

王亚红,祝 波.微波法提取狼把草总黄酮工艺研究[J].江苏农业科学,2014,42(4):235-237.

微波法提取狼把草总黄酮工艺研究

王亚红,祝 波

(吉林化工学院化学与制药工程学院,吉林吉林 132022)

摘要:以木犀草素、槲皮素、芹黄素为对照品,以总黄酮提取率为考察指标,采用单因素和正交试验优化狼把草总黄酮的微波提取工艺,确定乙醇体积分数 75%、微波功率 500 W、提取时间 35 min、料液比 1 g:20 mL 为狼把草总黄酮最佳提取工艺条件;该条件下总黄酮平均提取率为 0.507 2%。

关键词:狼把草;总黄酮;微波辅助提取;正交试验

中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)04-0235-02

狼把草(*Bidens tripartita* L.)为菊科鬼针草属植物,别名鬼叉、接力草、针线包等,广泛分布于我国大部分地区。狼把草药用历史悠久,其药用价值在《本草拾遗》《本草纲目》等文献中多有记载^[1],主要功效为养阴益肺、清利湿热,主治气管炎、肺结核、咽喉炎及丹毒、癰疮等,其药用主要有效成分为黄酮化合物木犀草素、槲皮素、芹黄素及糖苷^[2]。黄酮类化合物是一种生理活性物质,具有抗病毒、抗炎、抗癌防癌、降低血压、防止动脉粥样硬化和抗氧化、抗衰老等作用^[3-8],该化合物已成为国内外医药界研究的热门话题,是一类具有广泛开发前景的天然药物^[9]。本试验以总黄酮提取率为指标,采用单因素和正交试验,优选狼把草的微波提取工艺,为狼把草的综合利用及相关领域的深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与设备 微波辅助萃取仪(MAS-Ⅱ,上海新仪器微波化学科技有限公司);高效液相色谱仪(LC-20AT,日本岛津);紫外检测器(SPD-20A,日本岛津);色谱柱(Shim-pack VP-ODS,日本岛津);超声波清洗器(AS3120,天津奥特赛恩斯);旋转蒸发仪(RE-52A,上海亚荣生化仪器厂);电子分析天平(FA2004N,上海精密科学仪器有限公司)。

1.1.2 试验材料 狼把草购自吉林市江城大药房,经鉴定为狼把草(*Bidens tripartita* L.)干燥全草;木犀草素、槲皮素、芹黄素由北京捷诚科远化工技术研究院提供;无水甲醇、乙酸均为分析纯。

1.2 狼把草总黄酮含量测定

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇:水:乙酸为 75:30:0.4,用前微孔滤膜过滤并经超声脱气处理;检测波长为 254 nm,流速为 0.7 mL/min;柱温为室温;测试样品每次进样量为 10 μL。

1.2.2 对照品溶液的制备与线性试验 精密称取干燥至恒

重的木犀草素、槲皮素、芹黄素标准品,用流动相溶解并定容制成 60.5、30.3、26.3 mg/mL 的对照品溶液;分别精密吸取 1、3、5、7、9 mL,用流动相定容至 10 mL,用高效液相色谱仪进行测定。以峰面积(A)对浓度 C 进行线性回归,得回归方程为:木犀草素 $A = 7.65 \times 10^3 C + 685$, $r = 0.9997$,浓度范围 6.05~60.59 μg/mL;槲皮素 $A = 2.02 \times 10^4 C - 1.65 \times 10^3$, $r = 0.9998$,浓度范围 3.03~30.39 μg/mL;芹黄素 $A = 5.61 \times 10^3 C + 395$, $r = 0.9997$,浓度范围 2.63~26.39 μg/mL。

1.2.3 供试品溶液的制备与测定 准确称取 5.0 g 狼把草生药粉末于三颈瓶中,加入一定量 75%乙醇溶液作溶剂,在设定的试验参数下进行微波萃取,抽滤,滤渣加入等量 75%乙醇提取第 2 次;合并 2 次提取液旋蒸,所得溶液放入坩埚,在 70℃水浴锅中水浴蒸发;在烘箱中干燥至恒重得干浸膏,取一定量干浸膏用流动相溶解定容,用高效液相色谱仪测定狼把草中木犀草素、槲皮素、芹黄素的含量。

1.2.4 总黄酮提取率计算 加和每次提取得到浸膏的木犀草素、槲皮素、芹黄素 3 类黄酮化合物质量作为浸膏中总黄酮质量。狼把草总黄酮提取率计算公式为:狼把草总黄酮提取率 = 浸膏中总黄酮质量(g)/所用狼把草粉末量(g)×100%。

1.3 精确度与稳定性试验

1.3.1 精密度试验 精密吸取木犀草素、槲皮素、芹黄素 3 个对照品溶液,按照色谱条件连续进样 5 次,求得相应含量,并计算相对标准偏差 RSD。

1.3.2 重现性试验 在平行条件下,称取 6 份狼把草药粉各 5.0 g,测定样品溶液中木犀草素、槲皮素、芹黄素含量,并计算 RSD。

1.3.3 稳定性试验 取供试品溶液,用高效液相色谱仪每隔 2 h 测定 1 次样品溶液中木犀草素、槲皮素、芹黄素含量,并计算 RSD。

1.3.4 加样回收试验 取 6 份 1.5 g 狼把草,加入木犀草素、槲皮素、芹黄素标准品适量,按照供试样品提取条件,提取并制备相应溶液,测定木犀草素、槲皮素、芹黄素含量,并计算 RSD。

1.4 单因素试验

1.4.1 料液比 设定微波功率 700 W、微波温度 70℃、提取时间 30 min、乙醇体积分数 75%,分别按 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30(g:mL)的料液比进行微波萃取。

收稿日期:2013-08-29

基金项目:吉林化工学院项目(编号:吉化院合字第 2012 第 061 号)。
作者简介:王亚红(1970—),女,吉林吉林人,硕士,教授,从事天然产物研究开发。E-mail:wangyahong99999@163.com。

1.4.2 微波功率 设定微波温度 70 ℃、提取时间 30 min、料液比为 1 g∶20 mL、乙醇体积分数 75%，分别按 400、500、600、700、800 W 的微波功率进行微波萃取。

1.4.3 乙醇体积分数 设定微波功率 600 W、微波温度 70 ℃、提取时间 30 min、料液比 1 g∶20 mL，分别加入体积分数为 45%、55%、65%、75%、85% 的乙醇进行微波萃取。

1.4.4 微波时间 设定微波功率 600 W、微波温度 70 ℃、料液比 1 g∶20 mL、乙醇体积分数 75%，分别微波萃取 20、25、30、35、40 min。

1.5 正交试验

在单因素试验的基础上,进行 4 因素 3 水平的正交试验(表 1)。

表 1 狼把草总黄酮提取工艺正交试验因素水平

水平	A:乙醇体积分数(%)	B:微波功率(W)	C:微波时间(min)	D:料液比(g∶mL)
1	65	500	30	1∶15
2	75	600	35	1∶20
3	85	700	40	1∶25

2 结果与分析

2.1 精确度与稳定性试验

试验结果表明,在精密度试验中,木犀草素、槲皮素、芹黄素 3 个对照品溶液的 *RSD* 分别为 1.38%、1.09%、1.28%;在重现性试验中,木犀草素、槲皮素、芹黄素的 *RSD* 分别为 1.38%、1.68%、2.26%;在稳定性试验中,连续 6 次测得木犀草素、槲皮素、芹黄素的 *RSD* 分别为 1.37%、1.54%、1.44%,

该方法在 12 h 内测定数据比较稳定;在加样回收试验中,木犀草素、槲皮素、芹黄素回收率分别为 98.7%、98.5%、99.3%,*RSD* 分别为 1.13%、1.15%、1.12%。各试验 *RSD* 均小于 2%,试验精确度与稳定性较好,满足试验要求。

2.2 单因素试验结果

试验结果表明,在微波功率 700 W、微波温度 70 ℃、提取时间 30 min、乙醇体积分数 75% 条件下,随着料液比的增大,狼把草总黄酮提取率先增加后减小,1 g∶20 mL 时提取率最大。在微波温度 70 ℃、提取时间 30 min、料液比为 1 g∶20 mL、乙醇体积分数 75% 条件下,随着微波功率的增大,总黄酮提取率在 600 W 时达到最大值,之后有降低趋势。在微波功率 600 W、微波温度 70 ℃、提取时间 30 min、料液比 1 g∶20 mL 条件下,75% 乙醇为提取溶剂时,狼把草总黄酮提取效果最好。在微波功率 600 W、微波温度 70 ℃、料液比 1 g∶20 mL、乙醇体积分数 75% 条件下,35 min 时狼把草总黄酮提取率最高,此后,提取率随着时间延长而降低。

2.3 正交试验结果

由表 2 可见,影响狼把草总黄酮提取的因素大小顺序依次为:微波时间>乙醇体积分数>料液比>微波功率,确定最优组合为 A₂B₁C₂D₃。由表 3 可知,微波时间和乙醇体积分数对总黄酮提取影响的显著性较大,料液比和微波功率对试验影响的显著性较小。由于料液比均值 2 与均值 3 较为接近,因此,从降低成本角度考虑,选择料液比为 1 g∶20 mL,最终确定最佳提取工艺条件的水平组合为 A₂B₁C₂D₂,即最佳工艺条件为:乙醇体积分数 75%、微波功率 500 W、提取时间 35 min、料液比 1 g∶20 mL。

表 2 狼把草总黄酮提取正交试验结果

正交试验	A	B	C	D	浸膏质量(g)	黄酮提取量(mg)	提取率(%)
1	1	1	1	1	0.7493	15.208 3	0.304 2
2	1	2	2	2	0.8062	21.924 4	0.438 5
3	1	3	3	3	0.7446	18.513 5	0.370 3
4	2	1	2	3	0.6775	23.463 5	0.469 3
5	2	2	3	1	0.5949	17.514 9	0.350 3
6	2	3	1	2	0.5878	15.255 3	0.305 1
7	3	1	3	2	0.4993	15.636 8	0.312 7
8	3	2	1	3	0.5676	14.176 1	0.283 5
9	3	3	2	1	0.5483	18.399 4	0.368 0
<i>k</i> ₁ (提取率)	0.371 0	0.362 1	0.297 6	0.342 8			
<i>k</i> ₂ (提取率)	0.376 9	0.359 4	0.425 3	0.352 1			
<i>k</i> ₃ (提取率)	0.321 4	0.347 8	0.346 4	0.374 4			
<i>R</i> (提取率)	0.055 5	0.014 3	0.127 7	0.031 6			

表 3 狼把草总黄酮提取结果方差分析

因素	偏差平方和	自由度	<i>F</i> 比	<i>F</i> 临界值	显著性
A	0.005	2	0.625	3.110	*
B	0.000	2	0.000	3.110	
C	0.025	2	3.125	3.110	*
D	0.002	2	0.250	3.110	
误差	0.030				

2.4 最佳提取工艺验证

在最佳提取工艺条件下,按照单因素试验方法做 5 次,对该工艺提取狼把草总黄酮的效率进行验证。由表 4 可见,在

表 4 狼把草总黄酮提取验证性试验结果

试验号	浸膏质量(g)	吸光度	黄酮质量(mg)	提取率(%)	<i>RSD</i> (%)
1	0.733 5	0.483	25.57 5	0.511 5	
2	0.712 3	0.488	25.047 5	0.500 9	
3	0.737 9	0.484	25.670 5	0.513 4	
4	0.718 5	0.49	25.419 8	0.508 4	
5	0.722 5	0.482	25.080 4	0.501 6	
平均				0.507 2	1.12

乙醇体积分数 75%、微波功率 500 W、提取时间 35 min、料液

李 聪,朱晓吉. 超声破碎酵母细胞提取蔗糖酶条件优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):237-239.

超声破碎酵母细胞提取蔗糖酶条件优化

李 聪¹, 朱晓吉²

(1. 辽宁石油化工大学化学化工与环境学部, 辽宁抚顺 113001; 2. 辽宁省抚顺市环境科学研究院, 辽宁抚顺 113006)

摘要:采用单因素试验和 $L_9(3^3)$ 正交试验确定酿酒酵母的最佳超声破碎条件。结果表明,酿酒酵母的最佳超声破碎条件为:破碎功率 350 W、总工作时间 25 min、工作时间/间歇时间 15 s/25 s。

关键词:酵母细胞;蔗糖酶;酶活性;超声破碎法;正交试验

中图分类号: TS201.2⁺5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0237-03

蔗糖酶(sucrase, EC 3.2.1.26)别称转化酶,能催化蔗糖水解产生葡萄糖、果糖,是一种广泛存在于自然界中的糖苷酶^[1]。目前蔗糖酶已在农产品加工业^[2]、食品工业^[3-4]、医药行业^[5-6]中发挥重要作用。工业上一般从酵母中提取蔗糖酶^[7]。蔗糖酶属于胞内水解酶,提取时须对酵母细胞进行破壁处理,酵母细胞的破壁方法主要有机械研磨法、酶解法、反复冻融法等^[8],这些方法都有一些不足之处,例如酶解法耗时、费用高,机械研磨法操作复杂、损耗大等^[9]。超声波具有空化效应,会产生机械剪切压力而使细胞破碎^[10-11]。本研究采用超声波法破碎酵母细胞,以期找出有效保存酵母蔗糖酶活性的超声破碎条件。

1 材料与方法

1.1 菌株

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) GY 7,由辽宁石油化工大学化学化工与环境学部实验室保存。

1.2 培养基

种子培养基:葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 5 g/L,酵母膏 15 g/L,氯化钠 4 g/L, pH 值 7.0。

摇瓶发酵培养基:葡萄糖 20 g/L,酵母粉 10 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, MgSO_4 1 g/L, pH 值 5.5。

1.3 仪器设备

立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);全温振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技生物有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 酿酒酵母的培养及收集 向装有 30 mL 液体种子培养基的 250 mL 三角瓶中接种两环斜面种子, 30 ℃、150 r/min 振荡培养 24 h,得到二级种子液。将二级种子液以 10% 的接种量接入 100 mL 发酵培养基中, 29 ℃、摇床转速 160 r/min 条件下培养 27 h 左右。取菌液于 4 000 r/min 离心 10 min,得到酵母菌体细胞。

1.4.2 超声破碎酿酒酵母 将离心得到的菌体用 pH 值 4.6 的醋酸-醋酸钠缓冲液冲洗 2 次,取菌体 1 g,加入到 50 mL 缓冲液中充分振荡混匀制成菌悬液,在超声细胞破碎仪中破碎,破碎条件按单因素试验和正交试验表进行。

收稿日期:2013-08-26

作者简介:李 聪(1984—),女,辽宁抚顺人,硕士研究生,助理实验师,研究方向为食品微生物发酵。E-mail: lcfayewong@126.com。

比 1 g:20 mL 的最佳工艺条件下,对样品中狼把草总黄酮的提取量在 25.080 4~25.670 5 mg 之间,平均提取率为 0.507 2%,提取效果比较理想。

3 小结

本试验采用微波工艺提取狼把草黄酮,该方法加热耗能量少,成本低,简单方便。优化所得最佳提取工艺条件为:乙醇体积分数 75%、微波功率 500 W、提取时间 35 min、料液比 1 g:20 mL、微波温度 70 ℃,该优化条件下的平均提取率为 0.507 2%。该研究结果对狼把草总黄酮在药物、食品等领域的深入开发提供了一定参考。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1979:1901.
- [2] 王天勇,南凤仙,杨文远. RP-HPLC 法同时测定狼把草中的木

犀草素、槲皮素和芹黄素[J]. 宁夏大学学报:自然科学版, 1996, 17(4):18-21.

- [3] 万洪善,李 凡. 盐生植物碱蓬黄酮类物质的提取及抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(4):296-298.
- [4] 鄢春旻. 黄酮类化合物抗病毒及抗炎活性研究[D]. 南京:南京大学,2012:32.
- [5] 才金玲,单 群,陆 军,等. 大豆黄酮对衰老小鼠脑组织的保护作用[J]. 江苏农业科学,2012,40(6):289-291.
- [6] Aquila S, Giner R M, Recio M C, et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 121(2):333-337.
- [7] 张 宇,曲佐寅,刘立新,等. 万寿菊茎叶中 2 种黄酮类化合物的体外抗肿瘤活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):233-237.
- [8] 张海生,陈锦屏. 蜂蛹黄酮的提取及体外抗氧化作用的研究[J]. 食品科学,2008,29(2):158-162.
- [9] 尹爱群,穆惠军,江雪欣,等. 黄酮类化合物研究进展[J]. 中国药事,2005,19(11):50-53.