

微波辅助提取贯叶连翘总黄酮的工艺研究

王小华¹, 邓斌^{1,2*}, 张晓军², 龙石红³, 王存端¹ (1. 湘南学院化学与生命科学系, 湖南郴州 423000; 2. 中国科学技术大学合肥微尺度物质科学国家实验室, 安徽合肥 230026; 3. 永州职业技术学院, 湖南永州 425000)

摘要 [目的] 探讨贯叶连翘中总黄酮的微波辅助提取优化工艺条件。[方法] 采用正交试验方法, 考察微波功率、提取溶剂浓度、液固比、提取时间对总黄酮含量的影响, 确定微波辅助提取贯叶连翘总黄酮的最佳工艺条件, 并与超声波提取法、索氏提取法进行比较。[结果] 微波辅助提取贯叶连翘总黄酮的最佳条件为乙醇溶液的体积浓度为 70%、液固比为 30:1、微波功率 450 W、微波提取时间 5 min, 在该条件下贯叶连翘总黄酮得率为 6.02%。微波辅助提取 5 min 与索氏法提取 4 h、超声波法提取 1 h 得率相当。[结论] 微波辅助提取法具有快速、高效、节能、选择性好等特点。

关键词 贯叶连翘; 微波提取; 总黄酮; 正交试验

中图分类号 R284.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)14-06431-02

Study on Extracting Total Flavonoids from *Hypericum perforatum* L. with Microwave-assisted Extraction

WANG Xiao-hua et al (Department of Chemistry and Life Science, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000)

Abstract [Objective] The study aims to discuss the optimum technological conditions of extracting total flavonoids from *Hypericum perforatum* L. with microwave-assisted extraction. [Method] Microwave power, extraction solvent concentration, liquid-solid ratio, and extraction time are investigated and the appropriate microwave-assisted extraction conditions are obtained with the orthogonal test method. The microwave-assisted extraction method is compared with ultrasonic extraction and soxhlet extraction methods. [Result] The optimized conditions of microwave-assisted extraction are as follows: ethanol concentration is 70%, liquid-solid ratio is 30:1, microwave power is 450 W, and extraction time is 5 minutes. Also the extracting yield of flavonoids from *Hypericum perforatum* L. is up to 6.02% under the optimal extraction conditions. The yield of total flavonoids is almost equal to soxhlet extraction method for 4 hours, and ultrasonic extraction method for 1 hour. [Conclusion] The microwave-assisted extraction method is a fast, efficient, energy saving and high-selective.

Key words *Hypericum perforatum* L.; Microwave extraction; Total flavonoid; Orthogonal test

贯叶连翘 (*Hypericum perforatum* L.) 属于藤黄科金丝桃多年生草本植物, 富含大量的黄酮、酚酸、萜酮类化合物, 具有清心明目、调经止血、止血生肌、解毒消炎等功效^[1-2], 临床上常用于抗抑郁和抑制中枢神经紊乱等疾病的治疗, 同时它还是一种很有前途的内源性光敏剂, 可用于肿瘤的光化学诊断与治疗, 并能显著抑制人体免疫缺陷病毒 (HIV) 及其他一些逆转录病毒, 从而用于治疗艾滋病^[3]。微波技术作为一种新兴的应用技术, 近年来在提取天然植物的有效成分中得到了广泛应用^[4-5]。与常规方法相比, 微波辅助提取具有选择性高、快速高效、溶剂消耗小、活性成分得率高、不产生噪音、环保清洁、适合热不稳定物质等优点^[6-9]。笔者以一定浓度的乙醇溶液为提取剂, 利用微波辅助提取法从贯叶连翘中提取黄酮类化合物, 并用分光光度法测定提取液中总黄酮的含量, 旨在为贯叶连翘的进一步深入开发及利用提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料。贯叶连翘药材购于湖南九汇现代中药有限公司, 经广东药学院张精安教授鉴定。粉碎后过 80 目筛, 于 60℃ 鼓风干燥箱中干燥 12 h, 冷却后置于干燥器中备用。

1.1.2 仪器、试剂。①仪器。佛山市顺德区格兰仕微波炉电器有限公司 WD800 型 Galanz 微波炉, 最大输出功率 800 W; 上海精宏试验设备有限公司 DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱; 上海科导超声仪器有限公司 SK2200LH 型台式超声波清洗器; 上海摩勒生物科技有限公司摩尔分析系列超纯

水机; 天津市泰斯特仪器有限公司 FW100 型高速万能粉碎机; 上海精密科学仪器有限公司 TG328 型光电分析天平; 日本岛津公司 UV-2450 型紫外-可见分光光度计等。②试剂。芦丁对照品购自中国医药 (集团) 上海化学试剂公司, 生化试剂, 纯度 ≥ 99.9%; 无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 贯叶连翘总黄酮的提取与分离。精确称取一定量干燥粉碎后的贯叶连翘粉末, 按一定液固比 (固定液体体积为 100 ml) 加入不同体积浓度的乙醇溶液, 在设定的微波功率下加热提取一定时间, 取出提取液, 以 4 000 r/min 转速离心分离 15 min 后取上清液 1 ml 定容, 然后对贯叶连翘中的总黄酮类化合物含量进行测定。而在考察提取次数对总黄酮得率的影响时, 提取和分离步骤如下, 将第 1 次提取液离心分离后的下层残留物在同样条件下提取 2 次, 取各次上清液进行总黄酮含量的测定。

1.2.2 正交优化提取工艺。根据课题组前期的单因素试验结果和相关研究结果, 选取主要影响总黄酮得率的微波功率、提取时间、液固比、乙醇浓度 4 个因素进行正交试验, 正交试验设计选用 $L_9(3^4)$ 正交表, 并以贯叶连翘总黄酮得率为考察指标, 系统考察 4 个因素对总黄酮得率的影响程度, 以确定微波辅助提取贯叶连翘总黄酮的最佳工艺条件^[10-11]。微波辅助提取贯叶连翘总黄酮的正交试验因素和水平安排如表 1 所示。

1.2.3 总黄酮含量测定。①标准曲线的绘制。精密称取 120℃ 烘至恒重的芦丁标样 10 mg, 置于 50 ml 棕色容量瓶中, 加入 30% 乙醇溶液适量, 振摇使溶解, 并稀释至刻度, 所得对照品溶液中芦丁标样含量为 0.2 mg/ml。然后精密量取对照品溶液 0、0.5、1.0、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 ml 分别置于

基金项目 湖南省自然科学基金资助项目 (07JJ3017); 湖南省教育厅优秀青年科研基金项目 (06B089)。

作者简介 王小华 (1963-), 男, 湖南郴州人, 工程师, 从事生物、化学及药学方面的实验教学与科研工作。*通讯作者。

收稿日期 2009-02-16

表1 正交试验设计

Table 1 Factors and level designs of orthogonal test

水平 Levels	液固比(A) V/W Liquid- solid ratio	乙醇浓度 (B) // % Ethanol concentration	微波功率 (C) // W Microwave power	提取时间(D) // min Extraction time
1	20:1	50	350	5
2	30:1	60	450	10
3	40:1	70	550	15

10 ml 量瓶中,各加 30% 乙醇溶液至 5 ml,加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 ml,摇匀,放置 6 min,加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 ml,摇匀,放置 6 min,加 4% 氢氧化钠溶液 4 ml,加 30% 乙醇溶液至刻度,摇匀,放置 15 min 后,以相应的溶液为空白,用分光光度法在 510 nm 的波长处测定吸收度,以吸收度为纵坐标,芦丁标样浓度为横坐标,绘制标准曲线,用最小二乘法,以芦丁溶液浓度 C 与吸光值 A 进行线性回归,得到回归方程和相关系数。芦丁标准溶液浓度分别为 10.00、20.00、40.00、50.00、60.00、70.00、80.00 $\mu\text{g/ml}$ 的吸收度分别为 0.122、

0.226、0.436、0.542、0.646、0.753、0.856。②贯叶连翘总黄酮含量测定。取上清提取液 1 ml 于 25 ml 容量瓶中定容后,精确吸取 1 ml 溶液,以同样方法操作后,在 510 nm 处测定吸光值,代入所得回归方程计算出提取液中总黄酮的含量,并计算总黄酮的含量,贯叶连翘总黄酮提取率 = (提取液中总黄酮的含量/原料的质量) $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 标准曲线绘制结果 建立的以芦丁标样为含量的标准回归曲线方程为 $A = 0.0105C + 0.0165$,相关系数为 $r = 0.9995$,测定方法在 10.00 ~ 80.00 $\mu\text{g/ml}$ 有良好的线性关系,符合黄酮类化合物含量测定要求。

2.2 正交试验结果 由表 2 可知,各因素对贯叶连翘黄酮得率的影响程度大小顺序为液固比(A) > 乙醇浓度(B) > 提取时间(D) > 微波功率(C),其中,液固比对提取率影响最为显著,设定的微波炉功率最小。而最佳的提取工艺条件组合为 $A_2B_3C_2D_1$ 即微波提取最优条件为:液固比 30:1、乙醇浓度

表2 正交试验结果

Table 2 Result of orthogonal test and range analysis

试验序号 Test number	液固比(A) Liquid-solid ratio	乙醇浓度(B) Ethanol concentration	微波功率(C) Microwave power	提取时间(D) Extraction time	黄酮得率//% Extracting yield
1	1	1	1	1	3.63
2	1	2	2	2	4.17
3	1	3	3	3	4.40
4	2	1	2	3	4.61
5	2	2	3	1	5.22
6	2	3	1	2	5.63
7	3	1	3	2	3.71
8	3	2	1	3	4.38
9	3	3	2	1	4.91
K_1	12.20	11.95	13.64	13.76	
K_2	15.46	13.77	13.69	13.51	
K_3	13.00	14.94	13.33	13.39	
R	3.26	2.99	0.36	0.37	

70%、微波功率 450 W、微波加热时间 5 min。

2.3 最佳工艺条件验证试验 在优化组合 $A_2B_3C_2D_1$ 条件下,进行 3 次平行验证性试验,以考察最佳条件的合理性和可靠性,最佳工艺条件的验证结果是总黄酮平均得率为 6.02%, RSD 为 0.17%。在优化条件下,3 次测量结果均优于正交试验表中的任何一组,而且 3 次试验数据十分接近,说明通过该提取工艺基本稳定,适合于提取贯叶连翘总黄酮。所以最佳条件 $A_2B_3C_2D_1$ 是合理的。

2.4 提取次数对总黄酮得率的影响 提取 1 ~ 3 次的总黄酮得率分别为 6.02%、0.98%、0.21%,可见,提取 2 次后,贯叶连翘总黄酮得率已下降到 0.98%,考虑到提取时间和成本,选取提取次数为两次是经济、科学的。

2.5 不同提取方法的比较 以 70% 乙醇为提取剂,微波辅助提取、超声辅助提取和索氏提取的贯叶连翘总黄酮含量分别为 6.02%、6.01%、6.00% 时。试验结果表明,微波辅助提取 5 min 与索氏提取 4 h 和超声波提取 1 h 的得率相当,说明微波法是提取贯叶连翘中黄酮类化合物最为理想的方法。

3 结论

微波辅助提取法用于提取贯叶连翘中黄酮类化合物既

省时、高效又利于产物分离,是一种适合贯叶连翘黄酮提取的新方法。影响贯叶连翘中总黄酮得率的主要因素有微波功率、微波加热时间、液固比、乙醇浓度、提取次数。试验结果表明,微波辅助提取贯叶连翘总黄酮的最佳提取工艺条件为微波功率 450 W,微波提取时间 5 min、液固比 30:1、乙醇浓度 70%、提取次数两次。在最佳提取工艺条件下,贯叶连翘黄酮得率可达 6.00% 以上。而在其他条件一致的情况下,微波辅助提取 5 min 时,总黄酮的得率与索氏提取 4 h、超声提取 1 h 所的结果相当,说明微波提取具有快速、节能的优势,值得推广应用。

参考文献

- [1] 殷志琦,叶文才,赵守训. 国产贯叶连翘化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报,2002,31(4):15-17.
- [2] 吴敏,王霞,许平. 贯叶连翘的研究进展[J]. 中成药,2004,26(9):74-77.
- [3] 胡冬华,高颖,邵琛,等. 贯叶连翘有效成分金丝桃素与 HIV 逆转录酶相互作用的研究[J]. 分子科学学报,2008,24(4):280-283.
- [4] 刘钟栋. 微波技术在食品工业中的应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998:1-22.
- [5] GAIKAR V G, DANDEKAR D V. Microwave assisted extraction of curcuminoids from *Curcuma longa* [J]. Separation Science and Technology, 2002,11(6):2669-2690.

(下转第 6509 页)

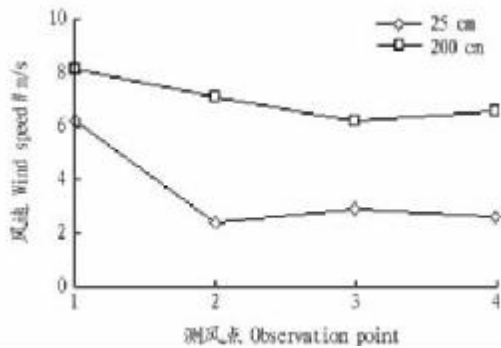


图3 多道高立式柳条沙障对不同高度风速的影响

Fig.3 The effect of multiple high-banded wicker sand barriers on wind speed at different heights

条沙障地表粗糙度,结果显示:多道高立式柳条沙障前旷野地表粗糙度为 0.032 3 cm,障内 2~4 测风点地表粗糙度分别为 8.549 9、4.252 5 和 7.761 6 cm,平均为 6.854 7 cm(图 4)。障内地表粗糙度较旷野地表粗糙度增加了 212.2 倍,反映出高立式柳条沙障对下垫面性质影响显著,障内地表静风区高度较高,该高度完全能够响应障外风速增加而造成的地表粗糙度降低的变化,使下垫面保持相对稳定状态,同时能够有效沉降上风侧外来流沙,实现对固沙带的保护功能,进一步促进植被恢复。

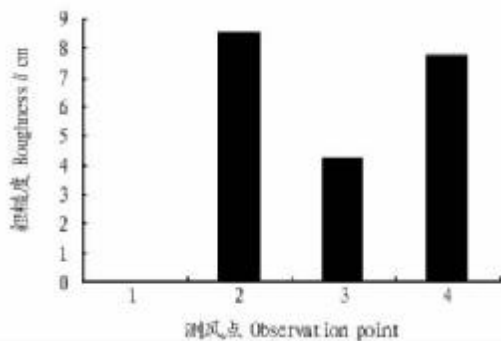


图4 多道高立式柳条沙障对地表粗糙度的影响

Fig.4 The effect of multiple high-banded wicker sand barriers on surface roughness

3.3.2 多道高立式柳条沙障防风效能。由图 5 可见,多道高立式柳条沙障 25 cm 高处的防风效能值平均为 57.35%,最大值 60.90% 出现于气流由旷野进入沙障后不久的测风点 2,但与测风点 3、4 防风效能平均值接近。气流进入沙障后不久 25 cm 高处风速明显下降,由旷野平均风速 6.19 m/s 依次于各测风点降低为 2.42、2.89 和 2.61 m/s,平均降低至

2.64 m/s。200 cm 高处的防风效能值平均为 18.57%,最大值 23.86%,出现于沙障带中测风点 3,即第一道沙障后 18 m 中心处,200 cm 高处平均风速由旷野的 8.13 m/s,依次降低为 7.11、6.19 和 6.56 m/s,平均为 6.62 m/s。

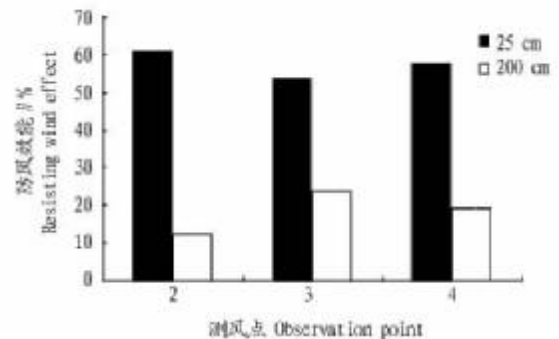


图5 多道高立式柳条沙障不同观测点防风效能的变化

Fig.5 The change of resisting wind effects of multiple high-banded wicker sand barriers in different observation points

测量时 2 m 高处旷野最高风速为 12.6 m/s,平均风速为 8.1 m/s,经过 9 道沙障后 0.25 m 高处平均风速由 6.2 m/s 降至 2.6 m/s,地表防风效能达 58.1%。近地表风速(距地面 0.25 m)明显下降,多道高立式柳条沙障降低风速效果显著,地表粗糙度和防风效能明显增加。高立式柳条沙障起到了阻聚风沙的作用。

4 结论

(1) 浑善达克沙地公路沙害防治疏透型高立式柳条沙障枝条密度为 25~30 根/m、地面以上平均高 150 cm 左右,风沙流通过多道沙障组成的阻沙带,地表风速降低 50% 以上,将地表流沙阻滞在高立式柳条沙障阻沙带内。

(2) 根据平缓的沙地不同密度沙障风速变化和阻风效果比较分析,单道高立式柳条沙障在 3H 和 5H 处的阻风效果显著,7H 的防护效果明显减弱,所以在平缓沙地,有效防护距离为大于 5H、小于 7H。

(3) 起伏的流动沙丘、半流动沙坡在起伏的流动沙丘、半流动沙坡,高立式柳条沙障设置沙障间距应取 2.5~4.0 m。

参考文献

(上接第 6432 页)

[6] 陈伟,刘清梅,杨性民,等.微波技术在杜仲黄酮提取工艺中的应用[J].食品科学,2006,27(10):285-288.
 [7] 吕丽爽,潘道东.微波对葡萄籽中低聚原花青素提取的影响[J].食品与机械,2004,20(6):31-32,51.
 [8] 赵功玲,娄天军,赵大克,等.微波酶法对提取番茄红素效率的影响研究[J].食品与机械,2004,20(1):8-10.

[1] 吴正.风沙地貌学[M].北京:科学出版社,1987.
 [2] 李青丰,胡春元,王明玖.浑善达克地区生态环境劣化原因分析及治理对策[J].干旱区资源与环境,2001,15(3):9-16.
 [3] 胡春元,杨茂,杨存良.库布齐沙漠穿沙公路沙害防治技术[J].干旱区资源与环境,2002,16(3):71-77.
 [4] 左合君,董智.沙漠地区高速公路工程防沙体系效益分析[J].水土保持研究,2005,12(6):222-225.
 [5] 高永,邱国玉,丁国栋,等.沙柳沙障的防风固沙效益研究[J].中国沙漠,2004,24(3):365-370.

[9] 梁艳,应苗苗,吕英华,等.微波辅助提取仙人掌多糖的工艺研究[J].农业工程学报,2006,22(7):159-162.
 [10] 李焱,金美芳.微波法提取银杏黄酮的新工艺[J].食品科学,2002,23(2):39-41.
 [11] 张梦军,张建锋,李伯玉,等.微波辅助提取甘草黄酮的研究[J].中成药,2002,24(5):334-336.