

正交试验鱼腥草中总黄酮超声提取工艺

王顺齐 王滢赛 罗睿琳 魏宇萱 李文瑄 王湏 张曼*
天津天狮学院医学院

DOI:10.12238/bmtr.v6i3.7489

[摘要] 总黄酮是指植物中的黄酮化合物的总和,它是评价植物药用价值的重要指标之一。本试验以95%乙醇为溶剂,研究料液比、乙醇浓度、时间和温度等因素对超声提取鱼腥草中总黄酮得率的影响。通过正交试验得出影响超声提取鱼腥草总黄酮得率因素大小顺序为:料液比>温度>时间>浓度,最佳实验条件为A2B3C3D2。结果显示:乙醇浓度为70%,料液比1:10,用超声波温度60℃、超声频率40KHz条件下处理45min,得到鱼腥草中总黄酮含量得率为2.068%。该工艺简单、成本低且高效,为后续研究鱼腥草中总黄酮的提取提供参考价值。

[关键词] 鱼腥草; 总黄酮; 正交试验; 超声提取

中图分类号: R445.1 文献标识码: A

Ultrasonic Extraction Technology of Total Flavonoids from *Houttuynia Cordata* was Tested by Orthogonal Method

Shunqi Wang Yingsai Wang Ruilin Luo Yuxuan Wei Wenxuan Li ZhenWang Man Zhang*
School of Medicine, Tianjin Tiens University

[Abstract] Total flavonoids refer to the sum of flavonoid compounds in plants, which is one of the important indicators to evaluate the medicinal value of plants. In this experiment, 95% ethanol was used as solvent to study the effects of the ratio of material to liquid, ethanol concentration, time and temperature on the yield of total flavonoids in *Houttuynia cordata* by ultrasonic extraction. The order of factors affecting the yield of total flavonoids in *Houttuynia cordata* by ultrasonic extraction was as follows: solid-liquid ratio > temperature > time > concentration, and the optimal experimental condition was A2B3C3D2. The results showed that the yield of total flavonoids in *Houttuynia cordata* was 2.068% when the concentration of ethanol was 70%, the ratio of solid to liquid was 1:10, the ultrasonic temperature was 60℃ and the ultrasonic frequency was 40KHz for 45min. This process is simple, low cost and efficient, which provides reference value for the subsequent research on the extraction of total flavonoids from *Houttuynia cordata*.

[Key word] *Houttuynia cordata*; Total flavonoids; Orthogonal experiment; Ultrasonic extraction

鱼腥草为三白草科植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的新鲜全草或干燥地上部分,目前已被国家卫生部正式确定为“既是药品,又是食品”的极具开发潜力的资源之一。据《中国药典》所记载,鱼腥草具有清热解毒、消痈排脓、利尿通淋等功效,临床上用于治疗肺痈吐脓、痰热喘咳、热痢、热淋、痈肿疮毒等疾病。鱼腥草的主要成分有黄酮、挥发油、酚酸、萜类、生物碱等,现代药理研究表明鱼腥草中黄酮类化合物具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、抗诱变和清除自由基等功能^[1]。

超声提取法主要利用超声波在介质中的机械振动及空化作用,加速鱼腥草中黄酮类化合物进入溶剂,从而达到提高黄酮提取率的目的^[2]。本文研究了不同超声条件对鱼腥草总黄酮提取效果的影响程度,确定最适的超声提取条件,为后续超声提取鱼

腥草总黄酮得率的相关实验提供理论依据。

1 材料、仪器与方法

1.1 材料与试剂

鱼腥草购自修年堂(产地:安徽);芦丁标准液(上海如吉生物科技有限公司,纯度>98%,Lot:230808);蒸馏水;95%乙醇;三氯化铁购自天津市风船化学试剂科技有限公司;亚硝酸钠购自阿法埃莎(天津)化学有限公司;氢氧化钠、硝酸铝等为分析纯。

1.2 主要仪器

TD6002C型电子天平购自天津天马衡基仪器有限公司;KC-500型中药材粉碎机购自北京开创同和科技发展有限公司(转速:25000r/min,电压:220V);JP-040S型超声波清洗器购自深圳市洁盟清洗设备有限公司;DHG-9140A型电热鼓风干燥箱购自

上海一恒科学仪器有限公司;UH5300型紫外可见分光光度计(天美公司)。

2 试验方法

2.1 鱼腥草醇提液的制备

将于60℃烘箱中干燥3h的鱼腥草在中药材粉碎机中粉碎,称取40.00g鱼腥草粉末放入烧杯,加入合适量95%乙醇摇匀溶解,浸泡10min。放入超声波清洗器中,处理完成后趁热过滤,弃去滤渣,转入25mL容量瓶中,用95%乙醇溶液定容至刻度。

2.2 黄酮类化合物的鉴别

黄酮类化合物的鉴别常常利用显色反应进行观察,其显色反应主要可分为还原反应和金属盐类试剂的络合反应。还原反应最常用到的是盐酸-镁粉(或锌粉)反应,其次是四氢硼钠(钾)反应。金属盐类试剂主要为铝盐、铅盐及三氯化铁的反应。这些物质可与黄酮化合物上特定部位发生反应,从而产生特定的显色现象,利用显色反应观察颜色变化即可进行黄酮化合物的定性分析。

本试验选择三氯化铁反应鉴别黄酮类化合物,多数黄酮类化合物含有酚羟基,FeCl₃水溶液或醇溶液作为酚类显色剂可与酚羟基发生反应,使反应呈现阳性^[5],出现颜色变化,故选用FeCl₃鉴别黄酮。

操作方法:用95%乙醇稀释2mL鱼腥草醇提液至一定浓度,置于试管中加FeCl₃醇溶液1~2滴,观察溶液颜色。(根据试管中颜色变化为浅绿色,可推断该成分可能为黄酮类成分。)

2.3 芦丁标准曲线的制定

配置梯度浓度溶液:吸取芦丁标准液0.2ml, 0.5ml, 1.0ml, 2.0ml, 3.0ml, 4.0ml, 5.0ml, 6.0ml分别置于25ml量瓶中,各加水至6ml。

将5%NaNO₂试液、10%Al(NO₃)₃试液、5%KOH试液分别加入配置好的梯度浓度溶液中,在500nm下测定吸光度,以芦丁浓度(C)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线见图1。

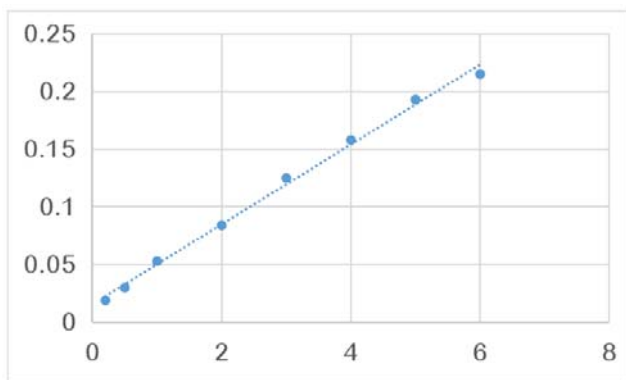


图1 芦丁标准曲线

以吸光度和浓度为单位计算出回归方程: $A=0.0346C+0.0157$ ($R^2=0.9958$),证明线性关系良好,结果的可信度较高。

通过该步骤得到的回归方程,将后续测定得到的样品稀释液的吸光度数值代入下列公式即可得到鱼腥草中总黄酮的得率。

总黄酮得率(%)=(C×V×稀释倍数)×100/M(其中C:标准液浓度,mg·mL⁻¹;V:样品体积,mL;M:称取样品质量,mg。)^[3]

2.4 乙醇浓度单因素考察

分别取3g干燥鱼腥草粉末于五个250ml烧杯中,各加入30mL不同浓度(50%、60%、70%、80%、90%)的乙醇溶液浸泡(料液比1:10)^[1],温度设置为40℃,控制超声时间为15min,超声波功率为40W,提取鱼腥草中的黄酮类化合物,滤液转入100ml容量瓶定容至刻度。用紫外可见分光光度计测定其吸光度,并根据所计算的总黄酮得率大小,确定三个最佳乙醇浓度梯度数值,用于后续设计正交试验乙醇浓度水平。

2.5 正交试验设计

以乙醇浓度A、提取时间B、提取温度C、料液比D因素进行正交试验^[1],取三个水平四个因素,用L₉(3⁴)正交表,见表1。

表1 鱼腥草醇提总黄酮条件正交水平与因素表

水平因素	乙醇浓度(C)	超声时间(min)	提取温度(°C)	料液比(w/v)
1	60%	15	40	1:5
2	70%	30	50	1:10
3	80%	45	60	1:15

3 结果与讨论

3.1 单因素考察结果分析

随着乙醇浓度的变化,得到总黄酮率如图2所示,随着乙醇浓度的不断增大,总黄酮得率也随之增加,但当乙醇浓度达到70%时,再加大乙醇浓度,总黄酮得率呈现下降趋势,原因是在一定的乙醇浓度范围内,黄酮类化合物的溶出速率逐渐提高,但当乙醇浓度超过70%时,鱼腥草中的其他脂溶性物质也会随之溶解出来,影响黄酮的提取,导致黄酮的提取率降低,证明并非乙醇浓度越大得率越高^[4]。根据表对应总黄酮率显示,三个最佳乙醇浓度梯度应取60%、70%、80%。

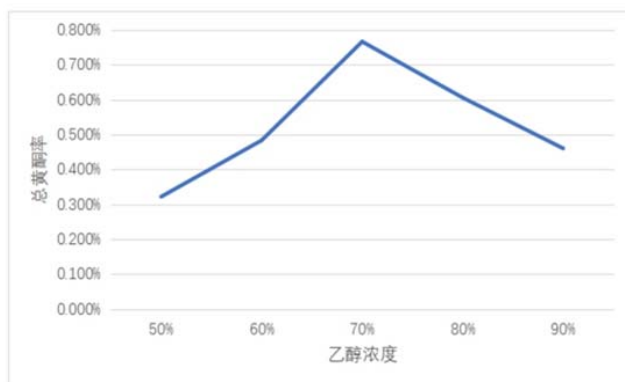


图2 不同乙醇浓度提取的总黄酮得率

3.2 正交试验结果分析

鱼腥草超声提取总黄酮正交试验结果及分析见表2:

表2 正交试验结果分析表

乙醇浓度	50%	60%	70%	80%	90%
总黄酮率	0.322%	0.484%	0.766%	0.606%	0.461%

试验序号	料液比	乙醇浓度	提取时间	提取温度	黄酮总含量
1	(1: 5)	60	15	40	1.886%
2	(1: 5)	70	30	50	2.063%
3	(1: 5)	80	45	60	2.059%
4	(1: 10)	60	45	50	1.936%
5	(1: 10)	70	15	60	2.064%
6	(1: 10)	80	30	40	2.050%
7	(1: 15)	60	30	60	1.938%
8	(1: 15)	70	45	40	2.061%
9	(1: 15)	80	15	50	1.913%
K1	1.91	2	1.96	2	
K2	2.06	2.01	2.01	1.97	
K3	2.03	1.98	2.02	2.02	
R	0.042	0.0002	0.0022	0.0004 6	

根据极差分析,四个因素对鱼腥草总黄酮提取效果影响的主次因素顺序为D(料液比)>C(提取温度)>B(提取时间)>A(乙醇浓度),最佳工艺条件为:A2B3C3D2。

3.3 验证实验

根据正交试验所确定的最优提取方案A2B3C3D2,重复试验结果显示鱼腥草中总黄酮得率为2.068%,实测结果与预测结果接近,具有一定可行性。

4 结果与讨论

通过对料液比、提取温度、提取时间、乙醇浓度等因素的考察,对鱼腥草中黄酮类化学成分的超声提取条件进行研究,发现提取时的料液比对黄酮得率影响最大,提取温度次之,再者是提取时间,提取浓度对黄酮得率的影响最小。通过正交试验得出,在60℃下,用10倍的70%的乙醇浓度超声45min为鱼腥草总黄酮类化合物的最佳提取条件。

超声提取工艺可以缩短提取所需的时间,通过合理的试验设计还可避免高温对黄酮化合物的破坏,该工艺可广泛用于黄酮化合物的提取上。通过试验可得知鱼腥草中总黄酮含量受多因素影响,提取方法的不同可直接导致黄酮得率的变化。本文对超声辅助提取鱼腥草进行实验分析,为后续对鱼腥草的深度开发提供理论基础。

[基金项目]

天津市级大学生创新创业训练计划资助项目(202310859022)。

[参考文献]

[1]黄明才,韦国兰,龙杰凤,等.超声波辅助提取鱼腥草总黄酮的工艺研究[J].凯里学院学报,2021,39(03):29-33.

[2]陈安利,马卓.鱼腥草中黄酮类化合物的研究进展[J].中药与临床,2021,12(02):74-78.

[3]黄春花,马泽刚,李帅.鱼腥草根茎中总黄酮提取工艺优化试验[J].化学工程师,2022,36(12):92-96.

[4]马娟娟,范海峰.鱼腥草黄酮类化合物提取、纯化及抗氧化研究[J].现代食品,2022,28(18):145-149.

[5]叶春,徐丽娟,杨根勤,等.鱼腥草叶总黄酮含量的测定及鉴别[J].中国食品添加剂,2007,(05):143-147.

作者简介:

王顺齐(2004--),男,汉族,河南省驻马店人,本科生,从事生药学方面研究。