

马兰总黄酮提取工艺优化及不同部位含量测定*

郑和权,周守标,朱肖锋,刘寿峰,刘 坤

(安徽师范大学生命科学学院 重要生物资源保护与利用安徽省重点实验室,安徽 芜湖,241000)

摘 要 以马兰全株为材料运用超声波辅助法进行黄酮类化合物的提取,采用正交试验法分析比较乙醇体积分数、料液比例、水浴温度和提取时间对总黄酮提取量的影响。结果表明:各因素的影响大小依次为:提取温度>乙醇体积分数>提取时间>料液比例;马兰中总黄酮提取的最佳工艺为,乙醇体积分数 75%,料液比例(g:mL) 1:30,水浴温度 70℃,提取时间 90min,在该工艺下测得马兰总黄酮含量为 16.452%;从 3 月~7 月,马兰同一部位总黄酮含量存在显著差异性($P<0.05$),7 月份达最高值,叶为 37.076%;茎次之,为 8.501%;根最少,为 4.314%。同时,同一月份中马兰不同部位总黄酮含量也存在显著差异性($P<0.05$),其中叶中总黄酮含量最高。

关键词 马兰,总黄酮,不同部位,超声提取

黄酮类化合物是一组存在于植物体中的天然次级代谢产物,在自然界中分布广泛,少部分以游离形式存在,大部分与蔗糖合成苷类,以配基的形式存在。含有黄酮类化合物的植物种类很多,如甘草^[1]、春花胡枝子^[2]、红薯^[3]、马兰^[4]等植物。研究表明,黄酮类化合物是一种重要的抗氧化剂,具有较强的药理作用,如芦丁、槲皮素等能够增强心脏收缩;杜鹃素具有止咳祛痰作用;黄芩苷具有抗菌消炎、抑制肿瘤细胞作用;水飞蓟素具有保肝作用等^[5];此外,黄酮类化合物还具有降血脂、止血、抑制血小板聚集等多种药理作用。因此,黄酮类化合物已成为国内外医药界研究的热点之一,是具有广泛开发与应用前景的天然药物成分^[6]。

马兰(*Kalimeris indica*),又名马兰头,属菊科(Compositae)马兰属(*Kalimeris*)多年生草本植物,嫩茎叶常作蔬菜食用,生殖期一般在 6~10 月,全草可入药,具有较高的药用价值。马兰广泛分布于我国东部、中部、西部、南部以及东北以南地区^[7]。研究表明^[8,9],马兰营养成分丰富,富含大量矿质元素、维生素、氨基酸等,是一类兼具营养与保健的野生蔬菜。目前,国外对马兰的研究不多,国内主要集中在组织培养^[10~14]、营养价值^[15,16]等方面,而在黄酮类化合物方面的研究较少。本试验主要对马兰总黄酮提取工艺及被测月份中马兰不同部位总黄酮含量差异进行了对比分析,旨在为马兰资源的进一步开发利用提供

理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

DFY-250 型摇摆式高速中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司),UV-3802 型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司),KQ-500DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),RE52-CS 旋转蒸发器,SHZ-Ⅲ型循环水真空泵,NW-15UF 分子生物型超纯水机。

1.2 试剂

定量滤纸,无水乙醇、乙醚、石油醚、NaOH、 NaNO_2 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、芦丁标品(国药集团化学试剂有限公司),以上试剂均为分析纯。实验以野生马兰全株为研究材料,分别于 2007 年 12 月、2008 年 3~7 月采自安徽师范大学赭山校区地理园内。

1.3 实验方法

有关黄酮的提取和测定方法有多种^[17,18]。本研究选用在一般条件下即可满足的提取和测定方法,并加以改进,以便在实际应用中能更好的加以推广。

1.3.1 提取工艺流程

采集马兰全株→洗净,分离各部位→105℃杀青 30 min→80℃恒温烘 24 h 后粉碎→过 40 目筛→索氏提取器中 45℃乙醚脱脂→挥发乙醚→超声波辅助提取(功率 500W,同一条件重复 3 次)→浓缩提取液→石油醚除杂→体积分数(下同)70%乙醇定容至 100 mL→黄酮提取液

1.3.2 马兰总黄酮含量测定

1.3.2.1 标准曲线绘制

第一作者:硕士研究生(周守标教授为通讯作者)。

*安徽省高校自然科学基金重点项目(2006kj060a)和安徽省重要生物资源保护与利用重点实验室、安徽省高校生物环境和生态安全重点实验室专项基金(2004sys003)资助

收稿日期:2008-09-09,改回日期:2008-10-15

取芦丁标品 50.00 mg,用 70%乙醇定容至 100 mL,再次用 70%乙醇配制成浓度分别为 0、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液,然后各取 2.00 mL 于试管中,加入 70%乙醇 22.80 mL,质量分数 5% Na_2NO_3 0.60 mL,充分摇匀后,静置 6 min,加入质量分数 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.60

mL,摇匀,静置 6 min,加入质量分数 4% NaOH 4.00 mL,摇匀,静置 10 min,以浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 并经一系列稀释后的稀释液为参比液于紫外可见分光光度计 510 nm 处测定吸光度(A),结果见表 1。根据表 1 得线性回归方程为: $C = 1\,123.9 A + 2.086\,8$, $R^2 = 0.998\,8$,相应标准工作曲线见图 1。

表 1 芦丁标准液吸光度

浓度(C)/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0	25	50	75	100	125	150	175	200	225	250
吸光度(A)	0	0.021	0.045	0.063	0.085	0.106	0.128	0.158	0.178	0.199	0.220

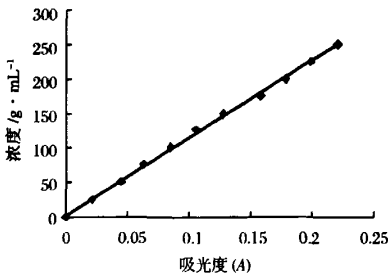


图 1 工作曲线

1.3.2.2 马兰总黄酮含量的测定

称取 4.00 g/份烘干至恒重的马兰粉末若干份,用滤纸包好,按 1.3.1 提取工艺流程进行提取。精密吸取提取液 2.00 mL 于试管中,对照组为 2.00 mL 蒸馏水,按 1.3.2.1 标准曲线绘制法测定马兰总黄酮提取液吸光度 A(见表 3),将测定的吸光度值代入回归方程,计算出样品液中总黄酮浓度。根据公式 $m = V \times V_2 \times C / V_1$,总黄酮质量百分含量/% = $(m/M) \times 100$,计算出马兰总黄酮质量百分含量。(V:马兰提取液总体积; V_1 :从总提取液中取出测吸光度的体积; V_2 : V_1 经稀释后的体积; C:根据回归方程算出的黄酮浓度; m:马兰中提取的总黄酮质量; M:烘干至恒重的马兰粉末质量。)

2 试验结果

2.1 正交试验设计

2.1.1 单因素提取条件选择

2.1.1.1 不同乙醇体积分数对黄酮提取量的影响

准确称取烘干至恒重的马兰粉末 4.000 g/份若干包,按料液比例 1:25 分别加入不同体积分数的乙醇,在 70℃ 恒温水浴下按 1.3.1 提取工艺流程提取 90 min,根据 1.3.2.2 中相应公式计算总黄酮含量平均值,得出乙醇体积分数对马兰总黄酮提取量的影响(图 2)。

由图 2 可知,乙醇体积分数低于 70% 时,随着体积分数的升高,总黄酮提取量明显提高;当乙醇体

积分数达到 70% 后,随着体积分数的增加,总黄酮提取量随之下降。这可能是乙醇体积分数较低时,一些蛋白质、糖类等水溶性物质大量溶出导致提取剂的粘度加大,使得黄酮类化合物扩散系数较低;当乙醇体积分数过高时,水溶性黄酮溶出减少而脂溶性杂质溶出增多并与脂溶性黄酮竞争溶剂,从而使黄酮提取量下降。故选择乙醇体积分数 60%~80% 作为进一步优化提取条件的浓度范围。

2.1.1.2 不同料液比例对黄酮提取量的影响

准确称取烘干至恒重的马兰粉末 4.000g/份若干包,分别按不同料液比例加入 70%乙醇,在 70℃ 下按 1.3.1 提取工艺流程提取 90 min,根据 1.3.2.2 中相应公式计算总黄酮含量平均值,得出料液比例对马兰总黄酮提取量的影响(图 3)。

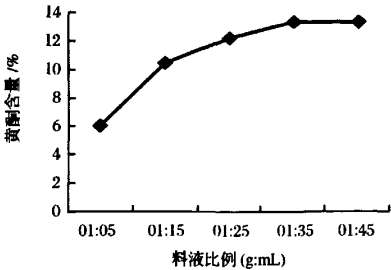


图 3 料液比例对马兰黄酮提取量的影响

由图 3 可知,随着料液比例的增大,黄酮的提取量明显增加,当料液比例达 1:25 时增幅变缓,至 1:35 后渐趋稳定。这可能是黄酮的溶出量已达到平

衡所致。故选择料液比例 1 : 20~1 : 35 作为进一步优化提取条件的料液比例范围。

2.1.1.3 不同提取温度对黄酮提取量的影响

准确称取烘干至恒重的马兰粉末 4.000 g/份若干包,按料液比例 1 : 25 加入 70%乙醇,分别在不同水浴温度下按 1.3.1 提取工艺流程提取 90 min,根据 1.3.2.2 中相应公式计算总黄酮含量平均值,得出温度对马兰总黄酮提取量的影响(图 4)。

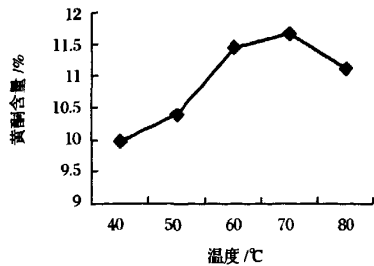


图 4 提取温度对马兰黄酮提取量的影响

分析图 4 可知,随着温度的升高,黄酮提取量随之增加;60~70℃ 温度范围黄酮提取量增幅变缓,70℃ 之后黄酮提取量明显下降。这可能是温度升高导致脂溶性杂质的溶出量加大,与黄酮竞争溶剂所致。故选择水浴温度 60~75℃ 作为进一步优化提取条件的温度范围。

2.1.1.4 不同提取时间对黄酮提取量的影响

准确称取烘干至恒重的马兰粉末 4.000 g/份若干包,按料液比例 1 : 25 加入 70%乙醇,在水浴温度 70℃ 中按 1.3.1 提取工艺流程提取不同时间,根据 1.3.2.2 中相应公式计算总黄酮含量平均值,得出提取时间对马兰总黄酮提取量的影响(图 5)。

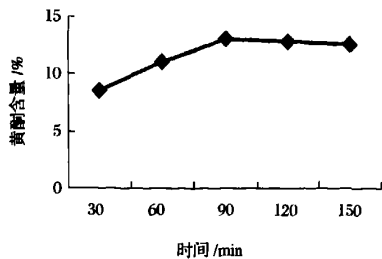


图 5 提取时间对马兰黄酮提取量的影响

由图 5 可知,随着提取时间的延长,黄酮提取量增加明显,但提取时间超过 90 min 后,黄酮提取量随时间逐渐下降。可能是黄酮的浸出率达到了动态平衡,黄酮氧化分解速度逐渐增加所致,故选择 60~105 min 作为进一步优化提取条件的时间范围。

2.1.2 正交试验结果

基于上述单因素条件对提取结果的影响,将水浴温度、料液比例、提取时间、乙醇体积分数作为主要影响马兰总黄酮提取量的因素,对黄酮提取工艺进行正交试验,并以总黄酮质量百分含量作为工艺优良的判断指标。正交试验中的因素、水平设置见表 2。根据设置选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表,试验方案设计及结果见表 3。

表 2 马兰黄酮超声提取因素水平表

水平	因 素			
	水浴温度 (A) /℃	料液比例 (B)(g : mL)	提取时间 (C)/min	乙醇体积分数 (D)/%
1	60	1 : 20	60	65
2	65	1 : 25	75	70
3	70	1 : 30	90	75
4	75	1 : 35	105	80

表 3 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计及测定结果

试验号	因 素				总黄酮含量 /%
	A	B	C	D	
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	7.110
2	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	9.570
3	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃	13.485
4	A ₁	B ₄	C ₄	D ₄	8.168
5	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃	10.588
6	A ₂	B ₂	C ₁	D ₄	7.906
7	A ₂	B ₃	C ₄	D ₁	10.014
8	A ₂	B ₄	C ₃	D ₂	10.498
9	A ₃	B ₁	C ₃	D ₄	12.809
10	A ₃	B ₂	C ₄	D ₃	12.968
11	A ₃	B ₃	C ₁	D ₂	12.695
12	A ₃	B ₄	C ₂	D ₁	10.123
13	A ₄	B ₁	C ₄	D ₂	8.336
14	A ₄	B ₂	C ₃	D ₁	10.332
15	A ₄	B ₃	C ₂	D ₄	10.850
16	A ₄	B ₄	C ₁	D ₃	10.305
K ₁	38.333	38.843	38.016	37.579	
K ₂	39.006	40.776	41.131	41.099	
K ₃	48.595	47.044	47.124	47.346	
K ₄	39.823	39.094	39.486	39.733	
T ₁	9.583	9.711	9.504	9.395	
T ₂	9.752	10.194	10.283	10.275	
T ₃	12.149	11.761	11.781	11.837	
T ₄	9.956	9.774	9.872	9.933	
R	2.566	2.050	2.277	2.442	

由表 3 中可以看出,第 3 号方案(A₁B₃C₃D₃)总黄酮提取量最高,分析后可知,各因素对总黄酮提取量影响的主次顺序为:提取温度>乙醇体积分数>提取时间>料液比例(即 A>D>C>B)。对比平均值(T)和极差值(R)得出马兰总黄酮超声辅助提取的最佳工艺条件是 A₃B₃C₃D₃,即当提取水浴温度为 70℃、料液比例为 1 : 30、提取时间为 90 min、乙醇体积分数

为 75% 时, 马兰中总黄酮提取量最高。但表 3 中的设计方案并不包含最佳提取条件 $A_3B_3C_3D_3$, 因此需要进行试验验证。按最佳提取工艺条件和 1.3.1 提取工艺流程再次重复提取 6 次, 试验结果见表 4。

由表 4 得知, 在 $A_3B_3C_3D_3$ 条件下总黄酮的提取量为 16.452%, 高于 $A_1B_3C_3D_3$ 条件下的提取量, 标准差仅为 0.339%。这表明由 $L_{16}(4^5)$ 正交试验得到的优化条件 $A_3B_3C_3D_3$ 来提取马兰中的总黄酮, 不仅

提取率高, 而且重复性好。

应用统计学分析软件进行方差分析(表 5)表明, 影响马兰中总黄酮提取量的水浴温度、料液比例、提取时间、乙醇浓度 4 个因素中, 水浴温度的影响最大, 乙醇浓度次之, 料液比例对马兰中总黄酮的提取量影响最小, 同时这 4 个因素对实验结果均有显著影响, 且 $F_A > F_D > F_C > F_B$, 这与 $L_{16}(4^5)$ 正交表中的直观分析结果相一致。

表 4 $L_{16}(4^5)$ 正交试验验证性试验结果

试验标号	1	2	3	4	5	6	平均值	标准差
吸光度值(Abs)	0.395	0.391	0.400	0.381	0.383	0.381	0.388	0.008
黄酮含量/%	16.726	16.557	16.937	16.136	16.220	16.136	16.452	0.339

表 5 $L_{16}(4^5)$ 正交试验方差分析

变异来源	平方和 SS	自由度 ν	均方 MS	F	临界值
A	17.347	3	5.782	16.412 *	
B	11.023	3	3.674	10.429 *	$F_{0.10}(3,3)=5.43$
C	11.986	3	3.995	11.340 *	$F_{0.05}(3,3)=9.28$
D	13.205	3	4.402	12.493 *	$F_{0.01}(3,3)=29.46$
误差	1.057	3	0.352		
总和	54.618	15			

注: 表 5 中“*”表示在该变异来源组下各数据之间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 不同月份马兰不同部位总黄酮含量

由上述正交试验得知马兰总黄酮的最佳提取工艺为: 水浴温度 70℃、料液比例 1:30、提取时间 90 min、乙醇体积分数 75%。运用此提取工艺按 1.3.1

流程(马兰各部位粉末为 2.000g/份)分别对马兰不同部位(根、茎、叶、花序)进行黄酮提取, 提取后按 1.3.2.2 测定法测定其总黄酮含量, 结果及数据分析见表 6。

表 6 不同月份马兰不同部位黄酮含量测定结果

月份	部 位			
	根	茎	叶	花序
3 月 26 日	1.701±0.037 ^{a(A)}	1.280±0.002 ^{a(A)}	10.411±0.264 ^{a(B)}	—
4 月 26 日	1.617±0.002 ^{a(A)}	4.370±0.007 ^{b(B)}	8.501±0.064 ^{b(C)}	—
5 月 26 日	1.533±0.002 ^{a(A)}	3.949±0.007 ^{c(B)}	7.601±0.073 ^{c(C)}	—
6 月 26 日	3.303±0.009 ^{b(A)}	4.718±0.005 ^{d(B)}	11.001±0.016 ^{d(C)}	—
7 月 26 日	4.314±0.002 ^{c(A)}	8.501±0.007 ^{e(B)}	37.076±0.064 ^{e(C)}	40.026±0.341 ^(d)

注: 表 6 中同一列数字后不同字母表示它们差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示没有统计学差异; 表中同一行数字后括号内不同字母表示它们差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示没有统计学差异; 表中“—”表示该部位在该月份未采集到。

如表 6 所示, 3~7 月份马兰不同部位中总黄酮含量多以叶含量最高(其中 7 月份为花序), 且不同部位黄酮含量均存在一定的差异性, 尤以叶与茎、根差异最为明显; 在不同月份中同一部位黄酮含量也有一定差异性, 试验周期中, 以 7 月份黄酮含量最高。

3 讨 论

3.1 正交试验因素选择

运用超声波辅助法提取黄酮类物质的正交试验中, 可供选择的因素较多。在提取剂方面, 常用水、乙

醇、甲醇、丙酮等。但由于甲醇、丙酮具有一定毒性, 且不适于大量应用, 乙醇作为一种极性适中、渗透性强、毒害小的有机溶剂被广泛用, 因此本研究中选择乙醇作为提取剂; 在提取温度方面, 尽管许多类似研究没有将温度作为影响黄酮提取的影响因素之一, 但大量有关黄酮提取方面的研究表明, 温度对其提取量有较大影响, 故本实验将温度作为正交试验因素之一; 在超声波功率上, 相关研究明确表明, 功率越高提取效率越高, 故本研究中不将超声功率作为正交试验因素。

3.2 工艺条件

对上述实验结果分析可知,超声波辅助法提取马兰总黄酮的最佳工艺条件为:料液比例 1:30,加入 75%乙醇溶液,70℃水浴温度下超声提取 90 min。

3.3 不同部位及不同月份黄酮含量变化

马兰植株总黄酮含量从部位分布来看,整个试验周期(3~7月),花序、叶含量均高于根、茎部分,由于马兰花期有限,且生物量较小,实际生产应用有限,故一般选择马兰叶进行黄酮提取,可达到高效、节能的功效。考虑到马兰花序黄酮含量较高,可以将其用于茶工艺、茶饮料生产应用中,具体应用工艺有待进一步研究。

对 3~7 月马兰总黄酮含量测定结果分析表明,马兰不同部位的总黄酮在不同月份间存在一定差异,6、7 月各部位的含量高于其他月份的相应部位。这种变化是否在全年的其他几个月份也同样存在,变化的具体机制有待于进一步的测定分析。

参 考 文 献

- 1 Hong B A I, Wei L I, Kazuo K O K E, et al. A novel bi-flavonoid from roots of glycyrrhiza uralensis cultivated in China [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2003, 51 (9):1095
- 2 陈乃东,周守标,王春景,等.春花胡枝子黄酮类化合物的提取及清除羟自由基作用的研究[J].食品科学,2007,28 (1):128~131
- 3 田迪英,杨荣华,王琪,等.红薯不同部位抑制亚硝化反应能力及总黄酮含量比较[J].食品与发酵工业,2007,33

(3):8~11

- 4 王贵军,胡娟,罗琦,等.马兰黄酮类化合物提取的研究[J].中国林副特产,2007,(2):13~14
- 5 肖常厚.中药化学[M].上海:上海科学技术出版社,1997.265
- 6 李莉,刘成梅,田建文,等.现代提取分析技术在黄酮类化合物中的应用[J].江西食品工业,2006,(4):42~44
- 7 安徽植物志协作组.安徽植物志(第4卷)[M].合肥:安徽科学技术出版社,1991.518~521
- 8 雷学仿,彭珊珊,张奇凤,等.马兰菜中的营养元素[J].广东微量元素科学,1999,6(10):64~66
- 9 许泳吉.野生植物马兰的营养成分[J].山东化工,2006,35(3):42~43
- 10 李岩,吴延军.野生山马兰的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2002,38(6):580
- 11 童妙君.野生蔬菜马兰头及其栽培要点[J].中国野生植物资源,2003,22(4):72~74
- 12 柳新红,刘跃钧.马兰人工栽培技术研究[J].林业科学研究,2005,18(5):595~600
- 13 刘跃钧,叶征鸾,徐东斌.马兰人工周年栽培技术[J].中国林副特产,2007,(1):34~36
- 14 石丽敏,陈劲枫,杨寅桂,等.野生蔬菜马兰的离体培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2007,43(1):133
- 15 雷学仿,彭珊珊,张奇凤,等.马兰菜中的营养元素[J].广东微量元素科学,1999,6(10):64~66
- 16 许泳吉.野生植物马兰的营养成分[J].山东化工,2006,35(3):42~43
- 17 李苗苗,于淑娟.黄酮类化合物现代分析方法概述[J].食品与发酵工业,2007,33(7):119~122
- 18 张岩,曹国杰,张燕,等.黄酮类化合物的提取以及检测方法的研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(1):154~157

Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoid and Determination of *Kalimeris indica* in Different Sections

Zheng Hequan, Zhou Shoubiao, Zhu Xiaofeng,
Liu Shoufeng, Liu Kun

(Key Laboratory of Biological Resources Conservation and Utilization, College of Life Science,
Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

ABSTRACT The total flavonoids of *Kalimeris indica* were extracted by the ultrasonic wave. At the same time, the orthogonal experiment was used to analyze the effects of alcohol concentration, material-solvent ratio, temperature and extraction time on the yield of total flavonoids. The order of the above four factors which affected extraction was temperature, alcohol concentration, extraction time and material-solvent ratio. The optimal conditions were 75% (volume fraction) alcohol solution, material-solvent ratio 1:30(g/mL), extraction temperature 70℃ and extraction time 90 minutes. The yield of the crude flavonoids was 16.452% (mass fraction). The content of total flavonoid showed a large difference in the same section of *Kalimeris indica* from March to July. The highest was in July, 37.076% was in leaves, 8.501% in stem, and 4.314% in roots. Certain difference also existed among different parts of *Kalimeris indica*, flavonoids ($P<0.05$) was found the highest in leaves.

Key words *Kalimeris indica*, total flavonoid, different section, ultrasonic extraction