

超声辅助提取裕丹参总黄酮工艺的优化

倪帆呈¹ 江喜梅² 李金贵¹ 杨双旭¹ 周炎花¹

1. 漳州科技职业学院 福建漳浦 363200

2. 南京融点食品科技有限公司 江苏南京 210000

摘要: 目的: 采用超声波提取法对裕丹参根黄酮类化合物提取工艺优化。方法: 采用分光光度法, 以裕丹参根为主要原材料, 以黄酮得率为主要指标, 并采用超声波辅助提取法的单因素、正交试验等方式, 确定了其最优工艺。结果: 优选条件: 料液比 (m/v): 1: 10, 提取温度: 50℃, 时间: 40 min, 乙醇体积分数: 50%。此最佳条件下, 裕丹参总黄酮的得率达4.81%。结论: 超声辅助下提取裕丹参总黄酮法, 可行、快速、可靠、高效。

关键词: 超声波; 裕丹参; 总黄酮; 提取

Optimization on Ultrasonic-assisted Extraction of the Total Flavonoids from *Salvia miltiorrhiza* Bge

Fan-cheng Ni¹, Xi-mei Jiang², Jing-gui Li¹, Shuang-xu Yang¹, Yan-hua Zhou¹

1. Zhangzhou College of Science&Technology, Zhangpu Fujian, China 363200

2. Nanjing Rongdian Food Technology Co., Ltd, Nanjing Jiangsu, China 211399

Abstract: Objective: Ultrasonic-assisted extraction of the total flavonoids from *Salvia miltiorrhiza* Bge. root. **Methods:** Using *Salvia miltiorrhiza* Bge roots as the main ingredients, the yield of its flavonoids as the main evaluation indicator via single factor test. Orthogonal tests were utilized to obtain the optimum parameters of the technology. **Results:** The best technical conditions for *Salvia miltiorrhiza* Bge total flavonoids extraction was obtained as follows: the extraction solvent is ethanol, ratio of raw materials and solution is 1g:10 mL, temperature is 50℃, action time is 23 min, ethanol volume fraction is 50%. The highest extraction rate reaches to 4.81%. **Conclusion:** The ultrasonic-assisted extraction process of the total flavonoids from *Salvia miltiorrhiza* Bge is optimized by orthogonal test. The method is feasible, fast, reliable and efficient.

Keywords: Ultrasonic-assisted; *Salvia miltiorrhiza* Bge; Total flavonoids; Extraction

丹参, 是指唇形科的多年生草本丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根茎或根。丹参酮、丹参素、丹酚酸、维生素 E^[1-2]、黄酮类和异黄酮类等化合物均为其主要的活性成份。其中, 黄酮具有抗肿瘤、消炎药物、降血脂、防生育、抗高血脂等药理作用^[3-6]。当前, 常见的黄酮提取方法有酶辅助提取、溶剂浸提法、高速剪切法、回流提取法、超临界萃取法、超声提取法、发酵法、

微波辅助法^[7-10]等。

裕丹参享有“丹参之首”的美称, 地理标志产品 (GBT22745-2008) 目前研究主要集中于其最主要的两个成分丹参酚酸和丹参酮^[11-12]等, 总黄酮的研究较少。本研究成果通过正交法, 对影响其总黄酮类萃取因素加以考虑, 并研究了萃取工艺的技术要求, 以探讨一个快捷、简单、萃取效率较高的裕丹参根部黄酮萃取方式。

一、材料与方法

1. 试剂与主要设备仪器

原料: 裕丹参购于河南省方城县中药公司; 95%乙醇; AlCl₃ (上海试剂四厂); KAc (国药集团化学试剂有限公司); 芦丁等化学试剂均为分析纯。

基金项目: 福建省科技厅星火计划项目“含茶食品的开发及茶副产物在日化中的应用”(2021s0051)

作者简介: 倪帆呈 (1988—), 女, 河南方城人, 硕士, 讲师, 主要从事茶叶化学与品质分析方向研究。E-mail: 781994040@qq.com

主要设备: 分析天平JA3003A (上海精天电子仪器有限公司); 可见分光光度计V-1600 (上海美谱达仪器有限公司); KQ-250DE型数控超声波清洗器 (昆山市超声波仪器有限公司); 循环水式真空泵 (河南省巩义市予华仪器有限责任公司)。

2. 方法

(1) 样品处理方法

参考文献^[13-14]方法, 将裕丹参根粉碎, 称取其粗粉2 g, 置于锥形瓶中, 后取适量一定浓度的乙醇溶液加入, 混匀。置于一定温度下恒温水浴, 冷凝回流, 经一定提取时间, 趁热减压抽滤。将合并提取液置于100 mL容量瓶, 用提取相同体积分数的乙醇溶液定容, 作待测液备用。

(2) 总黄酮含量的测定方法

① 芦丁标准曲线的绘制

通过查阅相关文献^[15], 采用 AlCl_3 -KAc法进行。称取0.011 g芦丁, 用95%乙醇, 作标准液。再取20 mL标准液, 95%乙醇定容至100 mL, 作工作液。分别取1、2、3、4、5 mL于50 mL容量瓶中, 向瓶中分别加各2 mL 2.5 % AlCl_3 和9.82% KAc摇匀, 30%乙醇定容, 静置30 min于415 nm下测量吸光值。得回归方程: $C=1.2636 \cdot A+0.0009$ $R^2=0.9998$ ($n=6$), 式中C为黄酮浓度 (mg/mL); A为吸光度。

② 裕丹参根黄酮水分含量的测定

参照药典 (2020版) 通则0832第二法进行。以减失的裕丹参重量为根据, 计算其粗粉含水量 (%)。

③ 黄酮的提取与测定

取1 mL提取液至50 mL容量瓶中, 参照1.2.2.1方法进行, 测溶液吸光度, 对照回归方程得黄酮的浓度。

裕丹参根黄酮的提取率按以下公式进行计算:

$$\text{裕丹参黄酮得率 (\%)} = \frac{\frac{C}{1000} \times V \times X}{m}$$

C: 总黄酮浓度 (mg/mL);

V: 样品提取液第一次定容的体积;

X: 稀释倍数;

m: 样品干重。

3. 黄酮提取工艺的实验设计

(1) 超声波提取法的单因素实验

由于传统的水煎煮法提取黄酮, 存在提取时间过长, 产品易腐败等缺点^[16]。本法采用乙醇作为溶剂。在此基础上, 另将三个因素——温度、料液比、提取时间等也作为考察对象, 其中超声波采用功率为250 W, 按照百分比进行, 各因素的考察范围如表1所示。

表1 超声波提取法单因素实验各因素的考察范围列表

Table 1 The factors range list of ultrasonic extraction single factor experiments

序号	考察因素			
	提取温度 (°C)	料液比 (m/v)	提取时间 (min)	乙醇体积分数 (%)
1	60	1: 20	30	50、60、70、80、95
2	60	1: 10、1: 20、1: 30、1: 40、1: 50	30	60
3	60	1: 20	15、30、45、60、75、90	60
4	40、50、60、70、80	1: 20	30	60
5	60	1: 20	30	60

(2) 裕丹参根黄酮超声波提取正交设计实验

根据正交设计的原理和使用原则, 系统考察提取温度A (°C)、料液比B (g/mL)、提取时间C (min)、乙醇体积分数D (%)对裕丹参根黄酮提取率的影响。实验结果如表2。

表2 因素水平表

Table 2 Factors level table

水平	考察因素			
	提取温度 (°C)	料液比 (m/v)	提取时间 (min)	乙醇体积分数 (%)
1	50	1: 10	20	50
2	60	1: 20	30	60
3	70	1: 30	40	70

二、结果分析

1. 裕丹参粗粉的水分含量

根据1.2.3的方法进行实验, 测得裕丹参粗粉的水分含量为9.918%。

2. 单因素试验结果与分析

(1) 温度对裕丹参根黄酮提取率的影响

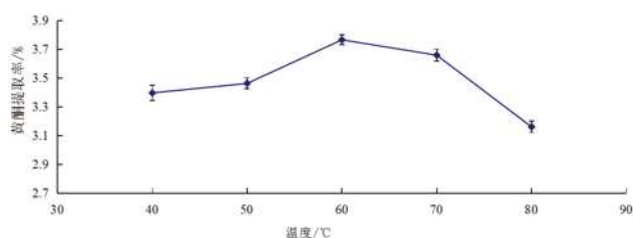


图1 提取温度对丹参根黄酮得率的影响

Figure1 Temperature influence on SMF extraction efficiency

由图1可知, 在随着提取溶剂温度的增加提取效果显著变化, 但超过60°C以后, 开始下降。表明: 在低于

60℃的范围内, 温度的增加, 致使裕丹参根黄酮中部分物质的溶解效率提升, 进而提取率增加^[17]。但过高温度, 部分黄酮类物质, 如酚式结构类, 对温度变化比较敏感, 易被破坏, 提取率下降^[18]。故选取60℃作为提取溶剂的温度, 较为适宜。

(2) 乙醇体积分数对黄酮提取率的影响

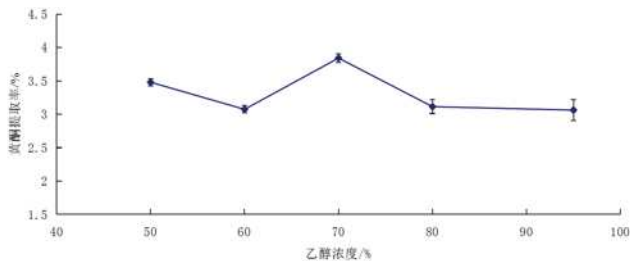


图2 乙醇体积分数对裕丹参根黄酮得率的影响

Figure2 Ethanol volume fraction influence on SMBF extraction efficiency

由图2可知, 丹参黄酮提取率整体上, 波动较小。在浓度70%时, 提取率达到最大。超过此体积分数时, 则出现明显的下降。可能与其黄酮的组分和比例有一定关系。如热水中黄酮苷类溶解度高, 醇等溶剂中黄酮苷元溶解度高^[19], 同时溶剂的极性也影响着黄酮的提取效率^[20]。故选取50%较为适宜。

(3) 提取时间对裕丹参根黄酮提取率的影响

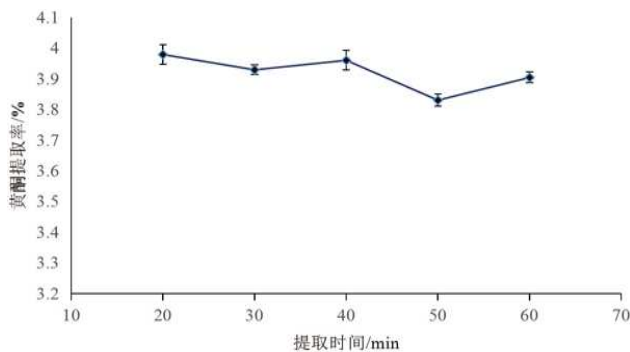


图3 提取时间对裕丹参根黄酮得率的影响

Figure3 Time influence on SMBF extraction efficiency

由图3可知, 提取率在小于40 min时无明显的增加, 在50 min时提取率最低。提取时间的延长可能会破坏部分黄酮类物质结构。出于时间和能效因素考虑, 将提取时间定为20 min为宜。

(4) 料液比对裕丹参根黄酮提取率的影响

结果由图4可知, 料液比(m/v)小于1:20时, 裕丹参根黄酮提取率随料液比的增大而减小, 因此料液比为1:20时较为适宜。可能原因: 一定范围内, 料液比的增加会提升黄酮物质的溶解。超过此范围, 极性的改

变、杂质的增加、结构的破坏等会降低黄酮的提取率^[21]。

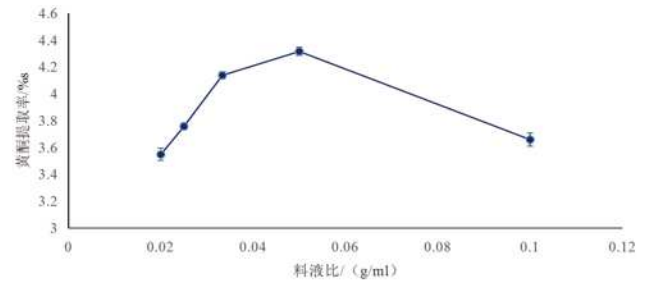


图4 料液比对裕丹参根黄酮得率的影响

Figure 4 Material and solution volume ratio influence on SMBF extraction efficiency

3. 正交试验确定超声波辅助提取的最佳工艺

在参考单因素试验结果的基础上, 正交试验选取较适宜的因素水平进行设计, 以确定裕丹参根黄酮的最优提取条件和工艺。

表3 正交实验结果

Table 3 Orthogonal experimental results

试验号	因素				提取率 %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	4.35
2	1	2	2	2	3.784
3	1	3	3	3	4.323
4	2	1	2	3	4.673
5	2	2	3	1	3.566
6	2	3	1	2	3.913
7	3	1	3	2	4.479
8	3	2	1	3	3.345
9	3	3	2	1	3.807
k1	4.152	4.501	3.869	3.908	
k2	4.051	3.565	4.088	4.059	
k3	3.877	4.014	4.123	4.114	
R	0.275	0.936	0.254	0.206	

表4 方差分析表

Table 4 Analysis of variance table

变异来源	偏差平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	0.1163	2	0.0582	1.7038	
B	1.3139	2	0.6569	19.2478	*
C	0.1132	2	0.0566	1.6582	
D	0.0683	2	0.0341	1	

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$

由表3和表4可得出, 考察的各影响裕丹参根黄酮得率因素的主次关系顺序——料液比>温度>时间>乙醇体积分数。其中料液比对结果有显著影响 ($P < 0.05$)。

最佳水平组合: A1B1C3D3, 由于乙醇浓度对结果影

响不显著,出于节约材料考虑,故最终选取:A1B1C3D1即料液比(m/v):1:10,提取水温:50℃,提取时间:40 min,乙醇体积分数:50%。以此最佳条件下,进行试验测得提取率达到4.81%。

三、结论

1)以超声辅助提取裕丹参根总黄酮方案是可行的。料液比在4个考察因素中即超声时间、料液比、提取水温和乙醇体积分数中,对结果的影响最大。不同因素对其提取率影响大小可能与此类黄酮的结构和极性有一定的关系,需进一步进行验证与研究。

2)通过对以上4个因素的单因素与正交实验对裕丹参根黄酮的提取工艺进行研究,结果表明,以黄酮得率为指标,提取裕丹参根黄酮的最佳工艺为料液比(m/v):1:10,提取温度:50℃,提取时间:40 min,乙醇体积分数:50%,其黄酮提取率达到4.81%。

3)在提取裕丹参根黄酮方面,超声辅助提取法较水煎煮法,具有用时更短、提取效率高、节省样品等优点。

参考文献:

[1]袁国卿.“八大宛药”的历史形成[J].时珍国医国药,2009,20(1):142-143.

[2]中国药典.一部[S].2020:77.

[3]王云龙,房岐,郑超.丹参化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J].中国药业,2020,29(15):6-10.

[4]Orozco Montes F, A V á zquez-Hern á ndez, B Fenton-Navarro. Active compounds of medicinal plants, mechanism for antioxidant and beneficial effects[J]. Phyton-International Journal of Experimental Botany .2019, 88(1):1-10.

[5]ZU M H, SONG H L, ZHANG J B, et al. Lycium barbarum Lipid-based edible nanoparticles protect against experimental colitis[J]. Colloids and Surfaces B, 2020, 187:110747.

[6]张东,邬国栋.沙棘黄酮的化学成分及药理作用研究进展[J].中国药房,2019,30(9):1292-1296.

[7]Panpan, Wu, Fajie, et al..Phytochemical compositions of extract from peel of hawthorn fruit, and its antioxidant capacity, cell growth inhibition, and acetylcholinesterase inhibitory activity[J].BMC Complementary & Alternative Medicine.2017, 17(1):151.

[8]李志清,王殿奎,许岩,等.发酵法对比提取丹

参黄酮研究[J].现代农村科技,2021(7):60-61.

[9]曹利慧,范业刚.植物中黄酮类化合物提取方法研究进展[J].安徽化工,2020,46(6):6-9.

[10]王鹏波,谢晓蓉,代云云,等.枸杞黄酮提取方法的优化以及不同生态因子与枸杞黄酮相关性研究[J].食品工业科技,2022,43(6):236-242.

[11]杨文杰,韦一言,汪雨.河南裕丹参中活性成分含量的测定及分析[J].当代医药论丛,2021,19(2):133-135.

[12]原景,杜韩,万梅绪,等.丹参有效成分及丹参类制剂抗炎药理作用的研究进展[J].药物评价研究,2021,44(11):2322-2332.

[13]李阳,余晓晖,郭玫,等.超声辅助提取西藏凹乳芹总黄酮工艺的优化[J].中成药,2022,44(2):362-366.

[14]陈建福,彭敏.芦柑叶总黄酮的提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2021,42(4):117-122.

[15]徐兰英,金丽,许引,等.分光光度法检测昆仑雪菊总黄酮络合显色体系适应性研究[J].食品工业科技,2020,41(13):247-252.

[16]宋林晓,邵娟娟.黄酮类化合物提取方法研究进展[J].粮食与油脂,2020,33(1):21-22.

[17]方芳,王凤忠.植物黄酮醇提取方法研究进展[J].食品工业科技,2018,39(7):323-328,334.

[18]赵学友.响应面法优化川丹参总黄酮提取工艺及其体外抗氧化活性评价[J].中国现代应用药学,2017,34(5):686-691.

[19]秦生华,李珊,凌旭彬,等.百香果果皮总黄酮的超声波辅助提取工艺优化及其性质研究[J].食品工业科技,2020,41(17):153-160,166.

[20]Haminiuk C W I, Plata-Oviedo M S V, Mattos G D, et al. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from Eugenia pyriformis using different solvents[J]. Journal of Food Science&Technology, 2014, 51(10):2862-2866.

[21]徐莉莉,刘静.响应面试验优化微波-超声波协同提取荞麦壳黄酮工艺[J].粮食与油脂,2017,30(12):50-54.