

超声波碱水法提取灯盏花总黄酮的研究

王万能¹, 全学军¹, 郑一敏^{1,2}

(1. 重庆工学院生物工程学院, 重庆 400050; 2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘要: 黄酮是灯盏花的有效药用成分, 而且含量较高, 以前的提取方法都是采用乙醇、甲醇、丙酮等传统有机溶剂加热、回流提取, 耗时费事, 成本高, 工艺复杂, 难以取得商业价值。而且甲醇等有机溶剂毒性较大, 污染环境。超声波循环提取技术加速处理物料中的有效成分进入溶剂, 可以在常温常压下增加有效成分提取率, 而且不影响其活性。该研究中采用超声波循环提取与碱水法相结合提取总黄酮, 时间短, 效率高, 成本低, 工艺简单, 商业价值高, 为其走向工业化生产提供了基础。

关键词: 黄酮; 超声波; 灯盏花

中图分类号: R9

文献标识码: A

文章编号: 1000-3630(2006)-03-0214-04

Lye extraction of erigeron breviscapus flavonoids by ultrasound

WANG Wan-neng¹, QUAN Xue-jun¹, ZHENG Yi-min^{1,2}

(1. College of Bioengineering, Chongqing Institute of Technology, Chongqing 400050, China; 2. Chongqing Academy of Chinese Traditional Medicine, Chongqing 400065, China)

Abstract: Erigeron breviscapus flavonoids is an important biology active material. Several methods were used to extract flavonoids from Erigeron breviscapus in the past, which are expensive, complicated, harmful to the environment, and difficult to batch-produce. Lye extraction of flavonoids by ultrasound is studied in this paper, which can overcome these drawbacks.

Key words: flavonoids; ultrasound; Erigeron breviscapus

1 引言

灯盏花又名灯盏细辛, 是菊科植物短葶飞蓬的全草(Erigeron breviscapus(Vant.) Hand-Mazz), 它是中华药库中的一朵奇葩, 被苗药、彝药、傣药、汉药等中华民族药书所收录, 性味辛、微苦, 温, 具有散寒解表、祛风除温、温络止痛之功效^[1,2]。近年来, 从中提取出黄酮类有效成份, 药理学研究发现具有扩张脑血管、冠脉血管和外周血管的作用, 改善微循环, 抑制血小板聚集等作用, 具有抗凝血、抗心肌

梗塞及脑缺氧、防止肾功能衰竭等多种药理作用。

超声作用于媒质的热力学、机制和空化制是超声技术提取植物有效成份的三个物理原理。超声波的热力学机制, 可以使传声媒质温度升高, 加速有效成分的溶解; 超声的机械作用主要是其二阶现象如辐射压等; 超声的空化机制可细化各种物质以及制取乳浊液, 加速处理物中的有效成分进入溶剂, 增加有效成分提取率。

灯盏花黄酮一般采用酒精浸取的方法, 存在耗时较长, 成本较高, 而提取率不高缺点^[3-5]。本研究中采用超声循环提取与碱水法相结合提取总黄酮。当 pH=9 时, 黄酮的酚羟基易离子化, 水溶性增强, 超声波的作用更能够充分提取出黄酮, 所以时间短, 效率高, 成本低, 工艺简单, 易扩大化, 降耗增效, 为提取黄酮从实验室走向工业化打下了基础。

2 材料与方法

2.1 材 料

灯盏花由重庆市中药研究院鉴定惠赠, 芦丁标准品购自上海生化制品厂, 酒精(AR)为化学纯, NaOH, NaNO₂, Al(NO₃)₃ 为分析纯, HF-2.5B 超声波循环提取机(北京弘祥隆生物技术开发有限公司, 20kHz, 1200W), UV2000 紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司), SHZ-D(III) 循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂), 真空恒温干燥箱(上海跃进医疗器械厂), 植物粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司), 分样筛, 电子天平, SPSS 软件。

2.2 方 法

2.2.1 建立标准曲线

检测方法是采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法^[6], 利用黄酮类分子中的酚羟基可与 Al³⁺在碱性溶液中显色, 在一定浓度范围内, 其浓度与吸光度符合比耳定律, 可进行比色定量, 按此原理测定其含量, 方法简便、准确。

精确称取芦丁标准品置于容量瓶中, 加 60%乙醇溶解, 得 0.1mg/ml 的标准溶液。标准曲线制作, 精确量取标准溶液 2.5ml、5.0ml、7.5ml、10.0ml、12.5ml 分别置于 25ml 容量瓶中, 加 30%乙醇补足至 12.5ml, 加 5%亚硝酸钠溶液 0.75ml, 摇匀, 放置 5min 后, 加入 10%硝酸铝溶液 0.75ml, 摇匀, 放置 5min, 再加入 1mol/L 氢氧化钠溶液 10ml, 定容, 510nm 处测其吸光度。作标准曲线和计算回归方程。

2.2.2 灯盏花总黄酮的提取

称取约 7.0g 灯盏花 (20-60 目), 溶于 30ml 的 60%酒精中, 超声波处理 25min, 30 再提取 5h, 然后超声波处理 10min, 过滤, 定溶, 按前面建标准曲线测定方法测吸光度, 据标准曲线计算出灯盏花总黄酮含量。

2.2.3 酒精溶剂法提取灯盏花黄酮^[7]

称取约 130.0g 灯盏花(20-60 目), 溶于 2.5L 的 60%酒精分别蒸馏水中, 置于 HF-2.5B 超声波循环提取机中, 调节温度为 25 , 搅拌 1500r/min, 分别在 5min、10min、15min、20min、25min、30min 时取样, 按前面建标准曲线测定方法测吸光度, 据标准曲线计算出灯盏花总黄酮提取量。

2.2.4 超声波碱水法循环提取灯盏花黄酮^[8]

称取约 130.0g 灯盏花(20-60 目)若干份, 分别溶于 2.5L 蒸馏水中, 置于 HF-2.5B 超声循环提取机中, 调节 pH 为 9.0, 温度为 25 , 设定超声波处理 10s, 间歇 5s, 1500r/min, 功率为 800W, 分别提取 5min、10min、15min、20min、25min, 抽滤, 定溶。调节样品 pH 为 5, 静置, 过滤定容, 再调节 pH 为 3.5, 50 加热 10min, 抽滤, 60 干燥, 得灯盏花黄酮粗制品。取适量溶于 60%乙醇, 在容量瓶中定容, 取 1ml 进入反应体系, 按前面建标准曲线测定方法测吸光度, 据标准曲线计算出总黄酮含量, 并计算出灯盏花黄酮的提取率。

3 结果与分析

3.1 标准曲线

用 SPSS 软件计算直线回归方程为 $Y=0.08885X+0.00167$, Y 为浓度(mg/ml), X 为吸光度, 得 $a=0.08885$, $b=0.00167$, $R=0.9998$ 。在 10 μ g/ml~50 μ g/ml 范围内呈良好线性关系。以后测定实验样品总黄酮含量, 利用此检测体系, 测得其吸光度, 利用回归直线方程, 计算出样品中总黄酮的含量。

3.2 灯盏花总黄酮

经测定该实验中所用灯盏花总黄酮提取液黄酮含量为 13.083mg/ml, 所测灯盏花黄酮含量为 4.67%。

3.3 超声碱水法与溶剂法的比较

表 1 灯盏花黄酮提取量随时间的变化
Table 1 The extracting quantities of Erigeron breviscapus flavonoids in different time

提取时间 /min	提取量 mg/g		提取率%	
	酒精溶剂法	超声碱水法	酒精溶剂法	超声碱水法
5	21.23	34.12	45.46	73.03
10	24.52	37.15	52.51	79.52
15	25.96	38.66	55.59	82.78
20	26.88	39.77	57.56	85.16
25	28.00	40.38	59.96	86.46
30	30.12	41.10	64.50	88.00

从表 1 中可以看出, 超声波碱水法提取灯盏花黄酮的提取量明显高于酒精溶剂法, 在 15min 时, 超声波碱水法的提取量为 38.66mg/g, 而酒精溶剂法的提取量为 25.96 mg/g, 分别为灯盏花总黄酮的 55.59%和 82.78%, 超声波碱水法的提取量比酒精溶

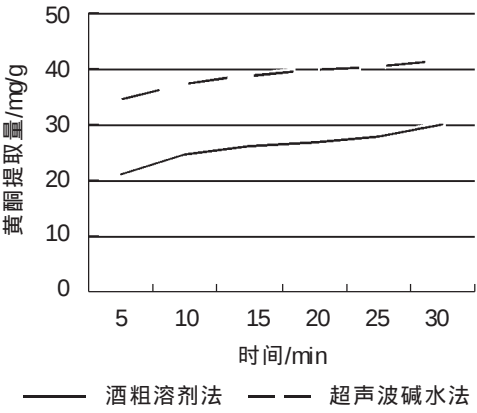


图 1 灯盏花黄酮提取量随时间的变化情况

Fig.1 The flavonoids extracting quantities from Erigeron breviscapus in different time

剂法高出 48.92%。可见超声波碱水法比酒精溶剂法效率高,而且溶剂成本很低(见图 1)。

3.4 超声碱水法提取灯盏花总黄酮动力学

在超声波碱水法提取灯盏花黄酮的过程中,随着超声波作用时间的延长,提取液总黄酮含量增加,提取率升高,在 10min 以前提取率上升很快,10min~25min 上升较缓慢,到 25min 时,提取率上升到

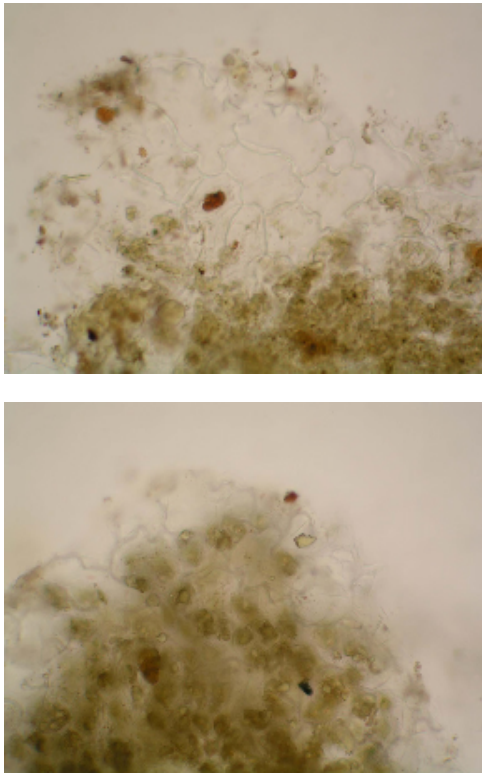


图 2 灯盏花组织细胞超声波处理后的显微结构

(16×40 倍,上:经超声波处理,下:未经超声波处理)

Fig.2 The microstructure of Erigeron breviscapus tissue after ultrasound-treated (16×40, above: ultrasound-treated, below: no ultrasound-treated)

表 2 数学曲线模型模拟结果

Table 2 The curve models being simulated according to the trial data

类型	方程	相关系数
Quadratic	$y=31.435+0.6399t-0.0108t^2$	$R^2=0.996$
Cubic	$y=29.6033+1.1007t-0.0413t^2+0.0006t^3$	$R^2=0.999$
Logarithmic	$y=28.0689+3.8659\ln t$	$R^2=0.996$

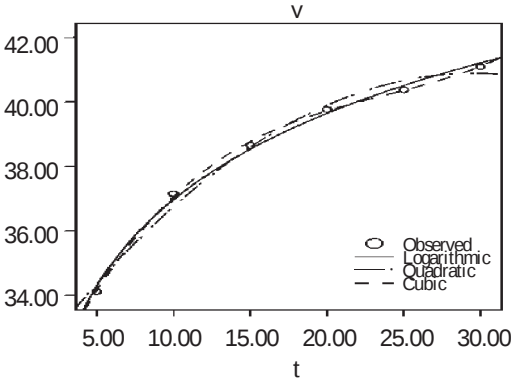


图 3 试验数据与数学模型的拟合情况

Fig.3 The comparison between trial data and curve models

86.46%,耗时比传统的酒精浸提要短,省时省事。

通过观察图 1 其动力学曲线,灯盏花黄酮提取量与时间并非成线性关系,而是随着时间的增加,提取量的增加变慢。

通过显微观察超声波处理前后灯盏花组织细胞的变化情况发现,超声波对灯盏花组织细胞有破坏作用,促使细胞壁破裂,释放黄酮物质,但是组织中细胞壁破裂不完整,而且没有脱落,影响超声波对灯盏花组织里层细胞的破碎作用,从而提取量增加缓慢,随着时间的增加,超声波对灯盏花组织里层细胞的破碎作用更进一步减小(见图 2)。

用 SPSS 软件对提取动力学过程进行数学模型模拟,建立灯盏花黄酮提取量 y 与时间 t 之间的函数关系,得到二次曲线模型、三次曲线模型、对数曲线模型,见表 2,拟合程度见图 3。对三者拟合情况进行比较,选择三次曲线模型较好,得方程 $y=29.6033+1.1007t-0.0413t^2+0.0006t^3$, $R^2=0.999$ 。

4 讨论与总结

超声波提取作为一种有效提取方法,因其简单、方便、快速和安全等优点,在植物的有效成分提取中得到了广泛应用。

超声提取无需加热,溶剂的选择范围更广泛。

溶剂选择是否得当将会影响到待提取样品中有效成分的提出率。在选择提取溶剂时,最好结合有效成分的理化性质进行筛选,黄酮在 pH 为 8~9 时,其酚羟基易离子化,水溶性增强,在 pH 下降后,又去离子化,从溶液中析出。但传统加热提取法不利于稳定酸碱度,不适于采用此法。

超声碱水法提取得到较高的总黄酮提取率及含量,而且具有能耗和溶剂成本较低的特点,具有较高的实用价值,工业化生产容易推广实现,提取过程模拟方程的建立为提取实践工艺提供了一定的理论依据。

超声提取灯盏花黄酮效果明显,但由于超声对植物组织细胞的破碎作用有限,所以不能较完整地提取出灯盏花黄酮,应探索其他生物工程技术协同超声进行植物天然有效成分的提取,以进一步提高提取效率。

参 考 文 献

[1] 张峻, 李雪松, 张卫东. 中药灯盏花化学成分与药理活性研究进展. 药学实践杂志[J], 2002, 20(2): 103-107.
ZHANG jun, LI Xuesong, ZHANG Weidong The research about chemistry ingredient and pharmonic action of Erigeron breviscapus[J]. The Journal of Pharmaceutical Practice,

2002, 20(2): 103-107.

- [2] 王冬梅, 李琰, 王敏茹, 门甜甜, 李科学. 山楂叶总黄酮生长积累动态及提取工艺研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(10): 2083-2087.
WANG Dongmei¹, LI Yan, WANG Minru, MEN Tiantian, LI Kexue Dynamic Accumulation and Extracting Technology of the Total Flavonoids in Crataegus pinnatifida Leaves[J]. Journal of Northwest Plant, 2005, 25(10): 2083-2087.
- [3] 张涛, 马海乐. 超声波提取辣木黄酮技术的研究. 粮油食品科技[J]. 2005, 13(5): 19-21.
ZHANG tao, MA Haile. The study of extraction of moringa flavone with ultrasonic assistance [J]. Technology of Grain and Oil, 2005, 13(5): 19-21.
- [4] 田呈瑞, 李昀. 银杏叶黄酮的乙醇提取方法研究[J]. 西北植物学报, 2001, 21(3): 556-561.
TIAN Cheng rui, LI Yun. Studies on the alcohol extracting technology of flavonoids in Ginkgo biloba leaves[J]. Journal of Northwest Plant, 2001, 21(3): 556-561.
- [5] ZHANG WD Kong, DY Li HT, et al. A new glycoside from erigeron breviscapul[J]. Chinese Chemical Letter, 1994, 6(3): 225.
- [6] YUE JM Lin, ZHW SUN HD et al. A sesquiterpene and other constituents from Erigeron Breviscapul [J]. Phytochemistry, 1994, 36(3): 717.