

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2021.05.002

毒根斑鸠菊花枝总黄酮的提取工艺*

贾紫菲¹ 王盈盈^{1△} 王开明² 李霄¹ 白瑶¹ 周凤玲¹(¹ 济宁医学院基础医学院; ² 山东理工职业学院能源与材料工程学院, 济宁 272067)

摘要 目的 对毒根斑鸠菊花枝中总黄酮的提取工艺进行最优选择。方法 采用单因素实验研究超声波功率、提取温度、乙醇浓度、液料比以及提取时间对毒根斑鸠菊花枝中总黄酮提取率的影响并用正交实验进行验证。结果 超声波功率 540W、温度 70℃、乙醇浓度 70%、料液比 1:20g/mL、提取时间 70min 为最佳提取条件。在此条件下,毒根斑鸠菊花枝提取总黄酮含量为 81.59 mg·g⁻¹。结论 本研究优化了毒根斑鸠菊花枝总黄酮的提取工艺,该工艺稳定可行,重复性好,提取效率较高。

关键词 毒根斑鸠菊;正交试验;总黄酮

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2021)10-310-05

The extraction technology of total flavonoids from the branches of vernonia cumingiana benth

JIA Zifei¹, WANG Yingying^{1△}, WANG Kaiming², LI Xiao¹, BAI Yao¹, ZHOU Fengling¹(¹ College of Basic Medicine, Jining Medical University;² School of Energy and Materials Engineering, Shandong Polytechnic Vocational College, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of total flavonoids from the branches of Vernonia cumingiana Benth. **Methods** Single factor experiment method was used to study the effects of ultrasonic power, extraction temperature, ethanol concentration, liquid-to-material ratio and extraction time on the extraction rate of total flavonoids from Vernonia branches and verified by orthogonal experiments. **Results** The ultrasonic power was 540W, the extraction temperature was 70℃, the ethanol concentration was 70%, the ratio of material to liquid was 1:20, and the extraction time was 70min, which were the best extraction conditions. Under these conditions, the content of total flavonoids in the venomous root Vernonia branch was 81.59 mg·g⁻¹. **Conclusion** In this study, the extraction process of the total flavonoids from the branches of Vernonia vulgaris was optimized. The process is stable and feasible, with good reproducibility and high extraction efficiency.

Keywords: Vernonia cumingiana Benth; Orthogonal test; Total flavonoids

毒根斑鸠菊(*Vernonia cumingiana Benth*)为斑鸠菊属(*Vernonia*),是含有 1000 多种植物的菊科(*Compositae*)大属,主要分布于福建、台湾、广东、海南、广西等地。斑鸠菊属植物中分离得到的化学成分种类较多,且含有多样生物活性,包括苯丙素

类、甾体、萜类^[1-3]、黄酮类^[4]、脂肪酸等^[5]。其药理学研究表明,该属植物具有抗肿瘤^[6]、抑菌^[7]、抗炎^[8]、免疫和抗感染活性^[9-11],目前关于其黄酮提取的报道很少。本实验采用正交试验方法从毒根斑鸠菊提取总黄酮,利用紫外分光光度法测定总黄酮的含量,为开发和利用毒根斑鸠菊资源提供了重要的理论基础。

* [基金项目] 大学生创新训练项目(cx2020063);济宁医学院教师科研扶持基金(JYFC 2018KJ055)

△[通信作者] 王盈盈, E-mail: ym86_87@163.com

1 仪器与材料

1.1 样品来源

本实验所用毒根斑鸠菊花枝样品于 2019 年 1 月采自于海南省昌江黎族自治县,由青岛科技大学化学与分子工程学院钟惠民教授鉴定。凭证样品保存于济宁医学院分子医学与化学实验室。

1.2 仪器与试剂

芦丁标准品 (CAS: 153-18-4 $C_{27}H_{30}O_{16}$, MW: 610.52, 如吉生物科技公司); 甲醇、硝酸铝、蒸馏水、无水乙醇、氢氧化钠、亚硝酸钠均为分析纯试剂 (国药集团化学试剂有限公司)。电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 超声机 (杭州萧山余祝超声波设备厂); 移液枪 (美国 thermo 热电移液器); 紫外可见分光光度计 5100UV (上海元析仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 芦丁标准品制备

在 50 mL 容量瓶中精准称取芦丁标准品 20 mg, 将其溶解在甲醇中并稀释至容量瓶标线, 使溶液的浓度为 $0.40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.1.1 测定波长选择 于 10 mL 玻璃比色管中加入 1.00 mL 上述标准品溶液, 再依次加入 CH_3OH 溶液 4.00 mL 5% NaNO_2 溶液 0.60 mL, 旋涡混合器混匀于 6 min 后, 再加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.60 mL, 旋涡混合器混匀, 静置 6 min, 最后加入 10% 氢氧化钠 3.00 mL 后并以 CH_3OH 溶液定容至刻度线, 摇匀, 得空白、对照品溶液, 将上述溶液静置 15 min 后, 空白不加标准品溶液, 利用紫外分光光度法在 400~800 nm 波长范围内测定上述标准液的吸光度值 $A^{[12]}$, 最后确定其测定波长为 510 nm。

2.1.2 芦丁标准曲线绘制 在 25 mL 容量瓶中, 分别加入制备好的标准品溶液 0.00、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL, 再依次加入 CH_3OH 溶液 4.00 mL、5% NaNO_2 溶液 0.60 mL, 旋涡混合器混匀于 6 min 后, 再加 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.60 mL, 旋涡混合器混匀, 静置 6 min, 最后加入 10%

氢氧化钠 3.00 mL 后并以 CH_3OH 溶液定容至刻度线, 得空白、对照品溶液, 15 min 后, 于 510 nm 波长处测定吸光度值 A 。依照回归线方程 $y = 6.7882x + 0.0230$, $R^2 = 0.9952$, 横坐标为芦丁浓度, 纵坐标为吸光度值 A , 得回归曲线显示各点分布均匀一致, 呈正相交。见图 1。

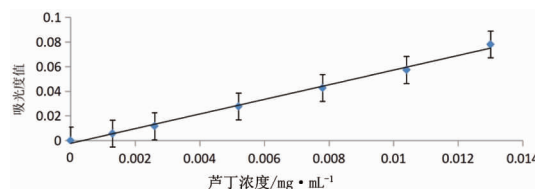


图 1 芦丁标准曲线

2.2 样品液制备及总黄酮含量的测定

精确称取 0.50 g 毒根斑鸠菊花枝粉末用 95% 乙醇 10 mL 溶解, 采用超声波提取, 将提取液过滤后并减压浓缩, 用 CH_3OH 溶液于 50 mL 容量瓶对浓缩液定容。用移液枪量取 0.10 mL 的上述样品液, 按“2.1.2”的操作方法测定吸光度值 A , 总黄酮含量由回归方程计算得出。

2.3 单因素试验

2.3.1 超声波功率 取 10 mL 95% 乙醇溶液溶解精确称取的毒根斑鸠菊花枝粉末 0.50 g, 分别按照 60、180、300、420、540 和 780 W 的超声功率梯度进行提取 30 min 后, 过滤并减压浓缩, 用 50 mL 容量瓶以 CH_3OH 溶液定容, 按照“2.1.2”项步骤测吸光度 A , 据回归方程计算总黄酮含量。由图 2 得出, 总黄酮提取含量总体表现为先升高后降低, 功率为 300~420 W 时黄酮量变化不明显。当超声波功率达 540 W 时, 提取的总黄酮含量最高。由此可以得出最佳超声波功率为 540 W。

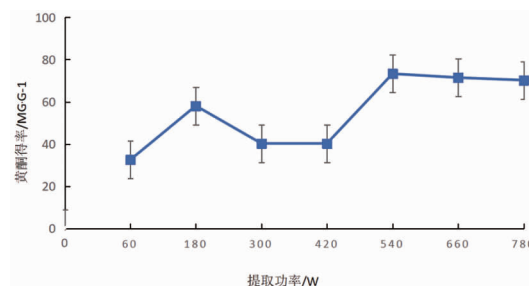


图 2 超声波功率对毒根斑鸠菊花枝总黄酮提取效果的影响

2.3.2 提取温度 取 10.00 ml 的 95% 乙醇溶解

精确称取的毒根斑鸠菊花枝粉末 0.50 g, 分别在温度梯度为 30 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃、80 ℃, 超声提取 30 min 后, 过滤并减压浓缩提取液, 用 50 mL 容量瓶以 CH₃OH 溶液定容, 按照“2.1.2”项步骤测取吸光度值 A, 结合回归方程得黄酮含量。由图 3 得出, 曲线在初始阶段变化不明显, 当温度超过 50 ℃ 时, 逐渐递增, 且增幅较大。一旦温度超过 70 ℃ 时, 总黄酮含量开始降低, 可能是由于温度升高导致黄酮化学结构的破坏, 从而使部分失活, 由此得知当提取温度为 70 ℃ 时, 总黄酮含量可达至最大值, 发挥最大效应。

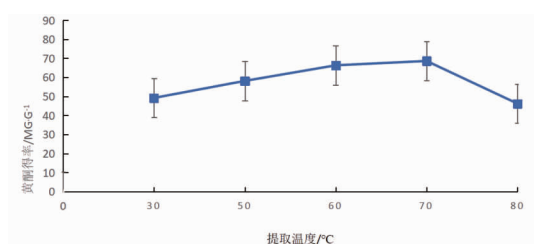


图 3 提取温度对毒根斑鸠菊花枝总黄酮提取量的影响

2.3.3 乙醇浓度 用 10 mL 的乙醇溶解毒根斑鸠菊花枝粉末 0.50 g, 乙醇浓度梯度为 10%、30%、50%、70%、90%、100%, 超声提取后过滤并减压浓缩, 于 50 mL 容量瓶中以 CH₃OH 溶液定容。按照“2.1.2”项步骤测取吸光度值 A, 由回归方程计算总黄酮含量。由图 4 得出, 随乙醇浓度的增大, 总黄酮提取总量逐渐升高, 在乙醇浓度为 70% 时达其高峰, 随之大幅下降。因此, 确定最佳提取乙醇浓度为 70%。

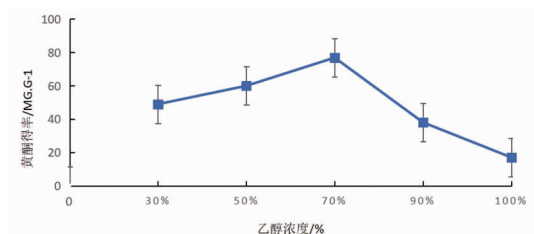


图 4 乙醇浓度对毒根斑鸠菊花枝总黄酮提取效果的影响

2.3.4 料液比 精密称取毒根斑鸠菊花枝粉末 0.50 g, 10 mL 95% 乙醇溶解, 按料液比分别为 1:10、1:20、1:30、1:40 和 1:50 g/mL, 之后在超声条件下提取 30 min, 甲醇定容至 50 mL, 按照“2.1.2”项步骤测取吸光度值 A, 由回归方程计算总黄酮含

量。由图 5 得出, 在初始阶段时, 黄酮含量变化不明显, 之后便大幅上升, 达其峰值, 对应料液比是 1:20 g/mL。峰值后的曲线呈明显的下降趋势, 当料液比继续增大时, 总黄酮含量却呈降低状态, 说明过大的料液比并不利于总黄酮的提取。因此, 选用 1:20 g/mL 料液比为最宜。

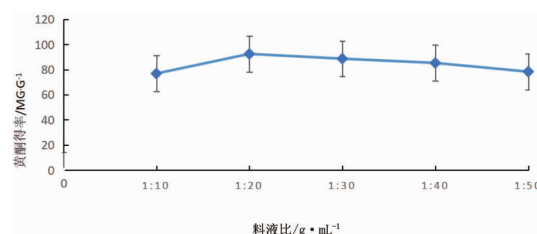


图 5 料液比对毒根斑鸠菊花枝总黄酮提取效果的影响

2.3.5 提取时间 精密称取毒根斑鸠菊花枝粉末 0.50 g, 10 mL 95% 乙醇溶解, 超声下分别提取 10、20、30、50 和 70 min 后过滤并减压浓缩, 用 50 mL 容量瓶以甲醇定容, 按照“2.1.2”步骤来测取吸光度 A, 结合回归方程得黄酮含量。由图 6 得出, 有一明显单峰, 对应横坐标值为 70 min, 黄酮含量为最大。70 min 后, 继续延长时间, 总黄酮含量反而有所降低。因此, 确定最佳提取时间为 70 min。

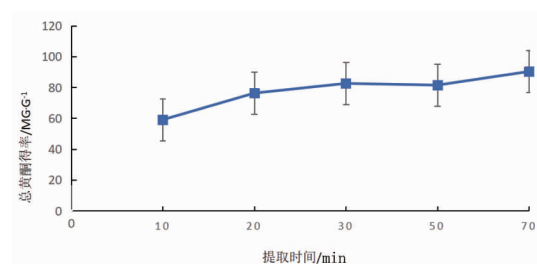


图 6 毒根斑鸠菊花枝总黄酮含量在不同提取时间下的效果图

2.4 正交试验

根据上述各因素实验所得结果, 设计正交试验 L₁₆(4⁵) 表。对毒根斑鸠菊花枝总黄酮含量计算按照“2.1.2”的操作方法, 由此来确定最佳的毒根斑鸠菊花枝总黄酮含量的提取条件。见表 1。

表 1 L₁₆(4⁵) 正交实验设计

水平	A 乙醇浓度/%	B 料液比/g·mL ⁻¹	C 提取时间/min	D 提取温度/℃	E 超声波功率/W
1	30	1:20	20	50	180
2	50	1:30	30	60	300
3	70	1:40	50	70	420
4	90	1:50	70	80	540

由表 2 的 5 个因素 4 个 K 值大小可以得出以下结论, A 种因素 $A_3 > A_2 > A_1 > A_4$, B 种因素 $B_1 > B_2 > B_3 > B_4$, C 种因素 $C_4 > C_2 > C_3 > C_1$, D 种因素 $D_3 > D_2 > D_1 > D_4$, E 种因素 $E_4 > E_1 > E_2 > E_3$, 正交实验结果见表 2。

表 2 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	E	总黄酮含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	1	68.96
2	1	2	2	2	2	67.69
3	1	3	3	3	3	68.42
4	1	4	4	4	4	75.87
5	2	1	2	3	4	75.77
6	2	2	1	4	3	70.72
7	2	3	4	1	2	68.96
8	2	4	3	2	1	69.37
9	3	1	3	4	2	75.90
10	3	2	1	3	1	77.21
11	3	1	4	3	4	81.35
12	3	4	2	1	3	69.42
13	4	1	4	2	3	67.81
14	4	2	3	1	4	70.86
15	4	3	2	4	1	70.48
16	4	4	1	3	2	63.82
K_1	56.19	72.11	70.18	69.55	71.51	
K_2	71.21	71.62	70.84	71.40	67.84	
K_3	75.82	72.15	71.14	71.31	69.09	
K_4	68.24	69.61	73.35	73.24	75.81	
R	19.63	2.54	3.17	3.70	7.97	

2.5 试验方法的考察

2.5.1 精密度试验 称 1.00 mL 芦丁标准品溶液共 5 份, 按“2.1.2”项操作于 $\lambda = 510 \text{ nm}$ 处测得吸光度后计算 RSD 值为 1.29% ($n=5$)。

2.5.2 显色稳定试验 精密称取毒根斑鸠菊花枝样品的溶液 0.10 mL 到试管中后加入 4.90 mL 甲醇, 按照“2.1.2”项的操作方法进行显色, 空白对照管不加入 NaNO_2 的溶液, 分别在 0、10、20、30、40 min 测 1 次吸光度值, 做 5 次平行实验后计算毒根斑鸠菊花枝中总黄酮含量, 经过计算得到的 RSD 值为 1.67% ($n=5$)。

2.5.3 方法重现性试验 称 5 份 5.00g 花枝粉末根据最佳提取条件提取总黄酮, 过滤、减压浓缩, 在 100 mL 容量瓶中加入斑鸠菊花枝浓缩液并用甲醇定容。将 0.10 mL 的花枝提取液置于比色管并用甲醇定容至 5 mL, 按“2.1.2”项方法显色并测定其

吸光度, 算得 RSD 值为 0.97% ($n=5$)。

2.5.4 回收率试验 称 5.00 g 毒根斑鸠菊花枝 5 份, 于最佳提取条件下进行提取总黄酮, 按“2.1.2”项操作显色并于 $\lambda = 510 \text{ nm}$ 处测吸光度后计算 RSD 值为 0.96% ($n=5$), 加样回收率为 99.10%。

2.5.5 试验方法结果 根据芦丁标准曲线方程可知, 在浓度为 0.005~0.070 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其质量浓度与吸光度之间呈良好的线性关系; 稳定性、回收率、精密度和重现性试验的 RSD 值都小于 2%, 因此可以得出, 此方法有良好的加样回收率、重复性稳定性与精密度; 表 3 所示为验证实验结果, 毒根斑鸠菊花枝中总黄酮平均含量为 81.59 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 表 3 所作 3 次平行试验的 RSD 值为 1.58% ($n=3$), 两者均比正交试验表中的值高, 由此可以确定 $A_3B_1C_4D_3E_4$ 为最佳提取工艺条件。

表 3 验证试验结果

试验号	总黄酮含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	平均含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%
1	80.44		
2	81.35	81.59	1.58
3	82.98		

3 结论

正交试验是一种科学便利的实验方法, 有快速、高效率、经济、简单易行的特点, 多因素综合结果可由其直接得出, 无论单味药^[13] 还是组方药^[14], 提取工艺试验都可通过正交试验验证。本研究通过正交试验法优化了毒根斑鸠菊花枝总黄酮的提取工艺, 并进行了 3 次平行试验进行验证得到最佳提取条件为: 超声波功率 540 W、温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 、乙醇 70%、料液比 1:20g/mL、提取时间 70 min 为最佳提取条件。此时参数组合为 $A_3B_1C_4D_3E_4$ 。得到的毒根斑鸠菊花枝中总黄酮含量为 81.59 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。综上所述, 影响毒根斑鸠菊花枝总黄酮提取因素排列为: 提取时间>料液比>乙醇浓度>超声波功率>提取温度。该实验工艺简单、成本低、稳定可行、重复性好、提取效率较高, 具有良好的应用前景, 为毒根斑鸠菊进一步科学研究和开发新的天然抗氧化剂和保鲜剂提供了理论基础。

利益冲突: 所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] 陈迪路, 李玄, 周小江. 天名精属植物的倍半萜类成分及其药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020,

- 45 (1): 37-51. DOI: 10. 19540/j. cnki. cjemmm. 20190929. 201.
- [2] 廖尚高,王珍,李靖,等. 南川斑鸠菊中的抗肿瘤倍半萜内酯[J]. 中国天然药物, 2012, 10(3): 230-233. DOI:10. 3724/SP. J. 1009. 2012. 00230.
- [3] 史茹茹,史资,陈新,等. 茄叶斑鸠菊中倍半萜类化学成分研究[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(2): 160-162. DOI:10. 13989/j. cnki. 0517-6611. 2018. 02. 046.
- [4] 彭彩曦,陈新,史茹茹. 斑鸠菊的化学成分研究[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(2): 160-162. DOI:10. 13989/j. cnki. 0517-6611. 2018. 05. 057.
- [5] 孙美利,李蕾,张舒媛,等. 斑鸠菊属药用植物化学成分研究[J]. 长春中医药大学学报, 2014, 30(3): 414-416. DOI:10. 13463/j. cnki. cczy. 2014. 03. 014.
- [6] Awe SO, Olajide OA, Makinde JM. Effects of *Allium sativum* and *Vernonia amygdalina* on thrombosis in mice [J]. *Phytoth Res*, 1998, 12(1): 57. DOI: 10. 1002/(SICI)1099-1573 (19980201)12:13. 3. 0. CO;2-M.
- [7] Abere H, Yadessa M. Antibacterial and antioxidant compounds from the flower extracts of *vernonia amygdalina* [J]. *Adv Pharmacol Sci*, 2018, 2018(4): 1-6. DOI: 10. 1155/2018/4083736.
- [8] 吴美芳,王杰,谷乐,等. 扁桃斑鸠菊抗炎抗氧化作用研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2019, 48(4): 366-372. DOI:10. 3969/j. issn. 1009-7791. 2019. 24. 012.
- [9] 孙力,巴玉兰,于鲁海,等. 斑鸠菊属植物药理活性研究进展[J]. 新疆中医药, 2009, 27(6): 82-85. DOI: 10. 3969/j. issn. 1009-3931. 2009. 08. 048.
- [10] 孙力,李红健,于鲁海,等. 驱虫斑鸠菊抗肿瘤化学成分的初步研究[J]. 中国现代中药, 2011, 13(12): 26-28. DOI:10. 13313/j. issn. 1673-4890. 2011. 12. 012.
- [11] 梁侨丽,闵知大. 咸虾花有效部位的化学成分研究[J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(3): 192-193. DOI:10. 3969/j. issn. 1000-5005. 2008. 03. 017.
- [12] 唐健民,朱成豪,许景堂,等. 响应面法优化扁桃斑鸠菊的黄酮提取及抗氧化活性研究[J]. 广西科学院学报, 2019, 35(1): 61-70. DOI: 10. 13657/j. cnki. gxkxyxb. 20190131. 003.
- [13] 王丹丹,陈俊,李俊丽,等. 优选牡丹皮中丹皮酚的提取工艺[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013, 15(9): 1998-2001. DOI: 10. 11842/wst. 2013. 09. 025.
- [14] 王莹,韩丽,郭志辉,等. 正交试验法优选姜黄胶囊提取工艺[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(5): 1188-1192. DOI: 10. 11842/wst. 2014. 05. 042.

(收稿日期 2021-04-09)

(本文编辑:石俊强)

(上接第 309 页)

- [14] Wang J, Zhang RY, Ji XT, et al. SERS and fluorescence detection of circulating tumor cells (CTCs) with specific capture-release mode based on multifunctional gold nanomaterials and dual-selective recognition [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1141: 206-213. DOI: 10. 1016/j. aca. 2020. 10. 033.
- [15] Levak M, Burić P, Sikirić MD, et al. Effect of protein corona on silver nanoparticle stabilization and ion release kinetics in artificial sea water [J]. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(3): 1259-1266. DOI: 10. 1021/acs. est. 6b03161.
- [16] Seedher N, Kanojia M. Fluorescence spectroscopic study for competitive binding of antidiabetic drugs and endogenous substances on serum albumin [J]. *Drug Metabol Drug Interact*, 2013, 28(2): 107-114. DOI: 10. 1515/dmdi-2012-0044.
- [17] Sandu N, Chilom C, David M, et al. Evaluation of the interaction of levothyroxine with bovine serum albumin using spectroscopic and molecular docking studies [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2020, 11-13. DOI: 10. 1080/07391102. 2020. 1822919.
- [18] Li X, Yang LQ, Wang YF, et al. Studies on binding of single-stranded DNA with reduced graphene oxide-silver nanocomposites [J]. *IET Nanobiotechnol*, 2020, 14(4): 308-313. DOI: 10. 1049/iet-nbt. 2019. 0377.
- [19] Xu X, Mao X, Wang Y, et al. Study on the interaction of graphene oxide-silver nanocomposites with bovine serum albumin and the formation of nanoparticle-protein corona [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 116: 492-501. DOI: 10. 1016/j. ijbiomac. 2018. 05. 043.
- [20] Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3102. DOI: 10. 1021/bi00514a017.
- [21] Xu XY, Du ZY, Wu WH, et al. Synthesis of triangular silver nanoprisms and spectroscopic analysis on the interaction with bovine serum albumin [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(12): 5327-5336. DOI: 10. 1007/s00216-017-0478-4.

(收稿日期 2021-05-26)

(本文编辑:石俊强)