

超声提取鼠曲草中水溶性黄酮类化合物和多糖工艺研究

杨桂珍, 陈伟珍, 冼彩霞, 黄翠容

(湛江师范学院 化学科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘要:以鼠曲草为试材,通过单因素试验和正交实验,研究了超声提取野生鼠曲草中水溶性黄酮类化合物和多糖的最佳工艺条件。结果表明:黄酮类化合物和多糖的最佳工艺分别为以蒸馏水为提取剂,提取时间 50 min、提取温度 80℃、超声功率 160 W、料液比 1:50 g/mL 和提取时间 50 min、提取温度 75℃、超声功率 160 W、料液比 1:60 g/mL;此条件下提取黄酮类化合物和多糖耗样少,快速准确,水溶性的黄酮类化合物和多糖的提取率分别为 4.36% 和 3.09%。该法类黄酮加标平均回收率为 96.96%,RSD<3%;还原糖和总糖平均加标回收率为 98.08% 和 101.8%。

关键词:鼠曲草;超声提取;黄酮类化合物;多糖

中图分类号:R 961 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)07-0148-05

鼠曲草(*Gnaphalium affine* D. Don)属菊花科鼠曲草属植物,别名清明菜、佛耳草、追骨风,民间称为“田艾草”,以野生为主,药食两用。其味甘酸、无毒,具有止咳平喘、理气止痛、降血压等功效^[1]。现代医学研究证明,鼠曲草中含有黄酮类、多糖类等化合物,而黄酮类化合物是具有多种生理活性的重要药用成分分类群。植物多糖有增强免疫功能和抗感染的作用,可强化血管和预防动脉硬化、血栓症、心肌梗塞等。因此,开发鼠曲草资源具有十分重要的意义^[2],虽然对鼠曲草的研究较多,但对同时提取野生鼠曲草中的黄酮类化合物和多糖提取工艺研究较少。

因鼠曲草含有较多的黄酮苷,较易溶于水^[3],多糖也易溶于热水中,因此选蒸馏水为提取剂。超声技术可加速植物有效成分进入溶剂,提高提取率,缩短提取时间,节省溶剂^[4-9]。该试验采用单因素试验和正交实验,研究了超声提取野生鼠曲草中水溶性的黄酮类化合物和多糖的最佳工艺条件,以期为鼠曲草的食用、药用及进一步开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试鼠曲草采摘于湛江吴川;芦丁标准样品由中国食品药品检定研究所提供。

供试试剂为氢氧化钠、过氧化氢、酒石酸钾钠、3,5-

二硝基水杨酸、苯酚、无水亚硫酸钠、无水乙醇、葡萄糖,均为分析纯。

供试仪器:752 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)、超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、AU120 型电子分析天平(日本岛津天平有限公司)、CS101-2A 型电热鼓风干燥箱(中国重庆银河试验仪器有限公司)、电子万用炉(天津市泰斯特仪器有限公司)、FW-200 型高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 黄酮类化合物和多糖的提取工艺流程 将新鲜鼠曲草可食部分洗净后,放入烘箱中 80℃ 恒温烘干至恒重,磨碎,备用。葡萄糖使用前将样品置于 105℃ 烘箱中烘干至恒重,备用。烘干鼠曲草粉过 80 目筛→称取 0.5000 g 置于三角烧瓶,按一定的料液比加溶剂浸润→超声提取→过滤→离心→用微孔滤膜取样分别测定黄酮类化合物和多糖含量。

1.2.2 样品黄酮类化合物和多糖及其相应标准曲线的测定 芦丁的标准曲线制作和样品黄酮类化合物的测定:芦丁标准品的最大吸收波长为 257 nm,分别取 0.10 mg/mL 的芦丁标准溶液 0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mL 于 10 mL 容量瓶中,用 30% 乙醇定容至刻度,用 30% 乙醇作空白,在最大吸收波长下,测定吸光度值 A。以吸光度值 A 为横坐标,浓度 C (μg/mL) 为纵坐标,得线性回归方程: $C = 40.69926A - 0.36097$ ($r^2 = 0.9993$)。芦丁对照品在 5~25 μg/mL 范围内与吸光度值呈良好的线性关系。3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定鼠曲草多糖和葡萄糖的标

第一作者简介:杨桂珍(1979-),女,硕士,实验师,现主要从事分析化学等的教学与科研工作。

收稿日期:2013-11-15

准曲线:准确移取 0.50 mL 提取液于 25 mL 比色管中,加入 1.50 mL DNS 试剂,沸水浴 5 min,快速冷却至室温,加水定容,在波长为 510 nm 处测定其吸光度;再准确移取 0.50 mL 提取液于 25 mL 比色管中,加入 0.15 mL 6 mol/L HCl,沸水浴 20 min,快速冷却至室温,用 4 mol/L NaOH 溶液调 pH=9,加入 1.50 mL DNS 试剂,沸水浴 5 min,快速冷却至室温,加蒸馏水定容,在波长为 510 nm 测定其吸光度;样品中多糖水解为还原糖部分的吸光度值为总糖与还原糖吸光度值之差,从而得出多糖的含量。以葡萄糖标准溶液浓度 C 对吸光度 A 进行线性回归,得回归方程 $C=0.09836A-9.16297\times 10^{-5}$ ($r^2=0.9986$),表明葡萄糖标准溶液在 8~40 $\mu\text{g/mL}$ 范围与吸光度呈良好的线性关系^[10-15]。

1.2.3 单因素试验 超声时间对黄酮化合物和多糖提取率的影响:准确称取 0.5000 g 鼠曲草粉 7 份,分别加入蒸馏水 20 mL,在 70℃,超声功率 180 W,分别提取 10、20、30、40、50、60、70 min。超声温度对黄酮化合物和多糖提取率的影响:准确称取 0.5000 g 鼠曲草粉 5 份,各加入蒸馏水 20 mL,分别在常温、50、60、70、80℃,180 W 超声功率提取 40 min。超声功率对黄酮化合物和多糖提取率的影响:准确称取 0.5000 g 干燥的鼠曲草粉末 5 份,各加入蒸馏水 20 mL,分别在 75℃,超声功率为 100、120、140、160、180 W 分别提取 40 min。料液比对黄酮化合物和多糖提取率的影响:准确称取 0.5000 g 干燥的鼠曲草粉末 5 份,按料液比 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 g/mL 分别加入蒸馏水,在 75℃,超声功率为 180 W 提取 40 min。以上试验均冷却,过滤,离心,收集提取液,测定黄酮化合物和多糖的提取率。

1.2.4 正交实验 根据单因素试验结果,确定影响野生鼠曲草黄酮类化合物和多糖提取效果的主要因素,以提取率为指标,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交实验,对提取条件进行优化组合。因素及水平见表 1。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Factor and levels of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factor			
	A 提取温度 Extraction temperature/℃	B 提取时间 Extraction time/min	C 超声功率 Ultrasonic power/W	D 料液比 Solid-liquid ratio/g·mL ⁻¹
1	70	30	140	1:40
2	75	40	160	1:50
3	80	50	180	1:60

1.2.5 加标回收试验 取 6 个 10 mL 容量瓶,各加入 0.10 mL 粗提取液,再分别加入 0.10 mg/mL 的芦丁标准液 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mL,用 30% 的乙醇定容,测其吸光度,并计算回收率。精密移取某一已知含量的鼠曲草多糖提取液 0.50 mL 5 份,分别加入 0.10 mL 葡萄糖标准溶液,测其吸光度,并计算回收率。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取时间对野生鼠曲草中黄酮类化合物和多糖提取率的影响 由图 1 可知,随着提取时间的延长,黄酮类化合物提取率逐渐升高,升到一定程度后缓慢下降。这可能是因提取时间过长,黄酮类化合物发生一定的化学反应,提取物中的活性成分被破坏,且杂质的溶出量增加,给后续操作带来不便^[16]。超声提取 40 min 时,有效成分浓度达到平衡,黄酮类化合物得率最高。由图 1 还可知,随超声时间越长,多糖提取率越高,但因多糖从细胞溶出时,超声波会对多糖的结构产生破坏^[17],当提取时间超过 40 min,会使已提取出来的多糖产生降解作用,最后提取液中多糖的提取率降低。

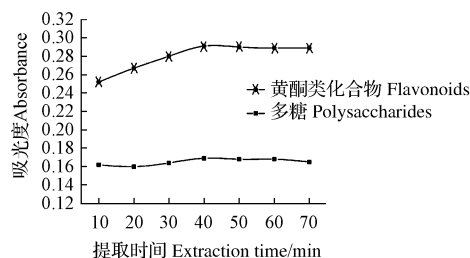


图 1 超声提取时间对提取率的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic extraction time on extraction rate

2.1.2 提取温度对鼠曲草中黄酮类化合物和多糖提取率的影响 由图 2 可知,随温度的升高,总黄酮类化合物提取率也增加,即温度越高,提取效果越好,这主要是由于黄酮类物质在温度高时易溶于提取液。从图 2 还可以看出,在超声波辅助提取多糖的过程中,温度对鼠曲草多糖的提取率影响较大,温度越高,提取率越高,是因为温度越高,细胞壁破坏得越严重,多糖更容易从细胞转移到水中^[17]。由于考虑到提取温度 80℃ 是超声波仪的最高工作温度,长期使用会对超声波清洗器造成一定的损坏^[18]。

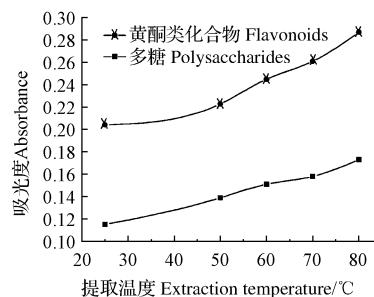


图 2 超声提取温度对提取率的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic extraction temperature on extraction rate

2.1.3 超声功率对提取鼠曲草中黄酮类化合物和多糖的影响 从图 3 可以看出,随着超声功率的增大,鼠曲草黄酮类化合物和多糖得率随之逐渐增高,当超声波功

率达到 160 W 时,黄酮类化合物达到最大;随着超声功率的再次增大,鼠曲草黄酮类化合物提取率有下降的趋势,而鼠曲草多糖得率在超声功率达到 140 W 时为最大;随着超声波功率的再次增大,鼠曲草多糖得率有下降的趋势。因超声的作用与其功率有一定的关系,一般当功率增加时,空化泡的最大半径与起始半径的比值增加,空化强度增大,即功率越高,空化越强烈,有利于超声作用。但不是超声功率越大越好,功率越高会产生大量无用的气泡,增加散射衰减,形成声屏障,同时功率增大也会增加非线性衰减,这样就会削弱远离声源地方的超声效果^[17]。所以一定范围内提高超声功率可以提高黄酮类化合物和多糖的提取率,但超声的效果不一定与所加功率成正比。

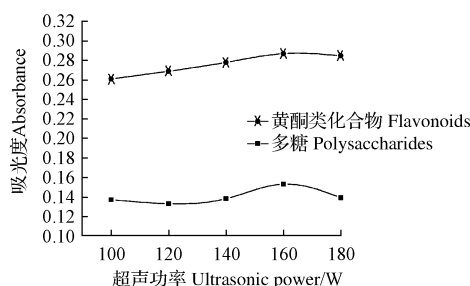


图3 超声功率对提取率的影响

Fig. 3 Effect of ultrasonic power on extraction rate

2.1.4 料液比对野生鼠曲草中黄酮类化合物和多糖提取率的影响 从图4可以看出,料液比为1:20 g/mL时的提取率并不高,料液比为1:30 g/mL时,黄酮类化合物的提取率稍有下降,但随着溶剂量增大,提取率也增大,但当料液比超过1:50 g/mL后又稍有下降。这可能是由于溶剂达到一定体积时就可以把鼠曲草中

的有效成分完全提取出来,超过最适宜的体积时,提取物中杂质含量增加,有效成分含量反而降低,影响提取效果。从图4还可以看出,当溶剂的量少,鼠曲草多糖提取率低,可能溶剂量少,物料粘度大,扩散速度慢,提取不完全;而随料液比的增大,提取率增加,当料液比为1:40 g/mL时,多糖提取率最高;之后多糖提取率随料液比的增加而减小,可能是多糖浓度变稀,在超声作用下,降解速率增加。

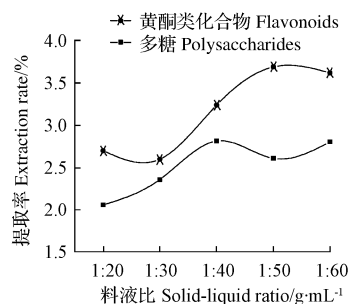


图4 料液比对提取率的影响

Fig. 4 Effect of solid-liquid rate on extraction rate

2.2 正交实验结果

由表2的极差分析可知,影响黄酮类化合物的提取效果的因素主次顺序为A>C>D>B,即提取温度>超声功率>料液比>提取时间,提取工艺的最佳条件为A₃B₃C₂D₂,即提取温度为80℃,提取时间为50 min,超声功率160 W,料液比为1:50 g/mL。

由表2可以看出,影响鼠曲草多糖提取的4个因素按重要性排列为:B>D>C>A,即提取时间>料液比>超声功率>提取温度。最佳优化组合为:A₂B₃C₂D₃,即提取温度75℃、提取时间50 min、超声功率160 W、料液比1:60 g/mL。

正交实验结果

Table 2

Results of orthogonal experiment

试验号 Experiment No.	A 提取温度 Extraction temperature/℃		B 提取时间 Extraction time/min		C 超声功率 Ultrasonic power/W		D 料液比 Solid-liquid ratio/g·mL ⁻¹		提取率 Extraction rate/%	
	黄酮类化合物	多糖	黄酮类化合物	多糖	黄酮类化合物	多糖	黄酮类化合物	多糖	黄酮类化合物	多糖
1	1(70)		1(30)		1(140)		1(1:40)		3.45	2.68
2	1		2(40)		2(160)		2(1:50)		3.55	2.66
3	1		3(50)		3(180)		3(1:60)		3.51	2.87
4	2(75)		1		2		3		3.72	2.85
5	2		2		3		1		3.49	2.69
6	2		3		1		2		3.85	2.77
7	3(80)		1		3		2		3.87	2.65
8	3		2		1		3		4.02	2.70
9	3		3		2		1		4.06	2.85
k ₁	3.50	2.74	3.68	2.73	3.77	2.72	3.67	2.74		
k ₂	3.69	2.77	3.69	2.68	3.78	2.79	3.82	2.69		
k ₃	4.98	2.73	3.76	2.83	3.62	2.74	3.75	2.81		
R	0.48	0.04	0.08	0.15	0.16	0.07	0.15	0.12		

2.3 验证试验

正交表分析得出的黄酮类化合物提取的最佳工艺条件为A₃B₃C₂D₂,不在正交实验方案内,因而进行验证试验。准确称取0.500 g干燥鼠曲草粉末5份,在最佳

工艺条件下进行提取,分别测其吸光度,计算出其提取率。野生鼠曲草中总黄酮的平均提取率为4.36%,高于正交实验中最高提取率。由此可以确定提取鼠曲草中总黄酮的最佳工艺条件为提取时间50 min,提取温度

80℃、超声功率 160 W、料液比 1:50 g/mL。并且相同条件下,平行测定 5 次,相对标准偏差 RSD 为 2.2%,表明该法重复性良好。

按最佳工艺条件提取鼠曲草多糖,平行提取 3 次,测得多糖得率分别为 3.07%、3.10%、3.10%,平均得率为 3.09%,说明在该试验范围内,此工艺条件最佳。

2.4 加标回收试验

由表 4 可知,超声波提取黄酮类的平均加标回收率为 96.96% (RSD=2.3%, $n=5$)。根据加标回收试验的

结果分析可知,相对标准偏差 RSD 为 2.3%,回收率达到 96.96%,说明方法有较高的可靠性。

表 3 超声提取验证实验结果 ($n=5$)

Table 3 Experimental results verify of ultrasonic assisted extraction ($n=5$)

	1	2	3	4	5	平均
提取率/%	4.38	4.30	4.40	4.34	4.42	4.36
RSD/%	2.2					

表 4 鼠曲草中黄酮类化合物的加标回收实验结果 ($n=5$)

Table 4 Recoveries of the measured results of flavonoids in gnaphalium affine ($n=5$)

编号	0	1	2	3	4	5
芦丁标准溶液/mL	0	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
芦丁测量值/ μg	75.75	85.93	91.22	100.17	113.6	121.34
芦丁实际含量/ μg	—	85.75	95.75	105.75	115.75	125.75
回收率/%	—	100.21	95.26	94.72	98.14	96.49
平均回收率/%	96.96					
RSD/%	2.3					

表 5 鼠曲草中多糖的加标回收测定结果 ($n=5$)

Table 5 Recoveries of the measured results of polysaccharides in gnaphalium affine ($n=5$)

样品中还原糖量	样品中总糖量	加标量	实测还原糖量	实测总糖含量	还原糖回收率	总糖回收率	平均回收率	RSD
Reducing sugar	Total sugar content in	Plus scalar	Measured the amount of	Measured the amount of	Sugar recovery	Total sugar	Average	
content in sample/mg	sample/mg	/mg	reducing sugar/mg	total sugar/mg	/%	recovery/%	recovery/%	/%
0.0838	0.2977	0.1006	0.1831	0.4005	98.74	102.2		
0.0838	0.2977	0.1006	0.1837	0.3996	99.33	101.3	98.08	0.96
0.0838	0.2977	0.1006	0.1814	0.4002	97.05	101.9	101.8	1.1
0.0838	0.2977	0.1006	0.1823	0.4015	97.94	103.2		
0.0838	0.2977	0.1006	0.1817	0.3987	97.35	100.4		

3 结论

该试验以水为提取剂,用超声辅助提取野生鼠曲草中的水溶性黄酮类化合物和多糖,在最佳工艺条件下水溶性的黄酮类化合物提取率为 4.36%、多糖提取率为 3.09%。可见结合紫外分光光度法的直接测定法来测定鼠曲草中黄酮类化合物的含量,和用 DNS 测定法测定鼠曲草中提取出水溶性多糖的含量,样品的检测较简单,操作方便,快捷,生产成本低。该工艺条件的研究为鼠曲草中水溶性黄酮类化合物和多糖提取的工业化生产奠定了理论基础,为开发利用该资源提供了试验数据和参考,其应用前景非常广阔。

参考文献

- [1] 杨桂珍,陈伟珍,李振凤,等.电感耦合等离子体原子发射光谱法同时测定鼠曲草中九种微量元素[J].食品工业科技,2013,34(5):309-314.
- [2] 王世宽,潘明,任路遥.大有开发前景的野生蔬菜-鼠曲草[J].食品研究与开发,2005,26(4):95-98.
- [3] 徐玉婷,吴丹慧.鼠曲草的研究进展[J].医药导报,2012,31(2):192-194.
- [4] 郭孝武,冯岳松.超声提取分离[M].北京:化学工业出版社,2008:26-35,93-110.
- [5] 牛立新,李章念,李红卷,等.超声波提取卷丹鳞茎中总黄酮研究[J].中药材,2007,30(1):85-88.
- [6] 王万能,全学军,郑一敏.超声波碱水法提取灯盏花总黄酮的研究

[J].声学技术,2006,25(3):214-217.

[7] 武正才,梁晓原,丁永胜.超声波提取灯盏花中总黄酮的研究[J].云南中医中药杂志,2004,25(3):35-36.

[8] 彭慧敏,任凤莲,禹文峰,等.黄花菜中黄酮的超声波提取、纯化及鉴定[J].广州化学,2006,31(4):22-26.

[9] 张昌军,原方圆,邵红兵.超声波法在提取多糖类化合物中的应用研究[J].化工时刊,2007,21(2):54-56.

[10] 王丽娜,陈水飏,张兵,等.3,5-二硝基水杨酸法测定多糖含量的研究进展[J].吉林医药学院学报,2009,30(4):232-234.

[11] 刘军海,黄宝旭,蒋德超.响应面分析法优化艾叶多糖提取工艺研究[J].食品科学,2009,30(2):114-118.

[12] 吐尔干乃义·吐尔逊,热衣木·马木提,阿不都拉·阿巴斯.3,5-二硝基水杨酸法测定中国树花中多糖的含量[J].食品科学,2009,30(4):236-238.

[13] 林志奎,刘俊劭.3,5-二硝基水杨酸法测定金钱草多糖的研究[J].云南民族大学学报(自然科学版),2011,20(2):89-91.

[14] 崔本连,宋海韬,齐放,等.3,5-二硝基水杨酸法测定安络小皮伞菌中多糖含量[J].长春中医药大学学报,2007,23(4):25-26.

[15] 赵凯,许鹏举,谷广焯.3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J].食品科学,2008,29(8):534-536.

[16] 罗兴武.艾蒿总黄酮的超声波提取工艺研究[J].食品研究与开发,2011,32(7):39-44.

[17] 薛明,钟苗苗,沈艾彬.超声波辅助黑加仑多糖提取研究[J].农产品加工(学刊),2012(12):62-65.

[18] 许丽丽,庄晓文.超声波辅助提取松针多糖的工艺研究[J].现代食品科技,2012,28(10):1376-1379.

不同氮源对铁皮石斛原球茎液体悬浮培养的影响

练华山^{1,2}, 杨贵先^{2,3}, 李焕秀²

(1. 成都农业科技职业学院, 四川 成都 610000; 2. 四川农业大学 园艺学院, 四川 雅安 625014;

3. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以铁皮石斛为试材,以 1/2MS 培养基为基本培养基,添加不同种类的附加氮源 20 mmol/L,研究了不同氮源对铁皮石斛原球茎悬浮培养增殖、多糖含量及蛋白质含量的影响。结果表明:最有利于铁皮石斛原球茎悬浮培养增殖的是甘氨酸,硝态氮次之,谷氨酸最差,甚至出现了负增长;在多糖积累方面,硝酸钙对铁皮石斛原球茎多糖积累最为明显,赖氨酸等不利于铁皮石斛原球茎的多糖积累;硝酸钾、硫酸铵有利于铁皮石斛原球茎蛋白质的积累,尿素等其它氮源则不利于铁皮石斛原球茎蛋白质的积累。综合分析发现,硝酸钙最利于铁皮石斛原球茎悬浮培养生长。

关键词:铁皮石斛;氮源;增殖;多糖;蛋白质

中图分类号:R 931.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)07-0152-04

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.)属兰科石斛属多年生附生草本植物。生于海拔 1 600 m 以上的山地半阴湿的岩石上,喜温暖湿润气候和半阴半阳的环境,不耐寒^[1]。据《中国药典》记载,铁皮石斛具有“益胃生津,滋阴清热”的功效,是我国重要的药用作物之一。由于铁皮石斛生长环境特殊,加上多年的乱采滥挖和自身种子繁殖极为困难^[2],目前我国野生铁皮石斛

资源日趋枯竭^[3-7],已被列为国家二级保护植物。为保护这一珍贵中药品种,许多学者对铁皮石斛组织培养技术进行了研究^[8-12]。在铁皮石斛组织培养的研究中,以铁皮石斛原球茎为材料研究试管苗分化及壮苗培养有较多报道^[13-14]。但铁皮石斛在组培快繁中存在着组培苗生产成本高、移栽苗成活率低、标准化生产程度低等技术瓶颈。作为兰科植物,铁皮石斛在组织培养过程中可产生大量原球茎,有研究表明,铁皮石斛在固体培养条件下,可以形成原球茎但是增殖率不高,而液体悬浮培养能显著提高原球茎的增殖率^[15-16]。而且原球茎可以分化为幼苗,发育为成熟的植株,液体悬浮培养大量

第一作者简介:练华山(1979-),男,农业推广硕士,讲师,农艺师,现主要从事蔬菜与花木等的教学与科研推广工作。E-mail: lhs8748@aliyun.com.

收稿日期:2013-11-22

Study on Ultrasonic Extraction of Water-soluble Flavonoids and Polysaccharides From *Gnaphalium affine*

YANG Gui-zhen, CHEN Wei-zhen, XIAN Cai-xia, HUANG Cui-rong

(Chemistry Science and Technology School, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048)

Abstract: Taking *Gnaphalium affine* as material, through single factor test and orthogonal experiment, the optimum conditions of ultrasonic extraction of the water-soluble flavonoids and polysaccharides in wild *Gnaphalium affine* D. Don were studied. The results showed that the optimal technology for flavonoid were: extraction time was 50 min, extraction temperature was 80°C, extraction power was 160 W, solid-liquid ratio was 1 : 50 g/mL; the aptimal extraction technology for polysaccharides were: extraction time was 50 min, extraction temperature was 75°C, extraction power 160 W, solid-liquid ratio 1 : 60 g/mL. The method consumes less, fast and accurac, extraction yield of water-soluble flavonoids and polysaccharide separately was 4.36% and 3.09% from *Gnaphalium affine* D. Don. The method of standard recovery rate of flavonoids between 96.96%, and relative standard deviation RSD < 3%; the standard recovery rate of reducing sugar and total reducing sugar were 98.08% and 101.8% respectively.

Key words: *Gnaphalium affine* D. Don; ultrasonic extraction; flavonoids; polysaccharides