

微波辅助提取连钱草总黄酮的研究

姜 宁¹, 刘晓鹏^{1,2*}, 丁峰峻³, 丁振国³, 李 力², 蒋晓军²

(1. 湖北民族学院 生物科学与技术学院, 湖北 恩施 445000; 2. 南京医药股份有限公司 博士后工作站, 江苏 南京 210012; 3. 南京同仁堂洪泽中药材科技有限公司, 江苏 洪泽 223200)

摘要: 通过正交试验优化了水浴法和微波辅助法提取连钱草总黄酮的提取工艺, 并对 2 种方法进行比较。结果表明, 水浴法提取的最优工艺为液固比 20:1、时间 90 min、温度 40 ℃ 以及乙醇体积分数 85%; 微波辅助法提取的最优工艺为液固比 10:1、高微波强度、微波时间 4 min 以及乙醇体积分数 90%。微波辅助法提取连钱草总黄酮的提取率达 7.82% ± 0.14%, 比水浴法总黄酮提取率 (6.07% ± 0.12%) 提高了 1.75 个百分点。表明微波辅助法不仅能提高连钱草总黄酮的产量, 而且具有提取体积小、节能、省时的优点。

关键词: 连钱草; 总黄酮; 微波辅助提取

中图分类号: S567 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)04-0169-04

Study on Microwave-assisted Extraction of Total
Flavonoids from *Glechoma longituba*

JIANG Ning¹, LIU Xiaopeng^{1,2*}, DING Fengjun³, DING Zhenguo³, LI Li², JIANG Xiaojun²

(1. School of Biological Science and Technology, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China;
2. Postdoctoral Research Station, Nanjing Medical Co., Ltd., Nanjing 210012, China;
3. Nanjing Tongrentang Hongze Chinese Herbal Science & Technology Co., Ltd., Hongze 223200, China)

Abstract: In order to study the microwave-assisted extraction process of total flavonoids from *Glechoma longituba*, the extraction processes of total flavonoids from *Glechoma longituba* by water bath method and microwave-assisted extraction method were optimized using orthogonal test, and the two methods were compared. The results showed that optimal process of water bath extraction was liquid-solid ratio of 20:1, time of 90 min, temperature of 40 ℃ and ethanol concentration of 85%. Meanwhile the optimal technology parameters of microwave-assisted extraction were liquid-solid ratio of 10:1, top microwave power, time of 4 min, and ethanol concentration of 90%. The yield of total flavonoids from *Glechoma longituba* by microwave-assisted and water bath methods were 7.82% ± 0.14% and 6.07% ± 0.12%, respectively, and the yield of microwave-assisted method increased by 1.75 percentage points compared to that of water bath method. The microwave-assisted extraction of total flavonoids from *Glechoma longituba* could not only improve the yield but also reduce the extract volume, save energy and time.

Key words: *Glechoma longituba*; total flavonoids; microwave-assisted extraction

连钱草为唇形科活血丹属植物活血丹[*Glechoma longituba* (Nakai) Kupr.]干燥地上部分, 晒干, 或鲜用。性味凉辛, 微苦, 微寒。归肝、肾、膀胱经^[1]。具有利胆、利尿、抗菌、抗炎、降血糖、抗肿瘤以及抗腹泻等药理作用, 主治黄疸型肝炎、胆囊炎、胆石症、疝积、肾结石、膀胱结石、多发性脓疡、疮痈肿痛、婴儿湿疹、跌打损伤、腮腺炎、牙痛等症^[2]。

连钱草的主要化学成分有萜类^[3]、黄酮^[4-5]、挥

收稿日期: 2014-10-11

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BA104B04); 江苏省“企业博士后集聚计划”项目(2011033)

作者简介: 姜 宁(1968-), 女, 江苏南通人, 副教授, 硕士, 主要从事天然产物研究工作。E-mail: jiangn888@163.com

* 通讯作者: 刘晓鹏(1971-), 男, 湖北建始人, 副教授, 博士, 主要从事天然产物研究工作。E-mail: 18913386031@189.cn

发油^[6-7]、有机酸^[8-9]以及多糖等化合物。其萜类化合物主要包括熊果酸、齐墩果酸、乌苏酸、2-羟基乌苏酸等。黄酮和黄酮苷类化合物包括木犀草素、芦丁、芹菜素、刺槐素、海棠素、胡萝卜苷、槲皮素、连钱草酮等。连钱草具有特殊的清香味,含有多种挥发油类化合物,包括左旋薄荷酮、胡薄荷酮、牻牛儿苗烯、1,8-桉叶素、异薄荷酮、异松樟酮、 α -松油醇等。有机酸类化合物包括阿魏酸、咖啡酸、芥子酸、月桂酸、迷迭香酸、原儿茶醛、迷迭香酸甲酯、三十烷酸、肉豆蔻酸等。

目前针对连钱草总黄酮提取工艺主要为水浴提取^[10]、超声辅助提取^[11],而采用微波辅助提取的研究尚未见报道。本研究通过考察液固比、微波强度、微波时间、乙醇体积分数等因素,采用单因素试验和正交试验优化了微波辅助提取连钱草总黄酮的工艺,为连钱草这一传统中药的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂与仪器

连钱草由南京同仁堂洪泽中药材科技有限公司提供(经姜宁副教授鉴定为唇形科活血丹属植物活血丹[*Glechoma longituba* (Nakai) Kupr.],烘干,粉碎,过孔径 0.25 mm 的筛;无水乙醇、芦丁、亚硝酸钠、硝酸铝等均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。主要仪器:紫外可见分光光度计、多功能粉碎机、离心机、恒温水浴锅等。

1.2 方法

1.2.1 芦丁标准曲线的绘制及总黄酮提取率的测定 标准曲线的绘制及连钱草总黄酮提取率的测定参照 2010 版《中华人民共和国药典》^[1]。以吸光度 A 为纵坐标、芦丁质量浓度 c ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标,绘制标准曲线方程为 $y = 0.0067x - 0.0017$ ($R^2 = 0.9995$)。按如下公式计算总黄酮提取率。

总黄酮提取率 (%) = $\frac{c \times \text{稀释倍数} \times V}{1\,000 \times m} \times 100$,

式中: c 为测定样液的质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$), V 为提取体积 (mL), m 为连钱草质量 (mg)。

1.2.2 水浴法提取连钱草总黄酮 水浴法提取连钱草总黄酮正交试验 $L_9(3^4)$ 的因素和水平设计见表 1。总黄酮提取率计算方法同 1.2.1。试验重复 3 次。

1.2.3 微波辅助提取连钱草总黄酮

1.2.3.1 单因素试验

(1) 液固比 将液固比设为 10:1、20:1、30:1、

40:1、50:1、60:1 进行单因素试验,微波时间 4 min,微波强度为高档,乙醇体积分数 70%。

表 1 水浴法提取连钱草总黄酮正交试验的因素和水平

水平	液固比 (A) /(mL/g)	时间 (B) /min	温度 (C) /℃	乙醇体积分 数 (D)/%
1	10:1	60	30	85
2	20:1	90	40	90
3	30:1	120	50	95

(2) 微波强度 将微波强度设为低、中、中高、高档进行单因素试验,液固比 30:1,微波时间 4 min,乙醇体积分数 70%。

(3) 微波时间 将微波时间设为 2、4、6、8、10、12 min 进行单因素试验,液固比 30:1,微波强度为高档,乙醇体积分数 70%。

(4) 乙醇体积分数 将乙醇体积分数设为 50%、60%、70%、80%、85%、90%、95% 进行单因素试验,液固比 30:1,微波强度为高档,微波时间 4 min。以上单因素试验均重复 3 次。将浸提液离心,取上清,按 1.2.1 计算总黄酮提取率。

1.2.3.2 正交试验 为了研究液固比、微波强度、时间、乙醇体积分数 4 个因素对连钱草总黄酮提取效果的综合影响,采用 $L_9(3^4)$ 正交表,因素水平设计见表 2。总黄酮提取率计算方法同 1.2.1。试验重复 3 次。

表 2 微波辅助提取连钱草总黄酮正交试验的因素和水平

水平	液固比 (A)	微波强度 (B)	时间 (C)/min	乙醇体积分 数 (D)/%
1	10:1	中	2	85
2	20:1	中高	4	90
3	30:1	高	6	95

1.2.4 微波辅助法与水浴法提取连钱草总黄酮效果的比较 根据正交试验结果,分别选取微波辅助提取的最佳工艺与水浴提取的最佳工艺进行提取效果比较,试验重复 10 次。总黄酮提取率测定方法同 1.2.1。

1.3 数据处理

试验数据均以平均数 \pm 标准误 (SE) 表示,正交方差分析采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。单因素结果分析采用 Origin 8.0 进行数据处理,组间多重比较采用 Tukey 法。

2 结果与分析

2.1 水浴法提取连钱草总黄酮的结果

由表 3 可知,水浴法提取连钱草总黄酮的优化工艺是 $A_2B_2C_2D_1$,即液固比 20:1、时间 90 min、温度 40 $^{\circ}\text{C}$ 、乙醇体积分数 85%。根据极差 R 可以推测

出各因素的主次顺序: A > C > D > B。对正交试验结果进行方差分析(表 4),结果表明:各因素对提取率的影响均达极显著水平($P < 0.01$),根据 F 值的大小,可以得到各因素对提取率影响的主次关系为 A > C > D > B,与根据极差 R 得到的结果一致。

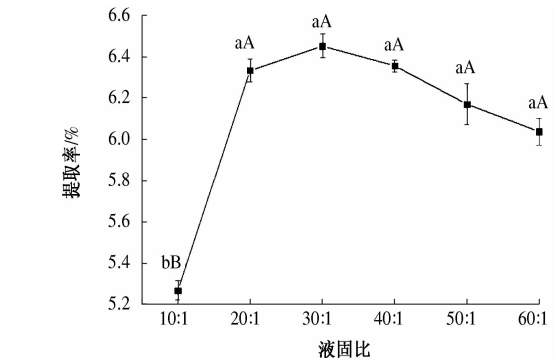
表 3 水浴法提取连钱草总黄酮正交试验结果					
试验号	A	B	C	D	总黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	4.52 ± 0.09
2	1	2	2	2	5.21 ± 0.11
3	1	3	3	3	3.87 ± 0.17
4	2	1	2	3	5.86 ± 0.09
5	2	2	3	1	5.91 ± 0.17
6	2	3	1	2	5.47 ± 0.10
7	3	1	3	2	4.99 ± 0.06
8	3	2	1	3	5.03 ± 0.08
9	3	3	2	1	5.61 ± 0.12
K_1	13.60	15.37	15.02	16.04	
K_2	17.24	16.15	16.68	15.67	
K_3	15.63	14.95	14.77	14.76	
R	3.64	1.20	1.91	1.28	

表 4 水浴法提取连钱草总黄酮正交试验方差分析					
差异源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	6.643	2	3.322	80.683	**
B	0.731	2	0.366	8.881	**
C	2.144	2	1.072	26.042	**
D	0.853	2	0.427	10.362	**
误差	0.741	18	0.041		
总和	731.244	26			

注: *、** 分别表示 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$,表 6 同。

2.2 微波辅助提取连钱草总黄酮的结果

2.2.1 单因素试验结果 由图 1 可知,当液固比由 10:1 升至 20:1 时,总黄酮的提取率极显著上升($P < 0.01$),但当液固比进一步增大后,提取率稍有上升后下降,但变化不显著($P > 0.05$);由图 2 可知,当微波强度由低至高时,提取率极显著增加($P < 0.01$);由图 3 可知,当微波时间为 2 min 时,提取



不同大、小写字母分别表示在 0.01 或 0.05 水平差异显著,下同
图 1 液固比对连钱草总黄酮提取率的影响

率较低,当微波时间延长至 4 min 时,提取率极显著上升($P < 0.01$),时间继续延长后,提取率不升反降;由图 4 可知,随着乙醇体积分数的增加,连钱草总黄酮的提取率逐渐升高,但当乙醇体积分数达到 90% 后,提取率不再增加。

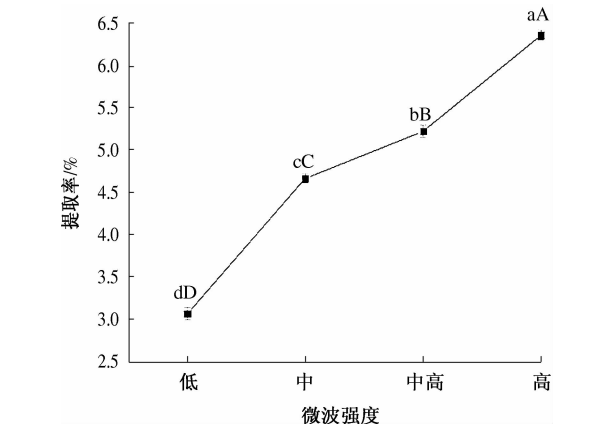


图 2 微波强度对连钱草总黄酮提取率的影响

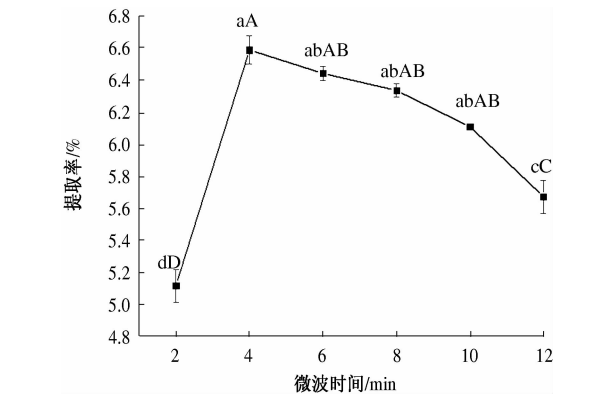


图 3 微波时间对连钱草总黄酮提取率的影响

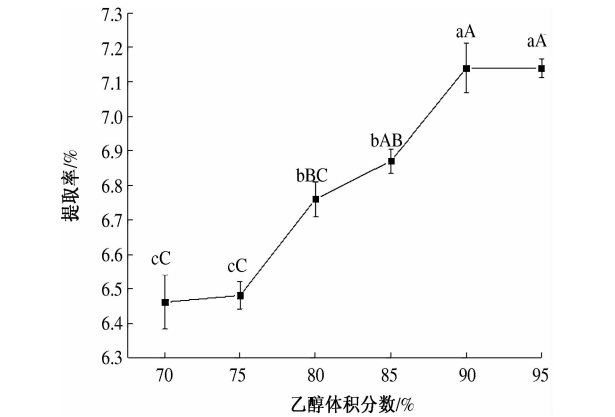


图 4 乙醇体积分数对连钱草总黄酮提取率的影响

2.2.2 正交试验结果 由表 5 可知,微波辅助提取连钱草总黄酮的最优工艺是 $A_1B_3C_2D_2$,即液固比 10:1、微波强度高档、微波时间 4 min、乙醇体积分数 90%。根据极差得到的各因素的主次关系为 B > C > A > D。由表 6 可知,各因素对提取率的影响均为极显著水平($P < 0.01$),由 F 值大小得到的各因

素对总黄酮提取率的影响主次顺序为 B > C > A > D,与极差分析结果相同。

表 5 微波辅助法提取连钱草总黄酮正交试验结果

试验号	A	B	C	D	总黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	5.82±0.06
2	1	2	2	2	6.56±0.29
3	1	3	3	3	6.87±0.17
4	2	1	2	3	6.19±0.07
5	2	2	3	1	5.32±0.07
6	2	3	1	2	7.12±0.05
7	3	1	3	2	5.44±0.07
8	3	2	1	3	3.78±0.06
9	3	3	2	1	7.45±0.13
K ₁	19.25	17.45	16.72	18.59	
K ₂	18.63	15.66	20.20	19.12	
K ₃	16.67	21.44	17.63	16.84	
R	2.58	5.78	3.48	2.28	

表 6 微波辅助法提取连钱草总黄酮正交试验方差分析

差异源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	3.619	2	1.809	22.020	**
B	17.526	2	8.763	106.647	**
C	6.544	2	3.272	39.820	**
D	2.847	2	1.424	17.326	**
误差	1.479	18	0.082		
总和	32.014	26			

2.3 微波辅助法与水浴法提取连钱草总黄酮效果的比较

采用 2 种方法的优化工艺提取连钱草总黄酮,以比较它们的优劣。微波辅助提取连钱草总黄酮提取率达 7.82%±0.14%,水浴法的提取率为 6.07%±0.12%,前者比后者提高了 1.75 个百分点,*t* 检验结果也表明,二者差异极显著(*P*<0.01)。

3 结论与讨论

微波辅助提取连钱草总黄酮的单因素试验结果表明,液固比、微波强度、微波时间、乙醇体积分数均会对总黄酮提取效果产生显著影响。微波强度为高档时,总黄酮提取率最高,这是因为样品经高档微波处理后,能在短时间内使细胞壁与细胞膜产生裂缝,促使胞内总黄酮释放^[12-13];微波时间为 4 min 时总黄酮提取率最高,而延长时间并不能增加总黄酮提取率,这是因为当微波时间大于 4 min 后,细胞壁与细胞膜的裂缝不再变大、不再增多,黄酮的释放也不会增加,并且微波时间的延长可能破坏黄酮的结构,反而使提取率下降;液固比为 20:1 时提取的黄酮较多,低于水浴法的 20:1,这是因为由于微波处理后,黄酮释放量变多、释放速度变快,无需过大的液固比就能使胞内黄酮充分溶于浸出液中,增大液固比只能增大提取液与所用试剂的消耗量,而水浴法中细

胞内黄酮释放速度较慢,只有增大料液比以加大浓度梯度才能使黄酮尽量多地释放;微波法提取黄酮的最佳乙醇体积分数为 90%,较水浴法(85%)高,这可能是因为微波处理后,黄酮释放量增多,需要较高浓度的乙醇溶解。

微波辅助法提取的最优工艺为液固比 10:1、高微波强度、微波时间 4 min 以及乙醇体积分数 90%,总黄酮提取率达 7.82%±0.14%,较水浴法的提高了 1.75 个百分点,也高于杨菁等^[14]采用超声辅助提取连钱草总黄酮的得率。这表明采用微波辅助法提取连钱草总黄酮能显著提高得率,并具有提取体积小、节能、省时的优点,为工业化提取连钱草总黄酮提供了理论依据。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 版)一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:158-159,355.

[2] 宋锐,张云,丛晓东,等. 连钱草的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中华中医药学刊,2010,28(12):2511-2514.

[3] 张前军,杨小生,朱海燕,等. 连钱草中三萜类化学成分[J]. 中草药,2006,37(12):1780-1781.

[4] 杨念云,段金殿,李萍,等. 连钱草中的黄酮类化学成分[J]. 中国药科大学学报,2005,36(3):210-212.

[5] 黄天赐,裴晶,张立群. 连钱草中黄酮、有机酸类成分的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(1):132-135.

[6] 樊钰虎,周刚,张璐,等. 连钱草挥发油化学成分的气相色谱-质谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):41-44.

[7] 吴丽群,江芳. 连钱草挥发油化学成分的研究[J]. 中国医药科学,2012,2(23):101-102,105.

[8] 朱求方,王永毅,瞿海斌. 连钱草的化学成分研究[J]. 中草药,2013,44(4):387-390.

[9] 刘杰,李国强,吴霞,等. 连钱草的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(4):695-698.

[10] 成明建,冯冠英,黄齐慧. 正交试验法优化连钱草中总黄酮的提取工艺[J]. 中国医院药学杂志,2005,25(2):147-149.

[11] 姜宁,刘晓鹏,丁振国,等. 连钱草总黄酮的超声辅助提取研究[J]. 湖北民族学院学报:自然科学版,2014,32(3):241-244.

[12] 李攻科,杜甫佑,肖小华. 微波辅助萃取技术在中药现代化中的应用[J]. 精细化工,2007,24(12):1184-1191.

[13] 马双忱,姚娟娟,金鑫,等. 微波化学中微波的热与非热效应研究进展[J]. 化学通报,2011,74(1):41-46.

[14] 杨菁,潘金火,梅馨. 星点设计-效应面优化法优选连钱草中总黄酮超声提取工艺[J]. 南京中医药大学学报,2012,28(3):269-271.