

果胶酶法提取翠云草中总黄酮的工艺优选

赖红芳*, 温晓娟

(河池学院化学与生命科学系, 广西 宜州 546300)

[摘要] **目的:**探索果胶酶法提取翠云草中总黄酮的工艺条件。**方法:**以总黄酮提取率为指标,选取酶用量、酶解时间、pH 值及酶解温度为影响因素,采用紫外分光光度法测定总黄酮含量,通过 $L_9(3^4)$ 正交试验优选总黄酮的提取工艺。**结果:**最佳提取工艺条件为果胶酶质量浓度 $0.075 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,酶解时间 2.5 h,酶解 pH 5.0,酶解温度 $50 \text{ }^\circ\text{C}$,总黄酮平均提取率 1.40%。**结论:**优选的提取工艺稳定可行,且较大地提高了提取效率,为翠云草药用价值的进一步开发提供实验依据。

[关键词] 翠云草; 总黄酮; 果胶酶; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0034-03

Optimization of Extraction Technology for Total Flavonoid from *Selaginella uncinata* by Pectinase Enzymatic Method

LAI Hong-fang*, WEN Xiao-juan

(Department of Chemistry and Life Science, Hechi University, Yizhou 546300, China)

[Abstract] **Objective:** To explore extraction process conditions of total flavonoid in *Selaginella uncinata* by pectinase enzymatic method. **Method:** With extraction ratio of total flavonoid as index, $L_9(3^4)$ orthogonal test was taken to optimize extraction technology of total flavonoid with pectinase dosage, enzymatic hydrolysis time, pH and enzymatic hydrolysis temperature as factors. The content of total flavonoid was determined by UV. **Result:** Optimum extraction technology conditions were as follows: the concentration of pectinase $0.075 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, enzymatic hydrolysis time 2.5 h, hydrolysis pH 5.0, extraction temperature $50 \text{ }^\circ\text{C}$, under these conditions, average extraction ratio of total flavonoid 1.40%. **Conclusion:** Optimized extraction technology was stable and feasible with high extraction efficiency, it provided experimental basis for further development of *S. uncinata*.

[Key words] *Selaginella uncinata*; total flavonoid; pectinase; extraction technology

翠云草在民间应用较广,其主要化学成分为黄酮类及酚性成分,具有清热利湿、止咳止血、抗菌消炎及抗肿瘤的作用,可用于治疗黄疸型肝炎、肠炎、痢疾等症,具有较高的药用价值。研究表明其还具有抗肿瘤、降血糖、抗菌、增强免疫、镇痛等多种功效^[1-3]。翠云草乙醇提取物具有良好的抗缺氧活性^[4-6],其中抗缺氧的活性成分主要为黄酮类化合物^[7-8]。

果胶酶是能够分解果胶物质的多种酶的总称,能够除去细胞壁中的果胶质,当果胶质降解时会导致细胞分离。在天然产物的提取过程中,果胶酶可快速脱除果胶,有效地破除植物细胞壁,使细胞内的物质快速、充分的溶解出来,既可减少溶剂用量、改变提取成分的性质、增强药物活性,还可有效地提高有效成分的提取率。本试验尝试采用果胶酶为外加酶来提取翠云草中的黄酮类物质,考察果胶酶用量、酶解时间、pH、酶解温度 4 个因素对提取率的影响,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选翠云草中总黄酮提取的最佳工艺参数,为进一步开发翠云草的药用价值提供实验数据。

1 材料

翠云草于 3 月份采自宜州市小龙村,经河池学

[收稿日期] 20120730(004)

[基金项目] 广西教育厅科研立项项目(201106LX584)

[通讯作者] * 赖红芳,副教授,从事天然产物提取及化学成分分析研究, Tel: 0778-3141892, E-mail: laihongfang263@tom.com

院化学与生命科学系邓晰朝讲师鉴定为翠云草 *Selaginella uncinata* (Desv.) Spring, 将翠云草洗净放入电热鼓风干燥箱干燥 24 h, 粉碎, 过 40 目筛, 置于保鲜袋放入干燥器, 备用。果胶酶(活性 $\geq 1\ 000\ \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 上海源叶生物科技有限公司), 芦丁对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号 20110825), 试剂均为分析纯。

FZ102 型微型植物粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司), UV-2102PCS 型紫外分光光度计(尤尼科仪器有限公司), AE240S 型电子天平(奥豪斯仪器有限公司), 雷磁 PHS-25 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司), DGF30/14-22A 型电热鼓风干燥箱(南京实验仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 准确称取干燥的翠云草粉末 2.00 g, 放入 100 mL 烧杯中, 加一定量果胶酶, 加水 40 mL 混合均匀, 置于水浴锅中进行酶解, 酶解结束后升温至 78 °C 进行浸提, 将提取液煮沸 2 min, 使酶灭活, 趁热过滤, 定容, 即得。

2.2 对照品溶液的配制 精确称取芦丁对照品 10 mg, 用 80% 乙醇加热溶解, 定容至 100 mL 量瓶中, 静置, 制得 $0.1\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芦丁对照品溶液。

2.3 检测波长的选择 将 2 mL 芦丁对照品溶液和 2 mL 供试品溶液分别置于 25 mL 量瓶中, 分别加入 5% NaNO_2 溶液 1.4 mL, 摇匀, 静置 5 min, 加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1.4 mL, 摇匀, 静置 5 min, 加入 $1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 10 mL, 用 30% 乙醇溶液定容, 摇匀, 静置 20 min。以空白的 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 液作参比液, 于 400 ~ 600 nm 处进行扫描^[7], 发现在 500 nm 处均有最大吸收峰, 故选择 500 nm 为检测波长。

2.4 标准曲线的绘制^[9-10] 分别吸取芦丁对照品溶液 0.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 mL 于 25 mL 量瓶中, 按 2.3 项下方法进行处理, 于 500 nm 处测定吸光度(A), 以 A 为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程 $A = 11.43X - 0.0023$ ($r = 0.9996$), 线性范围 0 ~ 32 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 样品测定 精确量取翠云草提取液 2 mL 于 25 mL 量瓶中, 按 2.3 项下方法进行显色, 用空白 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 溶液作为参比液进行调零, 在 500 nm 波长处测定 A, 计算总黄酮提取率。

2.6 单因素试验

2.6.1 果胶酶用量的选择 精确称取翠云草粉末 5 份, 每份 2.00 g, 加入 40 mL 已用缓冲液调节 pH

4.5 的溶液, 分别加入 3, 4, 6, 8, 10 mg 果胶酶, 45 °C 恒温酶解 2 h, 80 °C 回流浸提 2 h, 煮沸灭酶, 抽滤, 合并提取液至 100 mL 量瓶, 用 80% 乙醇溶液定容。移取提取液 2 mL 至 25 mL 量瓶中, 按 2.3 项下方法进行显色, 测定 A, 结果总黄酮提取率分别为 1.32%, 1.43%, 1.36%, 1.34%, 1.37%。故初步确定果胶酶质量浓度 $0.1\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6.2 酶解时间的选择 精密称取翠云草粉末 5 份, 每份 2.00 g, 加入 40 mL 已用缓冲溶液调节 pH 4.5 的溶液, 加入 $0.1\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 果胶酶, 分别于 45 °C 恒温水浴中酶解 1, 1.5, 2, 2.5, 3 h, 其余操作同 2.6.1 项下方法, 结果总黄酮提取率分别为 1.01%, 1.13%, 1.36%, 1.30%, 1.27%。故选取酶解时间 2 h。

2.6.3 酶解 pH 考察 精密称取翠云草粉末 5 份, 每份 2.00 g, 加入 40 mL 已用缓冲溶液调节 pH 分别为 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 的溶液, 加入 $0.1\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 果胶酶, 其余操作同 2.6.1 项下方法, 结果总黄酮提取率分别为 1.41%, 1.40%, 1.42%, 1.37%, 1.37%。说明 pH 对翠云草中总黄酮的提取率影响不明显, 故选取 pH 4.5。

2.6.4 酶解温度的选择 精密称取翠云草粉末 5 份, 每份 2.00 g, 加入 40 mL 已用缓冲溶液调节 pH 4.5 的溶液, 加入 $0.1\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 果胶酶, 分别于 40, 45, 50, 55, 60 °C 恒温酶解 2 h, 其余操作同 2.6.1 项下方法, 结果总黄酮提取率分别为 1.37%, 1.39%, 1.32%, 1.31%, 1.38%。说明在 45 ~ 55 °C 时, 总黄酮提取率随温度的升高而降低, 可能是由于随温度的升高果胶酶的活性开始降低所导致的; 而在 60 °C 时, 总黄酮提取率又开始上升, 可能是由于酶解温度较高刚好有利于有机溶剂对总黄酮的浸提^[15]。故选取酶解温度 45 °C。

2.7 正交试验优选 在单因素试验基础上, 选取酶液质量浓度、酶解时间、酶解 pH、酶解温度为影响因素, 精密称取翠云草粉末 9 份, 每份 2.00 g, 设计四因素三水平正交试验优化翠云草中黄酮的提取条件, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

由极差可知, 4 个因素对总黄酮提取率的影响顺序为果胶酶质量浓度 > 酶解时间 > 酶解温度 > pH。以极值最小的 D 因素为误差项进行方差分析, 发现 A, B, C 因素三水平间无显著性差异。确定最佳提取工艺条件为 $A_1B_3C_3D_3$, 即果胶酶质量浓度 $0.075\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酶解温度 50 °C, 酶解时间 2.5 h, pH 5。

表 1 翠云草中总黄酮果胶酶法提取工艺正交试验因素水平

水平	A 果胶酶质量 浓度/g·L ⁻¹	B 酶解温度 / °C	C 酶解时间 /h	D pH
1	0.075	40	1.5	4.0
2	0.100	45	2.0	4.5
3	0.150	50	2.5	5.0

表 2 翠云草中总黄酮果胶酶法提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	总黄酮 提取率/%
1	1	1	1	1	1.21
2	1	2	2	2	1.23
3	1	3	3	3	1.34
4	2	1	2	3	1.23
5	2	2	3	1	1.25
6	2	3	1	2	1.19
7	3	1	3	2	1.18
8	3	2	1	3	1.15
9	3	3	2	1	1.21
K ₁	1.26	1.21	1.18	1.22	
K ₂	1.22	1.21	1.22	1.20	
K ₃	1.18	1.25	1.26	1.24	
R	0.08	0.04	0.07	0.04	

表 3 总黄酮提取率方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.010	2	5.000	>0.05
B	0.003	2	1.500	>0.05
C	0.008	2	4.000	>0.05
D(误差)	0.002	2	1.000	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

2.8 验证试验 称取翠云草粉末 3 份,每份 2.00 g,按优选工艺进行酶解,酶解后于 80 °C 回流浸提 2 h,煮沸灭酶,抽滤,合并提取液至 100 mL 量瓶,用 80% 乙醇溶液定容,进行 3 次验证试验,分别移取提

取液 2 mL 至 25 mL 量瓶中,按 2.3 项下方法进行显色,测定 A ($n = 3$),计算总黄酮提取率分别为 1.40%,1.42%,1.38%。说明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

采用超声提取法、纤维素酶法进行翠云草中总黄酮的提取时,提取率分别为 0.77%,0.54%,而果胶酶提取则为 1.40%,明显高于其他 2 种提取方法,说明果胶酶对翠云草黄酮的提取是可行的,且工艺简单、便捷,有利于推广,为翠云草的进一步开发利用提供理论依据。

[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,1985:2583.
- [2] 李清玉,司民真,邓莉兰,等. 两种卷柏科药用蕨类植物的红外光谱分析研究[N]. 光散射学报,2007,19(2):163.
- [3] 鲁曼霞,黄可龙,施树云,等. 3 种卷柏属植物挥发性化学成分的气相色谱-质谱联用分析与比较[J]. 时珍国医国药,2009,20(9):2119.
- [4] 郑俊霞,王乃利,陈海峰,等. 翠云草中的酚性成分[J]. 中国药物化学杂志,2007,17(5):302.
- [5] 范晓磊,徐嘉成,林幸华,等. 翠云草中双黄酮类成分研究[J]. 中国药学杂志,2009,44(1):20.
- [6] 郑俊霞,郑扬,颜秋萍,等. 翠云草总黄酮的提取工艺研究[J]. 中药材,2011,34(12):1940.
- [7] 郑俊霞,王乃利,罗群会,等. 高原药用植物抗缺氧活性成分的研究[C]. 南昌:第九届全国中药和天然药物学术研讨会,2007:589.
- [8] 姚新生,王乃利,范明,等. 黄酮衍生物的用途及制备方法,中国:200810198590[P]. 2009-02-01.
- [9] 赖红芳,韦瑞松,黄秀香. 金樱根总黄酮提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):13.
- [10] 蓝峻峰,谢济运,玉澜. 纤维素酶辅助提取叶下珠黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):26.

[责任编辑 全燕]