

郝红英,周 芳,王改利,等. 超声波辅助的乙醇-硫酸铵双水相联合提取鱼腥草总黄酮工艺[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):183-185.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.052

超声波辅助的乙醇-硫酸铵双水相联合提取鱼腥草总黄酮工艺

郝红英,周 芳,王改利,丁小娟

(黄河科技学院医学院,河南郑州 450063)

摘要:为了优化超声波辅助的乙醇-硫酸铵双水相联合提取鱼腥草总黄酮的工艺,通过单因素试验优化影响总黄酮提取率各因素水平,通过正交试验确定各因素组合的影响程度。结果表明,各因素的影响排序为乙醇浓度>提取温度>提取时间>料液比;最佳提取条件为脱脂鱼腥草粉末 2.0 g、乙醇用量 32.50% (质量分数)、硫酸铵用量 16.00% (质量分数)、料液比 1 g:20 mL、超声波频率 300 W、超声波处理温度 70 ℃、超声波处理时间 50 min,在此条件下,鱼腥草总黄酮提取率为 2.97%。由结果可知,超声波-乙醇/硫酸铵双水相联合提取法提取效率高,操作简便,是一种很有发展前途的提取方法。

关键词:双水相;鱼腥草;总黄酮;提取工艺;正交设计;超声波辅助提取

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0183-03

鱼腥草 (*Houttuynia cordata* Thunb.) 是三白草科蕺菜属多年生草本植物,营养丰富,具有多种药理作用:抗菌、抗病毒、抗炎、抗过敏、抗肿瘤,此外,鱼腥草还可以增强机体免疫功能^[1-2]。鱼腥草含有多种成分^[3-4],如挥发油、阿福豆苷、金丝桃苷及蕺菜碱等,其中黄酮类成分有斛皮素、斛皮苷、绿原酸、金丝桃苷等。目前关于鱼腥草活性成分的提取尚无统一的方法,主要运用的提取方法有水煎煮法、醇提取法、索式抽

提取法、超声波提取法等^[5]。超声波能使植物组织细胞破裂,利于细胞中的成分进入溶剂中,加速细胞成分与溶剂的相互渗透和溶解,从而提高黄酮类化合物在溶剂中的溶解度^[6]。超声波提取法具有操作简单、能耗低、可以缩短提取时间、可提高有效成分的提取率、减少溶剂的使用量、提取成本低等特点,因此,目前超声波技术广泛应用于植物有效成分的提取^[7]。双水相提取技术因设备投资少、操作简单,引起了人们极大的重视,并且被广泛用于生物化学、细胞生物学和生物化工等领域^[8],但是目前未见采用超声波-双水相联合提取鱼腥草总黄酮的报道。因此,本研究结合超声波辅助提取法、双水相萃取法 2 种方法的优点,采用超声波-乙醇/硫酸铵双水相体系提取鱼腥草中主要成分黄酮,以总黄酮得率为指标,采用单因素和正交试验法,确定提取总黄酮有效成分

收稿日期:2015-11-18

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(编号:15B350003);黄河科技学院大学生实践创新项目(编号:2015XSXCXY015)。

作者简介:郝红英(1979—),女,河南商丘人,硕士,讲师,研究方向为制药工程与天然产物提取。E-mail:haohongying2006@163.com。

表 2 玉米抗性淀粉制备工艺 L₉(3⁴) 正交试验结果

试验号	因素				抗性淀粉得率 (%)
	A:淀粉乳含量	B:超声时间	C:超声功率	D:超声温度	
1	1	1	1	1	23.60
2	1	2	2	2	23.71
3	1	3	3	3	23.67
4	2	1	2	3	25.06
5	2	2	3	1	24.54
6	2	3	1	2	24.62
7	3	1	3	2	23.59
8	3	2	1	3	23.48
9	3	3	2	1	23.53
k ₁	23.66	24.08	23.90	23.89	
k ₂	24.74	23.91	24.10	23.97	
k ₃	23.53	23.94	23.93	24.07	
R	1.21	0.17	0.20	0.18	

淀粉的最佳工艺条件是淀粉乳含量 25%,超声时间 10 min,

超声功率 600 W,超声温度 45 ℃,回生时间 24 h,此时抗性淀粉得率为 25.06%。

参考文献:

- [1] 张文青,张月明,郑灿龙,等. 抗性淀粉临床降糖降脂效果观察[J]. 中华医学研究杂志,2006,6(7):732-734.
- [2] 翟爱华,吕博华,张洪微. 抗性淀粉的研究现状[J]. 农产品加工·学刊,2009(2):22-25.
- [3] 徐 忠,缪 铭. 功能性变性淀粉[M]. 北京:中国轻工业出版社,2010:39-62.
- [4] 程建军. 淀粉工艺学[M]. 北京:科学出版社,2011:185-193.
- [5] 周世成,刘国琴,李 琳. 抗性淀粉的制备与应用研究进展[J]. 粮油食品科技,2009,17(2):51-53,56.
- [6] 翟爱华,张洪微,王宪青. 酶解法制备玉米抗性淀粉的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2008,20(6):48-51.
- [7] 连喜军,罗庆丰,刘学燕,等. 超声波对甘薯回生抗性淀粉生成的作用[J]. 食品研究与开发,2011,32(1):61-64.

的较佳工艺,旨在为鱼腥草总黄酮提取工艺的产业化提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鱼腥草,购自当地药店。芸香苷标准样品,由中国药品生物制品检定所提供,为生化试剂;其他试剂均为分析纯。

超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;电热恒温水箱,北京市永光明医疗仪器厂;SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;7230G 型可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的绘制 鱼腥草中黄酮类化合物含量的测定参照文献[9-10]的方法,以芸香苷为标样测定鱼腥草总黄酮类化合物含量,所得标准曲线回归方程为 $y=0.093\ 8x+0.000\ 1$ 。式中: y 为芸香苷质量浓度, g/mL ; x 为吸光度; $r^2=0.999\ 8$ 。

1.2.2 鱼腥草总黄酮的提取与测定 鱼腥草总黄酮的提取:称取鱼腥草干细粉(过 60 目筛)于索氏提取器中,经石油醚脱脂,并除去部分色素。称取 2.0 g 处理样品于 250 mL 碘量瓶中,按一定的料液比加入乙醇-硫酸铵双水相溶液,置于超声波清洗器中,提取一段时间后,过滤,静置分层,将滤液用分液漏斗将两相分开,将醇相提取液高速离心 25 min,即得鱼腥草总黄酮类化合物提取液,后经微孔滤膜过滤,精确称取一定量用甲醇定容至 250 mL,以供分析测试用。

鱼腥草总黄酮的测定:取 2.5 mL 样品溶液至 25 mL 容量瓶中,加 1 mL 5% NaNO_2 (质量体积比,下同),摇匀,放置 5 min 后加入 1 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (质量体积比,下同),5 min 后再加入 10 mL 4% NaOH (质量体积比,下同),摇匀,用蒸馏水稀释至刻度,10 min 后于 7230G 型可见分光光度计上在 510 nm 处测定吸光度 $D_{510\text{nm}}$,根据芸香苷标准曲线回归方程,得到提取液浓度,总黄酮提取率按下式计算:

$$E_i=(C\times V\times D)/m\times 100\%$$

式中: E_i 为总黄酮提取率,%; C 为测得的提取液浓度, g/mL ; V 为提取液体积, mL ; D 为稀释倍数; m 为原料的质量, g 。

1.2.3 超声波处理时间对鱼腥草总黄酮提取率的影响 采用超声波功率 300 W、恒定的乙醇用量 32.50% (质量分数,下同)、超声波处理温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、硫酸铵用量 16.00% (质量分数,下同) 的条件,称取 2.0 g 处理样品,选择料液比 1 g : 20 mL,研究不同超声波处理时间(10、20、30、40 min)对鱼腥草总黄酮提取率的影响。

1.2.4 料液比对鱼腥草总黄酮提取率的影响 采用超声波功率 300 W、超声波处理时间 20 min、恒定的乙醇用量 32.50%、超声波处理温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、硫酸铵用量 16.00% 的条件,称取 2.0 g 处理样品,研究不同料液比(1 g : 15 mL、1 g : 20 mL、1 g : 25 mL、1 g : 30 mL)对鱼腥草总黄酮提取率的影响。

1.2.5 超声波处理温度对鱼腥草总黄酮提取率的影响 采用超声波功率 300 W、超声波处理时间 20 min、硫酸铵用量 16.00%、乙醇用量 32.50% 的条件,称取 2.0 g 处理样品,料液比选择 1 g : 20 mL,研究不同超声波处理温度(30、40、50、

60 $^{\circ}\text{C}$)对鱼腥草总黄酮提取率的影响

1.2.6 正交试验 在硫酸铵质量浓度、超声波功率确定的情况下,以乙醇用量(体积分数)、超声波提取温度、料液比($m_{\text{鱼腥草}}:V_{\text{双水相溶剂}}$)、超声提取时间为考察因素,设计 $L_9(3^4)$ 正交表(表 1),并按照此正交表安排试验,重复上述操作。

表 1 鱼腥草总黄酮提取工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验设计

水平	因素			
	乙醇用量 (%)	料液比 (g : mL)	超声提取 温度($^{\circ}\text{C}$)	超声处理 时间(min)
1	27.50	1 : 15	50	40
2	30.00	1 : 20	60	50
3	32.50	1 : 25	70	60

2 结果与分析

2.1 超声波处理时间对鱼腥草总黄酮提取率的影响

从图 1 可以看出,总黄酮提取率在超声波处理 10 ~ 20 min 时逐渐增高,而后随着处理时间的延长逐渐降低。其原因可能是超声波处理时间越长,超声波对鱼腥草细胞壁组织的破坏程度就越大,更有利于黄酮类物质的释放和进入溶液,但过长的超声处理时间,可能会引起黄酮类化合物的破坏和氧化。因此综合分析可知,乙醇-硫酸铵双水相体系超声提取鱼腥草总黄酮的处理时间以 20 min 为宜。

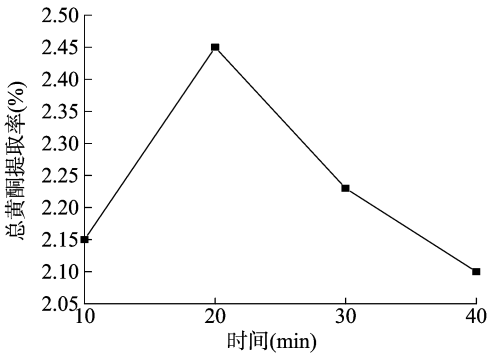


图1 超声处理时间对鱼腥草总黄酮提取率的影响

2.2 料液比对鱼腥草总黄酮提取率的影响

从图 2 可以看出,总黄酮提取率随料液比的增大而提高,当料液比为 1 g : 20 mL 时,提取率最高;随着料液比的进一步增大,溶剂用量过大,会造成双水相盐用量增加,不仅耗费大量的溶剂和铵盐,也会给后续处理带来不必要的麻烦。

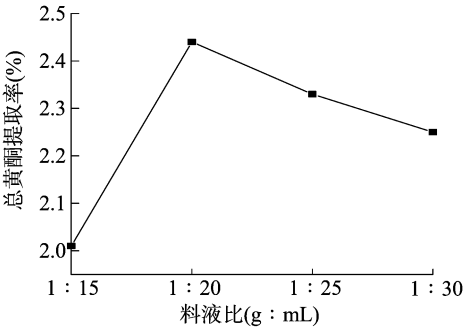


图2 料液比对鱼腥草总黄酮提取率的影响

2.3 超声提取温度对鱼腥草总黄酮提取率的影响

从图 3 可以看出,随着超声提取温度的升高,总黄酮提取

率提高;当超声温度超过 50 ℃时,提取率降低。超声温度低,导致黄酮不能完全溶出;而温度过高,使超声波破坏鱼腥草细胞组织的能力增强,黄酮类物质更易浸出,但是在超声波的作用下,过高的处理温度会导致鱼腥草黄酮类物质因氧化或被超声波破坏等原因,使变质的量增加,同时温度升高也会增加乙醇挥发量。因此由结果可以确定,50 ℃为鱼腥草总黄酮提取的最佳温度条件。

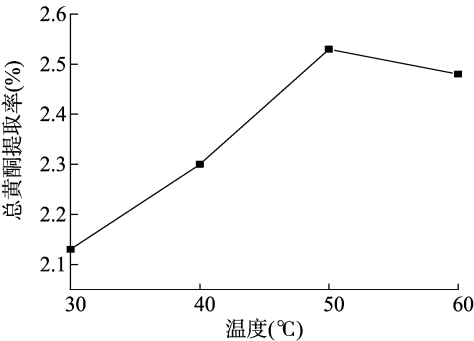


图3 超声提取温度对鱼腥草总黄酮提取率的影响

2.4 多因素正交试验结果

在单因素考察的基础上,为了得到更好的条件,进行正交试验。选取 3 因素 4 水平,使用 $L_9(3^4)$ 正交设计(表 1)来安排试验,结果见表 2、表 3。

表 2 鱼腥草总黄酮提取工艺正交试验结果

试验号	乙醇用量	料液比	超声提取温度	超声处理时间	总黄酮提取率 (%)
1	1	1	1	1	1.85
2	1	2	2	2	2.21
3	1	3	3	3	2.42
4	2	1	2	3	2.30
5	2	2	3	1	2.51
6	2	3	1	2	2.32
7	3	1	3	2	2.95
8	3	2	1	3	2.58
9	3	3	2	1	2.45
k_1	2.160	2.367	2.250	2.270	
k_2	2.377	2.433	2.320	2.493	
k_3	2.660	2.397	2.627	2.433	
R	0.500	0.066	0.377	0.223	

表 3 鱼腥草总黄酮提取工艺方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	F 值
乙醇用量	0.377	2	2.139
料液比	0.007	2	0.040
超声温度	0.241	2	1.367
超声时间	0.080	2	0.454
误差	0.70	8	

注: $F_{0.05}(2,2)=4.460$ 。

从表 2、表 3 可知,各因素对提取率影响排序为乙醇用量 > 超声提取温度 > 超声处理时间 > 料液比,其中乙醇浓度对鱼腥草中总黄酮提取率的影响最大。由分析结果初步认为,超声波-乙醇/硫酸铵双水相体系提取鱼腥草总黄酮的最佳条件:在鱼腥草质量为 2.00 g 的情况下,硫酸铵用量为 16.00%,乙醇用量 32.50%,料液比 1 g : 20 mL,提取温度 70 ℃,处理时间 50 min。

2.5 平行试验结果

为进一步验证此正交试验结果的可考性和重现性,按照所得最佳条件做了 3 次平行试验,总黄酮提取率分别为 3.00%、2.97%、2.94%,均值为 2.97%, RSD 为 0.03%。结果表明,使用正交试验得出的方法,优化出了最佳提取工艺,提取率均值为 2.97%,不但提取率较高,而且试验的重现性好。

3 讨论

通过单因素试验、正交试验法,优选出鱼腥草总黄酮的双水相最佳提取工艺:脱脂鱼腥草粉末 2.0 g,乙醇用量 32.50%,硫酸铵用量 16.00%,料液比 1 g : 20 mL,超声波功率 300 W,提取温度 70 ℃,处理时间 50 min。在此条件下,鱼腥草总黄酮提取率为 2.97%。

超声波-乙醇/硫酸铵双水相联合提取法是一种新型的液-液萃取技术,反应条件温和,提取时间短,提取效率高,操作简便,不存在有机残留问题,是一种很有发展前景的联合提取方法。

参考文献:

[1]王利勤,赵友兴,周 露,等. 鱼腥草的化学成分研究[J]. 中草药,2007,38(12):1788-1790.

[2]高璐琰,杨 钟,武瑞兵,等. 细菌耐药性研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2013,40(7):162-166.

[3]伍贤进,李胜华,李爱明,等. 鱼腥草化学成分研究[J]. 中药材,2008,32(8):1168-1170.

[4]杨小孟. 中药鱼腥草化学成分和临床应用的研究进展[J]. 天津药学,2013,25(2):58-60.

[5]李胜华,伍贤进. 鱼腥草总黄酮的提取及其方法对比[J]. 吉首大学学报(自然科学版),2007,28(3):117-118.

[6]许 晖,孙兰萍,张 斌,等. 花生壳黄酮类化合物的研究进展[J]. 农产品加工·学刊,2008(3):11-15.

[7]袁英髦,曹雁平. 超声波辅助提取杜仲皮中的杜仲胶和杜仲黄酮[J]. 食品科学技术学报,2014,32(2):67-71.

[8]汪建红,廖立敏,王 碧. 乙醇-硫酸铵双水相体系提取柠檬渣中总黄酮研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),2013,47(1):78-81.

[9]赵晨晨,承 伟,王立冬. 微波辅助提取络石藤总黄酮的工艺研究[J]. 中草药,2012,43(4):718-720.

[10]王仲英,李香兰. 马齿苋中黄酮类化合物含量的测定[J]. 太原理工大学学报,2004,35(1):95-96.