

超声辅助法提取剑叶龙血树根总黄酮的工艺研究

苏秀芳, 秦健梅

(广西民族师范学院化学与生物工程系, 广西 崇左 532200)

[摘要] 目的: 确定剑叶龙血树根中总黄酮最佳提取工艺。方法: 采用超声波辅助法提取剑叶龙血树根中的黄酮类化合物, 通过单因素及 $L_9(3^4)$ 正交试验, 考察超声波提取条件对剑叶龙血树根中总黄酮提取率的影响。结果: 总黄酮最佳提取工艺条件为温度 60 °C, 超声功率 60 W, 乙醇体积分数 90%, 料液比 1:30, 提取时间 30 min。结论: 此条件下剑叶龙血树根总黄酮提取率为 2.13%。

[关键词] 剑叶龙血树根; 总黄酮; 超声辅助提取; 正交试验

[中图分类号] R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0097-04

Ultrasound Wave Assisted Extraction Technology of Total Flavonoids from Roots of *Dracaena Cochinchinensis*

SU Xiu-fang, QIN Jian-mei

(Department of Chemistry and Biological Engineering, Guangxi Normal University for Nationalities, Chongzuo 532200 China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total flavonoids from the roots of *Dracaena cochinchinensis*. **Method:** Total flavonoids were extracted from the roots of *D. cochinchinensis* through ultrasound wave assisted technique. Effects of operation conditions were studied by using single factor and orthogonal design methods $L_9(3^4)$. **Result:** The optimize extraction technology condition was 60 °C, 60 W, 90% ethyl alcohol, 1:30 and 30 min. **Conclusion:** Under the optimized conditions, the extraction percent of total flavonoids is about 2.13% from the roots of *D. cochinchinensis*.

[Key words] roots of *Dracaena cochinchinensis*; total flavonoids; ultrasonic wave assisted extraction; orthogonal test

[收稿日期] 20110112(008)

[基金项目] 广西民族师范学院基金

[第一作者] 苏秀芳, 硕士, 副教授, 研究方向: 天然产物活性成分的提取分离、分析及药理活性研究, Tel: 13471121425, E-mail: suxiufong-88@sina.com

对大黄的临床作用有较明显影响, 本研究表明, 在贮存过程中检测的 5 种蒽醌成分在 3 种大黄饮片的贮存过程中均呈明显的下降趋势, 其中, 以大黄酚和大黄素甲醚含量下降最为明显, 其对饮片药效作用的影响需进一步试验证实。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:22.
- [2] Wang J, Li H, Jin C, et al. Development and validation of a UPLC method for quality control of rhubarb based

medicine; fast simultaneous determination of five anthraquinone derivatives[J]. J Pharm Biom Anal, 2008, 47(4/5):765.

- [3] 王强, 罗云, 金城, 等. 干燥方式和条件对大黄水提液蒽醌和鞣质成分含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(8):893.
- [4] 王伽伯, 张学儒, 肖小河, 等. 基于化学分析的大黄药材商品规格划分的科学合理性研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 35(4):470.

[责任编辑 蔡仲德]

剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 为百合科龙血树属植物,为濒危稀有物种,微幅分布,国家三级保护植物,主要分布于广西和云南,国外主要分布于柬埔寨、老挝、泰国、缅甸等地^[1]。广西地处我国亚热带地区,为龙血树集中分布的地区,主要产地有崇左、龙州等。龙血树受伤后会流出暗红色的树脂,干固的结块在中药里称为“血竭”或“麒麟竭”,是中国传统的重要南药——血竭(龙血竭),可以治疗筋骨疼痛等症。

剑叶龙血树的主要成分为黄酮类、螺甾类、酚类等化学成分^[2-7]。传统提取药用植物中黄酮类物质多采用热回流法进行,热回流法因长时间受热而易破坏其中的有效成分,且劳动强度大。大量资料表明,超声波的强烈搅拌、振动、空化作用可以破坏细胞结构,加速有效物质的溶出,超声提取不仅设备简单,提高提取效率,而且可以大大地缩短时间,节省能源^[8]。

本实验以剑叶龙血树根为研究对象,研究了超声提取过程中相关条件对黄酮提取率的影响,为优化剑叶龙血树中黄酮的提取工艺进行了实验研究,主要寻求一种快速、简便、有效地提取方法。

1 材料

UV-1601 型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);JA1003N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);SG2200HPT 型超声波清洗机(上海冠特超声仪器有限公司)。

芦丁(生化试剂,上海晶纯试剂有限公司);乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等化学试剂均为分析纯(AR)。

剑叶龙血树根于 2010 年 5 月摘自广西崇左市郊,经本院生物教研室黄秋婵副教授鉴定为 *D. cochinchinensis*。

2 方法

2.1 测定方法原理 以芦丁为对照品,加入 NaNO_2 ,还原提取液中的黄酮类化合物,再加入 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$,使黄酮类化合物与铝离子络合,形成稳定的化合物,再加入 NaOH 使其显色,在可见光区能获得稳定的特征吸收峰,所以提取液中总黄酮的含量与其吸光度有关。

2.2 标准曲线的绘制 准确称取芦丁标准品 25.00 mg 于 100 mL 量瓶中,加入少量 80% 乙醇,超声溶解后定容到刻度,得芦丁标准溶液。

精确量取芦丁对照品溶液 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 分别置于 10 mL 的比色管中,均用水稀释到 2.4 mL,各加 5% NaNO_2 溶液 0.4 mL,摇匀,放置 6 min;然后各加 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.4 mL 摇匀,放置 6 min;然后各加 4% 的 NaOH 溶液 4 mL 摇匀,最后用水稀释到刻度,混匀,放置 15 min,以试剂空白为参比,在最大吸收波长 510 nm 处测定吸光度值 A 。以 A 为纵坐标,浓度 C 为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $A = 9.4857C - 0.0031$, $R^2 = 0.9996$,在考查范围内呈良好的线性关系。

3 结果

3.1 单因素的影响

3.1.1 乙醇体积分数对黄酮提取率的影响 准确称取 1.000 g 粉碎后的原料粉末,以料液比为 1:20,在温度 40 °C,超声功率为 60 W,分别加入 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 的乙醇提取 30 min。计算提取率,结果见图 1。

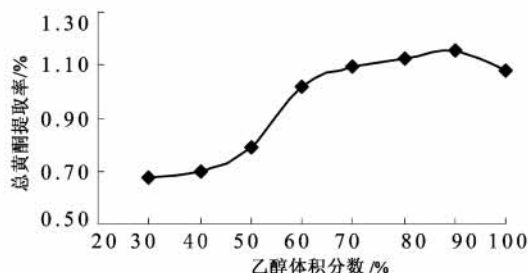


图 1 乙醇体积分数对黄酮提取率的影响

由图 1 可看出,总黄酮提取率随着乙醇体积分数的增加而增大,到达 90% 时提取率最大。但当体积分数大于 90% 时提取率不再增加,在 100% 时有所下降。这可能是因为部分黄酮化合物是水溶性的,如果提取剂中没有水分,这部分黄酮类化合物得不到充分的溶解。所以选择体积分数为 90% 的乙醇为最佳提取浓度。

3.1.2 料液比对黄酮提取率的影响 精确称取 6 份 1.000 g 的原料粉末,用体积分数为 90% 的乙醇溶液分别以料液比为 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35 的量加入,在 40 °C, 60 W 的条件下提取 30 min,在 510 nm 波长处测吸光度,考察料液比对黄酮提取率的影响,结果见图 2。

由图 2 可见,总黄酮提取率总体上是随着料液比的增大而增大的,到达 1:30 时提取率最大。继续增加溶剂量时,提取率有所下降。料液比过小不能充分溶解原料中黄酮类化合物,料液比过大,会造成

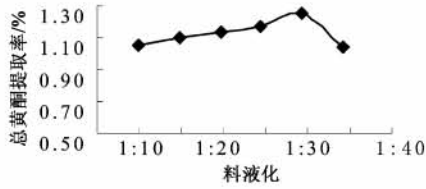


图2 料液比对黄酮提取率的影响

溶剂的浪费,还会增加浓缩和回收溶剂的困难。因此选择料液比为 1:30 作为最佳料液比提取条件。

3.1.3 提取温度对黄酮提取率的影响 精确称取 4 份 1.000 g 粉碎后的原料粉末,用体积分数 90% 的乙醇溶液以料液比为 1:30 的量加入,提取功率为 60 W,分别在 40, 50, 60, 70 °C 的条件提取 30 min,在 510 nm 波长处测吸光度,考察提取温度对黄酮提取的影响,结果见图 3。

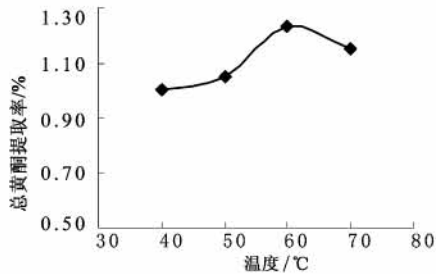


图3 提取温度对黄酮提取率的影响

由图 3 可知,总黄酮的提取率随温度的增加而增加,到达 60 °C 时提取率最大。但当温度继续增加时提取率没有增加,在 70 °C 时略有下降。可见,适宜的温度对黄酮的溶出有促进作用,但温度过高会破坏植物细胞,不利于黄酮的溶出,过低又没有达到黄酮溶出的温度,没有充分的溶解出物质内的黄酮物质,因此选择 60 °C 作为最佳提取温度。

3.1.4 提取功率对黄酮提取率的影响 精确称取 5 份 1.000 g 的原料粉末,用体积分数为 90% 的乙醇溶液以料液比为 1:30 的量加入,在 60 °C 的条件下分别用 40, 50, 60, 70, 80 W 的功率提取 30 min,在 510 nm 波长处测吸光度,考察提取功率对黄酮提取的影响,结果见图 4。

由图 4 可知,总黄酮提取率总体上是随着提取功率的增大而增加的,到达 70 W 时提取率最大,但当提取功率继续增加时,提取率反而有所下降。适宜的功率对黄酮的提取有促进的作用,功率过小不能起到充分的震荡作用,黄酮化合物不能有效地溶出,功率过大所提取的黄酮量并没有增加。因此选择 70 W 作为最佳提取功率。

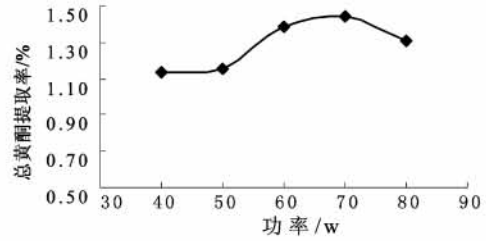


图4 功率对黄酮提取率的影响

3.1.5 提取时间对黄酮提取率的影响 精确称取 5 份 1.000 g 的原料粉末,乙醇体积分数为 90%,料液比为 1:30,提取温度为 60 °C,功率为 70 W,在超声时间分别为 20, 30, 40, 50, 60 min 的条件下进行提取,在 510 nm 波长处测吸光度,考察超声提取时间对黄酮提取率的影响,结果见图 5。

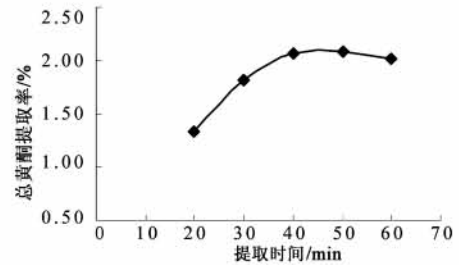


图5 提取时间对黄酮提取率的影响

由图 5 可见,提取时间在 40 min 时总黄酮提取率最大,再延长提取时间总黄酮的提取率没有增加,考虑能耗,选择 40 min 作为最佳提取时间。

3.2 正交试验 根据单因素实验结果,选取乙醇浓度(A),超声功率(B),料液比(C),超声时间(D)4 个因素作为考察指标。各因素及水平设计如表 1 所示。正交实验采用 4 因素 3 水平正交表,即 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验,在最佳提取温度 60 °C 下进行,结果见表 2。

表 1 总黄酮提取因素水平

水平	A 乙醇 体积分数/%	B 功率 /w	C 料液比	提取时间 /min
1	70	60	1:20	30
2	80	70	1:25	40
3	90	80	1:30	50

采用极差法及方差分析法对正交实验结果进行分析,由表 2,3 可知,影响剑叶龙血树根的总黄酮提取率的因素由大到小为 $A > B > C > D$,即乙醇体积分数 > 超声功率 > 料液比 > 超声时间,乙醇体积分数、超声料液比对总黄酮得率具有显著性影响,提取

表 2 总黄酮提取正交试验

No.	A	B	C	D	提取率 /%
1	1	1	1	1	1.546
2	1	2	2	2	1.097
3	1	3	3	3	1.493
4	2	1	2	3	1.740
5	2	2	3	1	1.536
6	2	3	1	2	1.613
7	3	1	3	2	2.126
8	3	2	1	3	1.587
9	3	3	2	1	1.794
K ₁	4.136	5.412	4.747	4.875	
K ₂	4.889	4.220	4.631	4.836	
K ₃	5.507	4.901	5.155	4.820	
k ₁	1.379	1.804	1.582	1.625	
k ₂	1.630	1.407	1.544	1.612	
k ₃	1.836	1.634	1.718	1.607	
R	0.457	0.397	0.174	0.018	

表 3 方差分析

变异来源	MS	f	\bar{x}	F	P
A	0.314 0	2	0.157 0	589.269	<0.01
B	0.238 6	2	0.119 3	447.627	<0.01
C	0.050 5	2	0.025 3	94.780	<0.05
D	0.000 5	2	0.000 3	1	

时间在考查范围内影响不显著,最佳提取条件为 A₃B₁C₃D₁,即 90% 的乙醇体积分数,超声功率 60 W,料液比 1:30,在 60 ℃ 下提取 30 min。

3.3 重复性试验 在最佳提取条件下,重复进行 3 次试验,测定吸光度,所得总黄酮的提取率为 2.114% ,2.120% ,2.129% 。

3.4 回收率试验 精密吸取已知质量分数的提取液 1.0 mL 3 份,分别置于 10 mL 比色管中,加入不同量的芦丁对照品,测定吸光度,计算回收率,平均回收率为 100.6% ,表明提取方法稳定可行。

4 结论

本实验在单因素的基础上进行了多因素的正交实验,研究了超声波法提取剑叶龙血树根的总黄酮的最佳提取实验条件。从正交实验的极差及方差分析可知,影响总黄酮提取率的因素大小顺序为乙醇体积分数 > 超声功率 > 料液比 > 超声时间,最佳的提取条件为:90% 体积分数的乙醇,超声功率 60 W,料液比 1:30,在 60 ℃ 下提取 30 min,所得总黄酮的提取率最高达 2.13% 。

[参考文献]

[1] 中国科学院 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京:科学出版社,1980.
 [2] 胡迎庆,屠鹏飞,李若瑜. 剑叶龙血树中芪类化合物及其抗真菌活性的研究[J]. 中草药,2001,32(2):104.
 [3] 周志宏,陈江,王锦亮. 云南血竭中的酚性成分(1)(摘要)[J]. 药学实践杂志,2000,18(5):354.
 [4] 王雪芬,卢文杰,陈家源. 剑叶龙血树化学成分的研究 I. 剑叶龙血素 A 和 B 的结构测定[J]. 广西中医药,1993(1):38.
 [5] 王雪芬,唐人九,卢文杰. 剑叶龙血树化学成分的研究 II. 剑叶龙血素 C 的结构测定[J]. 广西中医药,1993,16(1):39.
 [6] 卢文杰,王雪芬,陈家源. 剑叶龙血树氯仿部位化学成分的研究[J]. 药学学报,1998,33(10):755.
 [7] 李成,宋启示. 剑叶龙血树叶化学成分研究[J]. 中草药,2008,39(10):1456.
 [8] 郭孝武. 超声技术在中药有效成分提取中的应用[J]. 中草药,1993,10(24):548.

[责任编辑 蔡仲德]