

白花蛇舌草的三效动态逆流提取工艺研究

熊雯¹, 曹树稳^{1,2*}, 余燕影²

(1. 南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2. 南昌大学 化学系, 江西 南昌 330031)

摘要:目的 采用多指标综合评价和 SPSS 软件分析, 研究白花蛇舌草三效动态逆流提取工艺条件。方法 以总黄酮、总多酚的量、清除 DPPH 自由基能力以及提取率为优化指标, 采用正交实验设计, 考察乙醇浓度、固液比、提取温度和提取时间对优化指标的影响。结果 最佳提取工艺条件为: 阶段提取时间为 70 min, 固液比为 1:14, 乙醇体积分数为 50%, 提取温度为 85℃。结论 实验室模拟多效动态逆流提取白花蛇舌草的工艺研究可为企业大规模生产探索条件。

关键词: 白花蛇舌草; 三效动态逆流提取; 多指标优化; 正交试验

中图分类号: R284.2; R286.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)07-1057-03

Process of three-effect dynamic countercurrent extraction from *Hedyotis diffusa*

XIONG Wen¹, CAO Shu-wen^{1,2}, YU Yan-ying²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Department of Chemistry, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: **Objective** To study the lab-scale simulated method of three-effect dynamic countercurrent extraction from *Hedyotis diffusa* by multi-index optimization and SPSS software. **Methods** Polyphenol content, flavonoids content, scavenging activity of samples on DPPH radicals, and extracting rate were considered as the optimization indexes. Orthogonal design method was used to optimize the four main factors of alcohol concentration, ratio of solid to solution, extracting temperature, and extracting times. **Results** The optimum condition is 70 min extraction time, solid to solution ratio of 1:14, 50% alcohol, extracting temperature 85℃. **Conclusion** The condition of large-scale industrialized production might be explored by studying the lab-scale simulated method of dynamic countercurrent extraction from *H. diffusa*.

Key words: *Hedyotis diffusa* Willd.; three-effect dynamic countercurrent extraction; multi-index optimization; orthogonal test

白花蛇舌草为茜草科耳草属植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的全草, 常用于热症、肠胃病、肿瘤、泌尿系统疾病、咽喉肿痛、疮肿蛇咬等的治疗。白花蛇舌草产业化提取生产技术绝大部分采用传统的水煎法与热回流法, 但是这些方法存在着提取率低、提取时间长、溶剂用量大、后续工作能耗大等缺点。多效动态逆流提取与传统生产技术相比, 能大大减少溶剂用量, 提高最终提取液中有效成分, 降低后续工作的能耗^[1]。白花蛇舌草提取物的抗氧化成分以黄酮、酚类、萜类、羟基蒽醌类化合物为主^[2]。另外白花蛇舌草注射液(有效成分为黄酮类化合物)用于治疗癌症发热也取得良好疗效^[3]。因此本实验以模拟的三效动态逆流提取工艺模型的

方法, 采用多指标全概率公式评分法, 以白花蛇舌草提取物中总黄酮、总多酚、清除 DPPH 自由基能力以及提取率为优化指标, 采用 SPSS 软件分析阶段提取时间、固液比、乙醇体积分数以及提取温度对优化指标的影响, 获得了白花蛇舌草的三效动态逆流提取的最佳提取工艺参数, 为进一步工业化生产提供实验依据。

1 仪器与药材

UV-2450 紫外可见分光光度计(日本岛津); FA1104 电子天平(上海精科仪器设备有限公司); TDL-40B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); DZF-150 型数显小型恒温真空干燥箱(郑州长城科工贸有限公司)。

* 收稿日期: 2008-11-04

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAI06A18-06)

作者简介: 熊雯(1983—), 女, 江西南昌人, 在读硕士, 研究方向为天然产物的分离与纯化。

* 通讯作者: 曹树稳 Tel: (0791) 3969610 E-mail: cswyxy@ncjx.cn

DPPH(Sigma 公司), 福林酚试剂(上海蓝季科技有限公司), 槲皮素对照品(陕西惠科植物有限公司, 质量分数为 98 %), 焦性没食子酸、无水乙醇、甲醇(分析纯)。白花蛇舌草购自江西樟树市药材市场, 经南昌大学生物系杨柏云教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的测定^[4]

2.1.1 标准曲线的制备: 精密称取 120 烘至恒重槲皮素对照品 106.8 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用无水乙醇溶解并加至刻度, 得 1.068 mg/mL 贮备液。移取贮备液 2.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用无水乙醇加至刻度, 得 42.72 μg/mL 槲皮素对照品溶液。分别精密移取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 对照品溶液于 5 个 10 mL 量瓶中, 用无水乙醇作空白, 在 372 nm 处测定吸光值。以吸光值为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 28.843 X - 0.0019$, $R^2 = 0.9999$ 。

2.1.2 样品中总黄酮的测定: 取提取液用无水乙醇适当稀释后备用, 取备用液在 372 nm 处测定吸光度, 根据回归方程计算样品中总黄酮的量, 并计算总黄酮提取率(总黄酮提取率 = 总黄酮质量/干药材质量 × 100 %)。

2.2 总多酚的测定^[5]

2.2.1 标准曲线的制备: 精确称取 16.4 mg 干燥没食子酸对照品, 用蒸馏水溶解, 定容至 100 mL 量瓶中, 配成 164 μg/mL 对照品溶液。精密吸取 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 没食子酸对照品溶液分别定容于 10 mL 量瓶内。然后从各溶液中吸取 1 mL 加入 25 mL 量瓶内, 加 10 mL 蒸馏水, 摇匀, 再加 1 mL 福林酚试剂, 充分摇匀 30 s 后, 放置大约 8 min 后, 加入 10 % Na_2CO_3 溶液 4 mL, 混匀, 加水定容, 再混匀, 然后在 30 °C 下避光放置反应 2 h。以试剂空白为参比, 在 765 nm 处测定吸光值。以吸光值为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 0.1592 X - 0.0002$, $R^2 = 0.9975$ 。

2.2.2 样品中总多酚的测定: 取提取液用无水乙醇适当稀释后备用, 取备用液 2 mL, 按标准曲线的制备项下方法操作, 测定吸光度, 根据回归方程计算样品中总多酚的量, 并计算总多酚提取率(总多酚提取率 = 总多酚质量/干药材质量 × 100 %)。

2.3 清除 DPPH 自由基的测定: 参照 Blois 等的方法^[6]。比色管中加入 1 mg/mL 提取液 2 mL 及 0.6 mmol/L DPPH 乙醇溶液 0.5 mL, 然后以乙醇补充

体积至 5 mL, 30 min 室温避光反应后, 于 517 nm 处测定吸光值, 计算清除率[清除率 = (样品空白吸光度值 - DPPH 与样品反应 30 min 后吸光度值)/样品空白吸光度值 × 100 %]。

2.4 浸膏提取率的测定: 干药材 25 g 按三效动态逆流正交设计提取后, 取其提取液总体积的一半, 置已干燥恒重(m_2)的蒸发皿中, 水浴蒸至尽干, 于 70 °C 真空干燥箱干燥 3.5 h, 置干燥器中冷却 30 min, 称定质量(m_1), 计算浸膏提取率[浸膏提取率 = ($m_1 - m_2$)/25 × 2 × 100 %]。

2.5 三效逆流提取正交试验设计及结果: 每罐称取药材 5 g, 由 5 个 250 mL 圆底烧瓶按三效动态逆流提取工艺模型进行试验。因素和水平安排见表 1。

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因 素			
	A 阶段提取 时间/min	B 固液比 /(g · mL ⁻¹)	C 乙醇体积 分数/%	D 提取温度 /
1	30	1 12	35	45
2	40	1 14	50	55
3	50	1 16	65	65
4	60	1 18	80	75
5	70	1 20	95	85

选用 $L_{25}(5^6)$ 正交试验设计表, 以总黄酮提取率、总多酚提取率、清除 DPPH 自由基能力以及浸膏提取率为评价指标。按总黄酮提取率、总多酚提取率、清除 DPPH 自由基能力权重为 1, 浸膏提取率权重为 -1 计算, 利用多指标全概率法进行数据处理, 结果见表 2。

采用 SPSS 软件对综合积分进行方差分析, 结果见表 3 和表 4。直观分析可见, 各因素水平对结果影响的强弱顺序是: $A_5 > A_4 > A_3 > A_2 > A_1$, $B_5 = B_4 > B_2 > B_3 = B_1$, $C_2 = C_3 > C_1 > C_4 > C_5$, $D_5 > D_4 > D_3 > D_2 > D_1$ 。方差分析结果可知, 阶段提取时间(A)、乙醇体积分数(C)以及提取温度(D)具有高度显著性影响, 固液比(B)不具显著性影响。其影响因素顺序为 $C > D > A > B$ 。从经济学角度考虑, 无显著性影响因素 B 可取水平 B_2 , 乙醇体积分数可取水平 C_2 。三效动态逆流提取最佳工艺条件为: $A_5 B_2 C_2 D_5$, 即阶段提取时间为 70 min, 固液比为 1 14, 乙醇体积分数为 50 %, 提取温度为 85 °C。

2.6 工艺验证试验: 为考察上述优选提取工艺的稳定性, 根据所筛选的最佳工艺条件重复试验 3 次, 结果见表 5。验证试验结果说明, 所筛选的工艺条件基本稳定。

表 2 正交试验结果与多指标全概率分析

Table 2 Results of orthogonal test and analysis of multi-index breakdown formula

试验号	A	B	C	D	总酚 / %	总黄酮 / %	浸膏提取率 / %	清除自由基能力 / %	全概率值
1	1	1	2	4	0.322	0.300	9.19	90.97	0.093 4
2	2	1	5	5	0.120	0.201	3.98	58.25	0.057 5
3	3	1	4	1	0.118	0.198	4.23	69.84	0.061 2
4	4	1	1	3	0.336	0.239	8.92	90.72	0.087 9
5	5	1	3	2	0.213	0.271	6.55	88.76	0.084 5
6	1	2	3	3	0.231	0.290	7.73	90.38	0.084 6
7	2	2	2	2	0.273	0.245	7.42	91.32	0.087 3
8	3	2	5	4	0.117	0.219	4.13	49.60	0.054 4
9	4	2	4	5	0.239	0.366	7.15	80.85	0.095 8
10	5	2	1	1	0.276	0.248	7.84	88.57	0.084 4
11	1	3	1	5	0.374	0.288	10.70	88.07	0.090 3
12	2	3	3	1	0.181	0.220	6.17	85.37	0.072 1
13	3	3	2	3	0.335	0.288	9.79	85.01	0.087 3
14	4	3	5	2	0.075	0.145	2.82	41.00	0.039 4
15	5	3	4	4	0.257	0.360	7.29	82.20	0.097 7
16	1	4	4	2	0.142	0.236	5.28	73.24	0.066 9
17	2	4	1	4	0.403	0.323	10.68	88.57	0.100 6
18	3	4	3	5	0.364	0.433	10.11	86.39	0.112 8
19	4	4	2	1	0.250	0.225	6.95	89.01	0.081 8
20	5	4	5	3	0.095	0.171	3.60	52.85	0.048 3
21	1	5	5	1	0.051	0.093	2.07	43.80	0.033 1
22	2	5	4	3	0.194	0.300	6.26	67.15	0.076 3
23	3	5	1	2	0.332	0.254	9.46	90.08	0.086 2
24	4	5	3	4	0.337	0.401	9.71	90.30	0.107 7
25	5	5	2	5	0.437	0.400	12.38	89.01	0.108 5

表 3 各因素对多指标全概率值的影响

Table 3 Effect of factors on multi-index probability value

因素	水平	平均数	标准差	因素	水平	平均数	标准差
A	1	0.074	0.002	C	1	0.090	0.002
	2	0.079	0.002		2	0.092	0.002
	3	0.080	0.002		3	0.092	0.002
	4	0.083	0.002		4	0.080	0.002
	5	0.085	0.002		5	0.047	0.002
B	1	0.077	0.002	D	1	0.067	0.002
	2	0.081	0.002		2	0.073	0.002
	3	0.077	0.002		3	0.077	0.002
	4	0.082	0.002		4	0.091	0.002
	5	0.082	0.002		5	0.093	0.002

表 4 全概率评价方差分析

Table 4 Variance analysis of breakdown evaluation

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	相伴概率
校正模型	0.011	16	0.001	32.774	0.000
	(调整 $R^2 = 0.955$)				
截距	0.160	1	0.160	7.876×10^3	0.000
阶段提取时间	0.000	4	8.766×10^{-5}	4.315	0.038
固液比	0.000	4	3.521×10^{-5}	1.733	0.235
乙醇体积分数	0.008	4	0.002	92.641	0.000
提取温度	0.003	4	0.001	32.407	0.000
误差	0.000	8	2.031×10^{-5}		
总和	0.171	25			
校正总和	0.011	24			

表 5 最佳工艺的验证

Table 5 Varification of optimum technology

批号	总酚 / %	总黄酮 / %	浸膏提取率 / %	自由基清除能力 / %
1	0.433	0.397	12.250	90.11
2	0.436	0.395	12.210	90.21
3	0.431	0.394	12.240	90.03
RSD / %	0.024	0.013	0.021	0.09

2.7 三效动态逆流与传统方法的比较:称取白花蛇舌草 5.00 g,按照阶段提取时间为 70 min、固液比为 1:14、乙醇体积分数为 50 %、提取温度为 85 与传统的回流法、浸出法提取 3 次进行比较,结果见表 6。研究表明,三效动态逆流与传统提取方法所得结果相差无几,但溶剂用量却大大减少,同时也降低后续工作能耗。因此,从经济学角度考虑,三效动态逆流提取法优于传统提取法。

表 6 提取方法的对比

Table 6 Comparison of extracting methods

提取方法	总酚 / %	总黄酮 / %	浸膏提取率 / %	自由基清除能力 / %	溶剂用量 / (mL · g ⁻¹)
回流法	0.424	0.403	12.29	90.19	42.0
浸出法	0.441	0.370	12.21	89.79	42.0
三效动态逆流	0.433	0.395	12.23	90.12	18.5

3 讨论

对于具有多种有效组分的中药材提取工艺来说,以单一指标来优化提取工艺,而不考虑其他指标对优化结果的影响,有时会出现矛盾的结论。综合考虑与药效相关的各项指标,能够更加科学地评价和优化白花蛇舌草提取工艺。

中药需求量增长迅速,但由于缺乏生产工艺的标准化,使其制剂的大规模生产受到限制。综合考虑与药效相关的各项指标,标准化中草药制剂的生产是中药发展与国际接轨的必然趋势。而实验室模拟多效动态逆流提取中草药的工艺研究可为企业大规模生产探索条件。

参考文献:

[1] 陈 赞,田景奎.一种中药动态连续逆流提取的实验室模拟方法[J].亚太传统医药,2006,2(1):60-64.
[2] 于 新,杜志坚,陈悦娇,等.白花蛇舌草提取物抗氧化作用的研究[J].食品与发酵工业,2002,28(3):10-13.
[3] 曲 震,史彦芬.白花蛇舌草治疗癌症发热 60 例疗效观察[J].中国中医药科技,2001,8(6):345.
[4] 董欢欢,曹树稳,余燕影.白花蛇舌草及其药对提取物抗氧化及清除自由基活性[J].天然产物研究与开发,2008,20(5):782-786,802.
[5] 何志勇,夏文水. Folin-Ciocalteu 比色法测定橄榄中多酚含量的研究[J].林产化学与工业,2006,26(4):15-18.
[6] Blois M S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical [J]. Nature, 1958, 181 (4617): 1199-1200.