

微波提取黄芪黄酮的方法研究

徐 东 生

(湖北工程学院特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室,湖北 孝感 432000)

摘 要:以黄芪为试材,用微波消解仪提取黄酮,分光光度法测定黄酮提取率,采用单因子试验及正交实验研究黄芪黄酮的最佳提取条件。结果表明:乙醇浓度 95%,提取时间 20 min,料液比 1:15 g/mL,提取温度 90℃时,提取效果最好,黄酮提取率为 0.489%,各因子对提取效果影响从大到小依次为提取温度>乙醇浓度>料液比>提取时间。

关键词:黄芪;微波;黄酮

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)03-0113-03

黄芪属豆科植物蒙古黄芪(*Astragalus mongholicus* (Bge.) Hsiao)或膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge)的干燥根,具有增强机体免疫力、调节血压和血糖、抗衰老、抗病毒、抗肿瘤等作用^[1-2]。黄芪的药用价值与其皂苷、黄酮、多糖等多种营养物质有关。黄酮在医学和保健等方面有重要价值,是目前研究的热点。研究黄芪黄酮的提取方法对于筛选优质黄芪资源,鉴定黄芪的药品质量,制定相应的栽培措施等有积极作用。黄酮的提取方法很多,常用的方法有回流和索氏提取,这些方法耗时长,通常要 4~6 h。利用回流和超声波提取黄芪黄酮的报道较多^[3-5],随着微波炉的普及,人们发现利用微波提取植物黄酮省时、高效、节能,这方面的报道在银杏等植物上报道较多^[6],尚鲜见用于黄芪黄酮的研究,现利用微波消解仪提取黄酮,采用单因素试验与正交实验,研究了乙醇浓度、提取温度、提取时间和料液比对黄酮提取率的影响。

作者简介:徐东生(1955-),男,湖北武汉人,高级实验师,现主要从事植物及植物保护等研究工作。E-mail:1377994531@qq.com.

基金项目:湖北省重点实验室开放基金资助项目(2014K09)。

收稿日期:2014-11-10

1 材料与方法

1.1 试验材料

市购膜荚黄芪去皮洗净晾干,置于恒温干燥箱 60℃干燥至恒重,粉碎后过 60 目筛,密封置于 4℃冰箱中备用。芦丁标准品购于南京替斯艾么中药研究所,亚硝酸钠、硝酸铝、95%乙醇、氢氧化钠均为分析纯。主要设备:电子天平(BS210S 赛多利斯仪器有限公司),温压双控微波消解仪(WX4000N 奥谱勒仪器有限公司),紫外可见分光光度计(TU1810 北京普析通用仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 单因子试验 乙醇浓度(体积份数,下同)对黄芪黄酮提取率的影响:黄芪粉 1 g 5 份,分别加 55%、65%、75%、85%、95%乙醇 25 mL,用 90℃提取 20 min。提取时间对黄芪黄酮提取率的影响:黄芪粉 1 g 5 份,每份加 25 mL 95%乙醇,用 90℃分别提取 10、15、20、25、30 min。料液比对黄芪黄酮提取率的影响:黄芪粉 1 g 5 份,分别加入 95%乙醇 15、20、25、30、35 mL,90℃提取 20 min。提取温度对黄芪黄酮提取率的影响:黄芪粉 1 g 5 份,每份加 25 mL 95%乙醇,分别用 50、60、70、80、90℃提取 20 min。各试验重复 3 次。

1.2.2 正交实验 根据单因子试验结果,选用 $L_9(3^4)$

Abstract: Taking pepper fruit of black spot as material, pathogen was isolated by streak plate method, it was identified by Koch's postulates and morphology, and tested the biological characteristics and fungicide sensitivity by mycelium growth rate method. The results showed that pathogen of pepper black spot from Mengzi Yunnan province was caused by *Alternaria* sp.. Optimum conditions for mycelial growth were maize agar (MA) medium, soluble starch as carbon source, glycine as nitrogen source, 25℃, pH 8, full of light. 58% metalaxyl • mancozeb and 50% iprodione wettable powder were the most sensitivity than other fungicides for the pathogen. This conclusion provided theoretical parameter for the control of pepper black spot.

Keywords: pepper black spot; *Alternaria*; identification; biological characteristics; screen fungicide

表 1 正交实验因素与水平

水平	因素			
	A 乙醇浓度 /%	B 提取时间 /min	C 料液比 /(g·mL ⁻¹)	D 提取温度 /℃
1	75	10	1:15	70
2	85	15	1:20	80
3	95	20	1:25	90

4 因素 3 水平的正交表,对乙醇浓度、提取时间、料液比、提取温度进行正交实验,各处理重复 3 次。试验设计见表 1。

1.2.3 黄酮提取率测定的标准曲线制作 精确称取芦丁 10 mg,置于小烧杯,加入少量 95%乙醇置于水浴锅上 60℃加热溶解,放冷后倒入 50 mL 容量瓶中用 70%乙醇定容,配置成 0.2 mg/mL 芦丁母液,分别准确吸取 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 母液置于 10 mL 具塞试管中,加入 30%的乙醇到达 5 mL 刻度处,接着加入 0.3 mL 5%的亚硝酸钠溶液,静置 6 min,再加入 0.3 mL 10%的硝酸铝溶液,静置 6 min,最后加入 4 mL 4%氢氧化钠溶液,用蒸馏水稀释到 10 mL,静置 10 min,在波长为 510 nm 处测定吸光值(第一管为空白对照)以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线,得到回归方程 $y = 0.1031x + 0.0004$, $R^2 = 0.9991$, y 为浓度(mg/mL), x 为吸光度。

1.2.4 微波提取黄酮的方法 按照试验设计的条件,利用微波消解仪处理,处理后的提取液注入离心管中离心,转速 4 000 r/min 离心 10 min,取离心的上清液于 50 mL 容量瓶中,用 70%乙醇溶液定容,此为待测液,取待测液 5 mL 于 10 mL 具塞试管中,按标准曲线中的方法显色和测定吸光度,根据吸光度和回归方程计算黄酮提取率。

1.3 数据分析

试验数据利用 SPSS 16.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 乙醇浓度对黄酮提取率的影响

由图 1 可知,乙醇浓度对黄酮提取率影响很大,乙醇浓度从 55%到 65%黄芪黄酮提取率变化很小,乙醇浓度从 65%到 95%黄酮提取率逐渐增加,而 85%到 95%增幅最大,乙醇浓度到 95%时黄芪黄酮提取率达到最大值,由此看出高浓度的乙醇有利黄芪黄酮的提取,这与银杏等植物黄酮提取不同,现有报道中提取植物黄酮适宜的乙醇浓度大多在 65%~75%,不同浓度的乙醇极性不同,可以看出高浓度的乙醇其极性有利于黄芪黄酮溶解。这可能与黄芪黄酮的组成有关。

2.2 提取时间对黄芪黄酮提取率的影响

由图 2 可知,微波处理时间对黄酮提取率影响很小,10~20 min 提取率略增加,20 min 提取率最好,20 ~

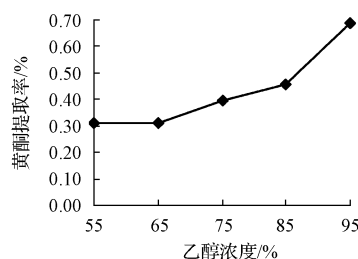


图 1 乙醇浓度对黄芪黄酮提取率的影响

25 min 提取率略下降,25~30 min 提取率基本不变,课题组对山药黄酮的研究中(另文发表)也发现类似现象,这可能与微波加热的特点有关。

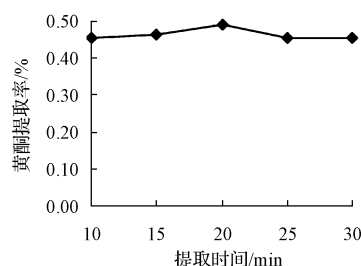


图 2 提取时间对黄芪黄酮提取率的影响

2.3 提取温度对黄芪黄酮提取率的影响

由图 3 可知,提取温度对黄酮提取率影响较大,温度 50~60℃黄酮提取率变化不大,60~80℃黄酮提取率上升明显,80℃以后黄酮提取率显著下降。由此推断温度超过 80℃对黄芪黄酮的结构和稳定性影响很大。

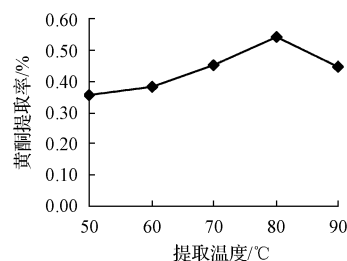


图 3 提取温度对黄芪黄酮提取率的影响

2.4 料液比对黄酮提取率的影响

由图 4 可知,料液比(1:15)~(1:30) g/mL 黄酮

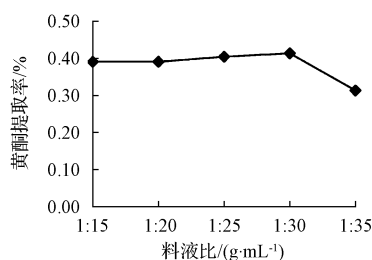


图 4 料液比对黄芪黄酮提取率的影响

提取率变化不大,1:35 g/mL 黄酮提取率下降,乙醇过多可能有利其它物质溶出,而影响黄酮的提取。

2.5 正交实验结果

从表 2 可知,不同处理试验结果差别明显,9 组正交实验中,最高的黄酮提取率 0.476%,最低的 0.357%,前者高出后者 33.33%,方差分析表明(表略),乙醇浓度、提取温度、提取时间和料液比对黄酮提取率均有显著差异,极差分析表明,各因子对黄酮提取效率影响的大小是提取温度>乙醇浓度>料液比>提取时间。

表 2 正交实验结果分析

试验号	A	B	C	D	黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	0.407
2	1	2	2	2	0.374
3	1	3	3	3	0.424
4	2	1	2	3	0.387
5	2	2	3	1	0.360
6	2	3	1	2	0.386
7	3	1	3	2	0.357
8	3	2	1	3	0.476
9	3	3	2	1	0.444
k_1	0.402	0.384	0.423	0.404	
k_2	0.378	0.393	0.402	0.372	
k_3	0.426	0.418	0.380	0.429	
R	0.048	0.034	0.043	0.056	

2.6 验证试验

根据正交实验优化结果,最佳条件是乙醇浓度 95%、提取时间 20 min、料液比 1:15 g/mL、提取温度 90℃,用此条件进行验证试验,黄酮提取率为 0.489%。

3 讨论

由于微波是内外同时加热,所以加热均匀而效率高,利用微波消解仪提取黄芪黄酮省时、高效、方便。不同的微波设备性能不同,应通过预备试验熟悉设备性能,确定适宜的提取参数。该试验的微波消解仪配有专用消解罐,密封性好,使用非常方便。

采用正交实验的方法提取植物黄酮的研究较多,试验因子主要有乙醇浓度、提取温度、提取时间以及料液比,现比较了众多的类似文献,虽然植物种类不同,但多数研究认为乙醇浓度、提取温度的影响大于提取时间和料液比,这与该研究结果一致。该研究表明 95%的乙醇提取黄芪黄酮最好,这与丁利君等^[6]、肖卫华等^[7]的研究结果吻合,亦有报道 80%或 88%的乙醇提取黄芪黄酮为好^[8-10],而多数植物黄酮提取的乙醇浓度 70%~75%为宜。由此看来,乙醇提取黄芪黄酮的浓度应比其它植物高,其原因可能和黄芪黄酮的组成有关。乙醇浓度对黄芪黄酮的提取效果有显著影响^[11]。

参考文献

- [1] 李淑芳. 中药黄芪药理作用研究进展[J]. 湖北中医杂志, 2013, 35(6): 73-75.
- [2] 晏洪波, 梁文. 黄芪的免疫调节及抗病毒作用[J]. 华南国防医学杂志, 2008, 22(6): 69-70.
- [3] 典灵辉, 吴铁, 吕应年. HPLC 法测定黄芪中槲皮素和山奈酚的含量[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(17): 2550-2551.
- [4] 纪松岗, 李翔, 姜子洋, 等. 正交设计法确定黄芪中黄酮类成分的超声提取条件[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(10): 1168-1170.
- [5] 倪林, 叶明, 杨必伟. 微波-高压提取银杏叶黄酮工艺条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(2): 199-206.
- [6] 丁利君, 冼建毅. 黄芪中黄酮类化合物提取及其对羟自由基清除作用[J]. 食品机械, 2002(3): 20-21.
- [7] 肖卫华, 韩鲁佳. 黄芪黄酮乙醇回流提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(1): 233-238.
- [8] 张吉刚, 林朝朋. 黄芪总黄酮的醇提工艺研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(3): 158-159, 162.
- [9] 常美玲, 薛彦朝, 李奉勤, 等. 超声波法提取黄芪中黄酮的最佳工艺研究[J]. 河北医药, 2006, 25(6): 426-427.
- [10] 肖卫华, 韩鲁佳, 杨增玲, 等. 响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究[J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(5): 52-56.
- [11] 管丽霞. 黄芪的乙醇提取工艺优化研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(9): 4110-4111.

Study on Extraction Total Flavonoids by Microwave from *Astragalus membranaceus*

XU Dong-sheng

(Hubei Key Laboratory of Quality Control of Characteristic Fruits and Vegetables, Hubei Engineering University, Xiaogan, Hubei 432000)

Abstract: Taking the *Astragalus membranaceus* as material and ethanol as solvent to extract total flavonoids with microwave digestion instrument, the optimal condition of extraction was studied through the orthogonal test based on the single factor, total flavonoid content were determined by spectrophotometry. The results showed the optimal extraction conditions were as follows: ethanol concentration 95%, extraction time 20 minutes, solid to liquid ratio 1:15 g/mL, temperature 90℃, flavonoids extraction rate was 0.489%, the order of affecting was the temperature > ethanol concentration > solid to liquid ratio > extraction time.

Keywords: *Astragalus membranaceus*; microwave; flavonoid