

梁永锋. 不同产地野生与人工种植金莲花黄酮含量的比较及提取工艺[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 253–255.

不同产地野生与人工种植金莲花黄酮含量的比较及提取工艺

梁永锋

(宁夏师范学院化学与化学工程学院, 宁夏固原 756000)

摘要:测定了人工种植金莲花黄酮含量并探究其最佳提取工艺, 并通过比较人工种植与道地野生金莲花中的黄酮含量, 对人工种植金莲花的药用品质进行评价。以芸香苷标准品为对照品, 用 UV-2450 型紫外可见分光光度计测定黄酮含量, 通过单因素试验和正交试验探索微波辐射下微波功率、溶剂浓度、微波辐射时间、料液比、浸泡时间对黄酮提取率的影响。结果显示, 人工种植金莲花黄酮含量为 11.916%, 最佳工艺条件是: 微波功率 500 W, 液物料比 1 g : 20 mL, 乙醇浓度 60%, 微波辐射时间 30 min, 浸泡时间 80 min。说明人工种植金莲花黄酮含量较高, 完全能够满足药用需要。

关键词:人工种植; 金莲花; 黄酮含量; 提取工艺

中图分类号: O657.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0253-02

金莲花(*Trollius chinensis*)为毛茛科植物干燥的花, 别称旱荷、寒荷、陆地莲、旱地莲、金梅草、金疙瘩、旱金莲, 其“味苦, 性寒, 无毒”, 可“治口疮喉肿、浮热牙宣、耳疼目痛”^[1]。现代药理研究表明, 金莲花具有抗菌、抗病毒等活性, 用于治疗慢性扁桃体炎、感冒、发烧、急性鼓膜炎、尿路感染等其他炎症。据文献报道, 金莲花主要活性成分为黄酮类化合物^[2], 因此黄酮含量的高低是评判金莲花药用价值的标准之一^[3]。本试验通过测量宁夏回族自治区隆德西北中药材有限公司种植的金莲花不同部位黄酮的含量, 并与野生金莲花中黄酮含量进行比较, 判断其药用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人工种植的金莲花采自宁夏隆德县西北中药材有限责任公司种植基地, 河北承德、山西五台山、内蒙古赤峰、长白山产的野生金莲花购于宁夏明德中药饮片有限公司, 由中药师、注册药剂师赵建军鉴定。将所采样品放入恒温箱中, 在 60℃ 下烘干至恒重, 取出后自然阴干, 粉碎, 过 80 目筛, 备用。质量分数为 99% 芸香苷标准品(中国生物药品鉴定所, 批号: 100080-200707), 乙醇、硝酸铝、氢氧化钠、亚硝酸钠等试剂均为分析纯。

1.2 主要试验仪器

UV-2450 型紫外可见分光光度计(日本岛津), XH-300A 微波催化合成/萃取仪(北京祥鹤科技发展有限公司), FW-177 型中草药粉碎机(天津泰斯特), L-S 电子天平(0.1 mg, 梅特勒-托利多仪器公司), RE-52A 旋转蒸发

仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的建立 精确称取 120℃ 干燥芸香苷^[4]标准品 0.025 g, 加无水乙醇水浴微热溶解, 冷却, 用无水乙醇定容至 100 mL, 配制成 0.25 mg/mL 标准溶液, 备用。分别吸取该标准溶液 0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL, 置于 25 mL 容量瓶中, 加 60% 乙醇 5 mL、5% 亚硝酸钠溶液 1.00 mL, 摇匀, 放置 6 min; 加入 10% 硝酸铝溶液 1.00 mL, 摇匀, 放置 6 min; 再加入 4.3% 氢氧化钠溶液 10 mL, 加蒸馏水至刻度摇匀后, 静置 15 min。空白对照直接加 60% 乙醇 10 mL, 其余所加试剂同上至刻度。在波长 510 nm 处测吸光度(D), 并以芸香苷标准溶液浓度(C)为横坐标, 绘制标准工作曲线, 得到芸香苷标准溶液浓度(C)与吸光度(D)回归方程: $C = 80.90615D - 2.45874$, $r^2 = 0.9998$ 。表明芸香苷标准品在 0.004~0.056 mg/mL 之间, 与吸光度具有良好的线性关系。

1.3.2 金莲花中黄酮的提取 准确称取粉碎的金莲花样品 1.00 g, 在一定的料液比、乙醇浓度和 pH 值下浸润 0.5 h, 然后微波辐射数分钟, 浸提过滤, 将滤渣在同样的条件下再浸提 1 次, 合并 2 次所得滤液, 将滤液转移到 100 mL 容量瓶中, 用乙醇定容至刻度, 作为供试样品溶液, 待测。

1.3.3 黄酮含量的测定 取样品液 0.1 mL, 置于 25 mL 容量瓶中, 按照制作标准曲线溶液的方法配制样品溶液并定容至 25 mL, 用 UV-2450 型紫外可见分光光度计测定波长 510 nm 处样品的吸光度。黄酮提取量(g/mL) = 黄酮质量分数(mg/mL) × 10⁻³ × 稀释倍数; 黄酮含量(%) = 黄酮提取量(g/mL) × 100 mL/金莲花样品重量(g) × 100%。

1.3.4 提取工艺研究 分别考察提取温度、溶剂浓度、物料比和微波辐射时间等 4 个因素对提取黄酮提取率的影响。同时, 为了综合考察多因素对提取过程的影响, 采用 5 因素 4 水平正交试验对提取过程中微波功率(A)、料液比(B)、溶剂浓度(C)、微波辐射时间(D)和浸泡时间(E)进行研究。

收稿日期: 2013-02-26

基金项目: 宁夏回族自治区科技支撑计划(编号: NKJZC2013); 宁夏师范学院创新团队资助(编号: ZZ201203)。

作者简介: 梁永锋(1963—), 男, 甘肃宁县人, 硕士, 教授, 从事天然药物分析及应用研究。E-mail: qylyf338@yahoo.com.cn。

2 结果与分析

2.1 单因素对金莲花中黄酮提取的影响

2.1.1 微波功率对黄酮提取率的影响 称取 1.00 g 人工种植金莲花 4 份,固定微波辐射时间 30 min,乙醇浓度 60%,料液比 1 g : 20 mL,浸泡时间 60 min,依次在微波辐射功率 300、400、500、600 W 下进行试验,黄酮提取率分别 8.538%、8.627%、8.942%、8.802%,表明微波辐射功率 500 W 时,黄酮提取率最高。

2.1.2 料液比对黄酮提取率的影响 称取 1.00 g 人工种植金莲花 4 份,分别取料液比为 1 g : 10 mL、1 g : 15 mL、1 g : 20 mL、1 g : 25 mL,固定微波功率 500 W,乙醇浓度 60%,浸泡时间 60 min,微波辐射时间 30 min 进行试验。黄酮提取率依次为 8.584%、9.477%、9.529%、9.531%,试验表明黄酮的提取率随溶剂的增加而增加。这是因为随着溶剂的增加,溶剂与原料接触越充分,二者的传质作用越强,黄酮的提取率越大;当溶剂大于 20 mL 时,随着溶剂的增大,提取率增大并明显趋于缓慢,为了纯化方便和节约试剂,因此确定料液比 1 g : 20 mL 是金莲花中黄酮提取适宜的料液比。

2.1.3 溶剂浓度对黄酮提取率的影响 称取 1.00 g 人工种植金莲花 4 份,分别取乙醇浓度 50%、60%、70%、80%,固定料液比 1 g : 20 mL,浸泡时间 60 min,微波辐射功率 500 W,微波辐射时间 30 min 进行试验,黄酮提取率分别是 8.378%、9.796%、9.618%、8.655%。试验结果表明,乙醇浓度在 60% 时,黄酮提取率最高。

2.1.4 微波辐射时间对黄酮提取率的影响 称取 1.00 g 人工种植金莲花 4 份,固定微波辐射功率 500 W,乙醇浓度 60%,料液比 1 g : 20 mL,浸泡时间 60 min,依次在微波辐射时间分别为 15、30、45、60 min 下进行试验,黄酮提取率为 8.452%、9.760%、9.487%、8.845%。试验结果表明,一开始黄酮提取率随微波辐射时间的延长而变大,微波辐射时间在 30 min 时,提取率最高;但是当辐射时间≥30 min 时,提取率反而降低。这可能是随着微波辐射时间的延长,提取物中的杂质也随着增加,这些杂质可能会吸附黄酮,造成黄酮提取率降低。因此,适宜的微波辐射时间是 30 min。

2.1.5 浸泡时间对黄酮提取率的影响 称取 1.00 g 人工种植金莲花 4 份,固定微波辐射功率 500 W,乙醇浓度 60%,料液比 1 g : 20 mL,微波辐射时间 30 min,依次在浸泡时间分别是 20、40、60、80 min 下进行试验,黄酮提取率为 8.178%、8.836%、9.473%、9.475%。试验结果表明,一开始黄酮提取率随浸泡时间的延长而变大;但是当浸泡时间大于 60 min 时,随着浸泡时间的延长,提取率增大明显趋于缓慢,为了节约时间,适宜的浸泡时间是 60 min。

2.2 多因素对金莲花中黄酮提取的影响

根据单因素试验结果确定各因素的合理水平(表 1),本试验为 5 因素 4 水平的试验,故选用 L₁₆(4⁵) 正交表安排试验,试验方案及结果如表 2 所示。

表 2 表明,影响金莲花黄酮提取的主要因素是微波辐射时间,影响因素依次为 D > C > E > B > A,即微波辐射时间 > 溶剂浓度 > 浸泡时间 > 料液比 > 微波辐射功率,最佳工艺条件是 A₃B₃C₂D₂E₄。

表 1 金莲花黄酮提取工艺的正交试验因素水平

水平 A:微波功率 代码	B:料液比 (g : mL)	C:溶剂浓度 (%)	D:微波时间 (min)	E:浸泡时间 (min)
1	300	1 : 10	50	15
2	400	1 : 15	60	30
3	500	1 : 20	70	45
4	600	1 : 25	80	60

表 2 金莲花黄酮提取工艺的正交试验结果

编号	A	B	C	D	E	黄酮含量 (mg/g)
1	1	1	1	1	1	85.18
2	1	2	2	2	2	114.89
3	1	3	3	3	3	101.12
4	1	4	4	4	4	81.07
5	2	1	2	3	4	109.57
6	2	2	1	4	3	85.69
7	2	3	4	1	2	95.20
8	2	4	3	2	1	106.42
9	3	1	3	4	2	87.82
10	3	2	4	3	1	94.31
11	3	3	1	2	4	117.25
12	3	4	2	1	3	107.21
13	4	1	4	2	3	86.28
14	4	2	3	1	4	109.27
15	4	3	2	4	1	91.89
16	4	4	1	3	2	103.07
k ₁	95.565	92.212	97.798	99.215	94.450	
k ₂	99.220	101.040	105.890	106.210	100.245	
k ₃	101.648	101.360	98.453	102.018	95.075	
k ₄	97.628	99.425	89.215	86.618	104.290	
R	6.083	9.148	16.675	19.592	9.840	

表 3 显示,影响微波辐射下提取金莲花中黄酮含量极显著的因素是溶剂浓度,显著因素是微波辐射时间,而微波功率、料液比和浸泡时间对黄酮的提取无显著影响,因此,提取过程中应严格控制溶剂浓度和微波辐射时间,浸泡时间可适当缩短。根据正交试验结果的直观分析和方差分析结果,最佳提取工艺为:微波辐射功率 500 W,液物料比 1 g : 20 mL,溶剂浓度 60%,微波辐射时间 30 min,浸泡时间 80 min。

表 3 金莲花黄酮提取工艺的正交试验方差分析结果

变异来源	偏差平方和	自由度	F	F _{0.05}	F _{0.01}
微波功率(A)	0.792	3	1	9.28	29.5
料液比(B)	2.203	3	2.78	9.28	29.5
溶剂浓度(C)	24.594	3	31.05**	9.28	29.5
微波时间(D)	8.541	3	10.78*	9.28	29.5
浸泡时间(E)	1.846	3	2.33	9.28	29.5
误差	0.792	3			

2.3 验证试验

取适量粉碎后的药材,在正交试验所得优化提取工艺条件下进行验证试验,得到黄酮含量为 11.916% (n = 3)。

陶 奕. 豆芽磷酸吡哆醛水解酶的部分纯化及性质[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 255–257.

豆芽磷酸吡哆醛水解酶的部分纯化及性质

陶 奕

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽合肥 230036)

摘要:采用硫酸铵沉淀及 Sephadex G-100 凝胶过滤柱、DEAE-Sephrose 阴离子交换柱、SP SephadexC-25 阳离子交换柱层析等步骤, 对豆芽中磷酸吡哆醛 (PLP) 水解酶进行分离纯化。结果表明: 黄豆芽 PLP 水解酶被纯化了 220.19 倍, 得率为 23.65%。最适温度为 50℃, 最适反应 pH 值为 5.5; Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 等对该酶有激活作用, Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 及金属离子螯合剂 EDTA 对该酶有抑制作用, 而 Ca^{2+} 对该酶活性无明显影响。在最适反应条件下, 测得反应底物磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺 (PMP) 的 K_m 分别为 0.27、0.41 mmol/L。

关键词: 豆芽; 磷酸吡哆醛; 酸性磷酸酶; 纯化; 性质

中图分类号: Q563⁺.3; S565.101

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2013)09-0255-03

维生素 B₆ 是一组吡啶化合物的总称, 其吡啶环第四碳位被甲酰基取代后形成吡哆醛 (pyridoxal, PL), PL 的磷酸酯形式为磷酸吡哆醛 (pyridoxal-5'-phosphate, PLP)。PLP 是重要的功能型维生素 B₆, 含有强活泼性的醛基, 能与细胞中多数亲核物质和蛋白质形成复合体, 参与催化氨基酸的各种代谢反应^[1]。PLP 水平的紊乱会影响生物体的正常生理机能。在生物体内, 受磷酸酶的作用, PLP 的浓度维持在一个较低的水平, 当体内 PLP 浓度过高时, 磷酸酶可以将 PLP 水解为 PL, 因此 PLP 水解酶是 PLP 代谢调控的关键性酶^[2]。

Lumeng 等最早对小鼠体内的 PLP 水解酶进行了研究^[3], 之后 Fonda 从人体红细胞中纯化出了 PLP 磷酸酶, 参与人体

中 PLP 的代谢调控^[4]。近年, Tazoe 等对细菌中 PLP 水解酶也进行了研究^[5], 但植物体内有关 PLP 水解代谢酶的研究只在烟草^[6]中有报道, 证实其为酸性磷酸酶, 酸性磷酸酶是一组在酸性条件下水解各种磷酸酯的酶, 因此, 研究开发来源丰富的植物 PLP 水解酶具有重要意义。本试验以取材容易且成本低的黄豆芽为材料, 对其体内 PLP 水解酶进行初步分离纯化和部分酶学性质研究, 以期为 PLP 水解酶的进一步研究和应用提供依据, 同时也为豆芽体内磷酸吡哆醛代谢调控机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

黄豆芽购自合肥市农贸市场。磷酸吡哆醛、磷酸吡哆胺 (PMP)、二硫苏糖醇 (DTT)、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、对硝基苯磷酸二钠 (PNPP)、柠檬酸、柠檬酸钠等均购自上海生工

收稿日期: 2013-03-18

作者简介: 陶 奕 (1989—), 女, 江苏靖江人, 硕士研究生, 研究方向为豆芽维生素 B₆ 代谢。E-mail: taoyi890616@126.com。

2.4 不同产地金莲花与人工种植金莲花黄酮含量比较

金莲花属 (*Trollhus* L.) 属于毛茛科金莲花亚科, 全世界约 25 种, 其中我国 16 种^[5], 主要分布于河北、山西、内蒙古、新疆、四川、云南、吉林、陕西、甘肃、青海等省 (区), 山西、河北是传统的金莲花道地产地和栽培地^[6]。从宁夏明德中药饮片有限公司购买河北承德、山西五台山、内蒙古赤峰、吉林长白山产的野生金莲花, 在正交试验所得优化提取工艺条件下进行提取, 其结果见表 4 ($n=3$)。

表 4 不同产地金莲花黄酮含量比较

金莲花产地	黄酮含量 (%)
河北承德	12.027
山西五台山	12.253
内蒙古赤峰	11.472
吉林长白山	4.573
宁夏隆德	11.916

3 结论

利用直观分析法, 在微波辐射下提取金莲花黄酮, 其影响因素依次为 $D > C > E > B > A$, 即微波辐射时间 > 溶剂浓度 >

浸泡时间 > 料液比 > 微波辐射功率, 最佳提取工艺条件是 $A_3B_3C_2D_2E_4$, 微波辐射功率 500 W, 液物料比 1 g : 20 mL, 溶剂浓度 60%, 微波辐射时间 30 min, 浸泡时间 80 min。与河北、山西、内蒙古、长白山产的野生金莲花中黄酮含量相比, 宁夏隆德西北中药材有限公司人工种植的金莲花中黄酮含量较高, 完全能满足药用需要。不过影响金莲花中黄酮含量的因素比较多, 除人工种植与野生的区别之外, 可能还与产地、生长年份、采摘时间、生长环境 (土壤养分) 等因素有关。

参考文献:

- [1] 赵学敏. 本草纲目拾遗 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 256.
- [2] 苏志伟, 田 鹤, 马英丽, 等. 金莲花中总黄酮提取工艺的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 850–851.
- [3] 苏连杰. 金莲花药效物质基础及质量评价研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2005.
- [4] 张进祥, 段吉平. 紫外分光光度法测定金莲花中总黄酮的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(10): 36–37.
- [5] 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, 1979: 70–88.
- [6] 白宇明. 中药材金莲花 [J]. 中草药, 1994, 25(6): 291.