

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.02.008

超声波技术辅助酶解法提取杜仲叶总黄酮工艺优化*

王柏强^{1,2}, 项 静¹, 张 杰¹, 刘 福^{1,2}

(1. 川北医学院附属医院药剂科, 四川 南充 637000; 2. 川北医学院药学院, 四川 南充 637000)

摘要:目的 优化杜仲叶总黄酮的提取工艺。方法 以总黄酮提取率为指标,通过单因素试验和正交试验确定最佳工艺条件。结果 优化的最佳工艺条件为纤维素酶用量 30 mg,料液比 1:30(g:mL),酶解 pH 5.0,酶解温度 45 ℃,乙醇体积分数 60%,超声温度 50 ℃,超声时间 25 min。结论 超声波技术辅助酶解法提取杜仲叶总黄酮的提取率较高,优选的工艺合理、可行。

关键词:杜仲叶;超声波技术;酶解法;总黄酮;正交试验

中图分类号:R932;R284.2;TQ460.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)02-0028-03

Optimization of Extraction Process for Flavonoids from *Eucommiae Folium* by Ultrasonic-Assisted Enzymatic Hydrolysis

WANG Baiqiang^{1,2}, XIANG Jing¹, ZHANG Jie¹, LIU Fu^{1,2}

(1. Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, China 637000; 2. College of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, China 637000)

Abstract: **Objective** To optimize the extraction process of flavonoids from *Eucommiae Folium*. **Methods** The extraction rate of total flavonoids was taken as the index, the extraction process was optimized by single factor test and orthogonal test. **Results** The optimum conditions were as follows: the dosage of cellulase was 30 mg, the ratio of solid to liquid was 1:30(g:mL), pH of enzymatic hydrolysis was 5.0, the temperature of enzymatic hydrolysis was 45 ℃, the volume fraction of ethanol was 60%, the ultrasonic temperature was 50 ℃, and the ultrasonic time was 25 min. **Conclusion** The ultrasonic-assisted extraction process is a reasonable and feasible way to extract flavonoids from *Eucommiae Folium* with a high extract rate.

Key words: *Eucommiae Folium*; ultrasonic technology; enzymatic hydrolysis; total flavonoids; orthogonal test

杜仲叶为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥叶,其味甘、微辛,性温,归肝、肾经,有补肝肾、强筋骨、降血压、安胎等功效^[1]。其有效成分主要为绿原酸等苯丙素类,芦丁等黄酮类,京尼平苷酸、桃叶珊瑚苷等环烯醚萜类,松脂醇二葡萄糖苷等木脂素类^[2]。黄酮类化合物在抗氧化、抑制脂质过氧化反应、预防动脉粥样硬化及保护心脑血管、防癌、抗癌等方面效果良好^[3]。黄酮类化合物是胞内物质,传统的水提法或醇提法不能有效破坏其细胞壁,存在很大的传质阻力,导致提取效果欠佳^[4]。目前,超声波技术和酶解技术的发展为高效提取天然活性物质提供了新方法^[5]。酶解法可破坏细胞壁,使更多重要化学成分(如黄酮)溶出;超声波的空化作用可加速植物细胞壁破裂及活性物质释放,提高有效物质提取率。本研究中结合酶解技术和超声波提取技术,通过单因素试验及正交试验优化提取工艺,提高了杜仲叶总黄酮的提取效果。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

760CRT 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);PHS-SB 型 pH 计(成都瑞驰分析控制仪器有限公司);SB-25-12DT 型超声波提取器(宁波

新芝生物科技股份有限公司);HH-2 型恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);TP-114 型电子分析天平(德国赛多利斯股份有限公司,精度为 0.1 mg)。

1.2 试剂

杜仲叶,采自四川省广元市,经川北医学院李生茂副教授鉴定为正品,晒干备用。纤维素酶(10 000 U/g),果胶酶(30 000 U/g),均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 0080-200707,纯度为 95%);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定

对照品溶液制备:取干燥至恒重的芦丁对照品 25 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加 60% 乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得(质量浓度为 0.5 mg/mL)。

检测波长确定^[6]:取对照品溶液 0.3 mL,置 10 mL 容量瓶中,精密量定,加入 5% 亚硝酸钠 0.5 mL,静置 6 min,加入 10% 硝酸铝 0.5 mL,混匀,静置 6 min,加入 4% 氢氧化钠 4 mL,60% 乙醇定容,静置 15 min。同法制备空白溶液。用紫外-可见分光光度计于 400~800 nm 波长范围内进行光谱扫描,扫描结果显示,于

*基金项目:四川省南充市科学技术和知识产权局市校合作科研专项[18SXHZ0530]。

第一作者:王柏强,男,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药物制剂学,(电子信箱)31618187@qq.com。

510 nm 波长处有最大吸收峰。因此,确定最大吸收波长为 510 nm。

线性关系考察:精密吸取对照品溶液 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中。用 0 mL 试管做空白对照,于 510 nm 波长处测定吸光度,以芦丁质量浓度(C)为纵坐标、吸光度(A)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $C = 1.732A + 0.071$, $r^2 = 0.9999$ ($n = 7$)。结果表明,对照品芦丁质量浓度在 0.25 ~ 1.50 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

样品含量测定:精确吸取药材初提液 1 mL,置 10 mL 容量瓶中,操作同线性关系考察项下,重复测定 3 次,计算平均吸光度值。根据公式[总黄酮提取率(%) = 初提液中总黄酮质量/杜仲叶干粉质量 × 100%]计算总黄酮提取率。

2.2 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计学软件分析。组间比较行 t 检验,正交试验数据采用正交设计助手 II 进行分析和处理。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.3 单因素试验

2.3.1 酶的种类及用量

分别称取杜仲叶粉末 5 g,各 12 份,置 12 个锥形瓶中,均分成两组(纤维素酶组和果胶酶组)。按料液比 1:20 (g:mL,下同)加入 60% 乙醇溶液,调节 pH 至 5.0,分别加入纤维素酶 0, 10, 20, 30, 40, 50 mg,加入果胶酶 0, 10, 20, 30, 40, 50 mg。恒温(50 ℃)下酶解 60 min,每 15 min 搅拌 1 次,超声处理(功率为 600 W,频率为 40 kHz) 20 min,抽滤,得滤液,测定总黄酮含量,并计算提取率,平行操作 3 次。结果纤维素酶组总黄酮提取率分别为 1.66%, 2.41%, 3.09%, 3.19%, 3.14%, 3.09%;果胶酶组总黄酮提取率分别为 1.58%, 2.16%, 2.82%, 2.95%, 3.01%, 2.92%。两组提取率差异显著($P < 0.05$)。当添加纤维素酶量超过 30 mg 时,总黄酮提取率逐渐下降。

2.3.2 料液比

分别称取杜仲叶粉末 5 g,各 6 份,置 6 个锥形瓶中,按料液比 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 加入 60% 乙醇溶液,调 pH 至 5.0,加入纤维素酶 30 mg,搅拌,溶解后在恒温水浴锅(50 ℃)酶解 60 min,每 15 min 搅拌 1 次,其余操作同 2.3.1 项下步骤。结果总黄酮提取率分别为 2.49%, 2.93%, 3.17%, 3.48%, 3.43%, 3.22%。可见,随着料液比的增加,总黄酮提取率逐渐增大,当料液比达到 1:30 后再继续增加料液比,提取效率增加不明显。可能是料液比过大降低了酶和底物的浓度,减少了酶分子与底物分子的碰撞概率,使底物未得到充分酶解,导致总黄酮溶出差异不明显^[7]。

2.3.3 酶解 pH

分别称取杜仲叶粉末 5 g,各 6 份,置 6 个锥形瓶

中,按料液比 1:30 加入 60% 乙醇溶液,分别调 pH 至 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0,加入纤维素酶 30 mg,搅拌溶解后在恒温水浴锅(50 ℃)酶解 60 min,每 15 min 搅拌 1 次,其余操作同 2.3.1 项下步骤。结果总黄酮提取率分别为 2.14%, 3.26%, 3.49%, 3.37%, 3.05%, 2.73%。可见,pH 4.5 时总黄酮提取率最大。

2.3.4 酶解温度

分别称取杜仲叶粉末 5 g,各 6 份,置 6 个锥形瓶中,按料液比 1:30 加入 60% 乙醇溶液,调 pH 至 4.5,加入纤维素酶 30 mg,搅拌,溶解后分别于恒温水浴锅 35, 40, 45, 50, 55, 60 ℃ 下酶解 60 min,每 15 min 搅拌 1 次,其余操作同 2.3.1 项下步骤。结果总黄酮提取率分别为 3.05%, 3.42%, 3.53%, 3.46%, 3.41%, 3.22%。可见,合适的酶解温度有利于总黄酮的溶出,温度过低不能保证酶的活性,过高酶又易失活,故酶解温度保持在 40 ~ 50 ℃ 为宜。

2.3.5 酶解时间

分别称取杜仲叶粉末 5 g,各 6 份,置 6 个锥形瓶中,按料液比 1:30 加入 60% 乙醇,调 pH 至 4.5,加入纤维素酶 30 mg,搅拌,溶解后分别于恒温水浴锅 45 ℃ 条件下酶解 30, 60, 90, 120, 150, 180 min,每 15 min 搅拌 1 次,其余操作同 2.3.1 项下步骤。结果总黄酮提取率分别为 2.81%, 3.45%, 3.60%, 3.52%, 3.24%, 3.18%。可见,随着酶解时间的增加,总黄酮提取率逐渐增大;酶解时间为 90 min 时,酶解反应基本完成,总黄酮提取率最大;在 90 min 后提取率降低。因此,选择酶解时间为 90 min。

2.3.6 乙醇体积分数

分别称取杜仲叶粉末 5 g,各 6 份,置 6 个锥形瓶中,按料液比 1:30 分别加入 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 乙醇,调 pH 至 4.5,加入纤维素酶 30 mg,搅拌,溶解后于恒温水浴锅 45 ℃ 条件下酶解 90 min,每 15 min 搅拌 1 次,其余操作同 2.3.1 项下步骤。结果总黄酮提取率分别为 2.43%, 2.97%, 3.36%, 3.64%, 3.56%, 3.08%。可见,杜仲叶总黄酮提取率随着乙醇体积分数的增大而增加,在 60% 以后增速减慢,同时杂质溶出也明显增多。故选择不同乙醇体积分数(50% ~ 70%)作进一步考察。

2.3.7 其他因素

分别考察超声提取温度、超声时间对杜仲叶总黄酮提取率的影响。结果适宜的超声提取温度为 40 ~ 60 ℃,超声时间为 15 ~ 25 min。

2.4 正交试验优化总黄酮提取工艺

综合单因素试验结果,选取对总黄酮提取影响较大的纤维素酶用量(A)、料液比(B)、酶解 pH(C)、酶解温度(D)、乙醇体积分数(E)、超声温度(F)、超声时间

(G)7 个因素,每个因素 3 个水平(见表 1)。以总黄酮提取率为考察指标,选用 $L_{18}(3^7)$ 正交试验表(见表 2)进行正交试验。结果见表 3。可见,各因素对杜仲叶总黄酮提取率的影响效果大小为料液比 > 酶解温度 > 纤维素酶用量 > 超声时间 > 乙醇体积分数 > 酶解 pH > 超声温度。其中,料液比、酶解温度、纤维素酶用量、超声时间影响显著($P < 0.05$)。根据直观分析及方差分析结果确定最佳工艺组合为 $A_2B_2C_3D_2E_2F_2G_3$,即纤维素酶用量 30 mg,料液比 1:30,酶解 pH 5.0,酶解温度 45℃,乙醇体积分数 60%,超声温度 50℃,超声时间 25 min。

2.5 验证试验

分别称取杜仲叶粉末 5 g,各 5 份,置 5 个锥形瓶中,按料液比 1:30 加入 60% 乙醇,调 pH 至 5.0,加入纤维素酶 30 mg,搅拌,溶解后于恒温水浴锅 45℃ 条件下酶解 90min,每 15min 搅拌 1 次,超声处理(温度 50℃,功率 600 W,

表 1 因素水平表

Tab. 1 Levels of factors

水平	因素						
	A(mg)	B(g/mL)	C	D(℃)	E(%)	F(℃)	G(min)
1	20	1:20	4.0	40	50	40	15
2	30	1:30	4.5	45	60	50	20
3	40	1:40	5.0	50	70	60	25

表 2 $L_{18}(3^7)$ 正交试验设计与结果

Tab. 2 Results of the $L_{18}(3^7)$ orthogonal test

序号	因素							总黄酮提取率(%)
	A	B	C	D	E	F	G	
1	1	1	1	1	1	1	1	2.11
2	1	2	2	2	2	2	2	3.64
3	1	3	3	3	3	3	3	3.42
4	2	1	1	2	2	3	3	3.25
5	2	2	2	3	3	1	1	3.54
6	2	3	3	1	1	2	2	3.26
7	3	1	2	1	3	2	3	2.43
8	3	2	3	2	1	3	1	3.09
9	3	3	1	3	2	1	2	3.16
10	1	1	3	3	2	2	1	2.51
11	1	2	1	1	3	3	2	2.63
12	1	3	2	2	1	1	3	3.22
13	2	1	2	3	1	3	2	2.98
14	2	2	3	1	2	1	3	3.52
15	2	3	1	2	3	2	1	3.41
16	3	1	3	2	3	1	2	3.02
17	3	2	1	3	1	2	3	3.37
18	3	3	2	1	2	3	1	2.96
k_1	2.922	2.717	2.988	2.818	3.005	3.095	2.937	
k_2	3.327	3.298	3.128	3.272	3.173	3.103	3.115	
k_3	3.005	3.238	3.137	3.163	3.075	3.055	3.202	
R	0.405	0.581	0.149	0.454	0.168	0.048	0.265	

表 3 方差分析结果

Tab. 3 Results of variance analysis

因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	P
A	0.549	2	0.275	68.625	<0.05
B	1.228	2	0.614	153.50	<0.05
C	0.083	2	0.042	10.375	
D	0.673	2	0.337	84.125	<0.05
E	0.086	2	0.043	10.750	
F	0.008	2	0.004	1.000	
G	0.219	2	0.110	27.375	<0.05
误差	0.010	2	0.005		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

Note: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

频率 40 kHz)25 min,抽滤,得滤液,测定总黄酮含量。结果杜仲叶总黄酮平均提取率为 3.80%,RSD 为 1.49%。

3 讨论

天然产物的提取过程中,加入一定量的酶可破坏构成药材细胞壁和细胞间质的果胶、纤维素、半纤维素等大分子化合物,使细胞内物质充分溶解,提高有效成分的溶出速率;降低提取温度,可缩短提取时间;减少溶剂用量,可提高有效成分提取率^[8-9]。本试验中利用超声波辅助酶解法提取杜仲叶中的总黄酮,在单因素试验基础上通过正交试验优化杜仲叶总黄酮的提取工艺,得最佳工艺条件:纤维素酶用量 30 mg,料液比 1:30,酶解 pH 5.0,酶解温度 45℃,乙醇体积分数 60%,超声温度 50℃,超声时间 25 min。此工艺条件下杜仲叶总黄酮提取率为 3.80%,与传统回流提取法比较,条件温和,溶剂用量较少,有效成分提取率高,节能、降耗,保护环境。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:166.
- [2] 严瑞娟,张水寒,罗跃龙,等. 不同产地初加工方式处理杜仲叶的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2013,44(15):2085-2091.
- [3] 何兰香,丁科,谢明华,等. 酶法-超声提取黄精总黄酮及其抗氧化活性研究[J]. 中国现代应用药学,2019,36(9):1075-1080.
- [4] 刘小锐,梅林. 超声波-酶法提取菊花中总黄酮工艺优化[J]. 激光杂志,2010,31(5):95-96.
- [5] 姚超,于海宁,阮晖,等. 酶解结合超声波辅助技术提取纯化菊总黄酮[J]. 食品科学,2010,31(6):48-51.
- [6] 陆俊,许妍妍,容欧,等. 酶法辅助提取鸭儿芹总黄酮的工艺优化研究[J]. 中药材,2013,36(7):1158-1162.
- [7] 黄秀香,赖红芳,李植伟. 复合酶辅助超声提取穿破石中黄酮苷工艺优化[J]. 医药导报,2013,32(5):664-666.
- [8] 刘玉梅,张家俊,吴浪. 复合酶协同超声波法提取香椿老叶总黄酮工艺研究[J]. 现代食品科技,2019,35(11):223-230.
- [9] 王 晓,李林波,马小来,等. 酶法提取山楂叶中总黄酮的研究[J]. 食品工业科技,2002,23(3):37-39.

(收稿日期:2020-07-31)