

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.05.005

表面活性剂协同提取苦瓜中总黄酮的研究

李淑玲 凌爱霞

(济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067)

摘要 **目的** 提高苦瓜中总黄酮提取效率, 筛选出其最佳提取工艺。**方法** 以苦瓜为原料, 选取非离子型表面活性剂用于协同提取苦瓜中的总黄酮, 研究表面活性剂用量、提取温度、提取时间、乙醇体积分数等因素对其影响。采用 L9(34) 正交试验确定苦瓜总黄酮的最佳提取工艺条件。**结果** Tween-20 对苦瓜中总黄酮的提取具有较好的协同作用。各因素对黄酮提取率影响大小依次是: 表面活性剂用量 > 提取温度 > 乙醇体积分数 > 提取时间。**结论** 最佳提取工艺条件乙醇浓度 70%, Tween-20 用量 0.05g, 提取时间 4h, 提取温度 70℃。

关键词 表面活性剂; 黄酮; 苦瓜; 正交试验

中图分类号: R927.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2012)10-325-04

Study on Extraction of Flavonoids from the Bitter Melon Assisted by Surfactant

LI Shu-ling, LING Ai-xia

(Academy of Basic and Forensic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To improve the extracting efficiency of total flavonoids from bitter melon, and filter out the best extracting process. **Methods** Experiments were carried out to explore the extraction of flavonoids from the bitter melon. The effects of surfactant usage, extracting temperature, extracting duration, ethanol volume percentage on extraction effect of total flavonoids from bitter melon were discussed. L9(34) orthogonal experiment was used to obtain the optimum extraction conditions of total flavonoids. **Results** Tween-20 was suit to explore the extraction of flavonoids from the bitter melon. Various factors on extraction effect sizes was as following: surfactant usage > extraction temperature > ethanol volume percentage > extracting duration. **Conclusion** The optimum extraction conditions were obtained as ethanol concentration 70%, Tween-20 0.05g, extraction at 70℃ for 4 hours.

Key words: Surfactant; Flavonoids; Bitter melon; Orthogonal experiment

为了进一步提高一些药材的利用效率, 近年来, 人们不断尝试一些新技术和新方法^[1-4], 自 20 世纪 50 年代, 表面活性剂开始应用于天然药物中有效成分的提取^[5], 不仅大大降低了提取成本, 而且提高了提取率, 且无环保问题^[6-7], 因此该研究近年来引起人们极大的研究热情^[8-13]。

苦瓜(bitter melon), 别名锦荔枝、凉瓜、癞葡萄, 是葫芦科苦瓜属蔓性草本植物, 既是家庭餐桌上的蔬菜又是著名的民间中草药。具有清热解毒、滋养强壮、降血脂、降血糖功效, 对提高机体的免疫能力, 防治湿疹等皮肤病有一定作用。目前, 对苦瓜中的多糖、皂苷等生物活性成分研究报道的较多, 而对苦瓜中黄酮类物质利用表面活性剂协同提取的研究还少见报道。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

H1650 高速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); TP213 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); 101-2A 型电热鼓风干燥箱(中国龙口市先科仪器有限公司); SHB-Ⅲ循环水式真空泵(郑州长城科技工贸有限公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); 电热恒温水浴锅(北京长风仪器仪表公司); FW100 万能粉碎机(天津市泰斯特仪器公司)。

1.2 材料与试剂

苦瓜购于日照市农贸市场, 洗净晾干, 去籽去瓢, 清洗, 切片, 70℃ 烘干, 80 目筛粉碎, 石油醚脱脂, 脱色素, 烘干至恒重; 芦丁标准品(中国生物检验所); Tween-20、Tween-60、Tween-80(天津市巴斯夫化工有限公司); 石油醚(天津广成化学试剂有限公司); 无水乙醇(分析纯); 浓盐酸; 氢氧化钠; 硝

酸铝;亚硝酸钠。

2 实验部分

2.1 苦瓜中黄酮提取工艺流程

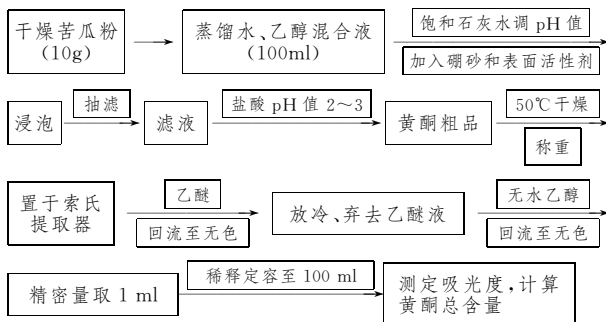


图1 苦瓜中黄酮提取工艺流程

2.2 单因素实验

分别考察了表面活性剂种类、用量、提取温度、提取时间、乙醇体积分数等各单一因素对苦瓜中总黄酮提取效率的影响,筛选出具有明显协同效应的表面活性剂。

2.3 正交实验设计

为了优化苦瓜中总黄酮的提取工艺条件,并进一步考察多因素共存时,各自对苦瓜中总黄酮提取效率的影响,本部分采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,对各因素的影响进行了考察,各因素及其水平设计见表1。

表1 正交实验设计 $L_9(3^4)$ 的因素和水平表

水平	A 乙醇体积分数 (%)	B 提取时间 (h)	C 表面活性剂剂量 (g)	D 提取温度 (°C)
1	70	3	0.005	60
2	80	3.5	0.0075	70
3	90	4	0.01	80

2.4 苦瓜中总黄酮的检测

2.4.1 标准曲线的绘制 准确称取芦丁标准品 25.0mg, 置 100ml 容量瓶中, 加 80% 乙醇溶解并稀释至刻度。精密吸取 2.0ml、4.0ml、6.0ml、8.0ml、10.0ml、12.0ml、14.0ml、16.0ml 于 8 只 50ml 容量瓶中, 分别加入质量分数 5% 的 NaNO_2 1.5ml, 摇匀, 放置 5min 后加入质量分数 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 1.5ml, 6min 后再加入质量分数 4% 的 NaOH 溶液 20ml, 混匀, 用 80% 乙醇稀释至刻度。10min 后于波长 500nm 处比色测定, 试剂空白为参比, 以吸光度为纵坐标, 芦丁质量浓度为横坐标, 绘制吸光度—芦丁质量浓度标准曲线, 结果见图2。

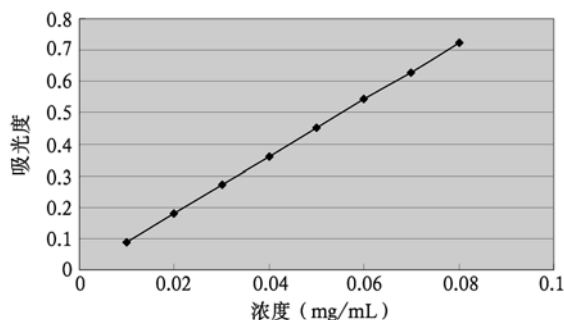


图2 芦丁标准曲线

2.4.2 样品总黄酮质量分数的测定 准确称取所得黄酮粗产品 25.0mg, 置 100ml 容量瓶中, 加 80% 乙醇溶解并加至刻度。精密吸取 9ml 于 50ml 容量瓶中, 用 80% 乙醇稀释至刻度。在 500nm 波长下, 进行比色测定, 根据芦丁标准曲线, 计算粗产品中黄酮质量分数。

3 结果分析

3.1 各单因素对苦瓜中黄酮提取效率的影响

各单因素对苦瓜中黄酮提取效率的影响见表2。

表2 单一条件的改变对提取率的影响

项目		产率(%)	纯度(%)
表面活性剂种类	对照品	0.72	90.2
	Tween-20	1.88	89.8
	Tween-60	0.64	79.8
	Tween-80	0.70	83.4
吐温 20 的用量(g)	0.0025	1.53	89.8
	0.005	1.88	89.5
	0.0075	1.89	87.6
	0.01	1.89	86.9
提取时间(h)	3	1.62	89.9
	3.5	1.73	89.6
	4	1.86	89.2
	4.5	1.88	88.3
提取温度(℃)	40	0.83	91.1
	50	1.22	90.5
	60	1.73	89.9
	70	1.88	89.9
	80	1.81	88.6

由表2可知: 1) Tween-60 和 Tween-80 的加入导致总黄酮产率和纯度的下降, 而 Tween-20 使黄酮产率大大提高, 且产品纯度较对照品变化不大, 对黄酮的提取效率有明显的协同作用, 因此其它实验均选取具有明显协同效应的表面活性剂。2) 随 Tween-20 用量的增加, 黄酮的产率随之提高, 但当用量达到 0.005g 后产率基本不再变化。这是因为在提取黄酮的过程中, 黄酮成分能否有效提出, 取决于苦瓜粉能否被药材润湿, 苦瓜粉的润湿程度取决于其接触角的大小, 而根据 young's 方

程 $\cos(\sigma_s - g - \sigma_s - l) / \sigma_l - g$ 知,随 Tween-20 用量的增加,其液体表面张力及固液间的界面张力均减小,从而使其接触角减小,润湿度增加,从而提高了提取效率,但当 Tween-20 增加到一定浓度后,由于胶束的形成,其表面张力基本不再随其用量的增加而改变,故其产率基本不再发生明显变化。而纯度则恰好相反,随着用量的增加,纯度降低,这说明 Tween-20 胶束不仅对芦丁有增溶作用,同时也对其它杂质有增溶作用。3)随着提取时间的延长产率有所提高,但当提取时间达到 4h 以后,产率已基本稳定,并且随着提取时间的延长,杂质溶出增加,产品纯度降低。综合两方面的因素,本实验选取提取时间 4h 为宜。随着提取温度的升高,黄酮产率呈升高趋势,但当温度超过 70℃ 时,产率却开始下降,这可能是因为温度过高导致乙醇挥发使其浓度降低,同时温度过高还会使黄酮类化合物受到破坏,从而产率下降。

3.2 正交实验结果

正交实验结果见表 3、4。由表可以看出,苦瓜中总黄酮最佳提取工艺条件为 6 号实验 $A_2B_3C_1D_2$,从极差分析可知 4 个因素中,对黄酮提取率影响大小依次是表面活性剂用量(C) > 提取温度(D) > 乙醇体积分数(A) > 提取时间(B)。

表 3 提取率正交分析的结果及直观分析表

	因素				提取率	纯度
	乙醇体积分数(%)	提取时间(h)	表面活性剂剂量(g)	提取温度(℃)		
实验 1	1	1	1	1	3.922	90.02
实验 2	1	2	2	2	1.992	88.62
实验 3	1	3	3	3	1.343	87.31
实验 4	2	1	2	3	1.734	87.92
实验 5	2	2	3	1	1.381	87.65
实验 6	2	3	1	2	4.516	91.14
实验 7	3	1	3	2	1.338	87.19
实验 8	3	2	1	3	2.641	88.94
实验 9	3	3	2	1	1.822	88.25
K1	7.257	6.994	11.079	7.125		
K2	7.631	6.014	5.0548	7.846		
K3	5.801	7.681	4.062	5.718		
1/3K1	2.419	2.332	3.693	2.375		
1/3K2	2.544	2.005	1.841	2.616		
1/3K3	1.934	2.561	1.354	1.906		
极差	0.610	0.556	2.339	0.710		

表 4 提取率的正交方差表

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
乙醇体积分数(%)	0.002	2	1.400	4.66	显著
提取时间(h)	0.001	2	0.080	4.66	不显著
表面活性剂剂量(g)	0.004	2	1.800	4.66	显著
提取温度(℃)	0.003	2	1.600	4.66	显著
误差	0.01	8			

3.3 黄酮样品纯度正交分析结果

黄酮样品纯度正交分析结果见表 3、5。由表 3、5 可以得知,以黄酮纯度为考察指标可得出其最佳工艺条件为 $A_2B_3C_1D_2$,从极差分析可以得知,4 个因素对黄酮提取纯度的影响依次是表面活性剂用量(C) > 提取温度(D) > 乙醇体积分数(A) > 提取时间(B),与以提取率为考查指标所得结果一致。

表 5 样品纯度的方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
乙醇体积分数(%)	0.003	2	1.400	4.660	显著
提取时间(h)	0.001	2	0.008	4.660	不显著
表面活性剂剂量(g)	0.006	2	1.800	4.660	显著
提取温度(℃)	0.002	2	1.200	4.660	显著
误差	0.013	8			

4 结论

1)表面活性剂的加入对苦瓜中总黄酮提取有较大影响,Tween-60、Tween-80 使黄酮提取率降低,Tween-20 使黄酮提取率升高,且升幅较大,对黄酮提取有明显的协同作用。

2)以苦瓜中总黄酮的提取效率和提取纯度为考察指标,用 Tween-20 协同提取苦瓜中总黄酮时表面活性剂用量、乙醇体积分数、提取温度均为显著性影响因子,而在实验范围内提取时间为非显著性影响因子,其最佳工艺条件为:提取温度为 70℃,提取时间为 4h,表面活性剂用量为 0.005g,乙醇体积分数为 70%。

参考文献:

[1] Chen YY,Gu XH,Huang SQ,et al. Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from Inonotus obliquus and evaluation of its anti-tumor activities[J]. Int J Biol Macromol,2010,46(4):429-435.

[2] Hromádková Z,Ebringerová A,Valachovic P. Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (Valeriana officinalis L.). Ultrasonics Sonochemistry[J]. Ultrasonics Sonochemistry,2002,9(1):37-44.

[3] 杨静娟,钟世安. 响应面法优化玉竹多糖表面活性剂协助提取条件[J]. 中南大学学报(自然科学版),2012,43(3):835-841.

[4] 庞红,文略,王小萍,等. 苦瓜总黄酮的超声波提取工艺研究[J]. 微量元素与健康研究,2006,24(6):49-50.

[5] 王培义,徐宝财,王军. 表面活性剂——合成性能应用[M]. 北京:化学工业出版社,2012:166-170.

[6] 郭青枝,赵二芳,陈婕. 正交试验优选苦瓜黄酮超声波提取工艺[J]. 酿酒科技,2007,1:36-37.

min. m^2 , MABP < 50 mmHg、左房压 > 20 mmHg、尿量 < 30 ml/h; 5) 联合应用 2 种以上正性肌力药物循环仍不稳定, 多巴胺量 $> 10 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$, 肾上腺素 $> 0.2 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$, MABP < 60 mmHg。

准确把握应用时机对其预后至关重要。本组资料显示, 术后应用大量升压药效果不佳方施行紧急应用者脱机率 (72.8%) 明显减低, 而死亡率 (63.6%) 明显增高, 术前及术毕植入 IABP 并及时应用者效果较好; 虽然部分患者应用 IABP 后循环稳定或已撤除 IABP, 但由于术后 LOCS 持续时间长造成肝、肾、胃肠及凝血功能严重损害, 最终导致多脏器功能衰竭或严重感染致患者死亡。故准确判断心功能及早使用 IABP, 是提高抢救成功率的关键^[3-4]; 作者强调对心功能应及时做出准确判断, 及时应用 IABP。同时在 IABP 维持循环稳定的前提下, 及时给予脏器功能支持与保护、保持内环境稳定、加强抗感染、提高免疫力等综合治疗。

IABP 疗效除与应用指征及时机密切相关外, 还与应用患者心衰的病理解剖和病理生理不同有关。本组资料显示对冠心病疗效最佳, 瓣膜病次之, 先心病效果最差。冠心病的主要病理改变为冠状动脉狭窄, 心肌供血减少, 心肌氧供需失衡。IABP 增加了冠脉近端血流速度, 使阻塞的冠脉血流量增加 5%~10%, 促进心脏缺血区侧支循环开放, 改善心肌氧供需失衡^[5-6]。风心病心力衰竭是由于心肌长期受损加上手术急性创伤加重心衰, IABP 效果逊于冠心病。先心病术后 LCOS 多与心脏畸形复杂且畸形矫正欠佳有关, IABP 效果差。

IABP 并发症防治。Meharwal 等^[6]报道 911 例植入 IABP 患者中, 发生比较严重并发症者占 5.9%, 其中下肢缺血、血栓形成较为常见。但随着

IABP 技术、管道材质及穿刺方法的改进成熟, IABP 的并发症显著下降。本组 40 例患者植入 IABP 后并发症以 PLT 减少最常见, 最低为 $36 \times 10^9/L$, 停用 IABP 并给予输注 PLT 后好转。仅 1 例 CABG 患者出现一过性下肢缺血, 术后行下肢超声检查发现有双侧股动脉狭窄, 给予拔除鞘管后好转。笔者体会术前合并有心脑血管广泛硬化狭窄的患者行 IABP 植入前需注意下肢动脉有无狭窄, 并以采取无鞘穿刺植入球囊为宜。术后持续监测穿刺侧下肢经皮氧饱和度, 及时应用肝素抗凝, 并监测 PLT 变化, 可减少严重并发症的发生。

参考文献:

- [1] Nauuheim KS, Swartz M T, Pennington D G, et al. Intra-aortic balloon pumping in patients requiring cardiac operations, risk analysis and long-term follow-up[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2007, 104: 1654-1661.
- [2] 丁文祥, 苏兆统. 小儿心脏重症监护手册[M]. 上海: 世界图书出版公司, 2009: 408.
- [3] 段大为, 李彤, 张文芳, 等. 主动脉内气囊反搏临床应用时机的选择与效果分析[J]. 心肺血管病杂志, 2009, 28(4): 223-225.
- [4] Miceli A, Fiorani B, Danesi TH, et al. Prophylac intra-aortic balloon pump in high-risk patients undergoing coronary artery bypass grafting: a propensity score analysis[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2009, 9(2): 291-294.
- [5] Takenchi M, Nohtomi Y, Yoshitani H, et al. Enhanced coronary flow velocity during intra-aortic balloon pumping assessed by transthoracic Doppler echocardiography[J]. Am Coll Cardiol, 2004, 43: 368-376.
- [6] Meharwal ZS, Trehan N. Vascular complications of intra-aortic balloon insertion in patients undergoing coronary revascularization: analysis of 911 cases[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2002, 21(4): 741-747.

(收稿日期 2012-08-11)

(上接第 327 页)

- [7] 龚盛昭, 程江, 杨卓如. 表面活性剂协同提取芦丁的研究[J]. 临产化工与工业, 2004, 8(24): 93-96.
- [8] RS Iskandarov, Kh M Kamilov. Extraction of rutin from Sophora japonica buds using surface-active agents[J]. Chemistry of Natural Compounds, 1998, 34(4): 448-449.
- [9] 韩伟, 马婉婉, 骆开荣, 等. 表面活性剂协同微波提取布渣叶总黄酮[J]. 南京工业大学学报(自然科学版), 2012, 34(2): 91-94.
- [10] Do LD, Sabatini DA. Aqueous extended-surfactant based method for vegetable oil extraction: proof of concept [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2010, 87(10):

1211-1220.

- [11] Naksuk A, Sabatini DA, Tongcumpou C. Microemulsion-based palm kernel oil extraction using mixed surfactant solutions[J]. Industrial Crops and Products, 2009, 30(2): 194-198.
- [12] 张卫丽, 李淑英. 表面活性剂的应用和发展[J]. 全面腐蚀控制, 2005, 19(6): 42-44.
- [13] 朱晓娜, 曹伟伟, 李明静. 十二烷基苯磺酸钠-超临界二氧化碳萃取槐花总黄酮的工艺研究[J]. 化学研究, 2012, 23(2): 73-77.

(收稿日期 2012-09-11)