

超声法优化金叶女贞叶中总黄酮的提取

王建安, 付英杰, 李艳芝, 雷绘敏, 陈庆红

(济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

[摘要] 以金叶女贞叶为材料, 寻找其中总黄酮的超声提取的最佳条件. 以总黄酮含量为考察指标, 在单因素实验的基础上, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验, 超声提取研究了乙醇浓度、超声提取时间、超声功率、超声温度对提取金叶女贞叶中总黄酮的影响. 从实验结果分析, 影响超声提取效果的因素为乙醇浓度 > 超声时间 > 提取功率 > 提取温度, 结果表明粒度为 40 目, 乙醇浓度为 65%, 超声时间为 75 min, 超声功率为 400 W, 提取温度为 50 ℃ 时总黄酮得率最高.

[关键词] 金叶女贞, 总黄酮, 超声辅助提取, 正交设计

[中图分类号] R931.6 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2014)03-0106-05

Optimum Extraction of Total Flavonoids from *Ligustrum Lucidum* cv. by Ultrasonic Wave

Wang Jian'an, Fu Yingjie, Li Yanzhi, Lei Huimin, Chen Qinghong

(College of Pharmaceutical Science, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: An ultrasonic method for the extraction of total flavonoids from *Ligustrum Vicaryi Hort.* was investigated and optimized. Using single factor and $L_9(3^4)$ orthogonal design, the effects of ethanol concentrations, ultrasonic time, ultrasonic power and extraction temperature were considered. The impact will activate by ethanol concentrations, ultrasonic time, ultrasonic power and extraction temperature. The optimum extracting conditions of total flavonoids are: mesh number 40, extraction time 75 min, extraction temperature 50 ℃, ultrasonic power 400 W and ethanol concentrations 65%. Under these conditions the yield of total flavonoids can reach the highest.

Key words: *Ligustrum Lucidum* cv., total flavonoids, Ultrasonic-assisted extraction, orthogonal design

金叶女贞 (*Ligustrum Vicaryi Hort.*) 系木犀科女贞属半绿小灌木, 因其适应性强, 对土壤要求不严格, 在我国长江以南及黄河流域等地均能适应, 又加之其叶色金黄, 常与其他植物等搭配做为园林绿化树种. 另据报道, 其同属植物紫茎女贞、粗壮女贞等植物的叶为我国卫生部颁布的苦丁茶的原料之一^[1-4], 具有清热消暑、明目益智、生津止渴、抗肿瘤以及预防心脑血管疾病等诸多功效^[5,6], 是一种具有良好市场前景的饮料, 受到人们的青睐, 极具市场前景.

黄酮类化合物为自然界普遍存在的一类天然物质, 广泛存在于植物的叶、花及果实中, 具有较强的抗氧化活性, 另亦有抗肿瘤、抗炎等活性, 目前已被人们广泛应用于食品及医药工业等领域, 具有广阔的开发前景^[7]. 目前常见的黄酮类物质的提取方法主要为回流法、索氏提取法、超声辅助提取法、超临界萃取法及微波辅助提取法等^[8-10], 其中超声法以其简单易行, 且对环境副作用小等优点越来越受到人们的广泛关注.

笔者在前期预实验中, 发现金叶女贞叶中富含黄酮类化合物, 且含量较高, 同时由于该植物叶色金黄, 极具观赏性, 为目前全国大部分城市选用的园林绿化树种之一, 取材极其方便. 为进一步研究和开发利用新的植物资源, 本文选取金叶女贞叶为研究对象, 在单因素实验的基础上, 利用正交实验设计的方法, 研究了超声提取过程中几种因素对金叶女贞叶中总黄酮提取率的影响, 为该植物的进一步开发利用提供理论支持.

收稿日期: 2013-12-08.

基金项目: 日照市科技发展项目 (2011sf 006).

通讯联系人: 王建安, 硕士, 副教授, 研究方向: 药用植物资源与活性成分研究. E-mail: anansen@163.com

1 仪器、试剂及材料

1.1 实验仪器

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, KQ-500DB 型数控超声波清洗器, LD-02 型高速中药粉碎机.

1.2 试剂

芦丁对照品(中国医药集团上海化学试剂公司, HPLC 级, 纯度 $\geq 98\%$), 无水乙醇、石油醚、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝等, 以上试剂均为分析纯.

1.3 药材

药材于 2012 年 5 月采集于山东省日照市市区, 济宁医学院中药教研室李艳芝老师鉴定为木犀科女贞属植物金叶女贞的嫩叶, 采集的样品材料放置室内自然阴干, 去除杂质后置于烘箱, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干至完全干燥, 粉碎过筛, 样品保存于干燥皿中备用.

2 实验方法

2.1 对照品溶液制备

精密称取干燥至恒重的芦丁对照品 10.7 mg , 置于 100 mL 容量瓶中, 加无水乙醇溶解并定容至刻度, 摇匀(即每 mL 含芦丁 0.107 mg), 备用.

2.2 检测波长的选定

精密量取芦丁对照品溶液 1.0 mL , 置于 10 mL 容量瓶中, 加入 5% 的亚硝酸钠 1.00 mL 摇匀, 6 min 后加入 10% 的氯化铝 1.00 mL 摇匀, 6 min 后加入 4% 的氢氧化钠 10.00 mL , 最后以 55% 的乙醇定容至刻度, 摇匀, 静置 15 min 后, 以不加对照品的溶液做空白, 在 $200\text{ nm} \sim 600\text{ nm}$ 波长范围内进行紫外全波长扫描, 结果发现最大吸收波长在 $\lambda=510\text{ nm}$ 处, 因而选择在 510 nm 波长处测定黄酮含量.

2.3 标准曲线的绘制

分别量取标准溶液 0.00 mL (空白对照)、 1.00 mL 、 1.50 mL 、 2.00 mL 、 2.50 mL 、 3.00 mL (相当于浓度 $0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $4.28\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $6.42\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $8.56\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $10.70\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $12.84\text{ }\mu\text{g/mL}$) 置于 25 mL 容量瓶中. 按 2.2 项方法处理, 应用 UV-win 5.0 软件测定各溶液的吸光度. 以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制芦丁标准曲线(结果见图 2), 得芦丁对照品溶液浓度 $X(\mu\text{g/mL})$ 与吸光度值 Y 关系线性的回归方程式: $Y=0.04790 \cdot X-0.0224$, $R^2=0.9980$.

3 结果与讨论

3.1 超声提取单因素实验

影响黄酮提取的因素很多, 目前常见的有溶剂提取、索氏提取以及超声提取等方法. 本实验在查阅大量资料的基础上, 考察乙醇浓度、超声温度、超声时间、超声功率以及提取次数对金叶女贞叶中总黄酮的影响程度. 并从中选取影响较为显著的因素进行正交实验, 以期找到合适的提取方法.

3.1.1 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

称取过 40 目筛的金叶女贞叶细粉 3.01 g , 置于 250 mL 具塞锥形瓶中, 分别加入浓度为 55% 、 65% 、 75% 、 85% 、 95% 的乙醇 40 mL , 置于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 400 W 超声波进行提取 30 min , 按 2.2 项方法处理, 显色, 在 510 nm 处测定其吸光值, 如图 2 所示.

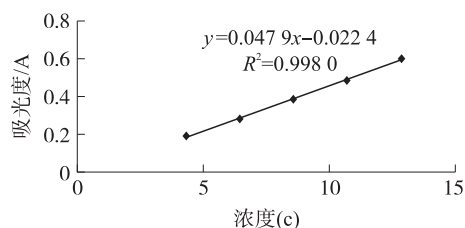


图 1 芦丁标准曲线

Fig. 1 Standard curve of Rutin

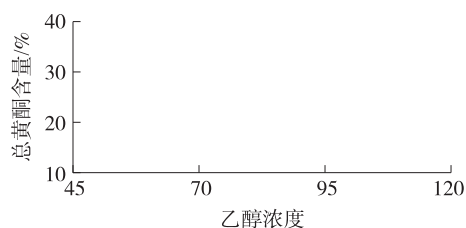


图 2 乙醇浓度对总黄酮含量的影响

Fig. 2 Effects of ethanol concentration on total flavonoids contents

在进行化合物的提取过程中,一方面溶剂的极性对效率有很大的影响;另一方面还要求溶剂对所分离的成分有较强的溶解能力.由图2可知,金叶女贞叶中总黄酮含量随乙醇浓度的增加而增加,在乙醇浓度为85%时,黄酮的提取率最高,但当乙醇浓度达到95%时,黄酮的提取率又表现为下降趋势.这可能是因为随着乙醇浓度的提高,其提取效率也不断增加,致使药材中大量杂质随之析出,从而对黄酮的提取造成了一定程度的阻碍,也为后续的进一步处理造成了困难.综合考虑实验成本,选择乙醇浓度为65%、75%、85%做后续正交试验.

3.1.2 超声时间对总黄酮提取率的影响

称取过40目筛的金叶女贞叶细粉3.01 g,置于250 mL锥形瓶中,加入65%的乙醇,置于50℃、400 W超声波各提取(30、45、60、75、90) min,按2.2项方法处理,显色,在510 nm处测定其吸光值,如图3所示.

由图3可知,在30 min~60 min中总黄酮得率随时间的增加而呈上升趋势,在60 min时达到最高峰,但60 min后总黄酮含量几乎趋于平衡.综合考虑,在节约时间的前提下,选择超声45 min、60 min、75 min进行下一步正交实验.

究其原因可能是由于超声波具有特殊的粉碎作用,在一定程度上增大了物质分子运动频率和溶剂的穿透能力,因而使有效成分溶出速率和溶出量提高,从而大大缩短了物质的提取时间.但长时间反应,其能量被溶剂所吸收,导致溶液温度上升,加速了溶剂挥发,从而导致了总黄酮得率降低.

3.1.3 超声频率对总黄酮提取率的影响

称取过40目筛的金叶女贞叶细粉3.01 g,置于250 mL具塞锥形瓶中,加入65%的乙醇,提取温度50℃,分别在200 W、300 W、400 W、500 W功率下进行提取30 min,按2.2项方法处理,显色,在353 nm处测定其吸光值.

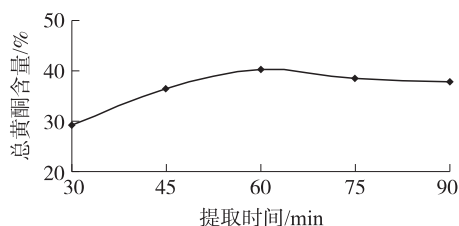


图3 超声时间对总黄酮含量的影响

Fig.3 Effects of ultrasonic time on total flavonoids contents

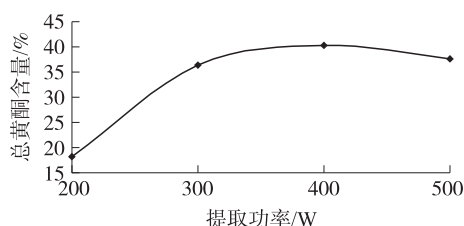


图4 超声功率对总黄酮含量的影响

Fig.4 Effects of ultrasonic power on total flavonoids contents

由图4可知,在以65%乙醇为溶剂提取总黄酮超声实验中,开始总黄酮的提取率随着频率的增加而呈上升趋势,在400 W左右时达到最高峰,400 W后总黄酮得率随超声频率的增高而呈下降趋势.综合考虑,选择超声频率为200 W、300 W、400 W进行正交试验.

3.1.4 超声温度对总黄酮提取率的影响

称取过40目筛的金叶女贞叶细粉5.00 g,置于250 mL锥形瓶中,加入65%的乙醇,置于30℃、40℃、50℃、60℃、70℃,400 W超声波进行提取30 min,按2.2项方法处理,显色,在353 nm处测定其吸光值,实验结果如图5所示.

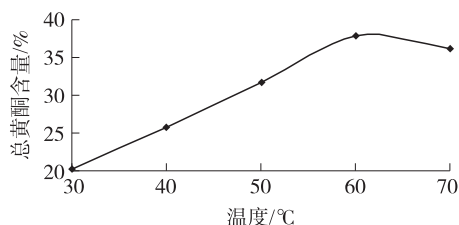


图5 超声温度对总黄酮含量的影响

Fig.5 Effects of ultrasonic temperature on total flavonoids contents

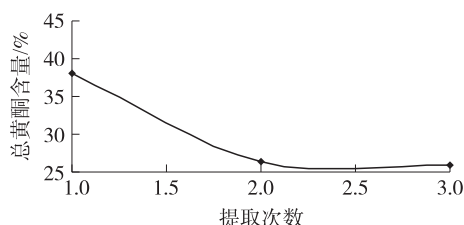


图6 提取次数对总黄酮含量的影响

Fig.6 Effects of extraction times on total flavonoids contents

由图5可知,总黄酮的得率随超声温度的增高而呈不断增大趋势.在60℃时总黄酮含量呈最大,60℃以后含量稍有下降趋势.综合以上,为节约成本,采用提取温度为50℃、60℃、70℃作为正交试验提取

温度较好.

究其原因可能是由于超声波具有加热效应,可以使组织局部升温,因而时间过长会导致溶剂挥发,并在一定程度分解目标产物.因此在实验中温度不宜过高,50℃~60℃即可.

3.1.5 提取次数对黄酮提取率的影响

称取过40目筛的金叶女贞果实细粉3.01g,置于250mL具塞锥形瓶中,加入65%的乙醇40mL,置于50℃、400W超声波进行提取30min,按2.2项方法显色,在353nm处测定其吸光值.结果如图6所示.实验结果表明,随提取次数增多总黄酮得率呈下降趋势,故提取次数选择1次为佳.

3.2 正交试验优化超声法提取金叶女贞叶中总黄酮的条件

由单因素实验结果可知,乙醇浓度、超声时间、超声功率、超声温度对金叶女贞叶中总黄酮的提取率影响较大,而提取次数对其影响较小.为系统考察超声法提取金叶女贞叶中总黄酮得率的工艺,选用乙醇浓度、提取时间/min、超声功率/W、提取温度作为考察因素,以测得样品中总黄酮含量为考察指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交表试验,实验结果及分析如下:

表1 因素水平表

Table 1 The level of form factors

水平	A 乙醇浓度(体积分数)	B 超声时间/min	C 超声功率/W	D 超声温度/℃
1	85%	45	400	50
2	75%	60	300	60
3	65%	80	200	70

表2 正交试验直观分析表

Table 2 Intuitive analysis of orthogonal test table

因素	溶剂浓度	时间	功率	温度	含量/%
实验1	1	1	1	1	35.17
实验2	1	2	2	2	29.16
实验3	1	3	3	3	36.21
实验4	2	1	2	3	41.34
实验5	2	2	3	1	41.87
实验6	2	3	1	2	46.30
实验7	3	1	3	2	44.74
实验8	3	2	1	3	43.78
实验9	3	3	2	1	45.43
均值1	33.513	40.417	41.750	40.823	
均值2	43.170	38.270	38.643	40.067	
均值3	44.650	42.647	40.970	40.443	
极差	11.137	4.377	3.107	0.756	

表3 正交试验方差分析表

Table 3 Analysis of variance table orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
乙醇浓度	219.467	2	255.491	19.000	**
时间	28.736	2	33.453	19.000	*
功率	15.582	2	18.140	19.000	
温度	0.859	2	1.000	19.000	
误差	0.86	2			

注: * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$.

由超声法提取金叶女贞叶中总黄酮的正交试验直观分析表可以看出,影响提取液总黄酮浓度的因素主次顺序依次为 $A>B>C>D$,即乙醇浓度>超声时间>超声功率>超声温度.随所选水平因素变动时,根据 K_1 、 K_2 、 K_3 的大小,确定最佳组合 $A_3B_3C_1D_1$,即药粉过40目筛,乙醇浓度65%,超声提取75min,超声功率为400W,提取温度为50℃,提取1次,此时总黄酮得率最高.本次试验中,4个因素对金叶女贞叶片中总黄酮含量的影响,从方差分析来看,乙醇浓度和超声时间达到了显著差异水平,且其中乙醇浓度达到极显著差异水平,证明在实验过程中这两个因素对实验结果影响较大.

3.3 验证性试验

为考察上述优选工艺条件的准确性和可靠性,按最佳实验组和 $A_3B_3C_1D_1$ 进行重复实验,取3次实验结果的平均值计算其总黄酮含量.结果表明,所选的最佳组和平均含量为46.41%,高于上述实验的任一结果,且也高于索氏提取法(含量为42.32%),因此认为此实验所得出的最佳水平是可行的.

4 结论

金叶女贞作为全国大部分地区常见的园林栽培植物,种植面积广,资源丰富,其同属植物女贞的果实为传统中药女贞子.前期研究结果发现,金叶女贞果实中富含齐墩果酸、熊果酸及多糖等物质,含量与中药女贞子基本一致,极具开发潜力^[11,12].李建法^[13]等曾对不同品种的苦丁茶中的总黄酮进行了含量分析,证明其中富含黄酮类化合物.Wu^[14]等对台湾当地特有的5种女贞树植物的叶片进行抗氧化实验,结果表明几种女贞的叶中具有一定程度的抗氧化作用,且其中均含黄酮类化合物.根据植物之间亲缘关系的可能具有像类似的成分推测,金叶女贞叶中应该富含黄酮类化合物^[15],这也和我们的前期实验结果相吻合.

本文以金叶女贞叶中的总黄酮类化合物作为衡量指标,在单因素实验的基础上,通过正交实验设计,优化了4种提取因素对叶片中总黄酮含量的影响.结果表明:当乙醇浓度为65%,超声提取时间为75 min,超声功率为400 W,提取温度为50℃,提取次数为1次,此时总黄酮含量最高.该实验为今后对于金叶女贞的进一步开发和利用提供了有力的理论及实验依据.

[参考文献]

- [1] 陈亮,周智修,舒爱民,等.3种苦丁茶与茶叶的感官与化学成分比较[J].浙江林学院学报,2000,17(3):298-300.
- [2] 周永红,王立升,韦藤幼.苦丁茶化学成分研究[J].广西大学学报:自然科学版,1999,24(3):203-204.
- [3] 郁建平.贵州苦丁茶植物资源及化学成分分析[J].植物资源与环境,1997,6(2):22-25.
- [4] 黄林芳.川产苦丁茶的品种、品质研究[D].成都:成都中医药大学药学院,2003:5.
- [5] 朱莉芬,罗集鹏,李美珠,等.苦丁茶的心血管药理作用研究[J].中药材,1994,17(3):37-40.
- [6] 蒋建敏,王兵,许实波,等.苦丁茶的抗菌作用研究[J].中药药理与临床,2001,17(1):18-19.
- [7] Luo Y P. Advances in pharmacological research of flavonoids[J]. Asia-Pac Trad Med,2010(4):126-128.
- [8] Gan L J, Deng Z Y. Optimization of ethanol extraction of total flavonoids from the leftover residue of a Chinese herbal medicine combination after supercritical carbon dioxide extraction using response surface methodology[J]. J Food Sci,2010(18):26-30.
- [9] Dong J, Li Y, Xu H, et al. Optimization of microwave-assisted extraction process of total flavonoids from persimmon leaves using response surface methodology[J]. J Zhejiang Agric Univ,2010,22:521-526.
- [10] Wang X W, Hai H, Jin W Y, et al. Optimization of microwave-ultrasound assisted extraction of flavonoids from Ginkgo Biloba leaves by response surface methodology[J]. Food Science and Technology,2010,35(3):189-193.
- [11] 王建安,王慧云,李艳芝,等.金叶女贞果实中齐墩果酸的提取与测定[J].食品工业科技,2010,31(11):301-303.
- [12] 王建安,苑光辉,李艳芝,等.超声法提取金叶女贞果实中多糖工艺的研究[J].南京师大学报:自然科学版,2012,35(4):73-77.
- [13] 李建法,胡六江,吕金红,等.苦丁茶黄酮类化合物的提取与分析[J].浙江林业科技,2005,25(1):31-34.
- [14] Wu C R, Lin W H, Hseu Y C, et al. Evaluation of the antioxidant activity of five endemic *Ligustrum* species leaves from Taiwan flora in vitro[J]. Food Chemistry,2011,127:564-571.
- [15] Zhu F, Cai Y Z, Sun M, et al. Comparison of major phenolic constituents and in vitro antioxidant activity of diverse Kudingcha genotypes from *Ilex Kudingcha*, *Ilex cornuta*, and *Ligustrum robustum*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2009,57:6 082-6 089.

[责任编辑:黄 敏]