

# 超声辅助碱溶酸沉法提取铁苋菜总黄酮的工艺优选

崔明筠<sup>1</sup>,徐健蓉<sup>1\*</sup>,徐秀霞<sup>1</sup>,向发椿<sup>1</sup>,刘俊<sup>2</sup>

(1. 西南科技大学,四川 绵阳 621010; 2. 四川省冶金地质勘查局,成都 611700)

**[摘要]** 目的:优选超声辅助碱溶酸沉法提取铁苋菜总黄酮的工艺条件。方法:以芦丁为对照成分,采用紫外-可见分光光度法测定铁苋菜总黄酮含量。以总黄酮得率为指标,在单因素试验基础上,通过正交试验考察料液比、碱性提取液 pH、温度、酸沉 pH 和时间对铁苋菜总黄酮提取工艺的影响。结果:铁苋菜总黄酮最佳提取工艺为料液比 1:20,碱提液 pH 11,温度 60 ℃,酸沉 pH 2.5,超声时间 90 min,提取数 1 次;铁苋菜总黄酮提取量 24.11 mg·g<sup>-1</sup>,提取率达 87.76%。结论:优选的提取工艺稳定可行、提取率高,为铁苋菜资源的开发利用提供实验依据。

**[关键词]** 铁苋菜;总黄酮;单因素试验;正交试验

**[中图分类号]** R283.6;R284.2;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0038-03

**[doi]** 10.11653/syjf2013220038

## Optimization of Ultrasonic-Assisted Alkali Extraction and Acid Precipitation Technology for Total Flavonoids from *Acalypha australis*

CUI Ming-jun<sup>1</sup>, XU Jian-rong<sup>1\*</sup>, XU Xiu-xia<sup>1</sup>, XIANG Fa-chun<sup>1</sup>, LIU Jun<sup>2</sup>

(1. Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China;

2. Sichuan Metallurgical Geological Exploration Bureau, Chengdu 611700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize ultrasonic-assisted alkali extraction and acid precipitation technology of total flavonoids from *Acalypha australis*. **Method:** UV spectrophotometry was used to determine the content of total flavonoids with rutin as a control component. With yield of total flavonoids as index, based on single factor test, effects of solid-liquid ratio, pH of alkaline extraction solvent, temperature, acid precipitation pH and time on extraction technology were investigated by orthogonal test. **Result:** The best extraction technology was as following: solid-liquid ratio of 1:20, pH of extraction solvent 11, extracting temperature of 60 ℃, acid precipitation pH of 2.5, and ultrasonic time of 90 min. Under these conditions, extraction amount of total flavonoids from *A. australis* was 24.11 mg·g<sup>-1</sup>, and its yield could reach 87.76%. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible with high extraction rate, it could provide experimental basis for development and utilization of *A. australis*.

**[Key words]** *Acalypha australis*; total flavonoids; single factor test; orthogonal test

铁苋菜别名血见愁、叶里藏珠、海蚌含珠<sup>[1]</sup>,具有抗菌、止泻、止咳、祛痰等药理作用<sup>[2-3]</sup>,富含黄酮类化合物<sup>[4]</sup>。目前,对铁苋菜黄酮类化合物的研究

较少,梁曾恩妮等<sup>[5]</sup>采用水提法提取铁苋菜总黄酮,并对水提液进行抑菌效果考察;王晓岚等<sup>[6]</sup>以铁苋菜醇提液的正丁醇相进行硅胶柱色谱分析,用三氯甲烷-甲醇梯度洗脱从铁苋菜中分离得到芦丁。黄酮类物质的分子结构中存在酚羟基,可溶于碱性物质中,故可用碱性水浸出<sup>[7-8]</sup>。本实验以总黄酮得率为指标,采用超声辅助碱溶酸沉法提取铁苋菜总黄酮,通过单因素试验和正交试验优选提取工艺,为铁苋菜资源的开发利用提供实验依据。

### 1 材料

UV/V-16/18 型紫外-可见分光光度计(上海美

**[收稿日期]** 20130418(019)

**[基金项目]** 西南科技大学博士基金项目(12zx7108)

**[第一作者]** 崔明筠,硕士,从事中药制剂与药理研究, Tel: 15280960214, E-mail: cmj.1209@163.com

**[通讯作者]** \*徐健蓉,博士,副教授,从事植物资源利用研究, Tel: 0816-6089530, E-mail: xujianrong@swust.edu.cn

谱达仪器有限公司),雷磁 PHB-4 型便携式 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。铁苋菜(于 2012 年 8 月中旬采自西南科技大学东校区,经西南科技大学生命科学与工程学院教授卢学琴副教授鉴定为大戟科植物铁苋菜 *Acalypha australis* L. 的全草),芦丁对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-11040302),水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 铁苋菜总黄酮的含量测定

**2.1.1 供试品溶液的制备<sup>[9]</sup>** 采集铁苋菜,晒干粉碎过 40 目筛,60 ℃ 干燥至恒重,装入密封袋置于干燥器中,备用。称取适量干燥的铁苋菜粉末,加入 8 倍量石油醚于 70 ℃ 下回流提取 2 h,重复 2 次,抽滤,置于培养皿上自然挥干,备用。准确称取上述铁苋菜样品 1.0 g 于锥形瓶中,加入一定量硼砂,以 pH 10 饱和石灰水为溶剂,在料液比 1:20,温度 60 ℃,时间 60 min 的条件下超声提取,收集上清液,用稀盐酸将上清液调 pH 2.5,静置 6 h,使黄酮类物质充分析出,离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>,15 min)得沉淀,水洗至中性,干燥,得铁苋菜总黄酮粗品。称取适量粗品,加 50% 乙醇充分溶解并定容至 50 mL 量瓶中,即得。

**2.1.2 标准曲线的绘制** 准确吸取 0.1 g·L<sup>-1</sup> 芦丁对照品溶液 0.0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,分别置于 10.0 mL 具塞试管中,各加水定容至 5.0 mL,加入 5% NaNO<sub>2</sub> 0.3 mL,摇匀静置 6 min;加入 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 0.3 mL,摇匀静置 6 min;加入 4% 氢氧化钠 4.0 mL,加水定容至 10.0 mL,摇匀,静置 15 min,配成系列质量浓度的芦丁对照品溶液。经紫外扫描确定最大吸收波长 510 nm。于 510 nm 处测定各芦丁对照品溶液的吸光度(A),以 A 为纵坐标,芦丁质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 12.194X - 0.0002$  ( $R^2 = 0.9999$ ),线性范围 0.01 ~ 0.05 g·L<sup>-1</sup>。

### 2.2 单因素试验考察

**2.2.1 料液比** 准确称取 5 份铁苋菜样品,每份 1.0 g,分别置于锥形瓶中,加入一定量的硼砂,加分别加入料液比为 1:10,1:20,1:30,1:40,1:50 的 pH 10 饱和澄清石灰水,于 60 ℃ 超声提取 60 min,用稀盐酸调 pH 2.5,酸沉,按 2.1.1 项下相应方法制备供试品溶液,考察料液比对铁苋菜总黄酮得率的影响。结果显示料液比 1:20 时,总黄酮得率最大(1.81%),继续增加提取液,铁苋菜总黄酮得率趋

于稳定,故选取铁苋菜总黄酮的提取料液比 1:20。

**2.2.2 碱性提取液 pH** 准确称取 5 份铁苋菜样品,每份 1.0 g,分别置于锥形瓶中,分别加入 20 倍量 pH 8.0,9.0,10.0,11.0,12.0 的饱和澄清石灰水和一定量硼砂,其他操作同 2.2.1 项,结果显示在 pH 10 时,铁苋菜总黄酮得率最大(1.86%),之后 pH 继续增加得率反而减小。

**2.2.3 温度** 准确称取 5 份铁苋菜样品,每份 1.0 g,分别置于锥形瓶中,加入 20 倍量 pH 10 的饱和澄清石灰水和一定量硼砂,分别于 40,50,60,70,80 ℃ 超声提取 60 min,其他操作同 2.2.1 项,结果显示提取温度 70 ℃ 时,铁苋菜总黄酮得率达最大(2.18%),当温度 > 70 ℃ 后,黄酮类化合物部分母核破坏,使得铁苋菜总黄酮得率下降。

**2.2.4 酸沉 pH** 准确称取 5 份铁苋菜样品,每份 1.0 g,分别置于锥形瓶中,加入 20 倍量 pH 10 的饱和澄清石灰水和一定量硼砂,于 70 ℃ 超声提取 60 min,分别于 pH 2.5,3.5,4.5,5.5,6.5 条件下酸沉,其他操作同 2.2.1 项,结果发现当用稀盐酸调 pH 2.5 时,铁苋菜总黄酮得率最高(1.85%)。

**2.2.5 提取时间** 准确称取 5 份铁苋菜样品,每份 1.0 g,分别置于锥形瓶中,加入 20 倍量 pH 10 的饱和澄清石灰水和一定量硼砂,于 60 ℃ 分别超声提取 60,90,120,150,180 min,加稀盐酸调 pH 2.5 条件下酸沉,结果发现超声提取 150 min 时,总黄酮得率最高(2.36%)。

**2.3 正交试验优选** 在单因素试验基础上,选择料液比、碱性提取液 pH、温度、提取时间和酸沉 pH 为考察因素,以铁苋菜总黄酮得率为评价指标,按 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交表对超声辅助碱溶酸沉法提取铁苋菜总黄酮的工艺进行优化,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 铁苋菜总黄酮提取工艺 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交试验因素水平

水平	A 料液比	B 碱溶 pH	C 温度 / ℃	D 酸沉 pH	E 提取时间 /min
1	1:10	8	50	2.5	90
2	1:20	9	60	3.5	120
3	1:30	10	70	4.5	150
4	1:40	11	80	5.5	180

由直观分析可知,各因素的对铁苋菜总黄酮提取工艺的影响顺序为  $A > B > E > C > D$ 。以极值最小的 D 因素为误差项进行方差分析,表明因素 E 对总黄酮得率具有显著影响,因素 A, B 具有极显著影响,因素 C 则无显著影响,最佳水平组合为

$A_2B_4C_2D_1E_1$ , 即料液比 1:20, 碱性提取液 pH 11, 温度 60 ℃, 酸沉 pH 2.5, 超声提取时间 90 min。

表 2 铁苋菜总黄酮提取工艺  $L_{16}(4^5)$  正交试验安排

No.	A	B	C	D	E	总黄酮得率 /%
1	1	1	1	1	1	1.631
2	1	2	2	2	2	1.721
3	1	3	3	3	3	1.634
4	1	4	4	4	4	1.794
5	2	1	2	3	4	1.920
6	2	2	1	4	3	2.151
7	2	3	4	1	2	2.193
8	2	4	3	2	1	2.540
9	3	1	3	4	2	1.964
10	3	2	4	3	1	2.268
11	3	3	1	2	4	2.104
12	3	4	2	1	3	2.463
13	4	1	4	2	3	1.731
14	4	2	3	1	4	1.994
15	4	3	2	4	1	2.217
16	4	4	1	3	2	2.326
$K_1$	1.695	1.812	2.053	2.070	2.164	
$K_2$	2.201	2.034	2.080	2.024	2.051	
$K_3$	2.200	2.037	2.033	2.037	1.995	
$K_4$	2.067	2.281	1.997	2.032	1.953	
R	0.506	0.469	0.083	0.046	0.211	

表 3 铁苋菜总黄酮得率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.685	3	0.228	136.908	<0.01
B	0.441	3	0.147	88.148	<0.01
C	0.015	3	0.005	2.982	>0.05
D(误差)	0.005	3	0.002		
E	0.1	3	0.033	20.083	<0.05

注:  $F_{0.05}(3,3) = 9.28$ ;  $F_{0.01}(3,3) = 29.46$ 。

**2.4 提取次数的确定**<sup>[10]</sup> 准确称取 5 份铁苋菜样品, 每份 1.0 g, 分别置于锥形瓶中, 按优选的工艺条件进行提取, 分别提取 1, 2, 3, 4, 5 次, 结果铁苋菜总黄酮提取量分别为 24.11, 25.82, 26.13, 27.13, 27.42  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 表明提取 1 次后, 铁苋菜总黄酮提取率达 87.76%, 从节约浸提成本的角度考虑, 确定提取 1 次。与传统醇提法得到的总黄酮提取率 (90.82%) 相差不大<sup>[11]</sup>。

**2.5 验证试验** 准确称取称铁苋菜样品 3 份, 按优选的提取工艺进行 3 次验证试验, 结果铁苋菜总黄酮平均得率 2.41%, 平均提取量 24.11  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 1.87%, 说明该工艺稳定可行。

### 3 讨论

传统的黄酮类化合物提取多采用有机溶剂法,

考虑到黄酮类化合物为弱酸性物质, 尝试采用超声辅助碱溶酸沉法提取铁苋菜总黄酮。现有碱提工艺采用氢氧化钠水溶液为提取溶剂, 浸出能力大, 但提取液中杂质浸出较多, 而澄清石灰水溶液使含羧基的果胶、黏液质或含多羟基鞣质等水溶性杂质生成钙盐沉淀, 有利于提取液后续的纯化。通过单因素试验和正交试验, 确定了碱提酸沉法提取铁苋菜总黄酮的最佳提取工艺, 总黄酮得率达 2.41%, 该优选工艺提取率高且稳定可行。超声辅助碱溶酸沉法和醇提法均提取铁苋菜总黄酮均具有较高提取率, 但前者提取工艺简单, 且提取溶剂为饱和澄清石灰水, 具有成本低廉、环境污染小等优点, 为铁苋菜资源的开发利用提供了实验依据。

### [参考文献]

- [1] 南京中医药大学. 中药大词典[M]. 2 版. 上海: 上海科技出版社, 2000: 1853.
- [2] 陈友香. 铁苋菜治疗小儿腹泻 85 例报告[J]. 中草药, 1998, 29(11): 761.
- [3] 王美纳, 林蓉, 刘俊田, 等. 铁苋菜止血作用机理[J]. 西北药学杂志, 1996, 11(5): 209.
- [4] HUANG W, XUE A, NIU H, et al. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems *in vitro* [J]. Food Chem, 2009, 114(3): 1147.
- [5] 梁曾恩妮, 蒋道松, 刘作梅, 等. 铁苋菜总黄酮提取工艺优化及其抑菌效果的初步鉴定[J]. 湖南农业科学, 2008(2): 110.
- [6] 王晓岚, 郁开北, 彭树林. 铁苋菜地上部分的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(12): 1415.
- [7] 唐浩国. 黄酮类化合物研究[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 34.
- [8] 屠鹏飞, 王钰芳, 邵杰, 等. 龙血竭中黄酮类成分提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 30.
- [9] CHEN G Z, CHEN H Z. Extraction and deglycosylation of flavonoids from sumac fruits using steam explosion [J]. Food Chem, 2011, 126(4): 1934.
- [10] 李丹. 植物药提取工艺中提取次数考察方法的比较与分析[J]. 中成药, 2004, 26(11): 943.
- [11] 王春景, 刘高峰, 李晶, 等. 铁苋菜黄酮类化合物的提取及清除羟自由基作用的研究[J]. 光谱实验室, 2010, 27(3): 797.

[责任编辑 仝燕]