

酶法辅助提取绞股蓝中总黄酮工艺优化

欧阳辉^{1,2}, 田启建¹, 余 佶¹, 李顺祥^{2*}

1. 吉首大学 植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室, 湖南 吉首 416000

2. 湖南中医药大学 中药现代化研究湖南省高校重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 优化酶法辅助提取绞股蓝中总黄酮工艺。方法 采用响应面法优化工艺, 绞股蓝经纤维素酶处理后用 95% 乙醇提取总黄酮, 研究酶用量、酶解温度、酶解时间和酶解 pH 值对总黄酮得率的影响。结果 酶法提取的最佳工艺条件: 酶用量 120 U/mL, 酶解温度 49 ℃, 酶解时间 150 min, 酶解 pH 值 3.9, 总黄酮得率可达 0.357%。结论 纤维素酶辅助提取绞股蓝中总黄酮工艺稳定可行。

关键词: 绞股蓝; 总黄酮; 提取; 纤维素酶; 响应面法

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0886-04

Technology optimization for extracting total flavonoids from *Gynostemma pentaphyllum* by cellulase

OUYANG Hui^{1,2}, TIAN Qi-jian¹, YU Ji¹, LI Shun-xiang²

1. Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Utilization, Jishou University, Jishou 416000, China

2. Key Laboratory of Modernization of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To optimize the extracting process of total flavonoids from *Gynostemma pentaphyllum*. **Methods** The total flavonoids were extracted with ethanol 95% after the cellulase treatment to *G. pentaphyllum*, and the effects of enzyme dosage, enzymatic treatment temperature, enzymatic treatment time, and pH value on the total flavonoids yield was studied with response surface method. **Results** The optimal enzymatic extracting process of total flavonoids was as follows: enzyme dosage 120 U/mL, enzymatic temperature 49 ℃, enzymatic time 150 min, and pH value 3.9, and the total flavonoids yield reached 0.357%. **Conclusion** Cellulase is suitable for the total flavonoid extraction from *G. pentaphyllum*.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino; total flavonoids; extraction; cellulase; response surface method (RSM)

绞股蓝又名七叶胆, 是葫芦科绞股蓝属植物绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 的全草, 为多年蔓生草本, 主要分布在东南亚及我国长江以南的广大地区, 含有丰富的黄酮类化合物(芦丁、槲皮素等)^[1-2], 具有抗疲劳、调血脂、降血压、促进细胞新陈代谢、抗衰老、增强免疫功能、抑制肿瘤、祛痰利尿等作用以及临床治疗气管炎、传染性肝炎等^[3-5]。

目前黄酮类化合物的提取方法主要有水提取、碱提酸沉、乙醇提取、微波辅助提取、超临界萃取等方法。酶解法为天然产物提取中的新兴技术, 利用酶制剂可以降解植物细胞壁, 使胞内有效成分最大限度溶出, 同时酶解可以较温和地将植物组织分

解, 保证了提取物的性质和结构的稳定^[6-11]。绞股蓝植物细胞壁的主要成分为纤维素、半纤维素, 选用纤维素酶作为实验用酶制剂。

响应面分析法(response surface method, RSM)是一种优化工艺条件的有效方法, 广泛应用于化学化工、生物工程、食品工业等方面^[12-13]。它与正交试验设计法不同, 它通常是利用中心组合试验拟合出一个完整的二次多项式模型, 在试验设计与结果表述方面更加优良, 已广泛地应用于各类条件优化实践中^[14-15]。本实验采用响应曲面法中的 Box-Behnken 设计优化酶法辅助提取绞股蓝中总黄酮的工艺参数。

1 仪器与材料

收稿日期: 2010-08-19

基金项目: 湖南省科技计划项目(2009FJ3028)

作者简介: 欧阳辉(1979—), 男, 湖南省衡阳人, 实验师, 理学学士, 主要从事天然生物活性成分研究。

Tel: 13117439981 E-mail: oyhmail@163.com

*通讯作者 李顺祥 Tel: (0731)88458229 E-mail: lishunxg@yahoo.com.cn

UV—2450 紫外可见分光光度计(日本岛津公司)、HH—2 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)、精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)、ZK—82A 型电热真空干燥箱(上海市实验仪器总厂)、Es—10K 电子天平(长沙湘平科技发展有限公司)、FA2004 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

绞股蓝产于湖南省湘西古丈县高峰乡,由吉首大学生物资源与环境科学学院刘世彪教授鉴定为绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 的全草。芦丁对照品(质量分数 $\geq 97\%$,批号 1000802-200829)购于中国药品生物制品检定所;纤维素酶(20 000 U/g,批号 200806)购于湖南尤特有限公司;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取工艺

准确称取粉碎好、干燥至恒定质量的绞股蓝 5 g,加纤维素酶和 95%乙醇 250 mL,在不同酶用量、酶解温度、酶解时间和酶解 pH 值条件下处理后,调 pH 值至 9.0,升温至 90 ℃提取 1 h,离心去沉淀得提取液,减压回收乙醇,浓缩成稠膏状,置真空干燥箱干燥至恒定质量,得提取物。

2.2 总黄酮的测定

2.2.1 对照品溶液的制备 将芦丁对照品于 120 ℃烘箱中烘至恒定质量,于干燥器中冷却后称取 10 mg 用 95%乙醇溶解,定容至 100 mL,得 0.100 mg/mL 芦丁对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取干燥至恒定质量的提取物 5 mg,置 100 mL 量瓶中,用 95%乙醇定容,摇匀,待测。

2.2.3 线性关系考察 准确吸取芦丁对照品溶液 0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 mL 于 25 mL 量瓶中,加 5%亚硝酸钠 0.3 mL,放置 6 min,再加入 10%硝酸铝 0.3 mL,放置 6 min 后加入 4% NaOH 溶液 10.0 mL,再用 95%乙醇定容,摇匀,以 95%乙醇为空白参比,测定 510 nm 处吸光度值;以质量浓度对吸光度值进行线性回归,得回归方程 $Y=0.097 X-0.001$, $R^2=0.997$,表明芦丁在 0.1~0.4 mg/mL 线性关系良好。

2.2.4 样品总黄酮的测定 按“2.2.3”项下方法处理供试品溶液,测定吸光度值,计算总黄酮质量分数及总黄酮得率(总黄酮得率=总黄酮的质量分数 $\times$ 提取物的质量/绞股蓝质量)。

2.3 响应曲面优化试验设计及其结果

根据单因素试验确定的初步结果,采用响应面法中的 Box-Behnken 设计,以酶用量(X_1)、酶解温度(X_2)、酶解时间(X_3)和酶解 pH 值(X_4) 4 个因素为自变量,每个因素取 3 水平,分别以 -1、0、+1 编码,以总黄酮得率为响应值,进行 4 因素 3 水平试验。因素与水平见表 1,结果见表 2。

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levers

水 平	因 素			
	$X_1/(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/min	X_4
+1	120	55	150	5.5
0	100	45	120	4.5
-1	80	35	90	3.5

表 2 Box-Behnken 设计及结果

Table 2 Design and results of Box-Behnken test

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	总黄酮得率/%
1	-1	-1	0	0	0.269
2	1	-1	0	0	0.275
3	-1	1	0	0	0.278
4	1	1	0	0	0.301
5	0	0	-1	-1	0.327
6	0	0	1	-1	0.332
7	0	0	-1	1	0.319
8	0	0	1	1	0.321
9	-1	0	0	-1	0.301
10	1	0	0	-1	0.327
11	-1	0	0	1	0.283
12	1	0	0	1	0.304
13	0	-1	-1	0	0.291
14	0	1	-1	0	0.321
15	0	-1	1	0	0.308
16	0	1	1	0	0.346
17	-1	0	-1	0	0.311
18	1	0	-1	0	0.332
19	-1	0	1	0	0.328
20	1	0	1	0	0.348
21	0	-1	0	-1	0.265
22	0	1	0	-1	0.290
23	0	-1	0	1	0.268
24	0	1	0	1	0.273
25	0	0	0	0	0.310
26	0	0	0	0	0.312
27	0	0	0	0	0.304
28	0	0	0	0	0.309
29	0	0	0	0	0.313

使用统计软件 Design Expert 7.16 对表 2 中总黄酮得率数据进行多元回归拟合, 得到总黄酮得率对编码自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 的二次多项回归方程 $Y=0.31+0.009\ 75\ X_1+0.011\ X_2+0.006\ 8\ X_3-0.006\ 2\ X_4+0.004\ 25\ X_1X_2-0.000\ 25\ X_1X_3-0.001\ 25\ X_1X_4+$

$0.002\ X_2X_3-0.005\ X_2X_4-0.000\ 75\ X_3X_4-0.002\ 6\ X_1^2-0.024\ X_2^2+0.026\ X_3^2-0.008\ 467\ X_4^2$ 。方差分析及回归系数显著性检验结果见表 3。所建立的二次多项模型具有高度的显著性 ($P<0.001$), 模型决定系数 $R^2=0.940\ 8$, 表明模型拟合度良好。

表 3 回归方程方差分析表

Table 3 Variance analysis of regression equation

方差来源	总 和	自由度	均 方	F 值	P 值	显著性
模型	0.014 333	14	0.001 024	15.902 34	<0.000 1	$P<0.001$
X_1	0.001 141	1	0.001 141	17.719 73	0.000 9	$P<0.001$
X_2	0.001 474	1	0.001 474	22.897 53	0.000 3	$P<0.001$
X_3	0.000 56	1	0.000 56	8.703 885	0.010 5	$P<0.05$
X_4	0.000 456	1	0.000 456	7.088 411	0.018 6	$P<0.05$
X_1X_2	0.000 072	1	0.000 072 3	1.122 289	0.307 4	
X_1X_3	0.000 000 25	1	0.000 000 25	0.003 883	0.951 2	
X_1X_4	0.000 006	1	0.000 006 25	0.097 084	0.759 9	
X_2X_3	0.000 016	1	0.000 016	0.248 534	0.625 8	
X_2X_4	0.000 1	1	0.000 1	1.553 341	0.233 1	
X_3X_4	0.000 002 25	1	0.000 002 25	0.034 95	0.854 4	
X_1^2	0.000 043 6	1	0.000 043 6	0.676 76	0.424 5	
X_2^2	0.003 765	1	0.003 765	58.480 34	<0.000 1	$P<0.001$
X_3^2	0.004 312	1	0.004 312	66.981 42	<0.000 1	$P<0.001$
X_4^2	0.000 465	1	0.000 465	7.222 726	0.017 7	
残差	0.000 901	14	0.000 064 4			
失拟项	0.000 852	10	0.000 085 2	6.927 507	0.038 6	
纯误差	0.000 049 2	4	0.000 012 3			
总和	0.015 234	28				
$R^2=0.940\ 8$						

通过求解回归方程, 得到绞股蓝中总黄酮的最佳提取工艺条件: 酶用量 120 U/mL, 酶解温度 49 °C, 酶解时间 150 min, 酶解 pH 值 3.9。由回归方程预测总黄酮理论得率可达 0.355%。

2.4 验证试验

在上述响应面分析结果确定的最佳工艺条件下进行 3 次提取试验, 得到绞股蓝总黄酮的平均得率为 0.357% (RSD=1.13%), 与预测值 0.355% 吻合良好。

2.5 酶法辅助提取与传统溶剂浸提法的比较

用确定的最佳工艺条件对绞股蓝中总黄酮进行酶法辅助提取, 同时采用传统溶剂浸提法对绞股蓝中总黄酮进行提取。结果传统溶剂浸提法的总黄酮得率为 0.266%, 比酶法辅助提取的低 0.091%, 绞

股蓝中总黄酮提取采用酶法辅助提取法要优于传统溶剂浸提法。

3 讨论

本实验采用 Box-Behnken 试验设计法对纤维素酶辅助提取绞股蓝总黄酮的工艺进行优化, 并建立了二次多项回归模型。通过对回归方程进行方差分析表明, 酶用量和酶解温度对绞股蓝总黄酮得率的线性效应极显著, 酶解时间和酶解 pH 值对绞股蓝总黄酮得率的线性效应显著。但 4 因素之间交互效应影响都不显著。优化后确定的酶法提取绞股蓝总黄酮的最佳工艺条件为酶用量 120 U/mL, 酶解温度 49 °C, 酶解时间 150 min, 酶解 pH 值 3.9, 此工艺条件下的绞股蓝总黄酮得率为 0.357%。与传统溶剂浸提法相比, 酶法辅助提取绞股蓝中总黄酮的得率

高约25%。酶法辅助提取操作过程简单方便、提取效果好,是一种高效提取方法。本研究为绞股蓝总黄酮提取的工业化生产提供了理论基础,具有实际的指导意义。

参考文献

- [1] 沈宏伟,肖彦春,车仁国,等.绞股蓝化学成分研究的现状[J].时珍国医国药,2008,19(7):1561-1564.
- [2] 刘世彪,严四华,鲁云,等.五柱绞股蓝总皂苷和总黄酮的季节性变化[J].中草药,2009,40(4):648-651.
- [3] 岳琳娜,高学玲,岳鹏翔.绞股蓝有效成分的研究进展[J].饮料工业,2008,11(6):9-11.
- [4] 史琳,赵红,张璐雅,等.绞股蓝药理作用的研究进展[J].药物评价研究,2011,34(2):125-129.
- [5] 韩晓燕,卫洪波,张富程.绞股蓝总苷对大鼠心、脑 Na^+ , K^+ -ATP酶的抑制作用及其动力学分析[J].中草药,2006,37(10):1542-1544.
- [6] 张睿,徐雅琴,时阳.黄酮类化合物提取工艺[J].食品与机械,2003(1):21-23.
- [7] 纵伟.酶法提取银杏叶中总黄酮的研究[J].山西食品工业,2000(1):13-15.
- [8] 杨吉霞,蔡俊鹏,祝玲.纤维素酶在中药成分提取中的应用[J].中药材,2005,28(1):64-67.
- [9] 余洪波,张晓昱.酶法在中药提取中的研究进展[J].中成药,2005,27(5):591-593.
- [10] 张巾英,张明春.应用纤维素酶提取中草药有效成分的研究进展[J].上海中医药杂志,2007,41(1):79-81.
- [11] 于敬,周晶.生物酶解技术在中药提取中的应用[J].现代药物与临床,2010,25(5):340-344.
- [12] 杨文雄,高彦祥.响应面法及其在食品工业中的应用[J].中国食品添加剂,2005(2):68-71.
- [13] 杨磊,刘婷婷,卫蔚,等.响应面法优选新疆紫草总萘醌的匀浆提取工艺研究[J].中草药,2010,41(4):568-573.
- [14] Li Q H, Fu C L. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein [J]. Food Chem, 2005, 92(4): 701-706.
- [15] 茆诗松,王静龙,史定华,等.统计手册[M].北京:科学出版社,2003.

《中国药学杂志》岛津杯第十届全国药物分析优秀论文评选交流会征文通知(第一轮)

为推动我国药物分析事业的发展,促进药物分析技术的交流,由中国药学会药物分析专业委员会主办、《中国药学杂志》社承办、岛津国际贸易(上海)有限公司协办的《中国药学杂志》岛津杯第十届全国药物分析优秀论文评选交流会定于2011年9月下旬在上海举行。本届大会主题为:药物分析在药品质量、用药安全及新药研发中的应用。届时将邀请中国药学会领导,药物分析专业委员会历届正、副主任委员及新一届全体药物分析专业委员会委员和有关专家参会。

1 征文内容

(1)近几年来国内外药物分析新理论、新技术、新方法;(2)现代分析手段和检测技术在药物分析中的应用;(3)中药注射剂的质控和安全性研究;(4)化学药物、抗生素药品质量分析及研究;(5)中药、天然药物及制剂质量分析及研究;(6)生物技术药品、生化药品质量分析及研究;(7)药用辅料、包装材料与药品质量分析研究;(8)药物血药浓度监测和药代动力学;(9)药物生物利用度和溶出度的研究;(10)药物快速分析检定新方法、新技术;(11)毒物快速分析检定;(12)组学(蛋白、代谢、细胞)分析检测方法研究;(13)计算机和数学在药物分析领域中的应用。

2 征文要求

(1)未公开发表及未在全国性会议上交流过,有一定的创新性。(2)论文体例、格式请参见《中国药学杂志》2011年第1期稿约。(3)应征论文被录用后,将通知作者,论文录用与否,一律不退稿,请自留底稿。(4)征文截止时间:2011年7月30日(以邮戳为准)。稿件及信封请注明“岛津杯征文”字样并附单位介绍信。同时将电子文件发至daojinbei@yahoo.com.cn; zgyxzz@cpa.org.cn(标题请注明岛津杯征文)。

3 会议时间及地点

时间:2011年9月下旬(暂定) 地点:上海(具体详见第二轮通知)

4 论文评奖

在本次会上对交流的论文将组织国内著名药物分析专家进行评奖,评选出优秀论文一等奖3名(3000元/名)、二等奖6名(2000元/名)、三等奖10名(1000元/名)。获得一、二等奖的论文在征得作者同意后将发表在《中国药学杂志》上发表。

5 联系地址及联系方式

地址:北京市朝阳区建外大街4号建外SOHO九号楼1803室(邮编:100022)

联系人:李亚娟、田菁

电话:010-58698031 转 65; 010-58699275 转 829