

藏纸中总黄酮的提取及其含量测定

刘蓉 李淞

阿坝师范学院 四川汶川 623002

摘要: 以阿坝州藏纸为研究对象, 提取藏纸中的总黄酮。通过试验选用超声波提取法, 提取溶剂为乙醇。以80%乙醇为提取溶剂, 超声时间55 min, 料液比1: 55 g/mL的条件下, 藏纸中总黄酮含量最高, 其得率为13.685 mg/g。超声波提取法稳定性好, 适用于阿坝州藏纸中总黄酮的提取。

关键词: 藏纸; 总黄酮; 紫外分光光度法; 提取

Extraction and content determination of total flavonoids from Tibetan paper

Rong Liu*, Song Li

Aba teachers University, Wenchuan, Sichuan 623002

Abstract: In this paper, the total flavonoids in Aba Tibetan paper were extracted. The ultrasonic extraction method was used to extract the ethanol. When 80% ethanol was used as extraction solvent, ultrasonic time was 55 min, the solid-liquid ratio was 1:55 g/mL, the total flavonoid content in the paper was the highest, and the yield was 13.685 mg/g. The ultrasonic extraction method has good stability and is suitable for the extraction of total flavonoids from Aba paper.

Keywords: Tibetan paper; total flavonoids; UV spectrophotometry; extraction

引言:

藏纸作为藏族人民特有的图文载体, 产生于公元7世纪中叶, 从古至今存在已有上千年, 神秘而独特, 是中国少数民族的主要纸种之一^[1]。藏纸被称为经书保镖, 有吸墨性强, 不易褪色, 质量轻, 不伤眼不刺眼, 自然防腐抑菌, 防虫蛀, 保存时间长等优点。其中, 藏纸具有抑菌作用, 与制作藏纸的原材料—瑞香狼毒有关, 而总黄酮^[2]是其发挥主要功能的物质, 具有两个酚羟基苯环, 起到抑菌^[3-4]和抗病毒等作用。

总黄酮的提取方法主要有索氏提取法^[5], 冷凝回流提取法^[6], 超声波提取法^[7], 微波提取法^[8], 酶解提取法^[9]和超临界流体萃取法^[10]等。在这些方法中索氏提取法具有选择性好, 能耗低, 操作简单, 提取效率高等优点。回

流提取相对于传统的冷浸法效率高, 提取时间短。超声波提取在一定程度上能够有效破坏细胞壁, 增加目标成分的溶出, 提高提取率, 节省时间。

本文以藏纸为原材料, 总黄酮为目标产物, 进行提取和测定, 从而为藏纸中总黄酮的后续探究提供一定参考依据, 为阿坝州藏纸发展提供一定的参考价值。

一、材料与方法

1.1 实验材料

实验所选用的藏纸购买于阿坝州壤塘县。

1.2 实验试剂与仪器

亚硝酸钠、氢氧化钠、95%乙醇、甲醇、乙酸乙酯、芦丁、硝酸铝。

101型电热鼓风干燥箱(101-4AB)、分析天平(JJ324BC)、循环水式多用真空泵(SHB-III)、超声波清洗机(PS-100A)、旋转蒸发仪(RE-2000E)、高速多功能粉碎机(1000Y)、紫外可见分光光度计(UV-1800PC)、数显恒温水浴锅(XR-53648)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品处理

基金项目: 阿坝师范学院科研基金专项培育项目(ASZ19-03), 四川省大学生创新创业训练计划项目(S202110646096)。

作者简介: 刘蓉(198908-), 女, 汉族, 甘肃天水人, 硕士, 讲师; 研究方向: 分析检测。

将藏纸剪成6 cm × 6 cm正方形大小, 平整放置在电热鼓风干燥箱中60℃干燥1 h, 取出, 粉碎, 装入干燥容器密封, 备用。

1.4 标准曲线

1.4.1 配置芦丁标准溶液

准确称量0.01 g的芦丁标准品在烧杯当中, 向其中加入5 mL 60%乙醇溶液, 定容至100 mL, 摇匀, 得到0.10 mg/mL的芦丁标准溶液。

1.4.2 绘制标准曲线

取配制好的芦丁标准溶液0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL于10.0 mL容量瓶中, 加入5%的亚硝酸钠溶液0.3 mL, 摇匀, 静置10 min后加入10%的亚硝酸铝溶液0.3 mL, 摇匀, 静置10 min后加入4%的氢氧化钠溶液4.0 mL, 再用60%乙醇溶液定容, 摇匀, 静置20 min^[21]。设置横坐标为总黄酮浓度, 纵坐标为吸光度, 测定波长505 nm, 得到标准曲线, 回归方程: $C=91.8567 \times A-0.6442$, $R^2=0.9998$ 。

1.4.3 总黄酮含量测定

计算方法如公式(1)^[11]:

$$\text{藏纸中总黄酮的含量} = \frac{C \times V \times n}{m \times 10^3} \quad (1)$$

式中: C-藏纸总黄酮提取液浓度, ug/mL; V-提取的用量, mL; n-提取液的稀释倍数; m-藏纸的用量, g。

1.4.4 提取方法

1.4.4.1 超声波提取法

准确称取1.00 g藏纸粉末3份, 分别加入甲醇, 70%乙醇和乙酸乙酯的量为30 mL, 提取3次, 每次提取的时间为30 min, 过滤, 浓缩, 定容, 测定, 计算藏纸中总黄酮含量。

1.4.4.2 索氏提取法

准确称取1.00 g藏纸粉末3份, 分别加入甲醇, 70%乙醇和乙酸乙酯的量为100倍, 提取3次, 每次提取的时间为60 min, 过滤, 浓缩, 定容, 测定, 计算藏纸中总黄酮含量。

1.4.4.3 冷凝回流提取法

准确称取1.00 g藏纸粉末3份, 分别加入甲醇, 70%乙醇和乙酸乙酯的量为100倍, 提取3次, 每次提取的时间为30 min, 过滤, 浓缩, 定容, 测定, 计算藏纸中总黄酮含量。

1.4.5 提取溶剂的筛选

准确称取1.00 g藏纸粉末3份, 分别采用甲醇、70%乙醇和乙酸乙酯三种溶剂, 超声波提取3次, 每次提取的时间为30 min, 过滤, 浓缩, 定容, 测定, 计算藏纸

中总黄酮的含量, 并筛选出最佳的提取溶剂。

1.4.6 乙醇体积分数的影响

称取1.00 g藏纸粉末, 加入50%、60%、70%、80%、90%的乙醇溶液各30 mL, 提取, 过滤, 浓缩, 测定其吸光度, 对照芦丁标准工作曲线, 找到对应吸光度下的浓度并计算出藏纸总黄酮含量。

1.4.7 料液比的影响

称取1.00 g藏纸粉末, 分别加入80%乙醇20 mL、30 mL、40 mL、50 mL、60 mL, 提取, 过滤, 浓缩, 测定其吸光度, 对照芦丁标准工作曲线, 找到对应的吸光度下的浓度并计算出藏纸总黄酮含量。

1.4.8 超声提取时间的影响

称取1.00 g藏纸粉末, 分别加入80%乙醇50 mL, 提取时间为20 min、30 min、40 min、50 min、60 min, 待各组实验超声提取完成后, 过滤, 浓缩, 测定其吸光度, 对照芦丁标准工作曲线, 找到对应的吸光度下的浓度并计算出藏纸总黄酮含量。

1.4.9 正交实验优化

为探究各因素影响, 设计了三因素三水平 $L_9(3^3)$ 的正交实验, 由表1所示。

表1 正交因素表

水平	因素		
	A 乙醇浓度 (%)	B 料液比	C 提取时间 (min)
1	75	1: 45	55
2	80	1: 50	60
3	85	1: 55	65

1.4.10 验证性实验

准确称取藏纸粉末1.00 g, 置于3个100 mL烧杯中, 通过正交实验筛选出藏纸中总黄酮的最佳提取工艺, 并进行3次重复性验证试验。

二、结果与分析

2.1 提取方法的确定

准确称取藏纸粉末约1.00 g, 以70%乙醇为提取剂, 分别用超声波提取法、冷凝回流提取法和索氏提取法提取藏纸中总黄酮, 其含量平均值分别为9.078 mg/g, 8.864 mg/g和6.613 mg/g, 其中冷凝回流提取和超声波提取所得总黄酮含量相差不大, 且超声波提取方法操作简单。所以本实验选用超声波提取法。

2.2 提取溶剂的确定

准确称取藏纸粉末1.00 g, 分别采用70%乙醇、乙酸乙酯和甲醇作为提取剂提取藏纸中总黄酮, 其含量平均值分别为9.047 mg/g, 0.275 mg/g和8.741 mg/g, 其中使

用70%乙醇和甲醇作为提取溶剂提取得到的总黄酮含量值相差不大,且乙醇对环境更加友好,所以本实验选用70%乙醇溶液为提取剂。

2.3 单因素实验

2.3.1 乙醇体积分数的影响

根据步骤“1.4.6”的操作,通过式(1)计算出藏纸中总黄酮的含量。由图1可知,当乙醇浓度为80%时,总黄酮的含量最高,为9.323 mg/g。当乙醇溶液的浓度在50%到80%的区间内,藏纸中总黄酮的含量增大,可能是乙醇溶液浓度的升高,增加了其溶液的极性,导致了藏纸中总黄酮的溶解度增加。乙醇浓度继续增加到90%时,藏纸中总黄酮的含量减小,可能是溶液的粘度越大,总黄酮的溶解度减小^[12]。因此,选择乙醇溶液体积分数为80%。

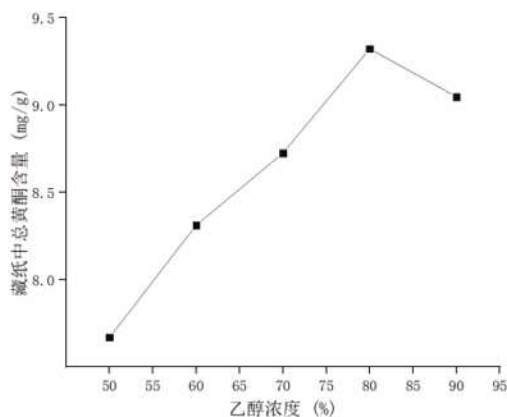


图1 乙醇浓度对藏纸总黄酮提取率测定的影响

2.3.2 料液比的影响

根据步骤“1.4.7”的操作,通过公式(1)计算出藏纸中总黄酮含量。由图2可知,当料液比为1:50 g/mL时,总黄酮含量最高,为12.767 mg/g。当料液比继续增加到1:60 g/mL时,藏纸中总黄酮的含量降低,可能是继续增大料液比,导致提取物中其他杂质的溶出^[13]。因此,选择料液比为1:50 g/mL。

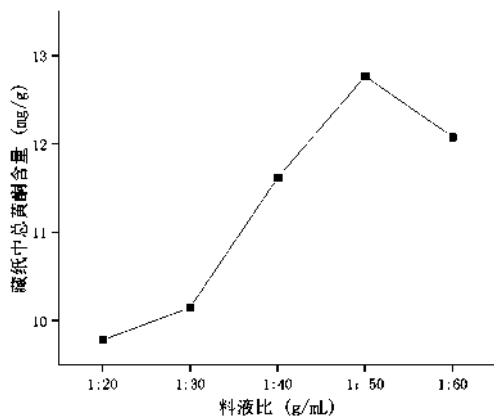


图2 料液比对藏纸总黄酮提取率的影响

2.3.3 超声提取时间的影响

根据步骤“1.4.8”的操作,通过公式(1)计算藏纸总黄酮含量,结果如图3。当提取时间为60 min时,总黄酮含量最高,为11.022 mg/g。随着时间的延长,总黄酮含量下降,可能是长时间的超声导致总黄酮的结构被破坏^[14]。因此,选择提取时间为60 min。

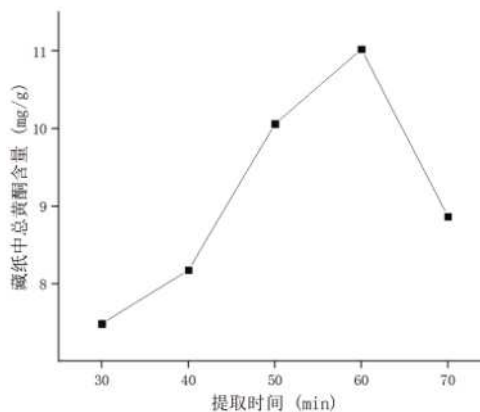


图3 提取时间对藏纸总黄酮提取率的影响

2.3.4 正交实验结果与分析

根据步骤“1.4.5”设计的正交实验,结果如表2。

表2 正交实验结果分析

因素	A	B	C	
实验序号	乙醇浓度 (%)	料液比 (g/mL)	提取时间 (min)	总黄酮含量 (mg/g)
实验1	1	1	1	10.470
实验2	1	2	3	10.011
实验3	1	3	2	9.827
实验4	2	1	3	10.562
实验5	2	2	2	10.470
实验6	2	3	1	13.685
实验7	3	1	2	10.746
实验8	3	2	1	10.379
实验9	3	3	3	10.288
K1	10.102	10.593	11.511	
K2	11.572	10.287	10.347	
K3	10.471	11.267	10.287	
R	1.470	0.980	1.224	
因素重要性 A > C > B				
最优水平	A2	B3	C1	
最优组合	A2B3C1			

采用 $L_9(3^3)$ 进行正交实验所得的结果见表2,由极差分析可知,各因素对藏纸中总黄酮类化合物含量的影响分别是乙醇浓度(A) > 提取时间(C) > 料液比(B)。A2B3C1组合是对藏纸中总黄酮的提取效果最好的组合。

2.4 验证性实验结果分析

根据表2中的正交实验结果, 筛选出藏纸中总黄酮含量的最佳提取工艺A2B3C1, 在提取条件最优组合A2B3C1下分别进行了三次验证性实验, 测得藏纸中总黄酮的含量分别为13.134 mg/g、13.226 mg/g、13.226 mg/g, 藏纸中总黄酮的含量平均值为13.195 mg/g, RSD=0.63%, RSD<2%, 结果显示离散程度小, 重现性好, 因此该方法适用提取藏纸总黄酮的测定。

三、结论

本文以藏纸为原料, 对比超声提取法, 索氏提取法和冷凝回流提取法下藏纸中总黄酮的含量, 选用了提取效果更好, 操作更为简便的超声波提取法。对比了70%乙醇, 甲醇和乙酸乙酯三种提取溶剂下藏纸中总黄酮的含量, 选用了提取效果更好, 对环境更加友好的70%乙醇。通过探究单因素实验中的料液比, 乙醇浓度, 提取时间对藏纸中总黄酮含量的影响。利用正交实验, 优化了提取工艺。结果表明, 超声波提取法对藏纸中总黄酮的含量的3个因素影响为: 乙醇浓度(A)>提取时间(C)>料液比(B)。最佳提取条件为: 乙醇浓度为80%、料液比为1: 55、提取时间55 min, 藏纸中总黄酮的含量为13.685 mg/g。该方法稳定性好, 适用于藏纸中总黄酮的提取, 为后续藏纸中总黄酮的探究提供一定的参考依据。

参考文献:

- [1]赵宝玉, 刘忠艳, 万学攀, 等.中国西部草地毒草危害及治理对策[J].中国农业科学, 2008, 41(10): 3094.
- [2]史志诚.中国草地的生态环境与毒草灾害[J].中国药理学与毒理学杂志, 1997, 02: 33-34.
- [3]Yoshida M, Feng W, Saijo N, et al. Antitumor activity of daphnane-type diterpene gnidimacrin isolated from *Stella*

chamaejasme L. *International Journal of Cancer*, 1996, 66(2): 26.

[4]张水平.直孔藏纸毒理学安全评价及抑菌性能研究[D].陕西咸阳:西北农林科技大学, 2019.

[5]唐楷, 颜杰, 黄新.金银花总黄酮的提取工艺优化及其抑菌作用研究[J].中国食品添加剂, 2012(04): 154-157.

[6]黎克纯, 卢建芳, 韩妆, 等.响应面法优化荔枝壳总黄酮提取及抗氧化活性[J].食品研究与开发, 2021, 42(10): 61-67.

[7]张毅, 秦海军, 马玲, 等.不同溶剂和提取方法对宣木瓜总黄酮提取率的影响[J].中国药业, 2014(12): 27-29.

[8]郭艳华, 张玉敏, 陈达畅.微波法提取生姜总黄酮及光热稳定性研究[J].应用化工, 2010, 39(02): 233-236.

[9]袁秀平, 王云云, 袁向辉.复合酶辅助提取柿叶总黄酮工艺研究[J].陕西农业科学, 2019, 65(05): 59-61+68.

[10]任彦荣, 陈晓麟, 李晓波.均匀设计优化大豆异黄酮的超临界流体萃取[J].重庆大学学报, 2008(11): 1333-1336.

[11]黎海妮, 刘海花, 唐玉莲, 等.超声波乙醇浸提法提取龙眼核总黄酮方法的探讨[J].右江民族医学院学报, 2006, 02: 168-169.

[12]丁强.玫瑰花渣中黄酮、花色苷提取与应用研究[D].合肥工业大学, 2021.

[13]江盛宇, 高良姜.挥发油与黄酮连续提取工艺及分离纯化研究[D].华南农业大学, 2018.

[14]徐艳丽.苦参种子黄酮类成分的提取工艺及其缓释微丸的制备研究[D].青岛科技大学, 2018.