

# 超声波辅助提取鸭跖草中总黄酮的工艺优化<sup>Δ</sup>

潘冬梅<sup>1,2\*</sup>, 张巧萍<sup>2</sup>, 沈斌<sup>2</sup>, 卓娟娟<sup>2</sup>, 李向荣<sup>3#</sup> (1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 杭州市中医院, 杭州 310007; 3. 浙江大学城市学院药学系, 杭州 310015)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0976-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.35

**摘要** 目的: 优化超声波辅助法提取鸭跖草中总黄酮成分的工艺。方法: 采用单因素试验考察不同乙醇体积分数、料液比、超声时间、超声温度对鸭跖草总黄酮含量的影响。在此试验确定的各因素较佳水平的基础上, 以总黄酮含量为指标进行L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验设计, 优选超声波提取鸭跖草的工艺条件并进行验证, 同时与传统醇回流法(2 h)比较。结果: 超声波辅助提取总黄酮的最优工艺为25倍药材量的70%乙醇于70℃提取30 min。超声波辅助提取鸭跖草中总黄酮的含量为52.51 mg/g, 而传统醇回流法提取总黄酮含量为32.34 mg/g。结论: 超声波辅助提取鸭跖草在提取时间和效果方面明显优于传统醇回流法, 更适用于工业化生产。

**关键词** 鸭跖草; 总黄酮含量; 工艺优化; 超声波辅助提取; 正交试验

## Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction Technology of Total Flavonoids from *Commelina communis*

PAN Dong-mei<sup>1, 2</sup>, ZHANG Qiao-ping<sup>2</sup>, SHEN Bin<sup>2</sup>, ZHUO Juan-juan<sup>2</sup>, LI Xiang-rong<sup>3</sup> (1. College of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Hangzhou Hospital of TCM, Hangzhou 310007, China; 3. Dept. of Pharmacy, Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize ultrasonic-assisted extraction technology of total flavonoids from *Commelina communis*. METHODS: The effects of different concentrations of ethanol, solid-liquid ratio, ultrasonic time and temperature on the content of total flavonoids from *C. communis* were investigated by single factor test. Using the content of total flavonoids as index, the extraction technology of *C. communis* was optimized by L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal experiment and validated on the basis of the results of single factor test, and then compared with traditional ethanol reflux method (2 h). RESULTS: The optimal condition was as follows: 25-fold 70% ethanol, extracting for 30 min at 70 °C. The content of total flavonoids by ultrasonic-assisted extraction technology from *C. communis* was 52.51 mg/g, while the content of total flavonoids extracted by traditional ethanol reflux method was 32.34 mg/g. CONCLUSIONS: The ultrasonic-assisted extraction is obviously superior to traditional ethanol reflux method on extracting time and effects, and it is suitable for industrialized production.

**KEYWORDS** *Commelina communis*; Total flavonoids contents; Technology optimization; Ultrasonic-assisted extraction; Orthogonal test

鸭跖草(*Commelina communis* L.)是鸭跖草科鸭跖草属植物, 别名竹节草、蓝花菜, 主要分布于热带, 少数种产于亚热带和温带地区; 中国产13属49种, 多分布于长江以南各省, 尤以西南地区为盛<sup>[1-2]</sup>。鸭跖草含黄酮、生物碱、多糖、有机酸等多种天然成分<sup>[3-4]</sup>, 具有抑菌<sup>[5]</sup>、抗炎<sup>[6]</sup>、抗氧化<sup>[7]</sup>、镇痛<sup>[8]</sup>、降血糖<sup>[9]</sup>等药理作用; 此外, 鸭跖草还具有清热、解毒、利尿作用, 为消肿利尿、清热解暑之良药, 对麦粒肿、咽炎、扁桃腺炎、宫颈糜烂、腹蛇咬伤也有良好的疗效<sup>[10]</sup>。

超声波提取黄酮是利用超声波具有的机械效应、空化效应及热效应, 通过增加递质分子的运动速度, 增强递质的穿透力以提取中药有效成分的方法, 具有省时、节能、提取效率高、溶剂用量少、避免常规提取法对热敏性物质的破坏等优点<sup>[11]</sup>。为改进和提高鸭跖草中总黄酮的提取工艺, 笔者采用超声波辅助法提取鸭跖草中总黄酮, 探索其最佳的提取工艺条件, 并

与传统醇提取法对比提取效果。

## 1 材料

### 1.1 仪器

TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); KQ-700DB 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); FW135 粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

### 1.2 药材、药品与试剂

鸭跖草(浙江省中医药大学中药饮片有限公司, 批号: 140301); 芦丁对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100080-200707, 纯度: 92.5%); 试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 芦丁标准曲线的制备

精密称取干燥至恒质量的芦丁对照品 20.0 mg, 置于 100 ml 量瓶中, 加 60% 乙醇溶解, 定容至刻度, 摇匀制成质量浓度为 0.2 mg/ml 的对照品贮备液, 于冰箱中保存。分别准确吸取贮备液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 ml 至 10 ml 刻度试管中, 加 30% 乙醇至 5 ml, 各加入 5% 的亚硝酸钠 0.3 ml, 摇匀, 静置 6 min; 加入 10% 硝酸铝 0.3 ml, 混匀后静置 6 min; 加 4% 的氢氧化钠 4 ml, 用 30% 乙醇补充至刻度, 混匀静置 15 min, 制备成系列芦

Δ 基金项目: 浙江省中西医结合学会临床药学科专项(N0.2014LYK005)

\* 主管药师, 硕士研究生。研究方向: 天然药物化学。E-mail: meizil116@126.com

# 通信作者: 教授, 硕士生导师。研究方向: 天然药物的有效分离、分析及药理学。电话: 0571-88018761。E-mail: lixr@zucc.edu.cn

丁乙醇标准溶液。以试剂空白为参比,于510 nm波长处测定吸光度( $A$ ),以芦丁质量浓度( $c$ )为横坐标(mg/ml),以 $A$ 为纵坐标,进行线性回归,计算标准曲线方程<sup>[12]</sup>,得方程为: $A=11.190c-0.0009$ ( $R^2=0.9993$ )。结果表明芦丁检测质量浓度线性范围为0.002~0.01 mg/ml。取已知鸭跖草总黄酮含量的样品溶液2.0 ml,加入0.2 mg/ml的芦丁对照品溶液1.0 ml,测定总黄酮含量,平行操作6份,计算得平均回收率为98.15%( $RSD=1.38%$ , $n=6$ ),表明该方法对鸭跖草中总黄酮提取的准确度及精密度均较高。

## 2.2 鸭跖草样品的制备及总黄酮含量测定方法

将鸭跖草粉碎,过60目筛,于烘箱中50℃烘干。精密称取鸭跖草5.00 g,置于提取罐中,按一定的料液比加入乙醇溶液,用90 W超声波辅助提取一定时间。提取液真空抽滤,弃去固体残渣,滤液旋转蒸发浓缩并定容于100 ml量瓶中,测定并计算总黄酮含量: $K=c \times N \times V/m$ 。式中, $K$ 为鸭跖草总黄酮含量(mg/g), $c$ 为总黄酮质量浓度(mg/ml), $N$ 为提取液稀释倍数, $V$ 为样品液体积(ml), $m$ 为鸭跖草的质量(g)。所有试验重复3次,结果取平均值。

## 2.3 单因素试验及结果

超声波提取鸭跖草总黄酮,分别考察乙醇体积分数、料液比[鸭跖草的质量(g)与乙醇的体积(ml)之比]、超声时间、超声温度对鸭跖草总黄酮含量的影响,确定各单因素的最佳水平。

2.3.1 乙醇体积分数 准确称取鸭跖草5.00 g,在料液比为1:20、超声时间为30 min、超声温度为50℃条件下,用不同体积分数的乙醇溶液(40%、50%、60%、70%、80%)提取,考察乙醇体积分数对总黄酮含量的影响,结果见图1。

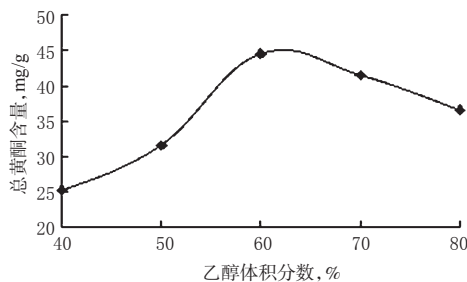


图1 乙醇体积分数对鸭跖草总黄酮含量的影响

Fig 1 Effect of ethanol concentration on the content of total flavonoids from *C. communis*

由图1可知,乙醇体积分数从40%提高到60%,鸭跖草的总黄酮含量逐渐增加,并在乙醇体积分数为60%时总黄酮含量达到最大值,这可能是提高乙醇体积分数后增加了溶剂对鸭跖草的渗透性,从而提高了黄酮的溶解度所致。随着乙醇体积分数的持续升高,总黄酮的含量下降,这可能是高体积分数乙醇使鸭跖草细胞内蛋白变性凝固、黄酮不易溶出所致。因此选择乙醇体积分数为50%、60%、70%进行正交试验。

2.3.2 料液比 准确称取鸭跖草5.00 g,在乙醇溶液体积分数为60%、超声时间为30 min、超声温度为50℃条件下,以料液比为变量(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30),考察料液比对总黄酮含量的影响,结果见图2。

由图2可知,随着料液比的增加,总黄酮含量增加,在1:25时达到最大值,这可能是料液比的增加使物料与溶剂的接触面积扩大,能使黄酮类物质充分溶出所致。随着料液比继续增加,总黄酮含量呈现出下降趋势,可能是由于料液比过大造

成杂质溶出过多所致。因此选择料液比1:20、1:25、1:30进行正交试验。

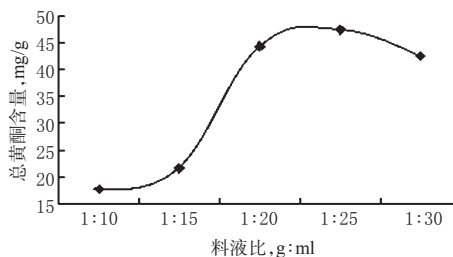


图2 料液比对鸭跖草总黄酮含量的影响

Fig 2 Effect of liquid-solid ratio on the content of total flavonoids from *C. communis*

2.3.3 超声时间 准确称取鸭跖草5.00 g,在乙醇体积分数为60%、料液比为1:20、超声温度为50℃条件下,以超声时间为变量(10、20、30、40、50 min),考察不同超声时间对总黄酮含量的影响,结果见图3。

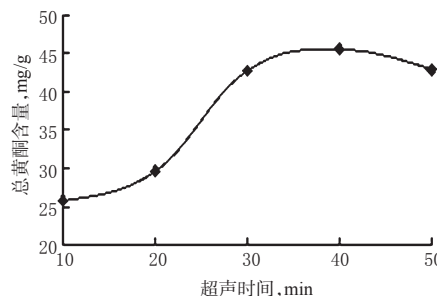


图3 超声时间对鸭跖草总黄酮含量的影响

Fig 3 Effect of ultrasonic time on the content of total flavonoids from *C. communis*

由图3可知,时间过短不利于黄酮溶出,但当时间达到40 min时,含量增加不明显,可能是黄酮已基本溶出、时间继续延长反而不利于黄酮的溶出所致。因此选择超声时间为30、40、50 min进行正交试验。

2.3.4 超声温度 准确称取鸭跖草5.00 g,在乙醇溶液体积分数为60%、料液比为1:20、超声时间为30 min下,以超声温度为变量(30、40、50、60、70℃),考察超声温度对总黄酮含量的影响,结果见图4。

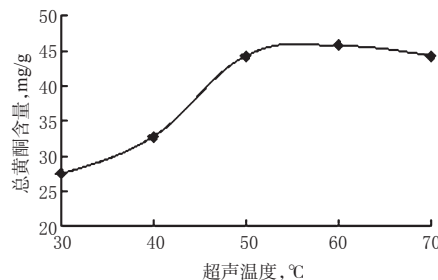


图4 超声温度对总黄酮含量的影响

Fig 4 Effect of ultrasonic temperature on the content of total flavonoids from *C. communis*

由图4可知,随着温度的升高,总黄酮含量也在增加;但是超过60℃后,含量开始下降,可能是温度过高影响了黄酮类化合物的结构稳定性所致。因此选择超声温度为50、60、70℃进行正交试验。

## 2.4 正交试验设计及结果

在单因素试验的基础上,综合考虑乙醇体积分数、料液比、超声时间、超声温度对总黄酮含量的影响,采用 $L_9(3^4)$ 设计正交试验<sup>[12]</sup>,如表1所示;正交试验结果见表2;方差分析见表3。

表1 正交试验因素与水平

Tab 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	乙醇体积分数, %	料液比, g:ml	超声时间, min	超声温度, °C
1	50	1:20	30	50
2	60	1:25	40	60
3	70	1:30	50	70

表2 正交试验安排与结果

Tab 2 Design and results of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

试验号	乙醇体积分	料液比	超声时间	超声温度	总黄酮含量, mg/g (平均值±标准差, n=3)	RSD, %
1	1	1	1	1	16.74±0.21	1.26
2	1	2	2	2	25.58±0.18	0.71
3	1	3	3	3	43.53±0.27	0.61
4	2	1	2	3	43.22±0.21	0.48
5	2	2	3	1	34.42±0.39	1.15
6	2	3	1	2	51.90±0.30	0.58
7	3	1	3	2	51.97±0.31	0.59
8	3	2	1	3	52.10±0.29	0.36
9	3	3	2	1	51.34±0.28	0.54
$K_1$	28.62	37.31	40.25	34.16		
$K_2$	43.18	37.37	40.05	43.15		
$K_3$	51.80	48.92	43.31	46.29		
R	23.18	11.61	3.26	12.13		

表3 正交试验方差分析

Tab 3 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F	P
乙醇体积分数	824.1	2	412.0	41.156	<0.05
料液比	268.3	2	134.2	13.401	
超声时间	20.02	2	10.01	1	
超声温度	237.6	2	118.8	11.867	

注:  $F_{0.01}(2, 2)=99, F_{0.05}(2, 2)=19, F_{0.1}(2, 2)=9$

Note:  $F_{0.01}(2, 2)=99, F_{0.05}(2, 2)=19, F_{0.1}(2, 2)=9$

经过极差和方差分析可知, 4种因素对鸭跖草总黄酮含量的影响顺序为: 乙醇体积分数为主要因素, 对试验结果影响显著( $P<0.05$ ); 料液比和超声温度次之, 超声时间影响不大。经综合考虑, 确定最佳提取工艺为乙醇体积分数为70%, 料液比为1:25, 超声时间为30 min, 超声温度为70 °C。

## 2.5 验证试验

精密称取鸭跖草粉末5.00 g, 共5份, 按以下条件提取: 乙醇体积分数为70%, 料液比为1:25, 超声时间为30 min, 超声温度为70 °C, 测得鸭跖草提取液中平均总黄酮含量为(52.51±0.23)mg/g (RSD=0.42%, n=5)。因此, 确定超声波提取鸭跖草总黄酮的最佳工艺为25倍量70%乙醇于70 °C提取30 min, 该工艺稳定、可靠。

## 2.6 与传统醇回流法比较

精密称取同一批鸭跖草粉末5.00 g, 按上述最优乙醇体积分数和料液比, 回流2 h, 过滤, 同法再操作1次; 合并提取液, 过滤, 回收乙醇, 并浓缩提取液至100 ml。按“2.2”项下方法测定溶液质量浓度, 计算得鸭跖草提取液中的总黄酮含量为32.34 mg/g。因此, 超声波辅助法与传统醇回流法相比, 提取

效率高出62.37%, 故采用超声波辅助法提取鸭跖草中的总黄酮, 提取时间短、效率高、损失少。

## 3 讨论

我国地域辽阔, 鸭跖草作为一种药食两用植物, 在国内大部分省区均有分布, 自然资源比较丰富; 而且鸭跖草是一种无毒或低毒的中草药, 近年来被临床广泛应用。合理应用鸭跖草依赖于对其作用机制的深入研究, 但是迄今未见对其比较系统的研究报道, 因此在其作药用时缺少比较明确的指导。本试验研究鸭跖草总黄酮提取的最优工艺条件, 可为其进一步的药理学和药剂学研究奠定基础, 为临床应用提供更广泛科学的试验依据, 以及为该药的进一步开发利用提供参考。

黄酮类化合物具有很强的抗氧化、抗炎等作用, 其化合物的提取逐渐成为热门主题。提取方法有很多, 尤其近年来有许多新方法、新技术涌现, 比如超临界流体提取法、仿生提取技术等, 提取效率不断提高。本试验采用超声波辅助法提取, 通过单因素试验和正交试验, 确定了鸭跖草总黄酮提取的最佳工艺条件。试验结果表明, 用传统醇提取需要2 h, 而超声波提取只需30 min即可完成, 提取黄酮的含量也比传统醇提取更高, 且节能, 其优越性显而易见。超声波提取鸭跖草总黄酮具有工艺稳定性好、操作简单、生产成本低等优点, 如果能适当放大至工业生产, 则能大大提高生产效率和生产效益; 而且其生产线组成较简单, 安全可靠。因此, 本试验为完善鸭跖草药材的质量标准及鸭跖草的开发利用提供了科学依据, 也为以后大规模的工业化生产提供了基础研究的试验数据。

## 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 126-132.
- [2] Grabile M, Davina JR, Honfi AL. Chromosomes of four species of *Commelina* (Commelinaceae) [J]. *Bot J Linn Soc*, 2005, 148 (2): 207.
- [3] 南海函, 林函, 蔡诗庆. 鸭跖草化学成分的研究[J]. *中成药*, 2010, 32(9): 1 556.
- [4] 王兴业, 李剑勇, 李冰, 等. 中药鸭跖草的研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(4): 652.
- [5] 陆风, 紫苏和鸭跖草的抗菌活性的研究[J]. *中国民族民间医药杂志*, 2009, 18(17): 22.
- [6] 康明芹. 鸭跖草黄酮类的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2008: 1-82.
- [7] 陈丛瑾, 王琪, 李欣. 黄酮类化合物抗氧化和抑菌生物活性研究进展[J]. *中国药房*, 2011, 22(35): 3 346.
- [8] 袁红娥, 周兴栋, 孟令杰. 鸭跖草的化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(19): 3 304.
- [9] Shibano M, Baba K. The potential to reduce postprandial hyperglycemia of *Commelina communis* vat. *hoensis* [J]. *Foods & Food Ingrid Jpn*, 2004, 209(6): 465.
- [10] 罗开梅, 黄轶群, 曹芳, 等. 莴苣总黄酮抗氧化活性研究[J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(6): 507.
- [11] 陶峰, 李向荣, 占洁. 黄酮醇类化合物提取分离方法的研究进展[J]. *中药材*, 2008, 31(10): 1 586.
- [12] 高丽威, 李向荣. 微波萃取法提取紫心甘薯总黄酮及其抗氧化活性研究[J]. *浙江大学学报: 理学版*, 2009, 36(5): 571.

(收稿日期: 2014-07-04 修回日期: 2014-12-08)

(编辑: 刘 萍)