

赖红芳. 正交试验优化翠云草黄酮的提取工艺[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 236–238.

正交试验优化翠云草黄酮的提取工艺

赖红芳

(河池学院化学与生命科学系, 广西宜州 546300)

摘要:采用单因素试验考察料液比、乙醇浓度、超声时间、超声温度、超声功率对黄酮提取率的影响,在此基础上进行正交试验,确定翠云草黄酮的最佳工艺条件。结果表明:最佳提取工艺条件是料液比 1 g : 30 mL、乙醇浓度 80%、超声时间 10 min、超声温度 50 ℃、超声功率 50 W,在此条件下,翠云草黄酮的平均提取率为 0.77%,加样回收率为 99.36%,*RSD* 为 2.36%。说明采用超声波法提取翠云草黄酮的工艺简易、可行、省时且无污染,对进一步工艺开发有较好的参考价值。

关键词:翠云草;黄酮;正交试验;提取工艺

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)09–0236–03

翠云草 [*Selaginella uncinata* (Desv.) Spring] 别称龙须、蓝草、蓝地柏、绿绒草,为卷柏科卷柏属蕨类植物,也是民间应用较广的中草药,主要分布于广西、广东、贵州、云南、四川、浙江、福建等地,全年可采,以全草入药。《湖南药物志》记载翠云草有化痰止咳的功效,其味微淡、苦,性寒,有清热解毒,利湿通络、止血生肌等功能,内服用于治疗黄疸性肝炎、痢疾、胆囊炎、风湿性关节炎等症,外用可治疗荨麻疹、烧烫伤、外伤出血、跌打损伤等症^[1]。翠云草中含有黄酮类、多糖及少量苷类等物质^[2–3],黄酮类物质具有明显的抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗氧化、抗血栓、扩张血管等作用。翠云草具有较高的药用价值。

黄酮类化合物的提取方法有热水提取、有机溶剂提取、超声波提取法、微波提取法、超临界流体提取法、酶法提取、半仿生提取法等^[4–5]。而超声波提取具有节能、减少对环境的污染等优点,在工业上的推广有很大的可行性。超声波技术广泛用于银杏叶、紫菀、甘草、半边莲、白花蛇舌草、荷叶以及各种植物的黄酮提取^[6–11],而超声波法提取翠云草黄酮的研究尚未见报道。

本研究以翠云草中黄酮提取和含量的测定为目标,以芸香苷为对照品绘制标准曲线,采用分光光度法测定黄酮含量,用超声波提取法,通过单因素和正交试验考察不同因素和水平对提取工艺的影响,从料液比、乙醇浓度、超声时间、超声温度、超声功率 5 个影响因素进行研究,以翠云草中黄酮的提取率为指标,选用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验对翠云草提取工艺参数进行优选,为进一步研究利用翠云草提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 翠云草于 2012 年 3 月采自广西宜州市小龙

村,经河池学院化学与生命科学系邓晰朝副教授鉴定为翠云草全草。

1.1.2 试剂 芸香苷标准品(上海源叶生物科技有限公司,批号:20110825);无水乙醇、石油醚、醋酸铅、碱式醋酸铅、 NaNO_2 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 NaOH 、浓 HCl 均为分析纯。

1.1.3 仪器 高速多功能粉碎机,上海冰都电器有限公司生产;分析天平,AE240S,梅特勒—托利多(上海)有限公司生产;电热恒温鼓风干燥箱,上海跃进医疗器械厂生产;KQ2200DE 型数控超声波清洗器,江苏省昆山市超声仪器有限公司生产;RE–52A 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂生产;SHB–Ⅲ型循环水式多用真空泵,河南郑州长城科工贸有限公司生产;UV–2102PCS 型紫外分光光度计,尤尼科仪器有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 样品的预处理 将翠云草放入电热恒温鼓风干燥箱 30 ℃干燥 24 h,用粉碎机粉碎过 40 目筛,用石油醚浸泡 5 h,进行脱脂、去除叶绿素,抽滤,收集滤渣并将其晾干,备用。

1.2.2 样品溶液的制备 准确称取 10 g 翠云草粉末于 250 mL 烧杯中,按要求加入一定量浓度的乙醇浸泡 30 min,在一定温度和功率下超声波辅助提取一定时间,趁热减压抽滤,将滤液转移至 500 mL 容量瓶中,用相应浓度的乙醇定容至刻度,摇匀,作为待测液。

1.2.3 标准品溶液的制备 准确称取芸香苷标准品 10 mg 于烧杯中,用 60% 乙醇溶解,待溶解后完全转移至 100 mL 容量瓶内,用 60% 乙醇定容至刻度,摇匀,即得标准液 0.1 mg/mL。

1.2.4 波长选择 用吸量管分别准确吸取 2.0 mL 样品溶液和 2.0 mL 标准品溶液于 25 mL 容量瓶中,各加 0.7 mL 5% NaNO_2 溶液,摇匀,放置 6 min;再加 0.7 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,摇匀,放置 6 min;再加 5 mL 4% NaOH 溶液,并用 60% 乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15 min。以空白的 NaNO_2 – $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ – NaOH 液作参比液,在 400 ~ 600 nm 范围内测定吸光度,然后以波长为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制吸收曲线。样品溶液在 500 nm 处有最大吸光度,与芸香苷标准品溶液吸收曲线相似,故选择 500 nm 为测定波长。

1.2.5 标准曲线的制作 准确吸取标准液 0.0、1.0、2.0、

收稿日期:2013–01–06

基金项目:广西教育厅科研项目(编号:201106LX584)。

作者简介:赖红芳(1975—),女,壮族,广西柳州人,副教授,主要从事天然产物提取及化学成分分析。Tel: (0778) 3141892; E-mail: laihongfang263@163.com。

3.0、4.0、5.0、6.0 mL, 分别置于 7 支 25 mL 容量瓶中, 加 0.7 mL 5% NaNO₂ 溶液, 摇匀, 放置 6 min; 再加 0.7 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液, 摇匀, 放置 6 min; 再加 5 mL 4% NaOH 溶液, 并用 60% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以空白的 NaNO₂ - Al(NO₃)₃ - NaOH 液作参比液, 在 500 nm 处测定吸光度。以浓度 (mg/mL) 为横坐标, 吸光度 *D* 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程: $y = 8.8571x - 0.004$, $r = 0.9995$, 结果表明, 当芸香苷的浓度在 0~0.024 mg/mL 时, 浓度与吸光度呈良好的线性关系。

1.2.6 样品提取液中黄酮含量的测定 精确吸取 5.0 mL 翠云草待测液于 25 mL 容量瓶中, 按照“1.2.5”标准曲线制作的显色方法进行显色, 用空白的 NaNO₂ - Al(NO₃)₃ - NaOH 溶液调零, 在 500 nm 处测吸光度, 然后代入回归方程计算, 可得黄酮的浓度, 再利用公式计算即得样品中黄酮的提取率。

2 结果与分析

2.1 正交试验

结合单因素试验结果, 本研究以料液比 (A)、乙醇浓度

(B)、超声时间 (C)、超声温度 (D)、超声功率 (E) 5 因素对黄酮提取工艺进行正交试验, 并以黄酮提取率作为提取工艺的判断指标, 各因素及水平设置如表 1 所示。正交试验采用 L₁₆(4⁵) 进行试验, 试验结果见表 2。

表 1 翠云草黄酮提取工艺正交试验因素与水平

水平	A:料液比 (g : mL)	B:乙醇 浓度 (%)	C:超声时 间 (min)	D:超声温 度 (℃)	E:超声 功率 (W)
1	1 : 20	50	10	40	50
2	1 : 25	60	15	50	60
3	1 : 30	70	20	60	70
4	1 : 35	80	25	70	80

由表 2 中的极差分析结果可知, 各因素组合的极差从大到小表现为 B > C > A > D > E, 各因素对试验影响顺序为 B > C > A > D > E, 即各因素对翠云草黄酮提取率的影响程度为: 乙醇浓度 > 超声时间 > 料液比 > 超声温度 > 超声功率。得出最佳提取工艺条件为 A₃B₄C₁D₂E₁, 即料液比为 1 g : 30 mL, 乙醇浓度为 80%, 超声时间为 10 min, 超声温度为 50 ℃, 超声功率为 50 W。

表 2 翠云草黄酮提取工艺正交试验结果

试验号	样品质量 (g)	料液比	乙醇浓度	超声时间	超声温度	超声功率	吸光度	黄酮提取率 (%)
1	1.000 7	1	1	1	1	1	0.107	0.313
2	1.000 5	1	2	2	2	2	0.129	0.375
3	1.000 8	1	3	3	3	3	0.174	0.502
4	1.000 5	1	4	4	4	4	0.255	0.731
5	1.000 5	2	1	2	3	4	0.103	0.302
6	1.000 8	2	2	1	4	3	0.143	0.415
7	1.000 9	2	3	4	1	2	0.201	0.578
8	1.000 4	2	4	3	2	1	0.264	0.756
9	1.000 7	3	1	3	4	2	0.115	0.336
10	1.000 8	3	2	4	3	1	0.145	0.420
11	1.000 4	3	3	1	2	4	0.212	0.609
12	1.000 8	3	4	2	1	3	0.241	0.691
13	1.000 8	4	1	4	2	3	0.114	0.333
4	1.000 4	4	2	3	1	4	0.125	0.364
15	1.000 5	4	3	2	4	1	0.198	0.570
16	1.000 6	4	4	1	3	2	0.259	0.742
<i>k</i> ₁		0.480	0.321	0.520	0.487	0.515		
<i>k</i> ₂		0.513	0.394	0.485	0.518	0.508		
<i>k</i> ₃		0.514	0.565	0.490	0.492	0.485		
<i>k</i> ₄		0.502	0.730	0.516	0.513	0.502		
<i>R</i>		0.034	0.409	0.035	0.031	0.030		

2.2 方差分析

对正交试验结果进行方差分析, 结果 (表 3) 显示, 乙醇浓度在各水平间差异有显著意义, 料液比、超声时间、超声温度、

超声功率在各水平间差异均不显著, 表明在 5 因素所确定的水平范围内, 乙醇浓度对翠云草黄酮提取率影响很大。

表 3 翠云草黄酮提取工艺方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>F</i> _{0.05} (3,3)	<i>P</i>	显著性
A	0.003 01	3	0.001 00	1.515 2	9.28	>0.05	不显著
B	0.401 90	3	0.133 97	202.980 0	9.28	<0.05	显著
C	0.003 92	3	0.001 31	1.984 8	9.28	>0.05	不显著
D	0.003 03	3	0.001 01	1.530 3	9.28	>0.05	不显著
E	0.001 99	3	0.000 66	1.000 0			

2.3 验证性试验

为了考察上述工艺的稳定性,按该工艺的最佳条件 $A_3B_4C_1D_2E_1$,即料液比为 1 g : 30 mL、乙醇浓度为 80%、超声时间为 10 min、超声温度为 50 ℃、超声功率为 50 W 的条件下进行重复性试验 5 次,按“1.2.3”样品溶液的制备及“1.2.5”标准曲线制作的操作方法分别试验,测定吸光度,算出黄酮的提取率,再计算其 *RSD*,试验结果见表 4。

表 4 翠云草黄酮提取工艺验证试验结果

样品	样品质量 (g)	吸光度	黄酮提取率 (%)
1	1.000 2	0.266	0.762
2	1.000 3	0.270	0.773
3	1.000 2	0.268	0.768
4	1.000 4	0.272	0.779
5	1.000 1	0.269	0.771
平均			0.770

注:*RSD* 为 0.82%。

由表 4 分析可知,在此工艺条件下,样品中黄酮的平均提取率为 0.77%,优于正交试验中的任何组合,*RSD* 为 0.82%,说明该工艺稳定。

2.4 加样回收率试验

分别精确量取 5.0 mL 已知黄酮含量的样品溶液 5 份,分别加入 1 mL 0.1 mg/mL 芸香苷标准品溶液,按“1.2.5”标准曲线制作的操作方法分别试验,测定吸光度,根据回归方程,分别计算翠云草样品中黄酮的含量与样品加标样后黄酮的含量计算回收率(表 5)。

表 5 翠云草黄酮提取工艺回收率试验结果

试验号	黄酮含量 (mg)	芸香苷含量 (mg)	加标后黄酮 含量(mg)	回收率 (%)
1	0.779 0	0.1	0.880 6	101.60
2	0.779 0	0.1	0.875 0	96.00
3	0.779 0	0.1	0.877 8	98.80
4	0.779 0	0.1	0.880 6	101.60
5	0.779 0	0.1	0.877 8	98.80

注:*RSD* 为 2.36%。

由试验结果(表 5)可知,在 $A_3B_4C_1D_2E_1$ 条件下,样品加样平均回收率为 99.36%,*RSD* 为 2.36%,说明此方法具有良好的加样回收率。

2.5 精密度试验

精确吸取验证试验中的第 1 份样品溶液 5.0 mL 于 25 mL 容量瓶中,按照“1.2.5”标准曲线制作的操作方法,重复做 5 次,测定吸光度,算出黄酮提取率,得出 *RSD* = 0.66%(表 6),说明此方法精密度良好。

3 结论

在单因素试验基础上进行多因素正交试验,研究超声波法提取翠云草黄酮的最佳工艺。从正交试验的结果和方差分析可知,影响翠云草黄酮提取率的因素主次顺序为:乙醇浓度

表 6 翠云草黄酮提取工艺精密度试验

测定次数	吸光度	黄酮提取率 (%)
1	0.265	0.759
2	0.264	0.756
3	0.266	0.762
4	0.264	0.756
5	0.268	0.768
平均		0.760

注:*RSD* 为 0.66%。

$B > \text{超声时间} > \text{料液比} > \text{超声温度} > \text{超声功率} > E$ 。并根据 *R* 的大小,确定了翠云草黄酮的最佳提取工艺条件为 $A_3B_4C_1D_2E_1$,即料液比为 1 g : 30 mL、乙醇浓度为 80%、超声时间为 10 min、超声温度为 50 ℃、超声功率为 50 W。在最佳工艺条件下,得到翠云草黄酮的平均提取率为 0.77%,加样回收率为 99.36%,*RSD* 为 2.36%。

翠云草中黄酮的提取率不高,可能是由于黄酮的提取率与原料的季节性、成熟度、生长环境等方面有关。此次试验采用的原料是在 3 月采于广西宜州市小龙村的,3 月是翠云草生长的初期,在此季节采集的翠云草黄酮的含量不是很高,因此实测黄酮提取率不高。

根据精密度试验、稳定性试验、重复性试验以及样品加样回收试验结果可知,超声波提取法的提取工艺精密度、稳定性、重复性良好,加样回收率较好。说明超声波法应用于翠云草黄酮的提取是合理、可行、省时、无污染的,且提取物稳定不易变质,为开发利用翠云草以及工业化生产提供理论依据。

参考文献:

[1] 范晓磊. 翠云草生药学研究[D]. 武汉:湖北中医学院,2007.
[2] 李清玉,司民真,邓莉兰,等. 两种卷柏科药用蕨类植物的红外光谱分析研究[J]. 光散射学报,2007,19(2):163-167.
[3] 王钢力. 春根藤化学成分的研究,翠云草等卷属植物的黄酮类成分研究[D]. 北京:北京中医药大学,2001.
[4] 陈丛瑾,黄克瀛,李德良,等. 植物中黄酮类化合物的提取方法研究概况[J]. 生物质化学工程,2007,41(3):42-46.
[5] 蔡健,华景清,王薇,等. 黄酮提取工艺研究进展[J]. 淮阴工学院学报,2003,12(5):82-83.
[6] 李宁,李楚. 银杏叶总黄酮提取工艺的正交设计研究[J]. 山西农业大学学报,2010,30(1):74-75.
[7] 陆敏,冯俊霞,于宏伟. 紫菀黄酮类化合物的超声波辅助提取与高效液相色谱法含量测定[J]. 江苏农业科学,2012,40(7):224-225.
[8] 王应强,张静,段玉峰. 超声波提取甘草黄酮的工艺研究[J]. 粮油食品科技,2006,14(3):41-43.
[9] 黄秀香,苏丹静,赖红芳. 超声波协同复合酶法提取半边莲中黄酮苷的工艺研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(5):234-237.
[10] 黄慧,田素英. 白花蛇舌草总黄酮的超声提取工艺研究[J]. 中国当代医药,2011,18(23):144-146.
[11] 张蕾,乔旭光,古习娟,等. 超声波提取对荷叶超微粉中黄酮类物质提取的影响[J]. 食品工业科技,2007,28(9):137-140.