

苍耳七黄酮化合物超声提取条件的优化

温新宝^a, 秦翠萍^a, 苗 芳^a, 周 乐^b

(西北农林科技大学 a 生命科学学院, b 理学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】确定苍耳七黄酮化合物超声提取的最佳条件,为后续苍耳七化学成分及黄酮化合物抗氧化活性研究奠定基础。【方法】采用超声提取法,以苍耳七全草总黄酮提取量为考察指标,通过单因素试验分析乙醇体积分数(10%,30%,50%,70%和 90%)、溶剂量(5,10,15,20 和 25 倍)、提取温度(25,35,45,55 和 65 ℃)以及提取时间(15,30,45,60 和 75 min)对苍耳七黄酮化合物提取的影响,确定 $L_9(3^4)$ 正交试验中各因素的水平;在此基础上,利用正交试验确定苍耳七总黄酮超声提取的最优条件。【结果】单因素试验结果表明,乙醇体积分数为 50%~90%、溶剂量为 10~20 倍、提取温度为 35~55 ℃、提取时间为 30~60 min 时,苍耳七总黄酮的提取量均较高。正交试验结果表明,影响苍耳七总黄酮提取量的 4 种因素中,影响程度从大到小依次为乙醇体积分数>溶剂量>提取温度>提取时间;超声提取苍耳七总黄酮的最佳条件为:提取溶剂体积分数 50%乙醇,溶剂量 20 倍,提取温度 55 ℃,提取时间 60 min。【结论】得到了苍耳七黄酮化合物提取的最佳条件,此条件下苍耳七总黄酮提取量为 47.18 mg/g。

【关键词】 苍耳七;黄酮化合物;正交试验;超声提取

【中图分类号】 R284.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)07-0153-05

Optimization of the ultrasonic extraction conditions of flavonoids from *Parnassia wightiana*

WEN Xin-bao^a, QIN Cui-ping^a, MIAO Fang^a, ZHOU Le^b

(a College of Life Sciences, b College of Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The research aimed to identify the optimum conditions for ultrasonic extraction of flavonoids from *Parnassia wightiana* to lay a foundation for the subsequent studies on chemical composition and antioxidant activity of *Parnassia wightiana*. 【Method】 The total flavonoids extraction volume of *Parnassia wightiana* was determined by ultrasonic extraction; The influence of every factor level on extraction volume of flavonoids from *Parnassia wightiana* was analyzed through single-factor test, using the extraction volume of total flavonoids as index. The factor levels included volume fraction of ethanol(10%, 30%, 50%, 70% and 90%), dosage of solvent(5, 10, 15, 20 and 25), extraction temperature(25, 35, 45, 55 and 65℃), extraction time(15, 30, 45, 60 and 75min), finally the factor levels of orthogonal test were determined. On this basis, the optimal conditions of ultrasonic extraction of flavonoids from *Parnassia wightiana* were determined by orthogonal test. 【Result】 The result of single-factor test showed that the extraction volume of total flavonoids from *Parnassia wightiana* was much higher when factor levels of volume fraction, dosage of solvent, extraction temperature and extraction time were correspondingly as follows: 50%(V/V)–90%(V/V); (10–20)×; 35–55℃; 30–60 min. The result of orthogonal test showed that among the 4 factors which affected the extraction volume of total flavonoids, the dominative order was: volume fraction of ethanol>dosage of solvent>extraction temperature>extraction time. The optimum condi-

* [收稿日期] 2010-12-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30771454)

[作者简介] 温新宝(1987—),男,陕西户县人,在读硕士,主要从事药用植物学研究。E-mail: denttt@163.com

[通信作者] 苗 芳(1965—),女,陕西蒲城人,副教授,博士,主要从事植物学、药用植物学研究。E-mail: miaofangmf@163.com

tions for ultrasonic extraction of flavonoids were as follows:with ethanol whose volume fraction was 50% (V/V) as the dissolving solution,the dosage of solvent 20,the extraction temperature 55 ℃,the extraction time 60 min.【Conclusion】 The optimal ultrasonic-extraction conditions of flavonoids from *Parnassia wightiana* were determined,and under these conditions,the extraction volume of total flavonoids from *Parnassia wightiana* was up to 47.18 mg/g.

Key words:*Parnassia wightiana*; flavonoids; orthogonal test; ultrasonic extraction

苍耳七(*Parnassia wightiana* Wall)是虎耳草科(Saxifragaceae)苍耳七属(*Parnassia*, 又称梅花草属^[1])多年生草本植物,又名荞麦叶、疔疮草、鸡眼梅花草等,是陕西民间一种常用中草药。苍耳七属约有 45 种,主要分布于北温带,我国有 36 种,各省均有分布,但主要生长于西南部,陕西秦岭生长有 4 种。苍耳七以全草入药,其全草称为鸡肫草,能补虚益气、利尿除湿、调经凉血,主治白带、咳嗽吐血、湿热疮毒、风湿、月经不调、疟疾、肾结石、胆结石、高血压等症^[2]。国内外研究表明,苍耳七属植物含有大量的黄酮化合物,主要以槲皮素和山奈酚的衍生物存在,包括单糖苷、双糖苷和三糖苷^[3-4]。黄酮化合物具有广泛的生物活性,可杀虫、抑菌或杀菌、扩张血管、利胆护肝、保护皮肤,对动脉粥样硬化、癌症、帕金森综合症也具有一定的治疗作用^[5-12]。但目前关于秦岭特产种苍耳七的化学成分和生物活性的研究还鲜见报道。为进一步明确秦岭特产种苍耳七的药用价值,本研究采用单因素试验和 $L_9(3^4)$ 正交试验,分析乙醇体积分数、溶剂量、提取温度和提取时间对超声提取苍耳七总黄酮的影响,筛选出最佳提取条件,旨在为后续苍耳七化学成分及黄酮化合物的抗氧化活性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

苍耳七具花全草,于 2010-8-28 采自秦岭南坡

表 1 苍耳七总黄酮超声提取条件 $L_9(3^4)$ 正交试验的因素及水平

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
	乙醇体积分数/% Volume fraction of EtOH	溶剂量/倍 Dosage of solvent	提取温度/℃ Temperature	提取时间/min Time
1	50	10	35	30
2	70	15	45	45
3	90	20	55	60

1.2.3 苍耳七提取液的制备 称取苍耳七干粉 5 g,按单因素试验和 $L_9(3^4)$ 正交试验中相应的提取条件,经超声提取仪重复提取 2 次,抽滤,合并滤液,将提取液经旋转蒸发仪蒸干。将提取物用 50 mL

陕西宁陕县平和梁山区,自然条件下阴干,粉碎后备用。

1.2 方 法

1.2.1 影响苍耳七总黄酮超声提取的单因素试验设计 (1)乙醇体积分数。在溶剂量 15 倍、提取温度 45 ℃、提取时间 45 min 的条件下,分别用体积分数为 10%,30%,50%,70%和 90%乙醇超声提取苍耳七全草总黄酮,考察乙醇体积分数对苍耳七总黄酮提取量的影响。

(2)溶剂量。在乙醇体积分数 70%、提取温度 45 ℃、提取时间 45 min 的条件下,分别用 5,10,15,20 和 25 倍溶剂量超声提取苍耳七全草总黄酮,考察溶剂量对苍耳七总黄酮提取量的影响。

(3)提取温度。在乙醇体积分数 70%、溶剂量 15 倍、提取时间 45 min 的条件下,分别在 25,35,45,55 和 65 ℃下超声提取苍耳七全草总黄酮,考察提取温度对苍耳七总黄酮提取量的影响。

(4)提取时间。在乙醇体积分数 70%、溶剂量 15 倍、提取温度 45 ℃的条件下,分别超声提取 15,30,45,60 和 75 min,考察提取时间对苍耳七总黄酮提取量的影响。

1.2.2 影响苍耳七总黄酮超声提取的多因素正交试验设计 选择乙醇体积分数、溶剂量、提取温度、提取时间 4 个因素,以黄酮提取量作为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表安排试验,所选因素及水平如表 1 所示。

蒸馏水溶解,经石油醚萃取,母液加无水乙醇配成体积分数 30%乙醇溶液,冰箱过夜,沉淀叶绿素(叶绿素极性较小,易溶于石油醚,难溶于极性大的体积分数 30%乙醇),经 5 000 r/min 离心 5 min,除去叶绿

素层,澄清液完全转入 100 mL 容量瓶中,用体积分数 30%乙醇定容至刻度。

1.2.4 苍耳七总黄酮提取量的测定 以芦丁标准品(分析纯,纯度≥98%,20 mg 装,阿拉丁试剂)为标样,利用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 系统显色法显色,在 510 nm 波长处测定吸光度 A_{bs} ,具体参照文献[13]方法进行操作。以吸光度 A_{bs} 为横坐标,芦丁标准品浓度 C 为纵坐标,对数据进行线性拟合,得标准曲线方程为:

$$C=0.098\ 8A_{bs}+0.000\ 3,R^2=0.999\ 8。$$

准确量取 1 mL 苍耳七提取液,以 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 系统显色法显色,并用体积分数 30%乙醇定容至 25 mL,在 510 nm 处测定吸光度 A_{bs} ,代入标准曲线计算 C ,然后按照下式计算提取物中总黄酮的提取量:

$$\text{苍耳七总黄酮的提取量}(\text{mg/g})=C(\text{mg/mL})\times100\times25(\text{mL})/5(\text{g})。$$

1.3 数据处理

采用 Excel 软件对所得数据进行处理并作图;采用 SPSS 软件进行方差分析,对正交试验结果进

行显著性检验和 F 检验^[14]。

2 结果与分析

2.1 不同单因素对苍耳七总黄酮提取量的影响

2.1.1 乙醇体积分数 从图 1 可以看出,乙醇体积分数从 10%增加到 50%时,苍耳七总黄酮的提取量呈缓慢增长趋势,黄酮提取量差异不大;当乙醇体积分数从 50%增加到 90%时,苍耳七总黄酮的提取量急剧下降,这是因为随着提取溶剂乙醇极性的减小,叶绿素溶出量增加,而含有多个糖分子的黄酮苷(极性较大)溶出量减少所致。但考虑到提取溶剂中水分含量较多会使提取液黏度上升,并且不利于减压浓缩。因此,本研究选择 50%,70%,90%作为正交试验中的乙醇体积分数水平。

2.1.2 溶剂量 由图 2 可以看出,在溶剂量为 5~15 倍时,随着溶剂量的增加,苍耳七总黄酮提取量呈明显增加的趋势;当溶剂量为 15~25 倍时,随着溶剂量的增加,苍耳七总黄酮的提取量增加缓慢并逐渐趋于平稳。因此,选择 10,15,20 倍体积作为正交试验中溶剂量的水平。

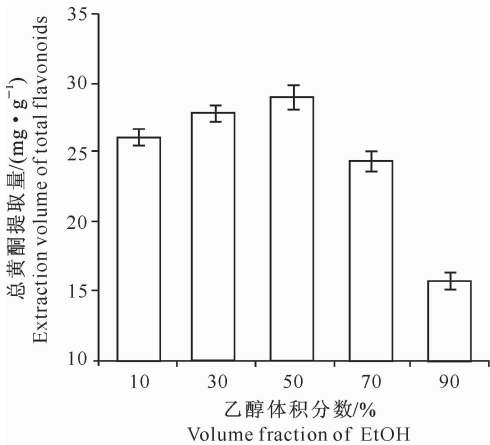


图 1 乙醇体积分数对苍耳七总黄酮提取量的影响
Fig.1 Effect of volume fraction of EtOH on extraction volume of total flavonoids from *P. wightiana*

2.1.3 提取温度 由图 3 可知,在提取温度为25~55 ℃时,随着提取温度的升高,总黄酮提取量缓慢增加;当提取温度从 55 ℃升高至 65 ℃时,总黄酮提取量没有提高反而稍有下降。这可能是因为温度太高时,部分热不稳定的黄酮化合物分解所致。因此,选择 35,45,55 ℃作为正交试验中提取温度的水平。

2.1.4 提取时间 由图 4 可以看出,当提取时间为 15~45 min 时,随着提取时间的延长,苍耳七总黄酮提取量呈增加的趋势;当提取时间为 45~75 min 时,随着提取时间的延长,苍耳七总黄酮提取量增加

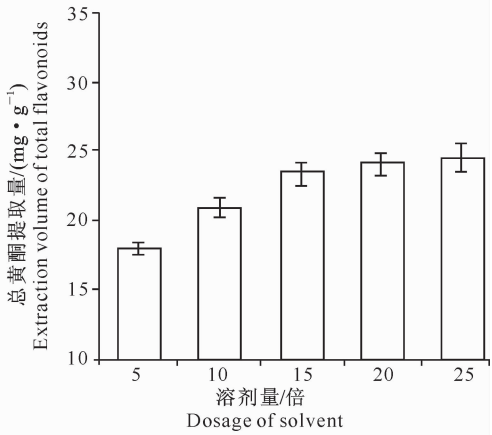


图 2 溶剂量对苍耳七总黄酮提取量的影响
Fig.2 Effect of dosage of solvent on extraction volume of total flavonoids from *P. wightiana*

缓慢并趋于平稳。因此,综合考虑提取量和成本,选用 30,45,60 min 作为正交试验中提取时间的水平。

2.2 苍耳七总黄酮超声提取的最佳条件筛选

影响苍耳七总黄酮超声提取的多因素正交试验结果见表 2。分析比较表 2 中 R 值的大小可以得出,在影响苍耳七总黄酮提取量的 4 个因素中,乙醇体积分数的影响程度最大,提取时间的影响程度最小,4 个因素影响程度从大到小的顺序为乙醇体积分数(A)>溶剂量(B)>提取温度(C)>提取时间(D)。由总黄酮提取量和 K 值大小,可知苍耳七总

黄酮提取的最佳条件为 $A_1B_3C_3D_3$,即以体积分数 50%乙醇为提取溶剂,溶剂量为 20 倍,提取温度为 55 ℃,提取时间为 60 min。从表 3 的 F 检验结果可

以看出,乙醇体积分数和溶剂量对苍耳七总黄酮的提取量具有极显著影响;提取温度和提取时间对苍耳七总黄酮提取量有显著影响。

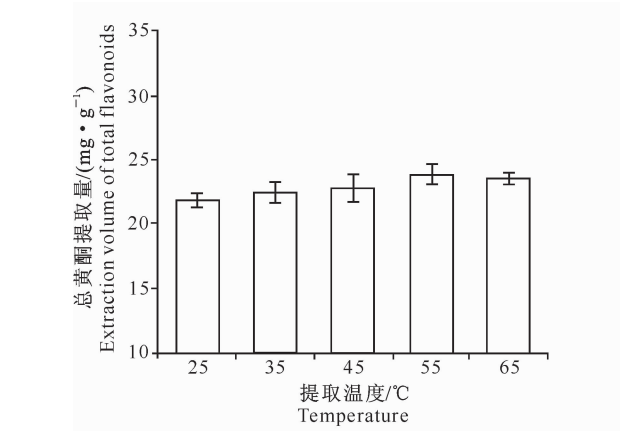


图 3 提取温度对苍耳七总黄酮提取量的影响
Fig. 3 Effect of temperature on extraction volume of total flavonoids from *P. wightiana*

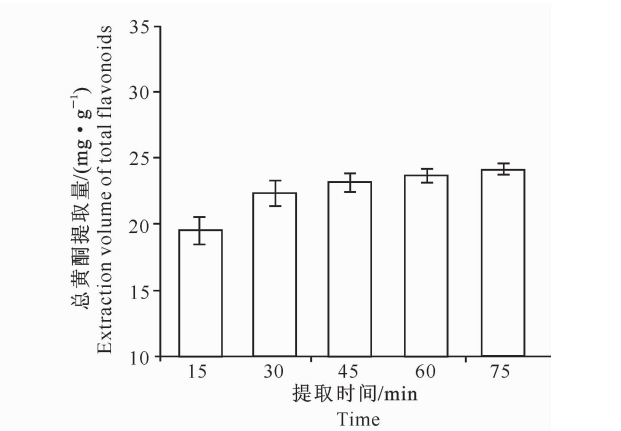


图 4 提取时间对苍耳七总黄酮提取量的影响
Fig. 4 Effect of time on extraction volume of total flavonoids from *P. wightiana*

表 2 影响苍耳七总黄酮超声提取的多因素 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Multi-factors orthogonal test of $L_9(3^4)$ results analysis of total flavonoids from *P. wightiana* by ultrasonic extraction

试验号 No.	因素 Factor				总黄酮提取量/(mg·g ⁻¹) Extraction volume of total flavonoids
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	25.657±1.161
2	1	2	2	2	29.461±1.286
3	1	3	3	3	31.453±1.334
4	2	1	2	3	22.759±0.766
5	2	2	3	1	24.965±1.062
6	2	3	1	2	25.196±1.014
7	3	1	3	2	14.723±0.840
8	3	2	1	3	16.337±0.865
9	3	3	2	1	16.057±0.840
K_1	259.712	189.416	201.568	200.037	
K_2	218.759	212.288	204.829	208.138	
K_3	141.350	218.117	213.424	211.646	
R	39.454	9.567	3.952	3.870	

表 3 影响苍耳七总黄酮超声提取的 4 个因素的方差分析

Table 3 Variance analysis of four factors which influenced total flavonoids ultrasonic extraction from *P. wightiana*

方差来源 Source of variance	离差平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	方差 Mean square	F	显著性 Significance
A	802.928	2	401.464	373.227	<0.01
B	51.144	2	25.572	23.773	<0.01
C	8.336	2	4.168	3.875	<0.05
D	7.878	2	3.939	3.662	<0.05
误差 Error	19.362	18	1.076		

注 (Note): $F_{0.01}(2,18)=6.01$; $F_{0.05}(2,18)=3.55$ 。

采用正交试验优化的最佳提取条件,超声提取苍耳七总黄酮,经过 3 次提取后,经测定得到苍耳七总黄酮的提取量为 47.18 mg/g。

3 讨 论

本试验所用的苍耳七干样为全草粉末,因此其叶绿素含量较高。用体积分数 50%~90%乙醇提

取苍耳七总黄酮时,随着乙醇体积分数的增大,叶绿素溶出量增加,为了减小叶绿素对比色的干扰,本试验采用石油醚萃取和体积分数 30%乙醇过夜沉淀离心的方法,清除叶绿素,以排除叶绿素的干扰;石油醚萃取物经 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 反应无颜色变化,说明石油醚萃取过程中并未有黄酮的损失。经正交试验优化,本研究确定苍耳七总黄酮提取的最佳条件为:提取溶剂体积分数 50%乙醇,溶剂量 20 倍,提取温度 55℃,提取时间 60 min,在此条件下,苍耳七总黄酮的提取量为 47.18 mg/g。陈科敏等^[15]对三叶青块根总黄酮超声提取条件进行了研究,所得的最优条件为:体积分数 50%乙醇、溶剂量 12 倍、提取时间 1.5 h;高中松等^[16]研究表明,桑树叶片总黄酮超声提取最优条件为:体积分数 70%乙醇、溶剂量 15 倍、提取时间 45 min;陈建明等^[17]发现,桑树嫩枝总黄酮超声提取的最优条件为:体积分数 80%乙醇、溶剂量 8 倍、提取时间 20 min;肖杭等^[18]发现,白藜茎皮总黄酮超声提取的最优条件为:体积分数 70%乙醇、溶剂量 30 倍、提取时间 35 min。由此可以看出,不同种类植物总黄酮超声提取的最优条件都不尽相同,即便是同种植物,不同部位的总黄酮超声提取最优条件亦有差异,这主要是与该植物的人药部位所含的黄酮种类及其极性和化学性质相关。

【参考文献】

- [1] 傅立国,陈潭清,郎楷永,等.中国高等植物志[M].第6卷.青岛:青岛出版集团,2003.
Fu L G, Chen T Q, Lang K Y, et al. Higher flora of China [M]. Vol 6. Qingdao: Qingdao Publishing Group, 2003. (in Chinese)
- [2] 中国科学院西北植物研究所.秦岭植物志[M].第1卷:种子植物.北京:科学出版社,1974.
Northwest institute for plant research of Chinese academy of sciences. Flora of Qinling Mountains [M]. Vol 1: Spermatophyte. Beijing: Science Press, 1974. (in Chinese)
- [3] Kharitonova N P. Flavonoid composition of *Parnassia palustris* [J]. Trudy Permskogo Farmatsevticheskogo Instituta, 1967, 2: 203-205.
- [4] Bruce A, Bohm L S, Donevan, et al. Flavonoids of some species of *Bergenia*, *Francoa*, *Parnassia* and *Lepuropetalon* [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1986, 14(1): 75-77.
- [5] Hollman P C H, Katan M B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability [J]. Food and Chemical Toxicology, 1999, 37: 937-942.
- [6] Cai Q Y, Ronald O R, Zhang R W. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals [J]. Cancer Letters, 1997, 119: 99-107.
- [7] Singhal R L, Albert Y Y, Prajda N, et al. Quercetin down-regulates signal transduction in human breast carcinoma cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 208: 425-431.
- [8] Acila M A, Velasco J A, Cansado J, et al. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468 [J]. Cancer Res, 1994, 54: 2424-2428.
- [9] Francesco B, Maria L, Lucia M, et al. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage [J]. International Journal of Pharmaceutics, 1996, 145: 87-94.
- [10] Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts [J]. FASEB J, 1987, 1: 358-364.
- [11] Kumiko I, David S, Yutaka S, et al. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2001, 30(4): 433-446.
- [12] 张靛灵,刘国强,马 琼,等.黄酮类化合物生物活性与结构的关系[J].西北林学院学报,2001,16(2):75-79.
Zhang A L, Liu G Q, Ma Q, et al. Structure-activity relationship of flavonoids [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2001, 16(2): 75-79. (in Chinese)
- [13] 王卫东,陈复生.陈皮中黄酮类化合物抗氧化活性的研究[J].中国食品添加剂,2007,59(2):59-62.
Wang W D, Chen F S. Studies on the antioxidation effects of flavonoids from the orange peel [J]. China Food Additives, 2007, 59(2): 59-62. (in Chinese)
- [14] 邵崇斌.概率论与数理统计[M].北京:中国林业出版社,2003.
Shao C B. Probability theory and mathematical statistics [M]. Beijing: Forestry Press of China, 2003. (in Chinese)
- [15] 陈科敏,石森林,黄林群,等.三叶青总黄酮的提取工艺研究[J].中国药业,2009,18(11):33-34.
Chen K M, Shi S L, Huang L Q, et al. Study on total flavones extraction from *Radix tetrastrigiae* [J]. China Pharmaceuticals, 2009, 18(11): 33-34. (in Chinese)
- [16] 高中松,丁 文,高 亮.超声波提取桑叶中总黄酮的工艺研究[J].中国农学通报,2006,22(4):116-119.
Gao Z S, Ding W, Gao L. Study on ultrasonic extraction of flavonoids in the *Mulberry leaves* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(4): 116-119. (in Chinese)
- [17] 陈建明,陈 彬,陈建真.桑枝总黄酮的超声提取工艺研究[J].医学研究杂志,2010,39(5):105-106.
Chen J M, Chen B, Chen J Z. Study on the ultrasonic extraction of flavonoids from *Ramulus mori* [J]. Journal of Medical Research, 2010, 39(5): 105-106. (in Chinese)
- [18] 肖 杭,黎云祥,蔡凌云,等.超声辅助法提取白藜茎皮总黄酮的工艺研究[J].光谱实验室,2010,27(1):197-201.
Xiao H, Li Y X, Cai L Y, et al. Research on the ultrasonic extraction of total flavones from stem bark of *Acanthopanax trifoliatum* [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2010, 27(1): 197-201. (in Chinese)