

黄花倒水莲总黄酮提取工艺研究

史艳财, 邹蓉, 韦记青, 陈宗游, 漆小雪

(广西壮族自治区中国科学院 广西植物研究所, 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西 桂林 541006)

摘要:以黄花倒水莲为试材, 采用单因素试验和正交实验相结合的方法, 研究了超声波频率、超声波功率、提取温度、提取时间、乙醇浓度、料液比对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响, 以优化超声波提取黄花倒水莲总黄酮的工艺条件。结果表明: 超声波提取黄花倒水莲总黄酮最佳提取工艺为超声波频率为高频(61 kHz), 超声波功率为 420 W, 提取温度 55℃, 料液比为 1:15 g/mL, 乙醇浓度 90%, 提取时间 40 min; 试验结果表明优选出的提取工艺稳定、重复性好, 该试验为黄花倒水莲总黄酮的提取提供了依据。

关键词:黄花倒水莲; 单因素试验; 正交实验; 提取工艺

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)12-0134-04

黄花倒水莲(*Polygala fallax* Hemsl.) 属远志科(Polygalaceae)远志属(*Polygala*)植物, 又名黄花参、鸡仔树、吊吊黄、黄花吊水莲、观音串、黄花大远志^[1]。黄花倒水莲的药用价值主要在根部, 其根含皂苷、糖脂、酮、有机酸等类物质, 具有抗炎、活血、调脂、对乙肝病毒体外抑制等作用^[2-3]。黄酮类化合物是广泛存在于自然界的一大类化合物, 该类化合物是植物中非常重要的一类次生代谢产物, 其对体内自由基有明显的清除作用, 可抑制细胞的凋亡, 常是治疗心血管疾病药物的主要成分^[4]。近年来, 许多学者对黄花倒水莲化学成分^[4-7]、药理作用^[8]及临床方面进行了研究。该试验通过单因素试验和正交实验对黄花倒水莲总黄酮的提取工艺进行了研究, 以期了解黄花倒水莲黄酮类物质的含量, 更全面地评价及合理开发这一药用植物提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黄花倒水莲植株采自广西壮族自治区恭城县, 经广西植物研究所韦霄研究员鉴定为远志科植物黄花倒水莲(*Polygala fallax* Hemsl.), 蒸馏水洗净后在干燥箱中干燥, 研磨成粉末, 过 60 目筛后装入封口袋干燥保存。

第一作者简介:史艳财(1984-), 男, 山西孝义人, 硕士研究生, 现主要从事药用植物与分子生物学等研究工作。E-mail: shiyancaianan@163.com.

责任作者:韦记青(1968-), 女, 研究员, 现主要从事植物营养与栽培等研究工作。E-mail: weijiq@gxib.cn.

基金项目:广西科技攻关资助项目(桂科攻 11107010-1-1); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室资助项目(ZRJ2013-10); 广西自然科学基金资助项目(2013GXNSFB019054); 广西植物研究所基本业务费资助项目(桂植业 12011)。

收稿日期:2014-01-27

供试试剂: 芦丁标准品(批号: MUST-12040302, 中国药品生物制品检定所); 试验用水为蒸馏水; 乙醇等试剂均为分析纯。

供试仪器: TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); DL-720E 智能超声波; 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 供试品溶液制备 称取黄花倒水莲干燥粉末 0.5 g, 加 50%乙醇 10 mL, 40℃水浴提取 30 min, 超声波频率为高频(61 kHz), 超声波功率 180 W。提取结束后过滤, 洗涤液合并, 定容至 50 mL, 即得供试品溶液。

1.2.2 标准曲线制备 精密称取真空干燥至恒重的芦丁标准品 20 mg, 乙醇溶解, 制成 0.4 mg/mL 的对照品溶液。分别取制备好的对照品溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 及提取液 1 mL, 置于 25 mL 容量瓶中, 加 50%乙醇至 10 mL, 加 5%亚硝酸钠 1 mL, 混匀, 静置 6 min; 加 10%硝酸铝溶液 1 mL, 混匀, 静置 6 min; 加 4%氢氧化钠溶液 10 mL, 50%乙醇调至刻度, 混匀, 得空白液、对照品溶液及样品供试液。静置 15 min 后在 190~900 nm 进行光谱扫描。确定选用 500 nm 作为测定波长。以总黄酮浓度为纵坐标, 吸光度为横坐标绘制回归曲线, 回归方程为 $Y = 0.1201X - 0.0057$ ($R^2 = 0.9996$), 总黄酮浓度在 0.0016~0.016 mg/mL 范围内, 线性关系良好。

1.2.3 单因素试验 超声波频率对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响: 精密称取黄花倒水莲粉末 0.5 g, 按料液比 1:20 g/mL 加入 50%的乙醇 10 mL, 40℃水浴中提取 30 min, 超声波功率为 180 W, 超声波频率分别为高频(61 kHz)和低频(35 kHz)。过滤, 定容至 50 mL。取 1 mL 提取液于 25 mL 容量瓶中, 测定吸光度, 计算总黄酮含

量。超声波功率对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响:精密称取黄花倒水莲粉末 0.5 g,按料液比 1:20 g/mL 加入 50% 的乙醇 10 mL,40℃ 水浴提取 30 min,超声波功率分别为 60、180、300、420、540 W,超声波频率为高频(61 kHz),测定吸光度,计算总黄酮含量。提取温度对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响:精密称取黄花倒水莲粉末 0.5 g,按料液比 1:20 g/mL 加入 50% 的乙醇 10 mL,分别在 30、50、60、70、90℃ 水浴提取 30 min,超声波功率为 420 W,超声波频率为高频(61 kHz),测定吸光度,计算总黄酮含量。乙醇浓度对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响:精密称取黄花倒水莲粉末 0.5 g,按料液比 1:20 g/mL 分别加入 20、40、60、80、100% 的乙醇 10 mL,60℃ 水浴提取 30 min,超声波功率为 420 W,超声波频率分别为高频(61 kHz),测定吸光度,计算总黄酮含量。料液比对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响:精密称取黄花倒水莲粉末 0.5 g,分别按料液比 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 g/mL 加入 100% 乙醇 10 mL,60℃ 水浴提取 30 min,超声波功率为 420 W,超声波频率为高频(61 kHz),测定吸光度,计算总黄酮含量。提取时间对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响:精密称取黄花倒水莲粉末 0.5 g,按料液比 1:20 g/mL 加入 100% 乙醇 10 mL,60℃ 水浴分别提取 10、30、60、90、120 min,超声波功率为 420 W,超声波频率为高频(61 kHz),测定吸光度,计算总黄酮含量。

1.2.4 正交实验 在单因素试验基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验考察乙醇浓度、提取时间、料液比、提取温度对总黄酮提取率的影响,进一步优化提取工艺。试验因素及水平如表 1 所示。

表 1 正交实验因素与水平

水平	乙醇浓度/%	提取时间/min	因素 料液比/g·mL ⁻¹	提取温度/℃
1	90	40	1:15	55
2	95	60	1:20	60
3	100	80	1:25	65

1.2.5 验证试验 按上述确定的提取工艺进行 5 次试验,计算 5 次总黄酮平均含量。

1.2.6 精密度试验 吸取芦丁对照品溶液 1 mL,照 1.2.2 步骤操作,连续测定 5 次,测定吸光度值。

1.2.7 重复性试验 称取 6 份同一样品,按 1.2.1 方法制备供试品溶液。按 1.2.2 测定吸光值。

1.2.8 稳定性试验 吸取某一供试液,按 1.2.2 方法每隔 30 min 测定 1 次吸光度,共测 5 次。

1.2.9 加样回收率试验 精密量取已知总黄酮含量的提取液 5 份,分别加入一定量的芦丁对照品,按 1.2.2 方法制备供试液,测定吸光度,得平均回收率。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 超声波频率对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响

由图 1 可知,超声波高频时的总黄酮提取率为 0.28%,高于低频时的提取率(0.22%),故超声波频率选用高频 61 kHz。

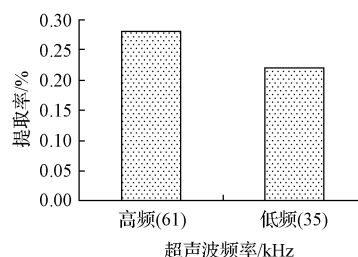


图 1 超声波频率对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响

2.1.2 超声波功率对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响

由图 2 可知,随着超声波功率增大,总黄酮提取率呈上升趋势,当超声波功率为 420 W 时,总黄酮提取率最高。继续提高超声波功率,总黄酮提取率下降。超声波最佳功率为 420 W。

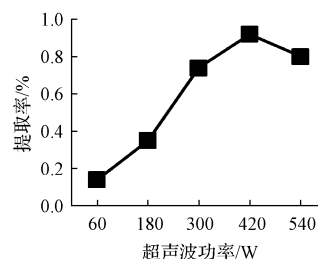


图 2 超声波功率对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响

2.1.3 提取温度对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响

由图 3 可知,总黄酮提取率随提取温度变化规律是先升高,后降低。当提取温度为 60℃ 时,总黄酮提取率最高。确定最佳提取温度是 60℃。

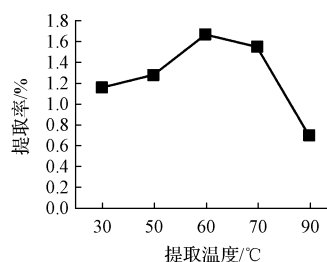


图 3 提取温度对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响

2.1.4 乙醇浓度对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响

由图 4 可知,总黄酮提取率随乙醇浓度的增加而增加,高浓度的乙醇更有利于总黄酮的溶出。选择 100% 乙醇为最佳浓度。

2.1.5 料液比对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响 由图 5 可知,随着料液比的加大,总黄酮提取率逐渐降低。但过小的料液比不利于乙醇完全浸透样品,提取中容易粘附于瓶壁上。选择料液比为 1:20 g/mL。

2.1.6 提取时间对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响 从图 6 可以看出,当提取时间为 60 min 时,总黄酮提取率最高,继续延长提取时间,提取率逐渐下降。故选择

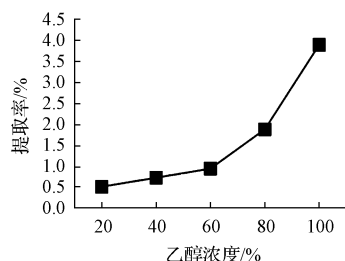


图4 乙醇浓度对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响

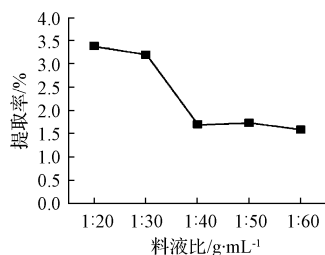


图5 料液比对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响

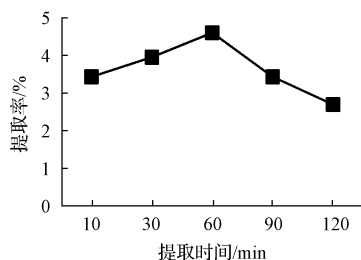


图6 提取时间对黄花倒水莲总黄酮提取率的影响

最佳提取时间为 60 min。

2.2 正交实验

正交实验结果、正交实验方差分析分别如表 2、3 所示。考察的 4 因素中,对总黄酮提取率影响大小顺序依次为 $C>A>D>B$,即料液比>乙醇浓度>提取温度>提取时间。由直观分析得出的最佳提取组合是 $A_1B_2C_1D_1$,正交实验中总黄酮提取率最高的是组合是 $A_1B_1C_1D_1$,因提取时间对提取率影响最小,在试验中可做适当调整,试验结果与直观分析结果相一致。由表 3

表 2 正交实验结果

编号	A	B	C	D	总黄酮含量/%
1	1	1	1	1	5.42
2	1	2	2	2	2.51
3	1	3	3	3	3.05
4	2	1	2	3	1.66
5	2	2	3	1	2.57
6	2	3	1	2	4.36
7	3	1	3	2	2.57
8	3	2	1	3	5.33
9	3	3	2	1	2.89
K_1	3.66	3.22	5.04	3.63	
K_2	2.86	3.47	2.35	3.15	
K_3	3.60	3.43	2.73	3.35	
R	0.80	0.25	2.68	0.48	

表 3 正交实验方差分析

方差来源	离差平方和 S	自由度 f	均方差	显著性 P
A	1.177	2	0.588	
B	0.113	2	0.056	
C	12.663	2	6.331	
D	0.349	2	0.174	
总和	14.301			

可知,各因素对总黄酮提取率的影响均未达到显著水平。确定最佳提取工艺为 $A_1B_1C_1D_1$,即乙醇浓度 90%,提取时间 40 min,料液比 1:15 g/mL,提取温度 55℃。

2.3 验证试验

对上述提取工艺进行 5 次试验,得到提取液中总黄酮含量平均为 5.36%, $RSD=1.14\%$,表明确定的提取工艺稳定、可靠。

2.4 精密度的试验

精密度的试验的吸光度值的 $RSD=0.84\%$,表明试验精密度的良好。

2.5 重复性试验

重复性试验的吸光值的 $RSD=1.01\%$,表明试验重复性较好。

2.6 稳定性试验

5 次测得吸光值的 $RSD=1.46\%$,表明样品在 120 min 内稳定。

2.7 加样回收率试验

平均加样回收率为 97.98%, $RSD=1.17\%$,加样回收率较高。

3 讨论

黄酮类化合物提取的方法很多,传统的提取手段有水提法、系统溶液提取法、有机溶剂提取法、碱性水或碱性稀醇提取法等,可根据提取物的性质、提取成本、工艺设备等条件来选择最适合的提取工艺,提高黄酮类物质的提取率,增大原料的利用效果。与传统提取方法相比,超声波提取法提高了黄酮类物质的提取率和纯度,所用时间短,要求温度低,具有明显的优势^[10]。该试验以黄花倒水莲中总黄酮提取率为考察指标,优选出超声波提取黄花倒水莲总黄酮的工艺参数:提取溶剂为 90% 的乙醇,料液比为 1:15 g/mL,提取时间为 40 min,提取温度为 55℃,超声波频率和功率分别为 61 kHz 和 420 W。

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]. 43 卷. 第 3 分册. 北京: 科学出版社, 1997: 151-152.
- [2] 罗泽宇, 王伟. 黄花倒水莲的化学及药理研究进展[J]. 药品评价, 2004, 1(3): 217-218.
- [3] 李萍, 闫明, 李平亚. 远志属植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 特产研究, 2004, 26(3): 56-61.
- [4] 鲁鑫炎, 张超, 赵怀清, 等. 不同产地葫芦巴中总黄酮和槲皮素的含量测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(6): 430-433.
- [5] 黄朝辉, 徐康平, 周应军, 等. 黄花倒水莲化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(3): 298-300.

土壤含盐量对枸杞生理生化指标的影响

武小靖, 杨 晴, 张国君, 杨俊明

(河北科技师范学院 园艺科技学院, 河北 秦皇岛 066600)

摘 要:以一年生枸杞扦插幼苗为试材,用 0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 的土壤含盐量对其进行胁迫,以清水为对照,研究盐胁迫条件下渗透调节物质、叶绿素含量以及生长表相参数的变化。结果表明:Na⁺、K⁺、Cl⁻ 3 种离子在枸杞各器官中的含量不同,Na⁺ 和 Cl⁻ 在叶中的含量最高,根中和茎中差异不显著,K⁺ 在各器官中的含量为叶>茎>根,3 种离子在地上部分的含量均高于地下部分;随土壤含盐量的升高,Na⁺、Cl⁻、可溶性糖、脯氨酸含量均呈不同程度的上升;叶绿素含量在 5 月份差异不显著,在 6、7、8 月份随土壤含盐量的增高降低,光合能力减弱;存活率、生长率和耐盐表相值均随含盐量的升高,呈现不同程度的下降;各指标与耐盐表相值间存在着显著相关性,表明枸杞耐盐性的高低是多因素共同作用的结果;综合各指标认为,枸杞属于耐盐性强的植物,适合应用于滨海盐碱地区造林。

关键词:枸杞;胁迫;土壤含盐量;生理生化指标

中图分类号:R 33 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)12-0137-05

枸杞(*Lycium barbarum*)属茄科枸杞属落叶灌木,不但营养成分丰富,药用价值很高,而且也是一种抗盐能力较强的造林先锋果树。近年来,许多学者就枸杞在盐

胁迫下的矿质元素、光合作用、生理指标的变化等方面进行了探讨。但大多数对枸杞抗盐性的研究仅着重于某一方面,如惠红霞等^[1]对枸杞盐胁迫的研究仅从叶绿素荧光、叶绿素含量方面进行,蔺海明等^[2]对枸杞盐胁迫的研究仅从不同营养器官中矿质元素的分布方面进行,魏玉清等^[3]对枸杞盐胁迫的研究比较全面,但没有结合到生长表相参数进行评价,且这些研究的试验均是通过花盆栽植、浇灌盐水的方式进行盐分胁迫处理,与盐碱地真实环境差异较大。该试验模拟植物生长的真

第一作者简介:武小靖(1988-),女,硕士研究生,研究方向为观赏园艺植物资源开发利用。E-mail:xiaojingwu163@163.com.

责任作者:杨俊明(1956-),男,博士,教授,现主要从事园林植物资源开发及遗传改良的研究工作。E-mail:yjmmail@126.com.

基金项目:国家林业科技支撑计划资助项目(2009BADB2B0105)。

收稿日期:2014-03-07

[6] 李进华,李丽,王静蓉,等. 黄花倒水莲化学成分研究Ⅱ[J]. 中国药科大学学报,2004,35(2):110-113.

[7] 徐宏江,徐增莱,朱丹妮. 广西黄花倒水莲资源调查及总皂苷含量比较[J]. 植物资源与环境学报,2003,12(1):47-49.

[8] 徐康平,黄伟,谭健兵,等. 黄花倒水莲降血脂活性成分研究[J]. 中药

材,2006,29(1):16-19.

[9] 黄锋,林黎琳,胡娟娟,等. 黄花倒水莲抗氧化活性研究[J]. 中国天然产物,2006(4):291-294.

[10] 朱丹,袁芳,孟坤,等. 黄酮类化合物的研究进展[J]. 中华中医药杂志,2007,22(6):387-389.

Study on Extraction Condition of Flavonoid in *Polygala fallax*

SHI Yan-cai, ZOU Rong, WEI Ji-qing, CHEN Zong-you, QI Xiao-xue

(Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guilin, Guangxi 541006)

Abstract: Taking *Polygala fallax* as material, using the method of single factor test and orthogonal test, the effect of ultrasonic frequency, ultrasonic power, extracting time, extracting temperature, alcohol concentration and ratio of solid and liquid on extracting rate of flavonoid from *Polygala fallax* were studied, to optimize extracting technique. The results showed that the optimal extracting conditions were ultrasonic frequency 61 kHz, ultrasonic power 420 W, extracting temperature 55℃, the ration of solid and liquid 1 : 15 g/mL, alcohol concentration 90%, extracting time 40 min. The stability and repeatability of this technique were good. It could provide the basis for extracting flavonoid from *Polygala fallax*.

Key words: *Polygala fallax*; single factor test; orthogonal test; extraction technology