

尤 静,任晓芳,刘春叶,等. 菊花中总黄酮成分不同提取工艺的比较[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):218-219.

菊花中总黄酮成分不同提取工艺的比较

尤 静,任晓芳,刘春叶,余丽丽

(西安医学院,陕西西安 710021)

摘要:采用超声法、酶法结合半仿生法提取野菊花中的总黄酮类物质,通过正交试验优化提取条件,用分光光度法测定总黄酮含量。结果表明,超声法的最佳提取条件为:提取溶剂 50% 乙醇,提取温度 70 ℃,料液比 1 g : 40 mL,时间 30 min;酶法结合半仿生法的最佳提取条件为:于 37 ℃ 分别在模拟胃肠环境 pH 值条件下提取 2 h,果胶酶酶解最佳料液比为 1 g : 20 mL,纤维素酶酶解最佳料液比为 1 g : 15 mL,但果胶酶酶解效果更优。综合比较可以发现,超声提取法简单易行且提取率较高,酶法结合半仿生提取法的耗时较长,提取率较低,但更符合口服给药的药物代谢原理。

关键词:野菊花;总黄酮;超声法;酶法结合半仿生法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0218-02

野菊花为菊科植物野菊的头状花序。在我国分布广泛,野生资源非常丰富^[1]。野菊花的主要药效成分是黄酮类化合物,具有保护心脑血管、抗癌抗氧化、利胆保肝等多种生物活性^[2]。野菊花在临床上的主要作用是抗菌消炎,主要产品有菊藻丸、野菊花注射液、野菊花栓等,在食品、化妆品、保健品等行业还具有进一步开发利用的广阔前景^[3]。为了对生物资源进行综合利用,提取方法的选择在制剂工艺中占据十分重要的地位,传统的方法有水提、醇提、碱提酸沉等,随着科学技术的进步,发展出了诸如半仿生提取、酶提取、超声提取、微波提取和超临界流体萃取等方法,从而大大提高了中药制剂的产量和质量^[4]。本研究采用半仿生法和酶法相结合的方式,模拟人体消化吸收的过程对野菊花总黄酮成分进行提取,并与提取效率较高的超声法提取结果进行比较^[5],以期得到更加适宜的总黄酮提取方法,为更好地开发利用野菊花提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 试验仪器 XH-2008DE 型智能温控双频超声波合成/萃取仪,北京祥鹄科技发展有限公司;RE-2000A 旋转蒸发仪,巩义市予华仪器有限责任公司;UV-2012C/PC/PCS 紫外-可见分光光度计,尤尼柯仪器有限公司;PB-10 型酸度计,赛多利斯科学仪器有限公司;FW-200 型高速万能粉碎机,北京中兴伟业仪器有限公司;WO-501 恒温水浴锅,北京科伟永兴仪器有限公司。

1.1.2 试剂与药材 无水乙醇、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠、磷酸氢二钠、柠檬酸均为分析纯;果胶酶、纤维素酶购自国药集团化学试剂有限公司;芸香苷标准品由中国食品药品检

定研究院提供;野菊花于 2010 年 10 月采自陕西秦岭山区。

1.2 试验方法

1.2.1 分光光度法测定总黄酮含量 分别精密吸取 1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.50 mL 浓度为 0.214 mg/mL 的芸香苷标准品贮备液于 10 mL 的容量瓶中,分别加入 0.3 mL 5% NaNO₂ 溶液,振荡后静置 6 min;再分别加入 0.3 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液,振荡后静置 6 min;再分别加入 4.0 mL 4% NaOH 溶液,用 60% 乙醇定容后摇匀,静置 13 min 进行显色;将上述溶液在 400~700 nm 波长范围内进行扫描,并以标准品浓度(x)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.2 超声法提取 野菊花洗净沥干后置于烘箱中,在 50 ℃ 条件下烘至恒重,粉碎后过 60 目筛,密封保存备用。称取野菊花粉末,加入乙醇溶液溶解,超声提取后将提取液经离心分离抽滤,即得样品溶液,按“1.2.1”节的方法测定吸光度,根据回归方程计算总黄酮得率。以超声时间、温度、乙醇浓度、野菊花粉末和乙醇溶液的料液比为因素设计正交试验,4 因素 3 水平设计见表 1。

表 1 菊花总黄酮提取工艺因素水平设计

水平	因素			
	A:时间 (min)	B:温度 (℃)	C:乙醇浓度 (%)	D:料液比 (g : mL)
1	20	60	50	1 : 20
2	30	70	60	1 : 30
3	40	80	70	1 : 40

1.2.3 酶法结合半仿生法提取

1.2.3.1 纤维素酶酶解 按一定料液比分别在一定量的野菊花粉末中加入 pH 值为 2 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、0.004 g 纤维素酶,37 ℃ 恒温水浴提取 2 h 后抽滤;将滤渣用蒸馏水洗涤几次后放入 pH 值为 7.5 的缓冲液中,再加入 0.004 g 纤维素酶,恒温提取 2 h,抽滤;洗涤滤渣并放入 pH 值为 8.3 的缓冲液中,再加入 0.004 g 纤维素酶,提取 2 h 后抽滤并合并滤液,60 ℃ 旋蒸,加 60% 乙醇溶解。精密吸取 0.2 mL 提取液至 10 mL 容量瓶中,按“1.2.1”节的方法进行显色处理,计算总黄酮得率:

总黄酮得率 = 由吸光度换算得到的浓度 × 稀释倍数 × 溶解后得到的体积 / 野菊花总质量 × 100%。

收稿日期:2013-09-03

基金项目:陕西省教育厅专项科研计划(编号:12JK0708);陕西省自然科学基金基础研究计划(编号:2012JQ4002);陕西省教育厅科研计划(编号:2013JK0759);西安医学院博士科研启动基金(编号:2011DOC05)。

作者简介:尤 静(1977—),女,陕西西安人,讲师,主要从事医用化学的教学与研究工作。E-mail:494515818@qq.com。

1.2.3.2 果胶酶酶解 按一定料液比分别在一定量的菊花粉末中加入 pH 值为 2 的磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液、0.004 g 果胶酶,37 ℃恒温水浴提取 2 h 后抽滤;将滤渣放入 pH 值为 7.5 的缓冲液中恒温提取 2 h,抽滤;将滤渣放入 pH 值为 8.3 的缓冲液中,提取 2 h 后抽滤,合并滤液,60 ℃旋蒸,加 60% 乙醇溶解。精密吸取 0.2 mL 提取液至 10 mL 容量瓶中,按“1.2.1”中的方法进行显色处理,计算总黄酮得率。

2 结果与分析

2.1 分光光度法的标准曲线

研究发现,芸香苷样品在 508 nm 处有最大吸收峰,以标准品浓度(x)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标绘制标准曲线,得到线性回归方程为: $y = 11.26x - 0.0235 (r = 0.9997)$ 。

2.2 超声法提取正交试验结果

通过单因素试验可知,超声法提取总黄酮物质的影响因素主要有料液比、乙醇浓度、提取温度和提取时间。以总黄酮得率为指标, $L_9(3^4)$ 正交试验结果见表 2。由表 2 可知,各因素对总黄酮提取得率影响大小顺序依次为:超声温度 > 超声时间 > 乙醇浓度 > 料液比。因此最优提取方案为:超声时间 30 min,超声温度 70 ℃,乙醇溶液浓度 50%,料液比 1 g : 40 mL。

表 2 超声法正交试验结果

编号	时间	温度	乙醇浓度	料液比	总黄酮得率 (%)
1	1	1	1	1	7.93
2	2	2	1	2	10.00
3	3	3	1	3	8.85
4	1	2	2	3	9.25
5	2	3	2	1	8.95
6	3	1	2	2	7.61
7	1	3	3	2	8.29
8	2	1	3	3	8.10
9	3	2	3	1	8.38
k_1	8.49	7.88	8.93	8.42	
k_2	9.01	9.21	8.60	8.63	
k_3	8.28	8.70	8.26	8.73	
R	0.73	1.33	0.66	0.32	

2.3 酶法结合半仿生法提取结果

选择了酶法提取中经常用到的纤维素酶和果胶酶为考察对象^[6]。由于纤维素酶水溶性较好,每次抽滤后将随缓冲液流失掉,因此在换不同 pH 值的缓冲液时都补充了一定量的酶;而果胶酶水溶性较差,提取时只一次性加入一定量酶。因为酶法结合半仿生提取法模拟的是人体消化道(胃、大肠、小肠)的消化过程,而人体的正常温度是 37 ℃,因此试验温度设定在此温度下进行。试验中通过分光光度法监测发现,连续提取 2 h 后,提取液的吸光度几乎不再升高,因此将提取时间定为 2 h。不同料液比下酶解的总黄酮得率见表 3,不同 pH 值下 2 种酶的酶解吸光度拟合情况见图 1。

试验结果表明,纤维素酶酶解提取的最佳料液比为 1 g : 15 mL,果胶酶酶解提取的最佳料液比为 1 g : 20 mL。因为野菊花中刺槐黄素与葡萄糖 - 鼠李糖连接形成的野菊花苷^[7]在水中较难溶解,且具有酚羟基和甲氧基,可溶于偏碱性水溶液,因此 pH 值 = 2 时虽然是一煎但提取效果最差;pH 值 = 7.5 时为二煎,此时纤维素酶和果胶酶具有一定的活性,因此不同料液比下的吸光度均是最高;而 pH 值 = 8.3 时为

表 3 酶法结合半仿生法提取的总黄酮得率试验结果

料液比 (g : mL)	总黄酮得率 (%)	
	纤维素酶酶解	果胶酶酶解
1 : 10	2.94	4.13
1 : 15	4.69	4.76
1 : 20	4.58	6.01
1 : 25	4.50	5.16

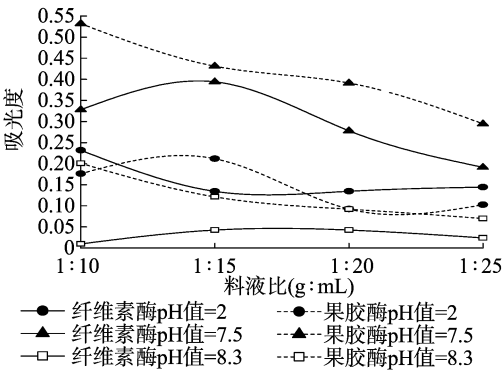


图 1 不同 pH 值条件下 2 种酶提取的拟合图

三煎,虽然酸碱度有利于黄酮类物质的提取,但由于纤维素酶和果胶酶的适宜 pH 值均为偏酸性,酶活性受到了抑制,其总黄酮提取效率也次之。从拟合图中还可看出,果胶酶比纤维素酶的酶解效果更优,可能由于果胶酶能够降解胶质从而使细胞壁疏松,降低扩散阻力,使得细胞内的黄酮类物质充分溶解出来,而纤维素酶只能破除细胞壁,因此效果没有果胶酶好。

3 结论

本研究设计了符合人体消化吸收过程的酶法结合半仿生法对野菊花中的总黄酮类物质进行提取,并与超声法提取比较,前者的总黄酮得率最高可达到约 6%,比后者的提取得率(约 10%)低且所耗时间更长。但是包括超声提取法在内的许多提取方法均需要较高的温度才能获得较高的提取效率^[4],而酶法结合半仿生法的提取温度只有 37 ℃,能够保留更多的活性成分,并协调发挥出酶和 pH 值的共同提取作用。综上所述,酶法结合半仿生法提取有效成分的研究为野菊花中总黄酮含量的提取优化提供了一定的参考依据。

参考文献:

[1] 刘建萍. 中药野菊花的研究概况[J]. 天津药学,2007,19(4): 66 - 68.
[2] 陈传千,沈艳平,屈跃丹,等. 野菊花提取物药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2010,31(3): 175 - 178.
[3] 王 丹. 药用植物野菊花的研究现状及发展前景[J]. 现代中药研究与实践,2007,21(4): 59 - 62.
[4] 王 鑫. 黄酮类化合物提取方法的应用[J]. 天津药学,2007,19(5): 61 - 66.
[5] 马彦梅,李炳奇,廉宜君,等. 棉花根茎叶中黄酮类化合物的超声提取及含量测定[J]. 时珍国医国药,2008,19(9): 2254 - 2256.
[6] 刘佳佳,赵国玲,章晓骅,等. 金银花绿原酸酶法提取新工艺研究[J]. 中成药,2002,24(6): 416 - 418.
[7] 蔡定建,柳茶花,钟鸿鸣,等. 野菊花中黄酮类物质的提取和鉴定[J]. 中国食品添加剂,2010(2): 143 - 147.