

梵净山七叶一枝花总黄酮提取工艺的优化

王 岚^{1,2}, 吴定军^{1,3}, 鲁道旺^{1,2}

(¹铜仁学院 生物科学与化学系; ²梵净山野生动植物资源保护与利用研究中心; ³梵净山特色动植物资源重点实验室;
贵州 铜仁 554300)

摘要:【目的】优化梵净山七叶一枝花总黄酮提取工艺,为其综合开发与利用提供技术支持。【方法】以梵净山七叶一枝花为材料,通过单因素试验和正交试验,考察料液比、乙醇体积分数、浸提温度和浸提次数对七叶一枝花总黄酮提取效果的影响。【结果】影响七叶一枝花总黄酮提取的因素顺序为:乙醇体积分数>料液比>浸提次数>浸提温度,其最佳提取工艺条件为:料液比1:15,乙醇体积分数90%,浸提温度70℃,浸提3次。在最佳工艺条件下,提取获得的七叶一枝花总黄酮含量为4.92 mg/g。【结论】乙醇超声波浸提法具有稳定性好、成本较低、易操作等特点,可有效提取获得七叶一枝花总黄酮。

关键词: 七叶一枝花; 总黄酮; 提取工艺; 优化; 正交试验; 梵净山

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 2095-1191(2014)04-0634-05

Optimization on extraction of total flavonoids from *Paris polyphylla* in Fanjing Mountain

WANG Lan^{1,2}, WU Ding-jun^{1,3}, LU Dao-wang^{1,2}

(¹Department of Biological science and Chemistry, Tongren University; ²Research Center of the Conservation and Utilization of Wildlife Resources in Fanjing Mountain; ³Key Laboratory of Special Animal and Plant Resources in Fanjing Mountain: Tongren, Guizhou 554300, China)

Abstract: 【Objective】The extraction process of total flavonoids from *Paris polyphylla* in Fanjing Mountain was optimized to provide technical support for the comprehensive development and utilization. 【Method】*Paris polyphylla* in Fanjing Mountain was used as materials. Single factor experiment and orthogonal test were conducted to investigate the effects of liquid-material ratio, ethanol volume, extracting temperature and times on the extraction of total flavonoids from *Paris polyphylla*. 【Result】The results showed that the order of factors influencing total flavonoids extraction was ethanol volume>liquid-material ratio>times>extracting temperature. The optimal process conditions were ethanol volume of 90%, liquid-material ratio of 1:15, extraction temperature of 70℃ and extracting times of 3. Under those optimal conditions, total flavonoids content was 4.92 mg/g. 【Conclusion】The method of ethanol ultrasonic extraction is stable, low cost, and accessible, hence it can be adopted for extracting total flavonoids from *Paris polyphylla*.

Key words: *Paris polyphylla*; total flavonoids; extraction process; process optimization; orthogonal test; Fanjing Mountain

0 引言

【研究意义】七叶一枝花(*Paris polyphylla*)为百合科重楼属多年生草本植物,属于珍稀濒危植物(王诗云等,1995),在我国云南、广西、贵州等地均有分布。七叶一枝花药用历史悠久,具有止血、抗菌和抑菌等

药理作用(边洪荣等,2002),民间主要用于治疗各种疮毒及毒蛇咬伤,目前还广泛用于研制抗病毒颗粒、抗病毒冲剂、热毒清等中药制剂(张伟,2011)。因此,研究七叶一枝花的药用成分及优化提取工艺,对其药用开发与利用具有重要意义。【前人研究进展】袁晓等

收稿日期:2013-10-11

基金项目:贵州省教育厅创新人才团队项目(黔教合KY[2012]08);贵州省教育厅特色实验室建设项目(黔教合KY[2011]232);贵州省教育厅青年项目(黔教科[2010]082);铜仁市科技局科研项目(铜市科研[2013]9-5号)

作者简介:王岚(1983-),主要从事药用植物学及植物生理生态教学与科研工作,E-mail: 407602077@qq.com

(2004)利用分光光度计、高效液相色谱仪和等离子光谱仪对华中地区珍稀药用植物七叶一枝花根茎的化学成分进行分析,结果显示,薯蓣皂甙元含量为0.62%,黄酮含量为0.0628%,总游离氨基酸含量为0.33%。崔艳(2006)使用硅胶柱层析、大孔吸附树脂层析等分离方法从七叶一枝花根茎部分提取分离得到 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ 、 $\text{C}_{57}\text{H}_{104}\text{O}_6$ 、25R-薯蓣皂苷元- α -L-鼠李吡喃糖基-(1 \rightarrow 2)- α -L-阿拉伯吡喃糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、薯蓣皂苷元等6个纯净化合物。李焘(2011)对比分析了滇重楼与七叶一枝花化学成分及生物活性,发现两者的化学成分基本一致,但各组分相对含量存在差异。梁玉勇等(2012)采用HPLC-UV测定来源于贵州省不同产地的七叶一枝花中9种甾体皂苷含量,结果表明,独山产地的七叶一枝花中甾体皂苷含量最高(9.62%),其次为铜仁产地(6.39%),含量最低的是遵义产地的七叶一枝花(0.99%)。王岚等(2013)采用紫外分光光度法对不同生长年限梵净山七叶一枝花的总黄酮含量进行测定,结果表明,不同生长年限的七叶一枝花,其总黄酮含量不同,且呈生长年限越长总黄酮含量越高的变化趋势。【本研究切入点】目前,已证实七叶一枝花的有效成分主要有薯蓣皂甙元、黄酮、游离氨基酸和微量元素,但有关梵净山七叶一枝花总黄酮提取工艺的研究鲜见报道。【拟解决的关键问题】通过单因素试验和正交试验对梵净山珍稀药用植物七叶一枝花总黄酮提取工艺进行优化,确定最佳提取工艺条件,为铜仁梵净山七叶一枝花资源的综合开发和利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

七叶一枝花采自梵净山保护林区内,将其洗净、切碎后置于70℃烘箱中烘干,粉碎过40目筛备用。试验试剂包括:芦丁(天津市光复精细化工有限公司)、无水乙醇(天津市富宇精细化工有限公司)、亚硝酸钠(成都金山化学试剂有限公司)、硝酸铝(天津市恒兴化学试剂制造有限公司)、氢氧化钠(天津石英钟厂霸州市化工分厂),均为国产分析纯。主要仪器设备有:T6新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、AR124CN电子天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司]、DHG-9140A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)、80-2离心机(江苏金坛市中大仪器厂)、SG5200HPT型台式超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 总黄酮提取工艺 称取样品粉末1.000 g置于100.0 mL三角瓶中,以一定体积分数的乙醇为浸提试

剂,在一定温度下超声浸提30 min,3000 r/min离心10 min;取上清液置于100.0 mL容量瓶中,加入0.05 g/mL亚硝酸钠0.4 mL,放置6 min后加入0.10 g/mL硝酸铝0.4 mL,放置6 min;再加入0.04 g/mL氢氧化钠4.0 mL,用蒸馏水定容至100.0 mL,摇匀,放置15 min后在分光光度计510 nm波长处测定吸光值。

1.2.2 标准曲线绘制 以芦丁为标准品,采用比色法测定总黄酮含量(张志良等,2009),标准曲线见图1。标准曲线方程为 $y=0.0823x-0.0033$, $R^2=0.9993$ 。

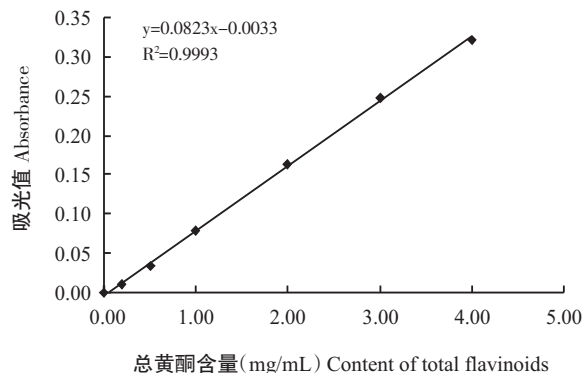


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 Standard curve of rutin

1.2.3 提取工艺优化 精确称取七叶一枝花1.000 g若干份,分别对料液比(1:5、1:10、1:20、1:30、1:40)、乙醇体积分数(40%、50%、60%、70%、80%、90%)、浸提温度(40、50、60、70、80℃)、浸提次数(1、2、3次)进行单因素试验。然后在单因素试验的基础上进行正交试验,以确定总黄酮最佳提取工艺条件。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 料液比选择 由图2可知,七叶一枝花总黄酮提取量随着料液比降低而呈先升高后降低的变化趋势,当料液比为1:10时,总黄酮提取量最高,为4.17 mg/g。因此,确定提取七叶一枝花总黄酮的最佳料液比为1:10。

2.1.2 乙醇体积分数选择 从图3可以看出,随着乙醇体积分数的增加,七叶一枝花总黄酮提取量呈先增后减的变化趋势,当乙醇体积分数为80%时提取效果最佳,70%乙醇和90%乙醇的提取效果次之。因此,确定80%乙醇为七叶一枝花总黄酮提取最佳浸提溶剂。

2.1.3 浸提温度选择 由图4可知,随着浸提温度的升高,七叶一枝花总黄酮提取量总体上呈逐渐增加趋势。当浸提温度为70℃时,总黄酮提取量最高,为3.10 mg/g;但浸提温度继续升高,提取的总黄酮量略有下降。因此,确定提取七叶一枝花总黄酮的最佳浸提温度为70℃。

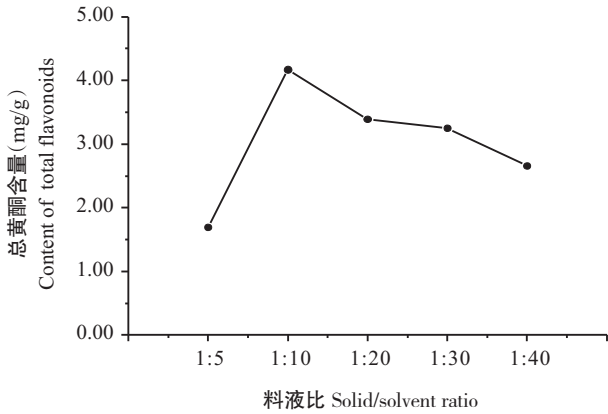


图 2 料液比对七叶一枝花总黄酮提取效果的影响
Fig.2 Effects of solid/ solvent ratio on extraction efficiency of total flavonoids

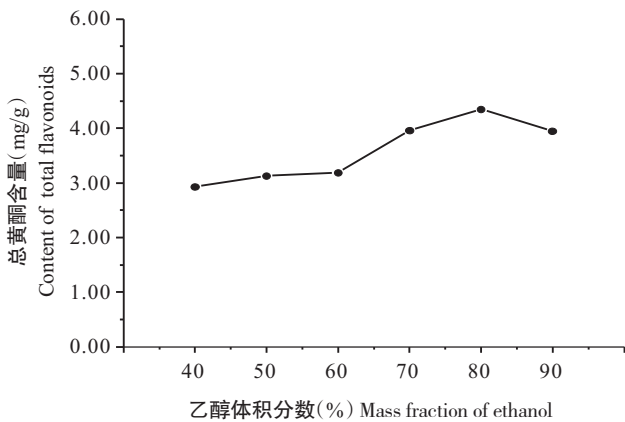


图 3 乙醇体积分数对七叶一枝花总黄酮提取效果的影响
Fig.3 Effects of volume fraction of ethanol on extraction efficiency of total flavonoids

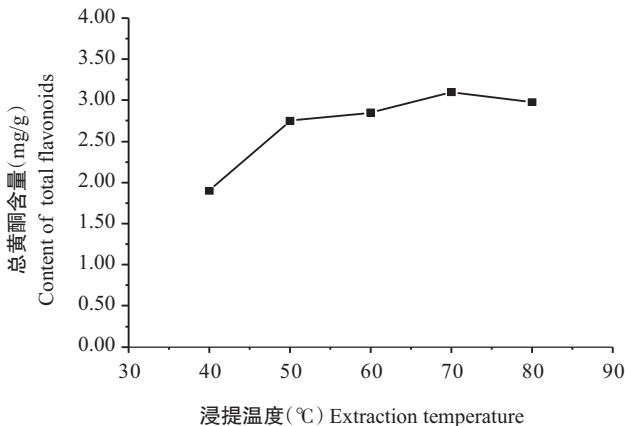


图 4 浸提温度对七叶一枝花总黄酮提取效果的影响
Fig.4 Effects of extraction temperature on extraction efficiency of total flavonoids

2. 1. 4 浸提次数选择 由图5可知,浸提1次时,七叶一枝花总黄酮含量为2.37 mg/g;浸提两次,总黄酮含量为3.90 mg/g,提取效果明显增加;浸提3次时,总黄酮含量达3.93 mg/g,提取效果增长不明显。综合考虑

提取能耗和时间,确定浸提两次为梵净山七叶一枝花总黄酮的最佳浸提次数。

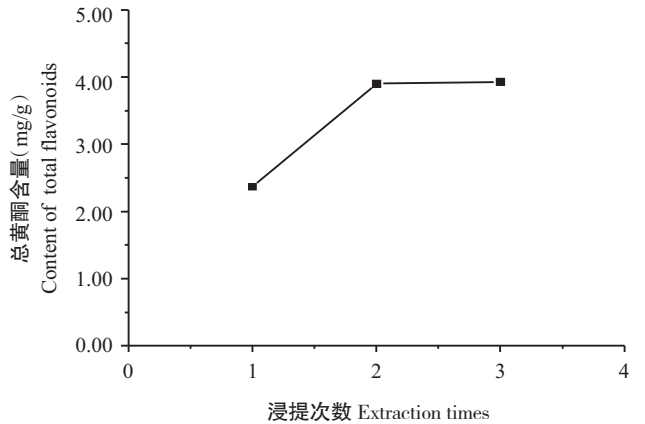


图 5 浸提次数对七叶一枝花总黄酮提取效果的影响
Fig.5 Effects of extraction times on extraction efficiency of total flavonoids

2. 2 正交试验结果

在单因素试验的基础上,选择上述4因素3水平进行L₉(3⁴)正交试验,通过正交分析确定七叶一枝花总黄酮最佳提取工艺条件,试验因素及水平见表1。

表 1 正交试验的因素及水平

水平 Level	因素 Factor			
	A:料液比 (g/mL) Solid/solvent ratio	B:乙醇体 积分数(%) Volume fraction of ethanol	C:浸提 温度(°C) Extraction temperature	D:浸提 次数 Extraction times
1	1:5	70	60	1
2	1:10	80	70	2
3	1:15	90	80	3

由表2可知,各因素及其水平对七叶一枝花总黄酮提取效果的影响表现出一定差异,4个因素的影响顺序为:B>A>D>C,即影响七叶一枝花总黄酮提取的主要因素是乙醇体积分数,其次是料液比和浸提次数,最后是浸提温度;其最佳工艺组合为A₃B₃C₂D₃,即最佳提取工艺条件为:料液比1:15,乙醇体积分数90%,浸提温度70 °C,浸提3次。

2. 3 验证试验结果

为验证工艺组合A₃B₃C₂D₃是否为最佳提取工艺,特进行3次平行试验。从表3可以看出,在A₃B₃C₂D₃组合工艺条件下,七叶一枝花总黄酮提取效果最佳,平均总黄酮含量为4.92 mg/g,高于正交试验中的任一设计组合,说明正交试验结果可靠。

3 讨论

黄酮类化合物在植物界广泛存在,是植物在自然选择中产生的次级代谢产物,现已发现4000余种,主

表 2 正交试验结果

Tab.2 Orthogonal test results

试验号 Number	A:料液比(g/mL) Solid/ solvent ratio	B:乙醇体积分数(%) Volume fraction of ethanol	C:浸提温度(℃) Extraction temperature	D:浸提次数 Extraction times	总黄酮含量(mg/g) Content of total flavonoids
1	1	1	1	1	1.56
2	1	2	2	2	2.76
3	1	3	3	3	4.40
4	2	1	2	3	2.86
5	2	2	3	1	1.80
6	2	3	1	2	4.37
7	3	1	3	2	3.03
8	3	2	1	3	2.99
9	3	3	2	1	4.85
k1	2.907	2.483	2.973	2.737	
k2	3.010	2.517	3.490	3.387	
k3	3.623	4.540	3.077	3.417	
R	0.716	2.057	0.517	0.680	

表 3 验证试验结果

Tab.3 Verification test results

样品 Sample	样品 质量(g) Weight	总黄酮含量(mg/g) Content of total flavonoids	平均值(mg/g) Average value	RSD(‰)
1	1.0000	4.91	4.92	2.033
2	1.0001	4.93		
3	1.0001	4.92		

要存在于植物的叶、果实、根和皮中(罗群等,2013)。黄酮可有效清除人体内自由基,具有抗衰老、抗肿瘤、改善血液循环和降低胆固醇等功效(黄晓兵等,2012),近年有关天然黄酮类化合物的生物学作用及其医用价值已引起人们的高度重视,如枣果黄酮(宋琳琳等,2010)、刺梨黄酮(刘畅等,2010)、葛根韧皮黄酮(张雁等,2010)、杨梅树皮黄酮(董悦涵,2011)、芒果叶黄酮(许晓鑫等,2012)、石榴皮黄酮(罗群等,2013)、甘蔗叶黄酮(赖秀娟等,2013)等。

本研究通过单因素试验和正交试验对七叶一枝花总黄酮提取工艺条件进行优化,结果表明,影响七叶一枝花总黄酮提取因素的顺序为:乙醇体积分数>料液比>浸提次数>浸提温度,与张雁等(2010)对葛根韧皮部总黄酮的提取结果一致。在单因素试验中,最佳提取料液比为1:10,乙醇体积分数为80%,而正交试验结果表明,最佳提取料液比为1:15,乙醇体积分数为90%,可能由于两提取因素间的交互作用不同,而导致提取效果不同,其具体原因有待进一步研究。

本研究确定七叶一枝花总黄酮的最佳提取工艺条件为:料液比1:15,乙醇体积分数90%,浸提温度70℃,浸提3次。在最佳工艺条件下提取获得的七叶一枝花总黄酮含量为4.92 mg/g。本研究仅对料液比、乙醇体积分数、浸提温度和浸提次数4个因素进行初步探究,而影响总黄酮的提取还有其他因素,如浸提时间、浸提试剂、超声波功率等,因此今后需对这些影响

因素进行综合研究。

4 结论

乙醇超声波浸提七叶一枝花总黄酮的最佳工艺条件为:料液比1:15,乙醇体积分数90%,浸提温度70℃,浸提3次,在此提取工艺条件下七叶一枝花总黄酮提取量为4.92 mg/g。该提取工艺具有稳定性好、成本较低、易操作等特点,可为梵净山七叶一枝花资源的开发与利用提供技术支持。

参考文献:

- 边洪荣, 李小娜, 王会敏. 2002. 重楼的研究及应用进展[J]. 中药材, 25(3):218-220.
- Bian H R, Li X N, Wang H M. 2002. Research and application progress of *Paris polyphylla*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 25(3):218-220.
- 崔艳. 2006. 中药七叶一枝花某些活性成分化学结构研究[D]. 北京:北京化工大学.
- Cui Y. 2006. Study on chemical structure of some active constituents of *Paris polyphylla* Smith[D]. Beijing:Beijing University of Chemical Technology.
- 董悦涵. 2011. 杨梅树皮提取物中总黄酮快速分析方法研究[J]. 南方农业学报, 42(10):1263-1266.
- Dong Y H. 2011. Development of method for quick analysis of flavonoids in bark extract of *Myrica rubra*[J]. Journal of Southern Agriculture, 42(10):1263-1266.
- 黄晓兵, 林丽静, 周瑶敏, 唐永富, 冉旭, 李积华. 2012. 响应面法超声提取龙眼核黄酮工艺的优化[J]. 江西农业学报, 24(4):116-119.
- Huang X B, Lin L J, Zhou Y M, Tang Y F, Ran X, Li J H. 2012. Optimization of ultrasonic extraction technology of flavonoids from longan (*Dimocarpus longan*) seed by response surface methodology[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 24(4):116-119.
- 赖秀娟, 蓝丽华, 尹茵. 2013. 甘蔗叶黄酮类成分的抗致龋菌

- 活性研究[J]. 广西科学, 20(3):261-263.
- Lai X J, Lan L H, Yin Y. 2013. Study on anticaries activity of flavonoids in sugarcane leaves[J]. Guangxi Sciences, 20(3):261-263.
- 李焘. 2011. 滇重楼与七叶一枝花化学成分及生物活性的研究[D]. 西安:陕西师范大学.
- Li T. 2011. Chemical components and biological activity of *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. and *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University.
- 梁玉勇, 刘振, 高文远, 满淑丽. 2012. HPLC 测定贵州不同产地的七叶一枝花中 9 种甾体皂苷的含量[J]. 中国中药杂志, 37(15):2309-2312.
- Liang Y Y, Liu Z, Gao W Y, Man S L. 2012. Determination of nine steroidal saponins in *Paris polyphylla* from different areas of Guizhou Province by HPLC[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 37(15):2309-2312.
- 刘畅, 王秋红, 方波, 彭丽. 2010. 刺梨黄酮提取工艺研究[J]. 食品工业, (1):52-54.
- Liu C, Wang Q H, Fang B, Peng L. 2010. Study on extraction of flavonoids from *Rosa Roxburghii* Tratt[J]. Food Industry, (1):52-54.
- 罗群, 李洁, 黄春萍. 2013. 石榴皮总黄酮超声波提取工艺的优化[J]. 南方农业学报, 44(9):1529-1533.
- Luo Q, Li J, Huang C P. 2013. Optimizing ultrasonic extraction process of total flavones from pomegranate peel[J]. Journal of Southern Agriculture, 44(9):1529-1533.
- 宋琳琳, 成元刚, 路源. 2010. 超声波法对枣果中总黄酮提取工艺的优化[J]. 贵州农业科学, 38(11):222-224.
- Song L L, Cheng Y G, Lu Y. 2010. Optimization of extraction technology of total flavonoids from jujube by ultrasonic wave method[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 38(11):222-224.
- 王岚, 陈仕学, 姚元勇. 2013. 梵净山七叶一枝花总黄酮含量测定[J]. 安徽农学通报, 19(20):25-28.
- Wang L, Chen S X, Yao Y Y. 2013. Determination for total flavones quantity in the *Paris Polyphylla* in Fanjing Moun-
tain[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 19(20):25-28.
- 王诗云, 赵子恩, 彭辅松. 1995. 华中珍稀濒危植物及其保存[M]. 北京:科学出版社.
- Wang S Y, Zhao Z E, Peng F S. 1995. Conservation of Rare and Endangered Plants in Central China[M]. Beijing: Science Press.
- 许晓鑫, 黄咸洲, 王芳. 2012. 微波辅助提取芒果叶总黄酮的工艺研究[J]. 南方农业学报, 43(12):2051-2055.
- Xu X X, Huang X Z, Wang F. 2012. Study on total flavonoids extraction from *Mangifera indica* L. leaves through the microwave-assisted extraction method[J]. Journal of Southern Agriculture, 43(12):2051-2055.
- 袁晓, 袁萍, 严海燕, 李建强, 袁友明. 2004. 野生珍稀药用植物七叶一枝花的成分含量分析[J]. 武汉植物学研究, 22(6):575-577.
- Yuan X, Yuan P, Yan H Y, Li J Q, Yuan Y M. 2004. Analysis on the constituents of wild rare Chinese medicinal plant *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara [J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 22(6):575-577.
- 张伟. 2011. 七叶一枝花 GAP 林下种植和人工促繁栽培技术研究[J]. 林业调查规划, 36(6):125-129.
- Zhang W. 2011. Understory planting and artificial promoting cultivation techniques of *Paris polyphylla* [J]. Forest Inventory and Planning, 36(6):125-129.
- 张雁, 池建伟, 魏振承, 唐小俊. 2010. 葛根韧皮部总黄酮提取工艺及其抗氧化作用初探[J]. 食品工业, (3):12-15.
- Zhang Y, Chi J W, Wei Z C, Tang X J. 2010. Study on extraction conditions and antioxidative activity of total flavones from *Puerariae radix liber* [J]. Food Industry, (3):12-15.
- 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 2009. 植物生理学实验指导[M]. 第4版. 北京:高等教育出版社.
- Zhang Z L, Qu W J, Li X F. 2009. Experimental Guide for Plant Physiology[M]. 4th Edition. Beijing: Higher Education Press.

(责任编辑 兰宗宝)