

# 箬叶总黄酮提取工艺优化及比较

乐 薇, 杨文婷, 吴格格, 辛巧春

(武汉工商学院 环境与生物工程学院, 湖北 武汉 430065)

**摘 要:**以阔叶箬竹叶为试材,采用单因素和正交实验,研究了回流法和超声法中乙醇浓度、料液比、提取时间等对箬叶总黄酮得率的影响,并优化了提取工艺。结果表明:回流法最佳工艺是提取溶剂 85%乙醇溶液、料液比 1:20 g/mL、提取回流时间 50 min;超声法的最佳提取工艺条件是提取溶剂 80%乙醇溶液、料液比 1:30 g/mL、提取时间 35 min;优化条件下,回流法的箬叶总黄酮的提取率达到 2.66%;超声法的提取率为 1.59%,回流法比超声法更适合于箬叶总黄酮的提取。

**关键词:**箬叶总黄酮;回流法;超声法

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9;S 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)16-0131-04

箬叶为禾本科竹亚科箬竹属植物叶的总称,主要分布于我国长江以南各省,自古以来就是端午节标志食物-粽子的包装物<sup>[1]</sup>。现代药理分析发现,箬叶具有杀菌、防腐、抗癌等多种显著作用,可广泛应用于医药、食品及日化用品等<sup>[2-5]</sup>。竹叶黄酮是一类具有多种生物活性的天然产物<sup>[6-8]</sup>,安全无毒,从构效关系上看,竹叶黄酮的生理活性超过了银杏叶黄酮<sup>[9]</sup>。研究证明,箬叶中黄酮含量较丰富,占箬叶总质量的 2%左右<sup>[10]</sup>。箬叶总黄酮作为具有开发价值的生物黄酮资源已越来越受到学者的关注,因此有必要对适用于工业化生产的箬叶总黄酮的提取方法进行研究。该试验优化了回流法和超声法提取阔叶箬竹叶总黄酮的工艺条件,以期对箬叶的综合开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

阔叶箬竹叶采自湖北恩施州,洗净后于 50℃烘干 5 h,粉碎后过 18 目筛,用石油醚(30~60℃)脱色脱脂,自然干燥后放入塑料瓶中备用。

芦丁标准品,由中国药品生物制品检定所提供;无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等均为分析纯。

B-220 型恒温水浴锅、RE52CS 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;752 型紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;KQ-100E 超声波清洗器,上海精密仪器

仪表有效公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 箬竹叶总黄酮质量浓度测定** 准确称取干燥至恒定质量的芦丁标准品 0.075 2 g,用 30%乙醇溶液微热溶解并定容至 250 mL,得 0.300 8 mg/mL 的芦丁对照溶液。精密移取 0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL 芦丁对照溶液至 6 个 10 mL 比色管中,添加 30%乙醇溶液至 5 mL;然后加入 5%NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.30 mL,摇匀后放置 5 min;加入 10%Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 0.30 mL,摇匀后放置 6 min;加入 4%NaOH 溶液 2.00 mL,再用 30%乙醇溶液稀释至 10 mL,摇匀后放置 10 min。以空白试剂为参比,于 510 nm 处测定吸光度。以芦丁质量浓度  $c$  为横坐标,吸光度  $A$  为纵坐标绘制标准曲线为  $A=10.518c+0.0057$ ,  $R^2=0.9991$ <sup>[11]</sup>。取适量箬叶黄酮提取液按上述绘制标准曲线的方法进行测定。

**1.2.2 箬叶总黄酮的提取** 精确称取 1 g 箬叶样品于圆底烧瓶中,加入一定浓度的乙醇,分别用回流法和超声法提取一段时间,其中回流法的水浴温度为 85℃,超声提取在室温下进行,趁热过滤,滤液定容后测定提取液中总黄酮的含量。

**1.2.3 单因素试验** 乙醇浓度的影响:在料液比为 1:20 g/mL 的情况下,考察不同乙醇浓度对箬叶总黄酮的提取率影响,回流法的时间为 50 min,超声法的提取时间为 30 min。提取时间的影响:在料液比为 1:20 g/mL,乙醇浓度为 85%的情况下,考察提取时间对箬叶总黄酮提取率的影响。料液比的影响:在乙醇浓度为 85%的情况下,考察不同料液比对箬叶总黄酮的提取率

**第一作者简介:**乐薇(1979-),女,硕士,副教授,现主要从事生物分析等研究工作。E-mail:yueweill@126.com。

**基金项目:**湖北省自然科学基金资助项目(2013C111)。

**收稿日期:**2015-05-19

影响,回流法提取时间为 50 min,超声法提取时间为 30 min。

1.2.4 正交实验 在单因素试验结果的基础上,对影响箬叶中总黄酮提取率的主要因素乙醇浓度、提取时间、料液比等进行  $L_9(3^4)$  正交实验,以确定箬叶中总黄酮类化合物提取的最佳工艺条件。回流法的正交实验因素与水平见表 1,超声法正交实验因素与水平见表 2。

表 1 回流法正交实验设计因素与水平

水平	因素		
	A 料液比/(g·mL <sup>-1</sup> )	B 提取时间/min	C 乙醇浓度/%
1	1:15	50	75
2	1:20	70	85
3	1:25	90	95

表 2 超声法正交实验设计因素与水平

水平	因素		
	A 乙醇浓度/%	B 提取时间/min	C 料液比/(g·mL <sup>-1</sup> )
1	80	25	1:20
2	85	30	1:25
3	90	35	1:30

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

分别考察了乙醇浓度、提取时间、料液比对回流法和超声法提取箬叶总黄酮的影响。由于回流法中采用的是乙醇水溶液能回流的温度,超声法中温度对提取影响较小<sup>[12]</sup>,因此该试验未考虑提取温度的影响。

2.1.1 乙醇浓度的影响 由图 1 可知,回流法和超声法中,随乙醇浓度升高箬叶总黄酮提取率都逐渐升高,当乙醇浓度为 85% 时提取率均达到最高,而后随着乙醇浓度升高总黄酮提取率逐渐降低。同时也发现,在试验范围内,同浓度的乙醇下,回流法比超声法的提取效果好。

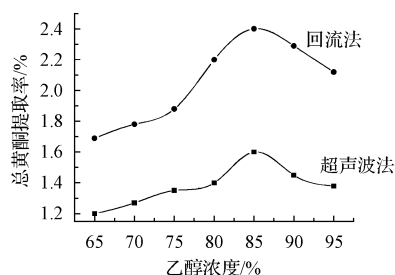


图 1 乙醇浓度对箬叶总黄酮提取率的影响

2.1.2 提取时间的影响 由图 2、3 可知,随着提取时间的延长,回流法和超声法中的总黄酮提取率都呈现先上升后下降的趋势。回流法中,由于长时间处于高温中,可能使有效成分受到破坏造成损失,提取时间以 50 min 较合适。超声法中,随着提取时间延长提取液的温度逐步上升,也可能造成有效成分的破坏,提取时间以 30 min 较合适。

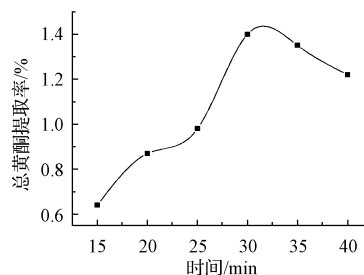


图 2 超声时间对总黄酮提取率的影响

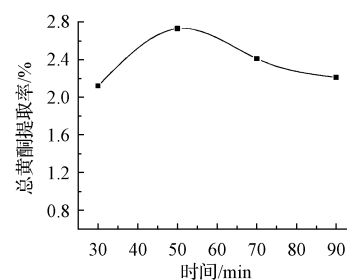


图 3 回流提取时间对总黄酮提取率的影响

2.1.3 料液比的影响 由图 4 可知,随着提取溶剂的增大,总黄酮提取率先提高后减小。回流法中最佳料液比是 1:20 g/mL,超声的最佳料液比是 1:25 g/mL。

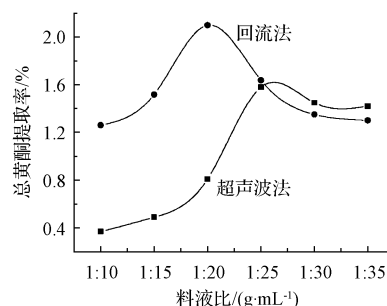


图 4 料液比对总黄酮提取率的影响

### 2.2 正交实验

2.2.1 回流法的正交实验 由表 3、4 可知,回流法中料液比对箬叶总黄酮提取率的影响达到显著水平,各因素影响大小顺序为料液比>乙醇浓度>提取时间,且最佳工艺条件应为  $A_2B_1C_2$ ,因此提取箬叶中总黄酮类化合物的最佳条件分别为料液比 1:20 g/mL、提取回流时间为 50 min、乙醇质量分数为 85%。

2.2.2 超声法的正交实验 从表 5、6 可知,超声法中各因素对箬叶总黄酮提取率的影响均未达到显著水平,各因素影响大小顺序为提取时间>乙醇浓度>料液比,最佳工艺条件应为  $A_1B_3C_3$ ,因此提取箬叶中总黄酮类化合物的优化条件分别为料液比 1:30 g/mL、乙醇质量分数为 80%、提取时间为 35 min。

表 3 回流法的正交实验结果

试验号	A	B	C	D(空白)	总黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	2.63
2	1	2	2	2	2.78
3	1	3	3	3	2.38
4	2	1	2	3	2.74
5	2	2	3	1	2.71
6	2	3	1	2	2.46
7	3	1	3	2	2.07
8	3	2	1	3	1.73
9	3	3	2	1	2.03
k1	7.79	7.44	6.82	7.37	
k2	7.91	7.22	7.55	7.31	
k3	5.83	6.87	7.16	6.85	
R	2.08	0.57	0.73	0.52	

表 4 回流法正交实验的方差分析结果

方差来源	A	B	C	误差 E
离差平方和	0.909	0.055	0.089	0.05
自由度	2	2	2	2
F 值	16.83	1.019	1.648	
F 临界值	$F_{0.1}(2,2)=9$		$F_{0.05}(2,2)=19$	

表 5 超声法正交实验结果

试验号	A	B	C	D	总黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	0.96
2	1	2	2	2	1.16
3	1	3	3	3	1.36
4	2	1	2	3	1.11
5	2	2	3	1	1.12
6	2	3	1	2	1.20
7	3	1	3	2	0.92
8	3	2	1	3	0.98
9	3	3	2	1	1.12
K1	3.48	2.99	3.14	3.21	
K2	3.43	3.26	3.39	3.28	
K3	3.02	3.68	3.40	3.45	
R	0.45	0.70	0.26	0.24	

表 6 回流法正交实验的方差分析结果

方差来源	A	B	C	误差 E
离差平方和	0.042	0.081	0.014	0.01
自由度	2	2	2	2
F 值	3.818	7.364	1.273	
F 临界值	$F_{0.1}(2,2)=9$		$F_{0.05}(2,2)=19$	

2.2.3 优化工艺的验证 在优化的试验条件下,分别采用回流法和超声法对箬叶总黄酮进行提取,结果见表 7。可见 2 种提取法的重复性较好,方法稳定可行。回流法的总黄酮提取率比超声法高出 1.09%,差异较大。这与有关文献报道有差别,如文献[12]报道超声方法优于水浴方法。这可能与箬叶产地和提取的具体条件有关。

文献[12]提取的是湖南株洲的阔叶箬竹叶,且回流法提取时间高达 3 h,该文提取的是湖北恩施的阔叶箬竹叶,回流时间仅为 50 min。

表 7 重复性试验结果

试验号	1	2	3	平均提取率	RSD/%
回流法总黄酮提取率/%	2.70	2.63	2.64	2.66	1.42
超声法总黄酮提取率/%	1.52	1.60	1.66	1.59	4.41

3 结论

回流法提取箬叶总黄酮的优化工艺为:提取溶剂 85%乙醇溶液,料液比 1:20 g/mL、提取回流时间 50 min;超声法的最佳提取工艺条件是:提取溶剂 80%乙醇溶液,料液比 1:30 g/mL,提取时间 35 min。回流法获得的箬叶总黄酮得率明显高于超声法的得率,且超声法会造成噪声污染,因此实际工业生产中,回流法比超声法更适合于箬叶总黄酮的提取。

参考文献

[1] 喻谨. 箬竹属竹叶化学成分研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2014.

[2] 周双林,祝宗波,徐龔,等. 箬竹叶黄酮醇提工艺条件优选[J]. 中国药师,2011,14(7):944-946.

[3] 靳祎,王恩军,宋洁,等. 箬叶多糖对宫颈癌的抑制及免疫功能的影响[J]. 中国计划生育学杂志,2012,20(3):164-167.

[4] 黄龙翔,戴果先,胡长玉. 箬叶提取物的制备及抗氧化活性研究[J]. 中国农学通报,2009,25(3):45-48.

[5] 王惠. 七种竹叶提取物抗氧化活性及提取工艺优化研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2012.

[6] 焦晶晶. 竹叶特征性类黄酮研究:单体制备、抗氧化活性及其血管保护作用研究[D]. 杭州:浙江大学,2008.

[7] 程桂广,王煜丹,曹建新. 竹叶黄酮类化合物的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2009(21):516-520,430.

[8] XIE J, LIN Y S, SHI X J, et al. Mechanochemical-assisted extraction of flavonoids from bamboo (*Phyllostachys edulis*) leaves[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 43: 276-282.

[9] 苏春花. 箬竹林结构特征及竹叶生物活性成分研究[D]. 南京:南京林业大学,2011.

[10] 崔健. 箬竹属植物黄酮类物质与挥发性成分的研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2011.

[11] 李水芳,文瑞芝,李忠海. 箬竹叶总黄酮含量的测定[J]. 中南林学院学报,2006,26(4):128-131.

[12] 李水芳,喻勋林,李姣娟,等. 箬叶总黄酮提取方法的研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(20):6032-6033,6035.

Optimization and Comparison of Extraction Technology of Flavonoids From Leaves of *Indocalamus iatifolius*

YUE Wei, YANG Wenting, WU Gege, XIN Qiaochun

(College of Environmental and Biological Engineering, Wuhan Technology and Business University, Wuhan, Hubei 430065)

DOI:10.11937/bfyy.201516032

# 四种农药对平菇菌丝和子实体性状的影响

李红玉, 李 蝶, 邵凡旭, 李子玲, 刘 斌

(广西大学 食用菌研究所, 广西 南宁 530005)

**摘 要:**以平菇菌丝为试材,采用菌丝生长速率法、菌丝干重法和拌料法测定4种杀虫剂对平菇生长的影响,为其在平菇生产上的应用提供参考依据。结果表明:4种杀虫剂对平菇菌丝生长的抑制率从高到低依次为印楝素>高效氯氰菊酯>除虫脲>灭蝇胺。印楝素对平菇子实体产量和农艺性状的负面影响最大,其余3种杀虫剂影响较小。高效氯氰菊酯、灭蝇胺和除虫脲可用于拌料栽培平菇,建议施用剂量范围分别为:5.63~11.25、80~160、15~60 mg/L,印楝素对平菇生长抑制较大,生产中应慎重使用。

**关键词:**农药;糙皮侧耳;抑制;子实体

**中图分类号:**S 646.1<sup>+</sup>4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)16-0134-06

随着我国农业产业结构的调整,食用菌种植业得到了迅猛发展,其产值在农业生产中已位居第六位<sup>[1]</sup>,但随着食用菌栽培技术的推广,栽培面积的不断扩大和场地的重复利用,食用菌害虫的危害也在逐年上升,其中以双翅目、眼蕈蚊科的害虫最为突出,是国际上公认的重要食用菌害虫之一<sup>[2]</sup>。其幼虫取食为害菌丝和子实体,并常引起病害和螨害的发生,从而导致食用菌品质和产量下降,减产20%~70%,已成为制约食用菌产业发展的重要因素<sup>[3-4]</sup>。

目前我国,化学防治仍是防治食用菌害虫的主要方法<sup>[5-7]</sup>,由于食用菌对杀虫剂普遍比较敏感,获准登记

的杀虫剂极少,因此我国不少学者仍致力于筛选防效好、对食用菌生长影响小的药剂。如王升厚等<sup>[8]</sup>研究发现高效氯氰菊酯和低浓度绿晶(主要成分:印楝素)对果蝇杀灭效果明显,并对平菇菌丝生长抑制作用小。李怡萍等<sup>[9]</sup>研究证明高效氯氰菊酯不仅对黑粪蚊具有良好的防效而且对平菇菌丝生长的影响甚微。杨东霞等<sup>[10]</sup>报道在0.1%浓度下,高效氯氰菊酯和印楝素对鸡腿菇菌丝生长抑制小且对菇蝇的杀灭效果明显。曲绍轩等<sup>[11]</sup>研究了灭蝇胺和除虫脲拌料处理防治古田山多菌蚊的效果,证明2种药剂均可达到很高的防效,且残留量均符合每日最低残留量标准。曲绍轩等<sup>[12]</sup>研究0.6%印楝素乳油在50 mg/L的处理下对异迟眼蕈蚊的防效,认为可达到80%以上。邹华娇<sup>[13]</sup>研究发现灭蝇胺对食用菌眼蕈蚊有较好的控制效果,并表现良好的持效性。由于食用菌对许多杀虫剂极为敏感,药害现象时有发生,陆晓民等<sup>[14]</sup>研究表明,高效氯氰菊酯不仅杀虫效果好,而且对食用菌影响小。赵晓娜等<sup>[15]</sup>研究表明氯虫苯甲酰胺对香菇菌丝生长无抑制作用;乙虫腈浓度为50 μg/mL时对2种食用菌菌丝生长表现显著的抑制

**第一作者简介:**李红玉(1989-),女,河南信阳人,硕士研究生,研究方向为农药学。

**责任作者:**刘斌(1966-),男,广西上林人,博士,教授,现主要从事食用菌等研究工作。E-mail:liubin@gxu.edu.cn.

**基金项目:**广西科学研究与技术开发计划资助项目(桂科攻1222012-1B);国家现代农业产业技术体系广西创新团队(食用菌)建设专项资助项目。

**收稿日期:**2015-05-25

**Abstract:** Taking leaves of *Indocalamus latifolius* as experimental material, the effect of the ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction time on the yield of total flavonoids were studied by the single factor experiments and orthogonal experiments, and the extraction technology was optimized. The results showed that the optimized extraction process of ethanol refluxing method, the extraction solvent was 85% ethanol, material/liquid ratio was 1:20 g/mL, extracting time was 50 min. The optimized extraction process of ethanol ultrasonic method; the extraction solvent was 85% ethanol, material/liquid ratio was 1:30 g/mL, extracting time was 35 min. Under the optimum process conditions, the yield of total flavonoids from leaves of *indocalamus* by ethanol refluxing method was 2.66%, the yield by ethanol ultrasonic method was 1.59%, the ethanol refluxing method was more suitable for the extraction of flavonoids.

**Keywords:** flavonoids from leaves of *indocalamus*; ethanol refluxing method; ethanol ultrasonic method