

# 纤维素酶辅助提取叶下珠黄酮的工艺优选

蓝峻峰, 谢济运, 玉澜

(柳州师范高等专科学校化学与生命科学系, 广西 柳州 545004)

**[摘要]** 目的: 优选纤维素酶辅助提取叶下珠黄酮提取工艺条件, 为叶下珠的高效利用提供依据。方法: 采用单因素试验研究料液比、提取温度、提取时间和酶浓度对叶下珠黄酮提取得率的影响, 通过正交试验优选纤维素酶辅助提取叶下珠黄酮的工艺条件。结果: 纤维素酶辅助提取叶下珠黄酮的最佳工艺条件为酶质量浓度  $4.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 提取温度  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , 料液比 1:30, 提取时间 1.5 h。在此条件下, 黄酮的提取得率为 1.51%。结论: 采用纤维素酶辅助提取叶下珠黄酮, 提取效果较好, 该方法具有较好的应用前景。

**[关键词]** 叶下珠; 黄酮; 提取工艺; 纤维素酶

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0026-03

## Extraction Process of Flavone in *Phyllanthus urinaria* Based on Cellulase

LAN Jun-feng, XIE Ji-yun, YU Lan

(Department of Chemistry and Life Science, Liuzhou Teachers College, Liuzhou 545004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the extraction process of flavone in *Phyllanthus urinaria* based on cellulase, and provide the basis for the efficient use of *P. urinaria*. **Method:** The single factor test was performed to study the effects of the material-liquid ratio, extraction temperature, extraction time and the concentration of cellulase on the yield rate of flavone from *P. urinaria*. The process of extracting flavone based on cellulose was optimized with orthogonal test. **Result:** The results showed that the optimized extraction condition of flavone in *P. urinaria* based on cellulase was as following: the concentration of cellulase was  $4.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , the extraction temperature was  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , the material-liquid ratio was 1:30 and the extraction time was 1.5 h. Under the optimized condition, the extraction ratio of flavone was high of 1.51%. **Conclusion:** In the present conditions, the extracting efficiency of flavone from *P. urinaria* based on cellulase is better, and it has a promising future in application.

**[Key words]** *Phyllanthus urinaria*; flavone; extraction process; cellulase

叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 系大戟科植物, 又名珍珠草、关门草等<sup>[1]</sup>, 最早收载于《生草药性备要》, 具有平肝清热、利水解毒之功效, 我国传统中医常用于治疗小儿疳积、黄疸、肝炎、肠炎、痢疾、肾炎、水肿等<sup>[2]</sup>, 近年来叶下珠成为研究热点, 国内外均有用于治疗病毒性乙型肝炎的报道, 叶下珠主要含有黄酮类等多种成分<sup>[3-5]</sup>。黄酮类化合物具有抗病毒、

抗肿瘤、免疫调节、抗老以及抗辐射等作用<sup>[6]</sup>。

中药材中纤维素占植物干重的 35% ~ 50%, 其有效成分往往包埋在细胞壁内, 植物的细胞壁是由纤维素构成的, 传统的热水、酸、碱和有机溶剂浸提法提取叶下珠的有效成分时, 由于受到细胞壁中纤维素的阻碍, 往往提取温度高、时间长, 提取得率较低。纤维素是  $\beta$ -D-葡萄糖以 1,4- $\beta$  葡萄糖苷键连接的<sup>[7]</sup>, 在提取过程中适当的使用纤维素酶进行处理, 可有效破坏植物细胞壁, 更利于其有效成分的提取。本研究以黄酮提取得率为指标, 通过单因素试验及正交试验, 优选纤维素酶对叶下珠有效成分进行辅助提取的工艺条件, 为叶下珠植物资源的开发

**[收稿日期]** 20110418(006)

**[第一作者]** 蓝峻峰, 硕士, 讲师, 从事天然产物化学及分析化学研究, Tel: 0772-2726500, E-mail: lzsrljf@163.com

和利用提供参考数据。

## 1 材料

叶下珠购于柳州市中药材市场,经柳州师范高等专科学校化生系覃逸明博士鉴定为叶下珠 *P. urinaria* 全草。

纤维素酶(2 000 U·g<sup>-1</sup>,购于广西南宁赛华发酵制品有限公司),芦丁对照品(由中国药品生物制品检定所提供,批号 100080-200707),Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, NaOH, NaNO<sub>2</sub> 等均为分析纯。

UV-2102PCS 型紫外分光光度计[尤尼科(上海)仪器有限公司],YJ501CJ 型超级恒温器(上海跃进医疗仪器厂),SHZ-C 型循环真空机(河南巩义市英峪子华仪器厂),AE240 型电子天平(梅特勒-托利多仪器厂)。

## 2 方法与结果

**2.1 提取方法** 准确称取 10 g 叶下珠干粉于烧瓶中,在一定条件下回流恒温提取相应的时间后,将提取液煮沸 2 min,使酶失活,待冷却后,抽滤,得叶下珠提取液,低温保存,待测。

### 2.2 分析方法

**2.2.1 标准曲线的绘制** 准确称取芦丁对照品 32 mg 于 50 mL 量瓶中,用 70% 乙醇溶解并定容,得芦丁对照品储备液。准确吸取芦丁对照品储备液 0.00,2.00,2.50,3.00,3.50,4.00 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加入 30% 乙醇 5 mL 后,再分别依次加入 0.05 g·L<sup>-1</sup> 的 NaNO<sub>2</sub> 溶液 1 mL、0.10 g·L<sup>-1</sup> 的 Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 1 mL 和 0.04 g·L<sup>-1</sup> NaOH 5 mL,摇匀后用 30% 乙醇定容,静置 10 min,用紫外-可见分光光度计以试剂空白为参比,在波长 510 nm 处测其吸光度。以芦丁质量浓度为纵坐标,吸光度为横坐标,绘制曲线并进行线性回归,得回归方程为  $Y = 93.842X - 0.3756$  ( $r = 0.9998$ ),说明黄酮 0~64 mg·L<sup>-1</sup> 与吸光度线性关系良好。

**2.2.2 样品的测定** 准确移取 2.1 的提取液于 25 mL 量瓶中,再按 2.2.1 方法测定其吸光度值,代入回归方程,计算溶液中黄酮浓度及黄酮的提取得率。

### 2.3 单因素试验

**2.3.1 料液比对提取得率的影响** 称量 10 g 叶下珠干粉 6 份,分别按料液比为 1:15,1:20,1:25,1:30,1:35,1:40 加水,并加入一定量的纤维素酶,使酶质量浓度为 2 g·L<sup>-1</sup>,在 50 °C 下提取 1 h,研究料

液比对叶下珠黄酮得率的影响,结果黄酮得率分别为 0.96%, 1.00%, 1.02%, 1.03%, 1.03%, 1.03%。在料液比达到 1:25 左右时,黄酮得率达到较高水平,之后料液比增加对黄酮提取得率影响不大。

**2.3.2 温度对提取得率的影响** 称量 10 g 叶下珠干粉 6 份于烧瓶中,按料液比为 1:20 加入水,并加入一定量的纤维素酶使酶浓度为 2 g·L<sup>-1</sup>,分别在 35,40,45,50,55,60 °C 下提取 1 h,研究提取温度对黄酮得率的影响,结果黄酮得率分别为 0.96%, 1.01%, 1.02%, 0.98%, 0.95%, 0.96%。温度达到 45 °C 后,黄酮提取得率反而下降,其原因是在一定温度下酶的活性较高,过高的温度会使酶失活,酶解作用降低。因此,提取温度应控制在 45 °C 左右。

**2.3.3 时间对提取得率的影响** 称量 10 g 叶下珠干粉 5 份,按料液比为 1:20 加水,并加入一定量的纤维素酶,使酶浓度为 2 g·L<sup>-1</sup>,在 50 °C 下分别提取 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 h,研究提取时间对黄酮得率的影响,结果黄酮得率分别为 0.96%, 0.99%, 1.00%, 1.01%, 0.99%。确定叶下珠黄酮提取时间为 1 h 左右。

**2.3.4 酶质量浓度对提取得率的影响** 称量 10 g 叶下珠干粉 5 份,按料液比为 1:20 加水,加入一定量的纤维素酶,使酶质量浓度分别为 1.25,2.5,3.75,5,6.25 g·L<sup>-1</sup>,在 50 °C 下提取 1 h,研究酶质量浓度对黄酮得率的影响,结果分别为 0.92%, 0.99%, 1.08%, 1.11%, 1.11%。该结果显示,随着酶质量浓度增加,黄酮得率也升高。但在随着酶质量浓度达到 4 g·L<sup>-1</sup> 以后,黄酮提取得率变化的量不大,说明此时纤维素已接近分解完全,酶用量增加对黄酮得率影响不明显,可确定酶质量浓度控制在 4 g·L<sup>-1</sup> 附近为佳。

**2.4 正交试验** 在单因素试验结果的基础上,为进一步考察各因素对提取得率的影响及它们之间的相互关系,选取酶质量浓度(A)、提取温度(B)、料液比(C)、提取时间(D)等 4 个因素,每个因素选取 3 个水平,用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表设计安排试验优选叶下珠黄酮提取工艺条件。因素水平安排见表 1,正交试验结果见表 2。

由极差 R 值可以看出,影响提取得率的因素主次顺序为 B > D > C > A,即在考察的水平范围内,对

表 1 纤维素酶辅助提取叶下珠黄酮工艺正交试验因素水平

水平	A 酶质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	B 提取温度 /℃	C 料液比	D 提取时间 /h
1	3.75	40	1:30	2.0
2	4.00	45	1:25	1.5
3	4.25	50	1:20	1.0

表 2 纤维素酶辅助提取叶下珠黄酮工艺正交试验

No.	A	B	C	D	得率/%
1	1	1	1	1	1.46
2	1	2	2	2	1.42
3	1	3	3	3	1.39
4	2	1	2	3	1.47
5	2	2	3	1	1.33
6	2	3	1	2	1.47
7	3	1	3	2	1.50
8	3	2	1	3	1.44
9	3	3	2	1	1.38
K <sub>1</sub>	1.43	1.48	1.46	1.39	
K <sub>2</sub>	1.42	1.40	1.43	1.46	
K <sub>3</sub>	1.44	1.41	1.41	1.43	
R	0.02	0.08	0.05	0.07	

提取效果的影响顺序为温度 > 时间 > 料液比 > 酶质量浓度。提取最佳工艺条件为 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>, 即酶质量浓度 4.25 g·L<sup>-1</sup>, 温度 40℃, 料液比 1:30, 提取时间 1.5 h。

**2.5 验证试验** 用上述最佳工艺条件重复试验 3 次, 3 次黄酮得率分别为 1.52%, 1.51%, 1.51%, RSD 0.24%。结果显示, 纤维素酶辅助提取叶下珠黄酮得率高于传统提取方法的 1.39%<sup>[8]</sup>, 说明优化实验所得的最佳提取工艺条件重复性高, 方法可靠,

对叶下珠黄酮的提取效果好。

### 3 结论

在提取中使用了纤维素酶, 使植物组织及细胞壁中纤维素分解, 有效成分的扩散溶出更容易, 有效地缩短提取时间, 且提取温度只有 40℃, 明显低于传统提取方法的 80~90℃<sup>[8-9]</sup>, 更好的保留了黄酮中热不稳定成分, 提取得率更高, 能耗更低。研究结果为叶下珠黄酮的提取工业化生产提供了理论参考依据, 具有较好的应用前景。

### [参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 1496.
- [2] 马延康, 赵东科, 郝海员, 等. 叶下珠栽培技术及药材质量研究[J]. 中国现代中药, 2006, 8(10): 34.
- [3] 范适, 李兰岚, 饶力群, 等. 抗乙肝植物药叶下珠化学成分和药理作用研究进展[J]. 南华大学学报: 自然科学版, 2006, 20(2): 83.
- [4] 张兰珍, 郭亚健, 涂光忠, 等. 叶下珠化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 615.
- [5] 万振先, 喻庆禄, 易杨华, 等. 叶下珠化学成分的研究(II)[J]. 中草药, 1997, 28(3): 134.
- [6] 贺浪冲, 钟林, 吕居娴, 等. 叶下珠提取物体外灭活 HBV 抗原作用[J]. 西北药学杂志, 1996, 11(1): 11.
- [7] 杨莉, 刘亚娜. 酶法在中药提取制备中的应用[J]. 中药材, 2001, 24(1): 72.
- [8] 马燮, 李敏, 杨虎, 等. 正交试验优选叶下珠中黄酮类化合物的提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(11): 117.
- [9] 蓝峻峰, 曾凡芝. 正交试验法优选叶下珠有效成分水提工艺[J]. 柳州师专学报, 2009, 24(6): 129.

[责任编辑 全燕]