

商洛连翘果实紫云英苷提取方法研究

张晓虎,王 超

(商洛学院 生物医药与食品工程学院,陕西 商洛 726000)

摘要:本文旨在研究商洛连翘果实紫云英苷提取工艺的较优方案。以乙醇和丙酮作为两种提取溶剂并采用超声波辅助对商洛连翘果实中紫云英苷进行提取,进行单因素试验和正交试验;紫外分光光度法测定紫云英苷含量;考察提取时间、提取温度、料液比3个因素对提取率的影响程度,选取较优提取方案。结果表明:乙醇法和丙酮法中各因素对紫云英苷得率影响程度为:料液比>提取时间>提取温度。采用乙醇提取法得出在70℃下,以1:25的料液比提取50 min为最佳提取工艺方案,紫云英苷得率为 $0.526 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。采用丙酮提取法得出在75℃下,以1:20的料液比提取70 min为最佳提取工艺方案,紫云英苷得率为 $0.213 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。比较两种提取方法得出乙醇法优于丙酮法,研究结果可作为商洛连翘果实中紫云英苷提取的技术参考。

关键词:连翘;紫云英苷;乙醇;丙酮;超声波

0 引言

紫云英苷化学式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$,相对分子量为448.38,熔点 $170\sim 171^\circ\text{C}$,易溶于乙醇、丙酮等有机溶剂,微溶或难溶于水,不溶于石油醚。紫云英苷是植物中重要的黄酮类化合物之一,具有较强的抑菌作用,可作为纯天然抗氧化剂使用^[1];在医用方面紫云英苷有着不容小视的功能,例如杨豪伟等^[2]采用体外成骨细胞培养技术研究杜仲叶中紫云英苷对小鼠成骨细胞的增殖及分化的影响表明,紫云英苷可作为调节骨代谢的主要药效物质成分。在紫云英苷提取方面,焦胜敏^[3]采用响应面法在超声波辅助条件下优化提取金缕梅中紫云英苷的工艺参数;纪晓花^[4]采用正交试验优化提出了超声辅助提取荷叶中紫云英苷的工艺条件。

随着紫云英苷应用研究的拓展,人们愈加重视其资源的挖掘。连翘是一种应用广泛的传统中药材,作为陕西省中药现代化建设核心区域的商洛山区连翘野生资源蕴藏丰富、亦为人工种植面积较大的主要药用植物^[5]。近年来已有以商洛连翘为对象进行芦丁、槲皮素、连翘苷、连翘酯苷等有效成分提取分析的研究报道,但未见有针对商洛连翘果实紫云英苷提取方法的研究报道^[6~8]。本文以乙醇和丙酮作为两种提取溶剂并采用超声波辅助对商洛连翘果实中紫云英苷进行提取试验

研究,以期获取可供参考的优化工艺参数。

1 材料与方法

1.1 试验材料、主要仪器

供试原料:连翘果实,2016年10月中旬采自商洛市商州区金凤山,杀青、烘干、粉碎、备用^[9]。

实验试剂:紫云英苷标品(批号:C21H20011),购自西安晶博生物科技公司。蒸馏水,95%乙醇、无水甲醇、丙酮(均为分析纯),由商洛学院生物医药与食品工程学院实验室提供。

主要仪器:高速万能粉碎机,电热恒温干燥箱,电子分析天平,超声波清洗器,紫外可见分光光度计等。

1.2 试验方法

1.2.1 紫云英苷标准曲线制备 标品溶液的制备:准确称取紫云英苷标品 5.000 mg ,置 100 mL 容量瓶中,用80%甲醇溶液溶解定容至刻度,摇匀后静置,所得浓度为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,备用。

标准曲线的制备:准确量取上述紫云英苷标品溶液各为 0.5 、 1.0 、 1.5 、 2.0 、 2.5 、 3.0 、 3.5 、 4.0 mL 分别置于 10 mL 的容量瓶中定容至刻度线,在波长 346 nm 处测定吸光度。以吸光度 A 为纵坐标,紫云英苷浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,绘制紫云英苷的标准曲线,见图1。紫云英苷回归方程为: $y=33.381x+0.0318$, $R^2=0.9953$,表明紫云英苷浓度与吸光度之间呈正比且相关性良好。

收稿日期:2017-09-28 修回日期:2017-10-20

基金项目:陕西省2011年科学技术研究发展计划中药材规范化种植基地建设项目“中国秦岭‘五大商药’专用肥开发研究与生产示范”课题(2011K16-01-05);商洛市2016年科学技术研究发展计划项目“中国秦岭‘五大商药’系列专用肥配方研制”(SK2016-49)。

第一作者简介:张晓虎(1962-),男,陕西商洛人,商洛学院 生物医药与食品工程学院,中国中医科学院商洛中药材 GAP 科研工程中心,硕士,教授,硕导,从事区域种植业土壤肥料研究。

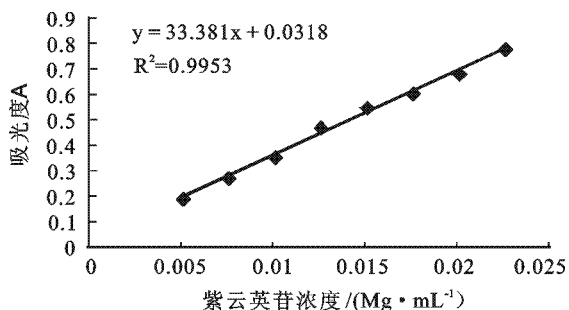


图 1 紫云英苷标准曲线

1.2.2 紫云英苷含量的测定 准确量取 0.5 mL 提取液,置于 25 mL 容量瓶中定容,摇匀静置。按照标准曲线绘制的方法,在波长 346 nm 处重复测量 3 次吸光度,取平均值,根据回归方程计算紫云英苷浓度,以下式计算紫云英苷得率。

$$Y=C \times V_1 / V_2 \times W$$

式中:Y 为紫云英苷得率($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$);C 为提取液中紫云英苷的浓度($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$); V_1 为稀释液体积(mL); V_2 为提取液的取样量(mL);W 为连翘果实粉末质量(g)。

1.2.3 影响提取效果的单因素的选取 在超声辅助条件下,两种提取方法中分别选取提取时间、提取温度、料液比 3 个影响提取效果较大的因素进行单因素试验,从而为确定正交试验中因素水平提供参考。

(1)提取时间对紫云英苷得率的影响。在乙醇提取法中控制料液比为 1:25、提取温度为 70℃ 的条件下,探讨提取时间(30、40、50、60、70 min)对紫云英苷得率的影响;在丙酮提取法中控制料液比为 1:25、提取温度为 70℃ 的条件下,探讨提取时间(30、40、50、60、70 min)对紫云英苷得率的影响。

(2)提取温度对紫云英苷得率的影响。在乙醇提取法中控制料液比为 1:25、提取时间为 30 min 的条件下,探讨提取温度(60、65、70、75、80℃)对紫云英苷得率的影响;在丙酮提取法中控制料液比为 1:25、提取时间 30 min 的条件下,探讨提取温度(60、65、70、75、80℃)对紫云英苷得率的影响。

(3)料液比对紫云英苷得率的影响。在乙醇提取法中控制提取温度为 70℃、提取时间为 30 min 的条件下,探讨料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 $\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)对紫云英苷得率的影响;在丙酮提取法中控制提取温度为 70℃、提取时间为 30 min 的条件下,探讨料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 $\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)对紫云英苷得率的影响。

1.2.4 正交试验设计 为探讨连翘果实中紫云

英苷提取的优化工艺条件,根据 3 个单因素试验结果,在每个因素中选取 3 个水平按照 $L_9(3^3)$ 设计正交试验。

1.2.5 验证性试验设置 根据正交试验的结果,选取最佳提取工艺组合进行验证性试验,以证明实验结果的可靠性。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 提取时间对紫云英苷得率的影响

(1)丙酮提取法提取时间对紫云英苷得率的影响,见图 2。

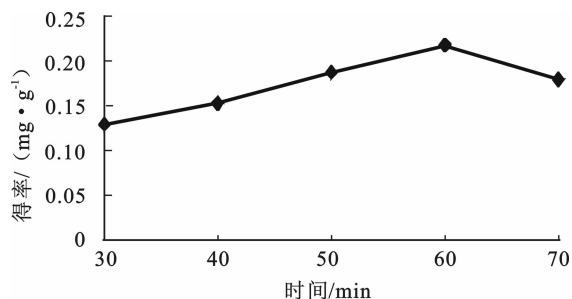


图 2 丙酮法提取时间对得率的影响

图 2 说明,以 70% 丙酮为溶剂,随着时间的增加,紫云英苷的得率先增大后减小,而当时间为 60 min,紫云英苷的得率最大。因此,丙酮提取法的提取时间应选择在 50~70 min 较为适宜。

(2)乙醇提取法提取时间对紫云英苷得率的影响,见图 3。

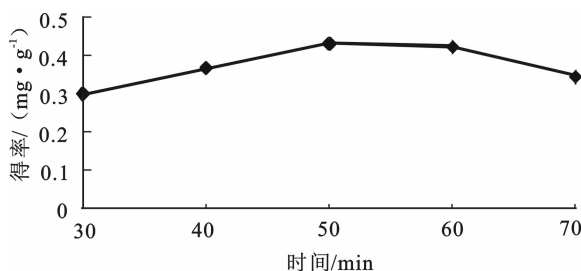


图 3 乙醇法提取时间对得率的影响

图 3 说明,以 60% 乙醇为溶剂,随着时间的增加,紫云英苷的得率先增大后减小,而当时间为 50 min,紫云英苷的得率最大。因此,乙醇提取法的提取时间应选择在 40~60 min 较为适宜。

2.1.2 提取温度对紫云英苷得率的影响

(1)丙酮提取法提取温度对紫云英苷得率的影响,见图 4。

图 4 说明,以 70% 丙酮为溶剂,随着温度的升高,紫云英苷的得率先增大后减小,而当温度为 75℃ 时,紫云英苷的得率最大。因此,丙酮提取法的提取温度应选择在 70℃~80℃ 较为适宜。

(2)乙醇提取法提取温度对紫云英苷得率的

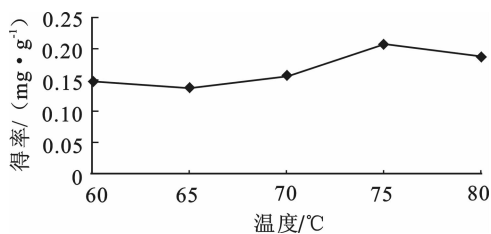


图4 丙酮法提取温度对得率的影响

影响,见图5。

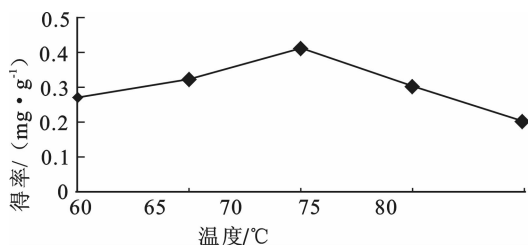


图5 乙醇法提取温度对得率的影响

图5说明,以60%乙醇为溶剂,随着温度的升高,紫云英苷的得率先增大后减小,而当温度为70℃时,紫云英苷的得率最大。因此,乙醇提取法的提取温度应选择在65℃~75℃较为适宜。

2.1.3 料液比对紫云英苷得率的影响

(1)丙酮提取法料液比对紫云英苷得率的影响,见图6。

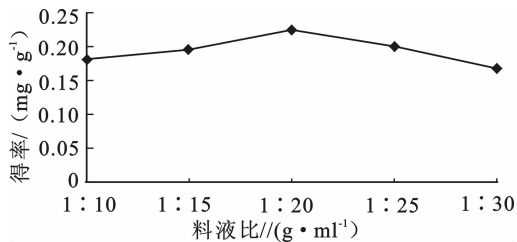


图6 丙酮法料液比对得率的影响

图6说明,以70%丙酮为溶剂,随着料液比

的增大,紫云英苷的得率先增大后减小,而当料液比为1:20时,紫云英苷的得率最大。因此,丙酮提取法的料液比应选择1:15~1:25较为适宜。

(2)乙醇提取法料液比对紫云英苷得率的影响,见图7。

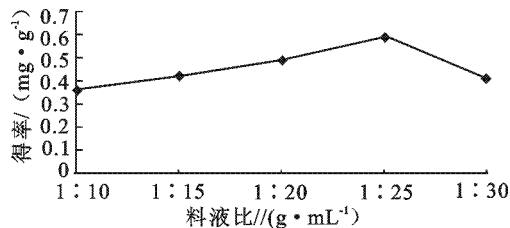


图7 乙醇法料液比对得率的影响

图7说明,以60%乙醇为溶剂,随着料液比的增大,紫云英苷的得率先增大后减小,而当料液比为1:25时,紫云英苷的得率最大。因此,乙醇提取法的料液比应选择1:20~1:30较为适宜。

2.2 正交试验结果与分析

根据正交试验结果并进行计算分析,得出最佳水平组合。

首先,采用正交试验直观分析的方法对正交实验数据的处理,统计出不同水平条件的紫云英苷的平均得率,以极差值R(极大值与极小值的差)分析结果数据,最终确定影响紫云英苷得率的因素重要性。

2.2.1 乙醇提取法正交试验结果与分析

乙醇提取法正交试验结果及分析,见表1。表中极差R结果表明,提取时间、提取温度、料液比3个因素对连翘果实紫云英苷得率的影响程度的大小为:料液比(C)>提取时间(A)>提取温度(B)。由表1中K值得出,紫云英苷的最优提取组合为A₂B₂C₂,即使用料液比为1:25,在70℃的条件下提取50min。

表1 乙醇提取法正交试验结果及分析

序号	因素			紫云英苷得率 /(mg·g ⁻¹)
	A 提取时间/min	B 提取温度/°C	C 料液比/(g·ml ⁻¹)	
1	A ₁ (40)	B ₁ (65)	C ₁ (1:20)	0.434
2	A ₁	B ₂ (70)	C ₂ (1:25)	0.481
3	A ₁	B ₃ (75)	C ₃ (1:30)	0.451
4	A ₂ (50)	B ₁	C ₂	0.523
5	A ₂	B ₂	C ₃	0.487
6	A ₂	B ₃	C ₁	0.452
7	A ₃ (60)	B ₁	C ₃	0.446
8	A ₃	B ₂	C ₁	0.455
9	A ₃	B ₃	C ₂	0.484
K ₁	1.366	1.403	1.341	
K ₂	1.462	1.423	1.488	
K ₃	1.385	1.387	1.384	
R	0.096	0.036	0.147	

2.2.2 丙酮提取法正交试验结果与分析 丙酮提取法正交试验结果及分析,见表 2。表中极差 R 结果证明,提取时间、提取温度、料液比 3 个因素对连翘果实紫云英苷得率的影响程度的大小为

料液比(C) > 提取时间(A) > 提取温度(B)。由表 2 中 K 值得出,紫云英苷的最优提取组合为 A₃B₂C₂,即使用料液比为 1 : 20,在 75℃ 的条件下提取 70 min。

表 2 丙酮提取法正交试验结果分析

序号	因素			紫云英苷得率 / (mg · g ⁻¹)
	A 提取时间/min	B 提取温度/℃	C 料液比/(g · ml ⁻¹)	
1	A ₁ (50)	B ₁ (70)	C ₁ (1 : 15)	0.096
2	A ₁	B ₂ (75)	C ₂ (1 : 20)	0.160
3	A ₁	B ₃ (80)	C ₃ (1 : 25)	0.085
4	A ₂ (60)	B ₁	C ₂	0.188
5	A ₂	B ₂	C ₃	0.092
6	A ₂	B ₃	C ₁	0.177
7	A ₃ (70)	B ₁	C ₃	0.146
8	A ₃	B ₂	C ₁	0.194
9	A ₃	B ₃	C ₂	0.124
K ₁	0.341	0.430	0.467	
K ₂	0.457	0.446	0.472	
K ₃	0.464	0.386	0.323	
R	0.123	0.06	0.149	

2.3 验证性试验结果与分析

由于在乙醇提取法的 9 组正交试验结果中没有出现 A₂B₂C₂ 这一工艺组合,因此需要进行验证试验,证明此组合是否为最佳提取方案;在丙酮提

取法的 9 组正交试验结果中没有出现 A₃B₂C₂ 这一工艺组合,因此需要进行验证试验,证明此组合是否为最佳提取方案,验证性试验结果见表 3。

表 3 验证性试验结果

实验号	乙醇提取法得率/(mg · g ⁻¹)		丙酮提取法得率/(mg · g ⁻¹)	
	紫云英苷		紫云英苷	
1	0.538		0.196	
2	0.507		0.218	
3	0.533		0.225	
平均值	0.526		0.213	

验证性实验结果得出,乙醇提取法中 A₂B₂C₂ 这一组合的得率均高于 9 组正交试验的得率,因此说明 A₂B₂C₂ 为乙醇法的最佳提取工艺方案;丙酮提取法中 A₃B₂C₂ 这一组合的得率均高于 9 组正交试验的得率,因此说明 A₃B₂C₂ 为乙醇法的最佳提取工艺方案。总体表明正交试验结果是可靠的。

3 结论与讨论

3.1 结论

本研究在超声波辅助条件下采用乙醇和丙酮两种溶剂对商洛连翘果实中紫云英苷进行提取,紫外分光光度法测定紫云英苷的含量,通过单因素试验及正交试验得出最佳提取工艺条件。

(1)超声波辅助 60%乙醇提取紫云英苷,其最佳提取工艺条件为在 70℃,以 1 : 25 的料液比提取 50 min,紫云英苷的得率为 0.526 mg · g⁻¹;

超声波辅助 70%丙酮提取紫云英苷,其最佳提取工艺条件为在 75℃,以 1 : 20 的料液比提取 70 min,紫云英苷的得率为 0.213 mg · g⁻¹。

(2)由丙酮和乙醇两种溶剂提取紫云英苷的结果表明,采用乙醇提取的紫云英苷的得率较高,效果较好,丙酮提取法得率较低,比较两种提取方法得出乙醇法优于丙酮法。并且利用超声波辅助提取紫云英苷所得的提取量较高且缩短提取时间,研究结果可作为商洛连翘果实中紫云英苷提取的技术参考。

3.2 讨论

紫云英苷是连翘果实中的黄酮类化合物之一,因其结构中含苯环且羟基较多,易溶于极性强的溶剂,微溶或不溶于水,所以研究选用乙醇和丙酮两种有机溶剂对紫云英苷进行提取。

通过对两种提取方法的提取效果进行比较,乙醇法的提取效果较好,可能是因为乙醇的极性

更接近于紫云英苷的极性。与乙醇相比,丙酮的气味刺激性较强,基于安全性的角度考虑,建议采用乙醇提取连翘果实中紫云英苷这一有效成分较好。笔者是在超声辅助条件下对3个影响紫云英苷提取的主要因素的研究,而对其他影响连翘果实中紫云英苷提取的因素需继续研究探讨。

目前实验室多采用乙醇回流法、浸提法及热水浸提法等方法进行药用植物有效成分的提取,传统的提取工艺费时费力,在整个提取过程中容易造成目标物质的浪费。多数中草药植物的主要活性成分为胞内产物,进行提取时需要先将细胞破碎,依目前破碎植物细胞的化学方法及机械方法来看,一般达不到预期的破碎效果,而超声波的作用已在药用植物活性物质的提取中凸显优势^[10]。本研究采用超声波辅助对连翘果实中活性成分紫云英苷进行提取,超声波产生的空化效应致使周围的压力的增大而被压碎,这些破裂的气泡产生的冲击及本身产生的搅拌作用破坏了植物细胞,因此有机溶剂才能渗透到连翘果实细胞内。研究中超声波辅助提取紫云英苷所用的实验仪器容易操作,可减少误差的产生,同时也解决了提取时间过长、提取率较低等问题。

参 考 文 献:

[1] 刘梦星,王涛,马晶军.微波辅助提取连翘黄酮类化

合物及其抗氧化性研究[J].湖北农业科学,2014,53(03):651-653,656.

[2] 杨豪伟,朱盼盼,张春风,等.紫云英苷对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 增殖与分化的影响[J].中医学报,2013,41(04):17-19.

[3] 焦胜敏.超声波辅助提取金缕梅紫云英苷及其体外抗氧化研究[J].食品工业,2014,35(05):51-53.

[4] 纪晓花.荷叶紫云英苷的超声辅助提取及其抑菌活性研究[J].食品工业,2014,35(10):112-114.

[5] 张晓虎.商洛连翘施肥配方技术研究[J].陕西农业科学,2017,63(06):5-10.

[6] 宋小俊,雷立,李惠民,等.商洛不同产地青翘和老翘中连翘苷及连翘酯苷 A 含量研究[J].吉林中医药,2014,34(12):1289-1291.

[7] 张晓虎,田西彬.洛南连翘果实中芦丁和槲皮素提取方法研究[J].陕西农业科学,2015,61(11):26-30.

[8] 张晓虎,孔令森.洛南连翘果实连翘苷和连翘酯苷提取方法研究[J].陕西农业科学,2016,62(02):10-15.

[9] 张晓虎,何军.商洛连翘氮磷钾不同配比施肥效应研究[J].陕西农业科学,2014,60(12):32-36,121.

[10] 兰昌云.槐花中总黄酮的提取及单体分离提纯研究[D].成都:成都理工大学,2006:4-9.

(上接第 5 页)

[19] 李斌,雷月,孟宪军,等.响应面优化超声波辅助提取蓝靛果多酚工艺及其抗氧化活性[J].食品科学,2015,36(22):33-39.

[20] CHEN R Z, LI H P, LI S Z, et al. Extraction optimization, preliminary characterization and immunological activity of polysaccharides from figs[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72:185-194. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.08.021.

[21] 张秀红,孙静超,李琪.响应面法优化茉莉花茶茶多糖提取工艺[J].基因组学与应用生物学,2010,29(03):603-608.

[22] 刘成梅,付桂明,涂宗财,等.百合多糖降血糖功能研究[J].食品科学,2002,23(06):113-114.

[23] FAN Y N, WU X Y, ZHNG M, et al. Physical characteristics and antioxidant effect of polysaccharides extracted by boiling water and enzymolysis from Grifola frondosa[J]. International Journal of

Biological Macromolecules, 2011, 48: 798-803. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2011.03.013.

[24] LIN T M, DURANCE T D, SCAMA C H. Characterization of vacuum microwave, air and freeze dried carrot slices[J]. Food Research International, 1998, 31(02):111-117.

[25] RAWDKUEN S, SAI-UT S, KHAMSORN S, et al. Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered using an acid-alkaline process[J]. Food Chemistry, 2009, 112(01):112-119. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.05.047.

[26] 王文武,闵玉涛,陶敬,等.水提法提取海藻多糖及其对 α -淀粉酶的抑制活性研究[J].中州大学学报,2014,35(06):120-121.

[27] 熊明郁,牛世全.水提法提取百合多糖优选工艺的研究[J].安徽农业科学,2014,42(36):13 047-13 049.