

乙醇浸提甘草中总黄酮的工艺研究

郭艳茹, 林 洁

(运城学院 生命科学系, 山西 运城 044000)

摘 要:以甘草为试材,采用乙醇浸提法提取甘草中黄酮类化合物,通过对提取时间、提取温度、料液比及乙醇浓度进行单因素试验,结合响应面软件 Design-Expert 8 对 4 个影响因素进行优化设计,以确定甘草中黄酮类化合物的最佳提取工艺条件。结果表明:响应面优化后的提取条件为乙醇浓度 71.02%,料液比 1:32.83 g/mL,提取时间 2.97 h,提取温度 70.04℃,在该条件下黄酮的最佳得率为 1.328%。

关键词:甘草;黄酮;乙醇浸提;响应面

中图分类号:S 567.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0158-04

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)属豆科多年生草本植物,又名蜜草、美草。根据《中华人民共和国药典》记录,甘草可以分为“胀果甘草”、“乌拉尔甘草”和“光果甘草”^[1],主要分布于我国的西部地区。甘草是一种大众化的药草,主要药用部分是根和根茎,药材呈圆柱状,直径 0.6~3.5 cm。外皮松紧不一,表面红棕色或灰棕

色,气微,味甜而特殊。主要功效为清热解毒、祛痰止咳,甘草的化学成分复杂,其中使其具有特殊药理作用的物质有黄酮类化合物、多糖、三萜皂苷类物质。人们发现甘草黄酮的药理作用主要表现在抗氧化^[2]、抗病毒、强心^[3]、镇静、抗炎和镇痛等,而后又发现甘草黄酮具有抗衰老^[4]、抗肿瘤等作用,尤其是近几年又发现甘草黄酮类化合物有具有抑制 HIV 病毒增殖的作用,这使得甘草黄酮类化合物的研究和应用成为一大热点。该试验以甘草为试材,运用乙醇加热浸提法(提取时间、提取温度、料液比、乙醇浓度)提取黄酮^[5-8],应用 NaOH-

第一作者简介:郭艳茹(1980-),女,内蒙古赤峰人,硕士,讲师,研究方向为生物工程。E-mail:yanruguo2003@126.com.

收稿日期:2013-09-09

[9] 张洪泉,胡坚.新疆阿魏的抗炎和免疫药理作用[J].中药药理学通报,1987,3(5):288.

[10] 黄秀梨.微生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2004:6-8.

[11] 徐亚军,赵龙飞.野生艾蒿浸提物对大肠杆菌的抑制作用[J].江苏农业科学,2012,40(4):306-308.

[12] 刘华玲,马欣荣,孙振元.地锦叶片正丁醇提取物的抑制作用[J].林

业科学研究,2007,20(6):872-875.

[13] 韩树.忍冬茎叶化学成分及其抑菌活性的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2008.

[14] 张志清,刘剑,李娟.中药抑菌作用研究进展[J].中药材,2008,25(9):688-690.

Study on Antimicrobial Activity *in vitro* of Extracts from Three Species of *Ferula* Root

GAO Ting-ting¹, YU Feng-hua¹, TAN Yong^{1,2}, LIU Wen-xia¹

(1. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002; 2. Key Laboratory of Phytomedicine Resources and Modernization of TCM, Shihezi, Xinjiang 832002)

Abstract: Taking *Ferula sinkiangensis*, *F. ferulaeoides* and *F. lohmanni* as test materials, bacteriostatic test *in vitro* of root extract and alcohol extract were done using filter paper diffusion method. The results showed that: the bacteriostatic effects of alcohol extract was better than extracts significantly; alcohol extracts of 3 species of *Ferula* root against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Sarcine* sp. had good antibacterial effect, no inhibitory effect on *Escherichia coli*, among which the strongest inhibitory effect was *F. ferulaeoides* extract; *F. lohmanni* extract had the weakest inhibitory action, only had obvious bacteriostasis effect on *Bacillus subtilis*.

Key words: *Ferula*; extract; filter paper diffusion method; antimicrobial activity

$\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2$ 比色法^[15]测定不同单因素(提取时间、提取温度、料液比、乙醇浓度)相应的得率,利用 Design-Expert 8 优化甘草提取工艺,进行响应面试验,以期得出最佳的工艺条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试“乌拉尔甘草”购于某中药店,在鼓风干燥箱进行干燥 3 h,将烘干的样品研磨成粉末,60 目过筛后保存备用。

试剂:芦丁标准品、无水乙醇(分析纯)、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠。

主要仪器:FW100 微型高速万能粉碎机、101A-1E 型电热恒温鼓风干燥箱、FA 型电子天平、SHZ-D(Ⅲ)型循环水式多用真空泵、722N 紫外可见分光光度计。

1.2 试验方法

1.2.1 芦丁标准曲线的绘制 标准液的配制:以芦丁为对照品测定甘草中总黄酮含量,加入铝离子试剂使黄酮化合物与铝盐形成络合物,在可见光 510 nm 处获得稳定吸收峰。精确称取干燥至恒重的芦丁对照品 10 mg,用 30% 乙醇溶解,定容至 50 mL 容量瓶,摇匀,得 0.20 mg/mL 芦丁标准品溶液。准确吸取芦丁标准溶液(0.20 mg/mL) 0.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00 mL 于 50 mL 容量瓶中,分别加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.5 mL,摇匀,6 min 后再加入 10% 硝酸铝溶液 1.5 mL,摇匀,静置 6 min;再加 4% 氢氧化钠溶液 20 mL,用 30% 乙醇稀释至刻度,摇匀,静置 20 min,于 510 nm 处测吸光度,以芦丁浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,得出芦丁标准曲线。将提取液测得的吸光度代入标准曲线方程可计算出总黄酮浓度 $C(\text{mg/mL})$,则得黄酮得率为: $W=(C \times V_2 \times 50 \text{ mL}) / (m \times 1\,000 \text{ mg} \times V_1) \times 100\%$,式中, W :黄酮的得率(%); C :提取液总黄酮浓度(mg/mL); V_1 :吸取的提取液体积(mL); V_2 :稀释倍数(mL); m :样品质量(g)。标准曲线的绘制:用 Excel 处理试验数据,得到芦丁标准曲线为 $y=7.6237x+0.0025$, $R^2=0.9987$,见图 1。

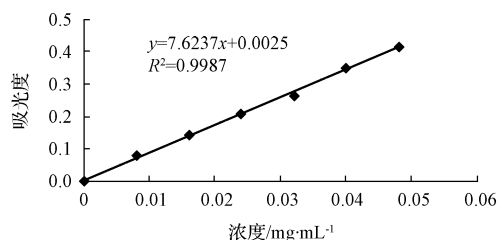


图 1 芦丁标准曲线

1.2.2 提取温度对甘草黄酮得率的影响 准确称取 1.00 g 制备好的甘草粉 5 份分别置于 100 mL 锥形瓶中,料液比为 1:30 g/mL,用体积分数 70% 乙醇分别在 40、50、60、70、80℃ 条件下提取 3 h。将得到的提取液进

行抽滤,分别加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.5 mL,摇匀,静置 6 min 后再加 1.5 mL 10% 硝酸铝溶液,摇匀,静置 6 min;再加 4% 氢氧化钠溶液 20 mL,用 30% 乙醇定容到 50 mL,摇匀,静置 20 min,于 510 nm 处测吸光度,重复测试 3 次,得出最佳的提取温度。

1.2.3 料液比对甘草黄酮得率的影响 准确称取 1.00 g 制备好的甘草粉 5 份,分别置于 100 mL 锥形瓶中,分别加入料液比为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL 的体积分数 70% 乙醇 60℃ 条件下恒温提取 3 h。将得到的提取液进行抽滤,分别加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.5 mL,摇匀,静置 6 min;再加 1.5 mL 10% 硝酸铝溶液,摇匀,静置 6 min;再加 4% 氢氧化钠溶液 20 mL,用 30% 乙醇定容到 50 mL,摇匀,静置 20 min,于 510 nm 处测吸光度,重复测试 3 次,得出最佳的料液比。

1.2.4 乙醇浓度对甘草黄酮得率的影响 称取 1.0 g 制备好的甘草粉 5 份,分别置于 100 mL 锥形瓶中,分别加入 30 mL 体积分数为 50%、60%、70%、80% 和 90% 的乙醇溶液 60℃ 条件下恒温提取 3 h。将得到的提取液进行抽滤,分别加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.5 mL,摇匀,静置 6 min;再加 1.5 mL 10% 硝酸铝溶液,摇匀,静置 6 min;再加 4% 氢氧化钠溶液 20 mL,用 30% 乙醇定容到 50 mL,摇匀,静置 20 min,于 510 nm 处测吸光度,重复测试 3 次,得出最佳的乙醇浓度。

1.2.5 提取时间对甘草黄酮得率的影响 准确称取 1.0 g 制备好的甘草粉 5 份,分别置于 100 mL 锥形瓶中,分别加入 30 mL 体积分数为 70% 乙醇于 60℃ 条件下分别恒温提取 1、2、3、4、5 h。将得到的提取液进行抽滤,分别加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.5 mL,摇匀,静置 6 min;再加 1.5 mL 10% 硝酸铝溶液,摇匀,静置 6 min;再加 4% 氢氧化钠溶液 20 mL,用 30% 乙醇定容到 50 mL,摇匀,静置 20 min,于 510 nm 处测吸光度,重复测试 3 次,得出最佳的提取时间。

1.2.6 响应优化提取条件 根据 Box-Behnken 设计原理,综合单因素影响试验结果,从中选取对响应值有显著影响的因素:乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度,试验因素与水平设计见表 1。通过 Design Expert 8 软件对试验数据进行回归分析,二次多项式模型方程拟合可靠性由 R^2 表示,统计学显著性由 F 值检验。影响因素的平方效应及交互效应的显著性由模型方程系数 P 值检验。

表 1 试验因素与水平

Table 1 Experimental factors and level

水平	因素			
	乙醇浓度/%	料液比/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	提取时间/h	提取温度/℃
1	60	20	2	60
2	70	30	3	70
3	80	40	4	80

2 结果与分析

2.1 单因素结果

2.1.1 乙醇浓度对甘草总黄酮得率的影响 从图2可以看出,乙醇浓度在60%~80%的时候,吸光度有最大值,而当乙醇浓度超过80%的时候,吸光度逐渐下降,乙醇浓度升高可能导致其它物质的溶出,导致吸光度的下降,并对甘草黄酮的提取造成影响,因此该试验将乙醇浓度60%~80%作为提取范围。

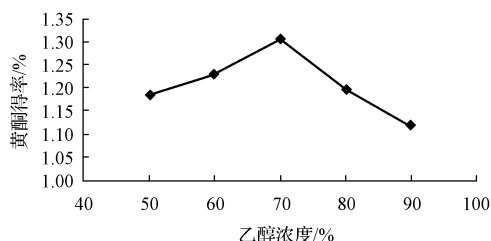


图2 乙醇浓度对甘草黄酮得率的影响

2.1.2 料液比对甘草总黄酮得率的影响 由图3可知,随着料液比的增大,吸光度逐渐增大,料液比达到1:30 g/mL时,黄酮得率已经达到饱和,此时黄酮的得率达到最大值;料液比达到1:30 g/mL后,吸光度下降,因此该试验将料液比1:20~1:40 g/mL作为提取范围。

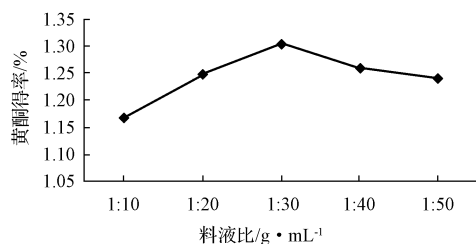


图3 料液比对甘草黄酮得率的影响

2.1.3 提取时间对甘草总黄酮得率的影响 由图4可知,当提取时间达到3 h的时候,甘草黄酮的得率达到最大,之后吸光度略有下降。当达到一定提取时间后,甘草中黄酮提取已经达到恒定,继续提取,可能会使黄酮糖苷类的水解,导致黄酮的得率下降,使吸光度的值降低,因此该试验将提取时间从2~4 h作为提取范围。

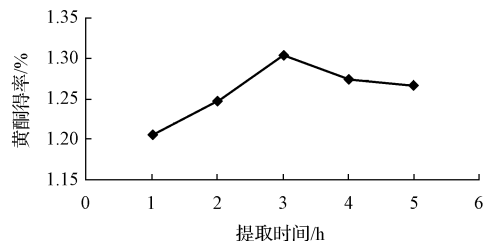


图4 提取时间对甘草黄酮得率的影响

2.1.4 温度对甘草总黄酮得率的影响 由图5可知,虽温度上升,吸光度也上升,当温度达到70℃的时候,吸光度达到最大值,继续升高温度,吸光度反而下降。可能

是由于温度上升让提取物在高温下化学性质发生变化,故吸光度下降。因此该试验将60~80℃作为考察范围。

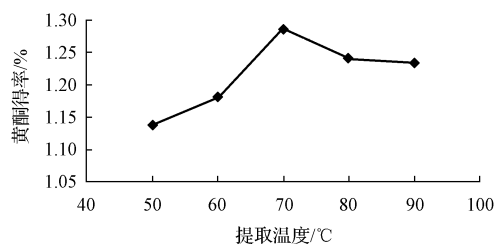


图5 提取温度对甘草黄酮得率的影响

2.2 响应面优化试验结果

在单因素试验的基础之上应用 Design-Expert 8 软件的 Box-Xehnken 设计方法设计响应面试验,得出响应面试验点,共有29个试验点,其中24个析因点,5个中心点,试验方案与结果见表2。

表2 试验方案与结果

std	Run	乙醇浓度/%	料液比/g·mL ⁻¹	提取时间/h	温度/℃	得率/%
20	1	80	30	4	70	1.255
9	2	60	30	3	60	1.190
13	3	70	20	2	70	1.237
16	4	70	40	4	70	1.266
17	5	60	30	2	70	1.171
27	6	70	30	3	70	1.327
5	7	70	30	2	60	1.273
15	8	70	20	4	70	1.247
22	9	70	40	3	60	1.269
6	10	70	30	4	60	1.196
8	11	70	30	4	80	1.243
14	12	70	40	2	70	1.285
4	13	80	40	3	70	1.220
2	14	80	20	3	70	1.216
1	15	60	20	3	70	1.235
29	16	70	30	3	70	1.346
3	17	60	40	3	70	1.141
19	18	60	30	4	70	1.166
21	19	70	20	3	60	1.124
25	20	70	30	3	70	1.297
24	21	70	40	3	80	1.264
10	22	80	30	3	60	1.106
23	23	70	20	3	80	1.184
26	24	70	30	3	70	1.323
12	25	80	30	3	80	1.170
18	26	80	30	2	70	1.203
7	27	70	30	2	80	1.217
28	28	70	30	3	70	1.334
11	29	60	30	3	80	1.108

甘草黄酮得率与乙醇浓度、提取时间、料液比和提取温度的关系公式如下: 黄酮得率 = $1.33 + 0.013A + 0.017B - 1.083E - 3C + 2.333E - 3D + 0.025A \times B + 0.014A \times C + 0.036A \times D - 7.250E - 3B \times C - 0.016B \times D + 0.026C \times D - 0.098A^2 - 0.034B^2 - 0.026C^2 - 0.077D^2$, 其中A为乙醇浓度,B为提取时间,C为料液比,D为提取温度。

对试验测定的甘草黄酮的得率进行回归,由表3可知,试验得出的模型 F 值为5.32,该模型是显著的。而 $\text{Prob}>F=0.0017$, $P<0.01$,表明该二次方程高度显著,使用该方程模拟真实的4因素3水平的分析是可行的。失拟项 $F=5.54$ 表明模型的失拟项不明显说明该模型是可行的。

表3 模型的方差分析表

来源	SS	df	增方	F 值	P 值 Prob> F	
Model	0.1	14	7.42E-03	5.32	0.0017	显著
A-乙醇浓度	2.11E-03	1	2.11E-03	1.51	0.2391	
B-料液比	3.40E-03	1	3.40E-03	2.44	0.1406	
C-提取时间	1.41E-05	1	1.41E-05	0.01	0.9213	
D-温度	6.53E-05	1	6.53E-05	0.047	0.8317	
A×B	2.40E-03	1	2.40E-03	1.72	0.2104	
A×C	8.12E-04	1	8.12E-04	0.58	0.4578	
A×D	5.33E-03	1	5.33E-03	3.82	0.0708	
B×C	2.10E-04	1	2.10E-04	0.15	0.7035	
B×D	1.06E-03	1	1.06E-03	0.76	0.3986	
C×D	2.65E-03	1	2.65E-03	1.90	0.1893	
A ²	0.062	1	0.062	44.55	< 0.0001	
B ²	7.70E-03	1	7.70E-03	5.52	0.0339	
C ²	4.24E-03	1	4.24E-03	3.04	0.1029	
D ²	0.039	1	0.039	27.92	0.0001	
Residual	0.02	14	1.39E-03			
Lack of Fit	0.018	10	1.82E-03	5.54	0.0567	不显著
Pure Error	1.31E-03	4	3.28E-04			
Cor Total	0.12	28				

响应面优化后的提取条件为乙醇浓度71.02%,料液比为1:32.83 g/mL,提取时间为2.97 h,提取温度为70.04℃,在该条件下黄酮的最佳得率为1.328%。

3 结论

该试验通过对乙醇热浸提法提取甘草中黄酮类化

合物的各影响因素进行单因素试验,得出乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度等对甘草黄酮的得率的影响。在单因素试验的基础上,应用 Design-Expert 8 软件的 Box-Behnken 设计方法设计响应面试验,建立了数学模型,得到了比较好的提取工艺条件。结合响应面分析得到的数学模型,进行实验的验证,最终得到了甘草中黄酮化合物的最佳提取工艺条件。单因素得出的最佳提取条件为乙醇浓度70%,料液比为1:30 g/mL,提取时间为3 h,提取温度为70℃,在这个条件下得到的最佳得率为1.279%。响应面优化后的提取条件为乙醇浓度71.02%,料液比为1:32.83 g/mL,提取时间为2.97 h,提取温度为70.04℃,在该条件下得到的最佳得率为1.328%。通过响应面法优化后,得率提高了0.049%,降低了工艺时间,提取高了生产效率。

参考文献

- [1] 赵明春. 甘草黄酮的研究进展[C]. 2010年中国药学会暨第十届中国药师周大会, 2010.
- [2] 崔永明, 余龙江, 敖明章, 等. 甘草总黄酮对油脂抗氧化作用研究[J]. 基础研究食品科学, 2007, 28(11): 119.
- [3] 胡小鹰, 彭国平, 陈汝炎. 甘草总黄酮抗心律失常作用研究[J]. 中草药, 1996, 27(12): 733-735.
- [4] 叶怀义, 龚赋岚, 尚明, 等. 甘草黄酮抗衰老作用的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2004(2): 20-21.
- [5] 罗伟强, 廖海达, 李小梅, 等. 四种提取柑皮中黄酮物质的方法比较[J]. 西部粮油科技, 2003(1): 50-51.
- [6] 李炳奇, 汪河滨. 超声法联合提取甘草黄酮和甘草酸的研究[J]. 山东中医杂志, 2005, 24(1): 38-40.
- [7] 朱菊花. 甘草黄酮类化合物提取分离的研究进展[J]. 中国药业, 2010, 26(6): 52-53.
- [8] 尉芹, 马希汉. 杜仲叶黄酮含量测定方法研究[J]. 西北农林科技大学(自然科学版), 2001, 29(5): 122-199.

Research on the Extraction Technology of Total Flavonoids from Licorice

GUO Yan-ru, LIN Jie

(Department of Life Science, Yuncheng University, Yuncheng, Shanxi 044000)

Abstract: Taking licorice as material, the best technological conditions of flavonoids compounds from licorice was studied with ethanol extraction method. In the research, the optimal processes for extracting flavonoids compounds from licorice were investigated by four single factors: extraction time, extraction temperature, liquid ratio and concentration of ethanol, combined with the analysis of response surface software Design-Expert 8, which made a optimal design on four influence factors to determine the best technological conditions of flavonoids compounds from licorice. The results showed that the optimum extraction conditions of flavonoids compounds from licorice were the ethanol concentration 71.02%, the solid-liquid ratio 1:32.83 g/mL, the extraction time 2.97 h, the extraction temperature 70.04℃. Under these conditions, the extraction rate of flavonoids compounds from licorice was 1.328%.

Key words: licorice; flavonoids; ethanol extraction; response surface