, PAN L J, et al. Effects of ultrasound/dilute H_2SO_4 pretreatment on cellulase activity of com straw liquid fermentation [J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(6): 20 - 22.
 [12] ZHAO J F, ZHANG W N, PENG X M, et al. Genetic diversity in wild populations of *Poa cynosuroides* from inland arid regions of northwest China [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(4): 39 - 43.
 [13] 朱飞娥,田自华,张子义. 甘草总黄酮微波法提取工艺的研究 [J]. 畜牧与饲料科学, 2008, 29(5): 1 - 2.
 [14] 吴晓亮,韩敏,刘晓松,等. 瑞香狼毒总黄酮 3 种提取方法的比较 [J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(1): 39 - 40.
 [15] 霍强,王宇,高荣远,等. 瑞香狼毒总黄酮的提取及体外抗氧化作用研究 [J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(2): 83

2009, 29(4): 66 - 68

[4] 李会东,陶新宇,张大为,等. 啤酒工业发酵副产品用于含铬废水处理生物吸附研究 [J]. 湖南科技大学学报, 2009, 24(3): 122 - 125.
 [5] 惠明,田青,马晓娜,等. 枯草芽孢杆菌 B53 产聚谷氨酸的絮凝特性 [J]. 生物技术, 2006, 16(4): 68 - 70.
 [6] 邓毛程,宋炜,张远平. 聚谷氨酸高产菌株的选育和发酵培养基的初步优化 [J]. 四川理工学院学报, 2006, 19(3): 47 - 51.
 [7] 施庆珊,许虹,林小平,等. 多聚谷氨酸的微生物合成 [J]. 生物技术, 2004, 14(1): 65 - 67.
 [8] 温志英,张香关. 味精生产废水的综合利用现状 [J]. 中国资源综合利用, 2006, 24(1): 28 - 29.
 [9] 张迎明,赵继红,伊三梯,等. 利用啤酒废水制备微生物絮凝剂研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(34): 15200 - 15201, 15244.
 [10] 王园园,王向东,陈希. 利用淀粉废水培养复合型絮凝剂产生菌研究 [J]. 中国给水排水, 2007, 23(9): 19 - 23.
 [11] 朱富坤,刘彬彬,闫永胜,等. 微生物絮凝剂 PF-2 的成分分析及絮凝机制研究 [J]. 环境污染与防治, 2008, 30(2): 37 - 44.
 [12] 张帅,程昊. 固定化啤酒酵母对 $\text{Cr}(\text{VI})$ 的吸附 [J]. 环境工程学院, 2009, 3(3): 489 - 492.
 [13] 林永波,张宁. 包埋碳纳米管海藻酸钠凝胶球吸附苯酚的研究 [J]. 环境工程学报, 2009, 2(3): 289 - 292.
 [14] 王立娜,赵瑞雪,郑月,等. 海藻酸钠-明胶-PVA 包埋法固定化酵母菌吸附铅 [J]. 长春理工大学学报, 2007, 30(4): 80 - 83.
 [15] 张菊花,邢建民,江洋洋,等. pH 响应的包覆超顺磁性纳米颗粒的 β -聚谷氨酸二级结构研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(8): 2148 - 2151.
 [16] WANG J, ZHU JH, LIN W, et al. Screening for the strain highly producing antagonistic substance from *Bacillus subtilis* B47 by UV mutagenesis [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(4): 68 - 72