

桑白皮总黄酮超声波提取法研究

李洪娟¹, 孙居锋¹, 代现平¹, 王术光², 张蕾³

(1. 滨州医学院药学院, 山东烟台264003; 2. 滨州医学院组织部, 山东烟台264003; 3. 滨州医学院临床学院, 山东烟台264003)

摘要 [目的] 探讨桑白皮总黄酮的超声波提取法。[方法] 采用正交试验法, 以提取液中总黄酮含量为考察指标, 对影响总黄酮超声提取的因素进行研究。[结果] 桑白皮总黄酮的最佳提取工艺为40%乙醇20倍量50℃提取30 min, 其中乙醇浓度对结果影响显著。[结论] 该工艺设计合理, 操作简单可行。

关键词 桑白皮; 总黄酮; 超声提取

中图分类号 S567.23+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)03-01188-02

Study on the Extraction Process of the Total Flavonone from White Mulberry Root-bark by Ultrasonic Wave

LI Hong-juan et al (School of Pharmacy, Binzhou Medical College, Yantai, Shandong 264003)

Abstract [Objective] To study the optimum extraction technique of total flavonoids from the white mulberry root-bark by ultrasonic wave. [Method] The conditions for the extraction by ultrasonic wave were studied by the orthogonal experimental design as guided by the content of total flavonoids in the extract. [Result] The optimum extracting condition was extracted by 30 min at 50℃ with 20 times of 40% ethanol. Among all factors, the ethanol concentration was significant for the result. [Conclusion] This procedure was proved to be convenient, appropriate and feasible.

Key words White mulberry Root-bark; Total flavonoids; Orthogonal design; Ultrasonic wave treatment

桑白皮又名桑根白皮、桑皮、桑根皮、白桑皮, 为桑科植物的根皮, 味甘、辛, 性寒, 入肺、脾经, 有泻肺平喘、利水消肿之功效, 可用于治疗肺热喘咳、水肿胀满、尿少、面目肌肤浮肿等症。桑白皮主要含多种黄酮类成分, 包括桑酮、桑酮醇、桑根酮、桑根酮醇、桑素、桑皮根素等。文献报道其总黄酮具有利尿、降压、降糖、镇痛、镇静、抗癌及抗HIV等作用^[1]。

桑白皮总黄酮提取方法主要有传统的水煮法、醇提法及微波辅助萃取法等^[2-3]。传统的水煮法和醇提法得到的总黄酮含量较低, 杂质较多。笔者引入一种新的实验方法——超声波法。超声波能产生强烈的振动、高的加速度、强烈的空化效应、搅拌作用等, 可加速植物材料中的有效成分进入溶剂, 从而增加有效成分的提取率, 缩短提取时间, 还可避免高温对提取成分的影响。近年来, 超声技术应用于提取植物中的生物碱、苷类、生物活性物质、动物组织浆的毒质等研究已有报道, 表明其具有能耗低、效率高、不破坏有效成分的特点^[4]。笔者通过超声提取法与传统提取方法的比较, 找到一条桑白皮总黄酮的提取工艺, 为进一步的工业化生产提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 KQ5200DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); TU1900紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); SHB循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。无水乙醇AR; 三氯化铝AR; 醋酸钠AR; 芦丁(购于中国药品生物制品检定所); 桑白皮购于药材市场。

1.2 方 法

1.2.1 因素和水平的确定。 选用超声波提取药材中的黄酮类化合物, 通过预试验, 选定乙醇浓度(A)、乙醇用量(B)、提取温度(C)、提取时间(D)为因素, 每个因素取3个水平进行优选, 以浸提样品中总黄酮含量为指标, 用 $L_9(3^4)$ 正交表设

计试验(表1)。

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平 Level	乙醇浓 度(A) %	乙醇用 量(B) 倍	提取温 度(C)	提取时 间(D) min
	Ethanol concentration	Ethanol dosage	Extraction temperature	Extraction time
1	40	10	30	10
2	60	15	40	20
3	80	20	50	30

1.2.2 样品制备。 精密称取5g桑白皮粉共9份, 按正交试验设计(表2)在60 MHz下进行超声提取, 提取完毕后, 过滤, 弃去固体残渣, 转移到100 ml容量瓶中, 用60%乙醇稀释至刻度, 得样品液备用。

1.2.3 总黄酮含量的测定。

1.2.3.1 对照品储备液及标准曲线制备。 精密称取105条件下干燥至恒重的芦丁对照品10 ng, 置于100 ml的容量瓶中, 加60%乙醇至刻度, 摇匀, 即得芦丁储备液(0.10 ng/ml)。

分别精密吸取芦丁储备液(0.10 ng/ml) 0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 ml于10 ml容量瓶中, 加60%乙醇补充至5 ml, 分别加入2 ml(0.1 mol/L)三氯化铝溶液, 3 ml(1 mol/ml)醋酸钠溶液, 用60%乙醇稀释到刻度, 摇匀, 放置30 min, 以试剂作空白参比液, 于417 nm处测吸光度。测定结果用最小二乘法作线性回归, 吸光度(A)与浓度(C)之间的回归方程为: $A = 0.0327C - 0.0208$ (C: $\mu\text{g/ml}$), $r = 0.9999$, 线性范围10.00~50.00 $\mu\text{g/ml}$ 。

1.2.3.2 样品测定。 精密吸取样品液3 ml, 置于25 ml的容量瓶中, 自“加60%乙醇补充至5 ml起”, 按“1.2.3.1”项下操作, 测定吸光度, 并依标准曲线计算样品溶液的浓度及黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 最佳工艺条件的选择 以总黄酮含量为考察指标, 分析结果表明(表2), 各因素对提取效果的影响程度依次为 $A > D > B > C$ 。即乙醇浓度为主要因素, 对试验结果影响较

作者简介 李洪娟(1981-), 女, 山东潍坊人, 硕士, 讲师, 从事天然药物化学研究。

收稿日期 2008-11-05

大,其次为提取时间和乙醇用量,提取温度几乎不影响试验结果。最佳工艺条件为 $A_1B_3C_3D_3$,即40%乙醇20倍量,于50超声萃取30 min。

表2 正交试验结果

Table 2 Design and result of orthogonal test

试验号 Est code	水平 Level				黄酮含量 ng/g Flavone content
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.28
2	1	2	2	2	2.64
3	1	3	3	3	3.99
4	2	1	2	3	1.63
5	2	2	3	1	1.02
6	2	3	1	2	1.88
7	3	1	3	2	0.94
8	3	2	1	3	1.26
9	3	3	2	1	1.11
K_1	2.64	1.28	1.47	1.14	
K_2	1.51	1.64	1.79	1.82	
K_3	1.10	2.33	1.98	2.29	
R	1.54	1.05	0.51	1.15	

注:A.乙醇浓度;B.乙醇用量;C.提取温度;D.提取时间。

Note :A. Ethanol concentration ; B. Ethanol dosage ; C. Extraction temperature ; D. Extraction time .

2.2 精密度试验 取5号对照品溶液依“1.2.3.1”方法测定吸光度,连续测定5次,结果 $RSD=0.34\%$,表明仪器精密度良好。

2.3 稳定性试验 精密吸取桑白皮提取液样品液1 ml,依“1.2.3.1”方法每0.5 h测定1次吸光度,共测定5次,结果 $RSD=0.73\%$,表明桑白皮总黄酮的吸光度在2.5 h内稳定。

2.4 重复性试验 取同一桑白皮提取液5份,制备供试品溶液,依“1.2.3.1”方法测定吸光度,计算总黄酮的含量,得其

(上接第1177页)

下降,从而提高其安全性。另外,不同处理对马铃薯淀粉和维生素C含量也有影响,其中处理D与对照相比差异达到极显著水平,处理B、C、A与对照差异达到显著水平。产品的维生素C含量变化规律为处理 $D>B>A>C>CK$,处理D和B与对照相比差异达到了极显著水平。由分析可知,施用有机肥加生物菌肥和菌糠对提高马铃薯淀粉及维生素C含量有明显的促进作用。

2.3 不同肥料对马铃薯叶绿素含量的影响^[2] 叶绿素是植物光合作用重要的光合色素,是光能吸收和转换的原初物质,凡是影响叶绿素的因子都将直接影响植物的生长发育及产量的形成。由表1可知,不同处理马铃薯叶绿素含量不同,其变化规律依次为处理 $D>B>C>A>CK$,它们分别比对照增加了58.82%、41.17%、35.29%、29.41%,这说明施用不同有机肥可明显提高叶绿素含量。而处理D即有机肥+生物菌肥+菌糠处理马铃薯叶绿素含量最高。

3 结论

试验结果表明,马铃薯施肥量大,处理D(有机肥+生物菌肥+菌糠)的组合肥效最好且优于处理B(有机肥+生物

$RSD=0.50\%$ 。

2.5 加样回收率试验 精密吸取已知含量的样品液5份,分别置于25 ml容量瓶中,加入芦丁对照品,制备供试品溶液,依“1.2.3.1”方法测定吸光度,计算总黄酮含量,结果平均回收率为99.78%, $RSD=1.27\%$ 。

2.6 最佳工艺验证试验 称取桑白皮粗粉5g,按上述最佳提取工艺进行提取,进行验证试验,结果3批桑白皮总黄酮含量分别为3.97、3.98、3.93 ng/g, $RSD=0.67\%$ 。

2.7 与传统醇提法比较 称取桑白皮粉末5g,按预试验所得最佳工艺条件,即60%乙醇10倍量,回流提取3次,每次1 h在50℃进行回流提取,得到总黄酮的含量为1.78 ng/g。超声波法与之相比,含量高1倍左右,且超声波法萃取时间短、效率高、损失少。

3 结论

试验结果表明,对超声提取总黄酮影响因素的排序为:乙醇浓度>提取时间>乙醇用量>提取温度,其中乙醇浓度对试验结果影响显著,提取温度几乎不影响结果。超声波法提取桑白皮总黄酮的工艺参数为40%乙醇、20倍量、50℃下提取30 min。在此条件下提取,得黄酮含量平均为3.96 ng/g,远高于传统的醇提法。稳定性与加样回收率试验表明,该提取工艺重复性好、回收率高、简单可行,省时节能。该方法为物理过程,无污染,具有一定的应用前景。

参考文献

- [1] 张明发,沈雅琴.桑白皮的药理研究进展[J].上海医药,2006,27(4):164-167.
- [2] 张国刚,黎琼红,李乐道,等.桑白皮中总黄酮提取工艺研究[J].中草药,2005,36(11):1662-1727.
- [3] 陈菁菁,李向荣.微波萃取法提取桑叶和桑白皮的黄酮类成分[J].中药材,2006,29(10):1090-1092.
- [4] 邬方宁.超声提取技术在现代中药中的应用[J].中草药,2007,38(2):315-316.

菌肥)、处理C(有机肥+菌糠)、处理A(生物菌肥+菌糠)及对照(有机肥+化肥),多种有机肥与生物菌肥之间交互作用显著,这与肥料中含有微生物有关,它可激活土壤中微生物,使肥料有效成分大大增加^[3]。有机肥+生物菌肥+菌糠配方施肥的处理组合对马铃薯的产量、品质及叶绿素含量影响较大,说明该组合具有较高的使用价值。

参考文献

- [1] 李成军.不同肥料的组配施用对马铃薯产量的影响试验[J].中国马铃薯,2002,16(5):294-296.
- [2] 李莉萍.有机肥、无机肥与微肥配施对色素辣椒产量和品质的影响[J].太谷:山西农业大学,2004.
- [3] 吴微,葛诚.我国卫生肥料生产和应用现状的调查报告[J].微生物学通报,1995,22(2):104-107.
- [4] HAN Y J, LI J P, WANG T H, et al. Comparative study on the effect of different fertilizers on the growth and development of *Halenia dilitica* D. Don [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(3):137-140.
- [5] 陈丽华,李云海,赵德柱.马铃薯专用肥用量试验[J].中国马铃薯,2004,18(2):82-83.
- [6] RENT B, ZHAO J X. Effect of different nitrogen application amount on the net increment of fresh dry weight in hybrid rape [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2):147-151.
- [7] 刘东海,马仁彪,谢国豫.马铃薯专用肥效果试验[J].宁夏农林科技,2001(6):25-26.