

微波辅助提取鸡眼草中的黄酮类物质

许海棠^{1,2}, 欧小辉³, 陈其锋¹, 李家璇⁴ (1. 广西民族大学化学化工学院, 广西南宁 530006; 2. 广西林产化学与工程重点实验室, 广西南宁 530006; 3. 广西壮族自治区环境监测中心站, 广西南宁 530028; 4. 山东省潍坊市 94303 部队医院, 山东潍坊 261051)

摘要 [目的] 优化鸡眼草中黄酮类化合物的提取条件。[方法] 以鸡眼草的总黄酮提取率为评价指标, 通过单因素试验对微波辅助提取鸡眼草黄酮类化合物的工艺条件进行了研究, 再运用正交分析法确定最佳提取条件。[结果] 微波辅助提取鸡眼草中的黄酮类物质的最佳条件为: 乙醇浓度为 50%、料液比 1:30 (W/V, g/ml, 下同)、微波功率 300 W、微波处理时间 25 min; 在此条件下, 鸡眼草的总黄酮提取率为 3.28%。[结论] 微波辅助提取鸡眼草中的黄酮类物质, 操作简单易行, 提取率较高, 是一种理想的提取方法。

关键词 鸡眼草 (*Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl.); 黄酮类化合物; 微波辅助提取

中图分类号 S567.21+9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)01-00083-03

Microwave-assisted Extraction of Flavonoids from the *Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl.

XU Hai-tang et al (College of Chemical and Chemistry Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning, Guangxi 530006)

Abstract [Objective] To study the optimal conditions for extracting total flavonoids from *Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl. [Method] The technological conditions of microwave-assisted extraction of flavonoids were investigated by the single factor and orthogonal experiments, and were assessed according to the extraction rate of total flavonoids. [Result] The optimum conditions of microwave-assisted extraction were 50% ethanol as solvent, 1:30 (W/V, g/ml) of solid-liquid ratio, 300 W of microwave power and 25 min of microwave extraction time. Under the conditions, the extraction rate of total flavonoid was 3.28%. [Conclusion] The microwave-assisted extraction extracting flavonoids in *Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl. is a simple and ideal extraction method with high efficiency.

Key words *Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl.; Flavonoid compounds; Microwave-assisted extraction

鸡眼草 (*Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl.), 别名三叶人字草、公母草等, 为豆科 (Leguminosae sp.) 鸡眼草属 (*Kummerowia*) 一年生草本植物^[1]。《救荒本草》中始有记载, 名曰招不齐。鸡眼草营养丰富, 为优良的饲药兼用植物^[2]。其提取物有非常重要的药用价值, 主要功效为清热解毒、健脾利湿和活血止血等, 主治胃肠炎、痢疾、肝炎、夜盲症、泌尿系统感染、跌打损伤和疔疮疖肿等^[3-4]。

鸡眼草的化学成分主要包括黄酮类化合物、氨基酸、甾醇和糖等。文献报道从鸡眼草中分离出多种黄酮类化合物^[5]。药理研究表明, 鸡眼草提取液具有抗炎、镇痛和止血作用^[6-8]。大多数天然黄酮类化合物都具有明显的生理活性, 如降血压、降血脂, 抗病毒、抗炎、抗氧化和抗菌等作用^[9]。目前, 有关黄酮类化合物的提取方法较多。试验以芦丁为对照品, 采用微波辅助提取法从鸡眼草中提取黄酮类化合物, 采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法测定总黄酮含量^[10], 并通过正交试验确定最佳提取工艺, 以期为鸡眼草的开发应用提供研究依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。鸡眼草, 购于广西玉林中药材市场, 鉴定为豆科鸡眼草属鸡眼草 (*Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl.)。

1.1.2 主要仪器。UV-1800 岛津紫外可见分光光度计, 购自岛津仪器 (苏州) 有限公司; SP-752 紫外可见分光光度计, 购自上海光谱仪器有限公司; XH-MC-1 型祥鸽实验室微波合成反应器, 购自北京祥鸽科技发展有限公司; SHB-III 型循环水式真

空泵, 郑州长城科工贸易有限公司; AJF-1001-U 型基础性纯水器, 艾科浦公司; PL203 电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; SPS401F 型电子天平, 奥豪斯国际贸易 (上海) 有限公司; HH-S6 数显恒温水浴锅, 金坛市医疗仪器厂。

1.1.3 主要试剂。芦丁标准品, 购自中国食品药品检定研究院; 石油醚、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠均为分析纯, 市售; 超纯水为自制。

1.2 方法

1.2.1 微波辅助提取工艺路线。鸡眼草→清洗→烘干 (60℃)→粉碎→称重→溶剂浸泡→微波处理→过滤→滤液定容→测定吸光度值。

1.2.2 线性关系的考察。精密称取芦丁对照品 22.0 mg 置于 100 ml 容量瓶中, 加入浓度 50% 乙醇溶液溶解并定容。精密吸取 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 和 12.0 ml 分别置于 50 ml 的容量瓶中, 加入 2.0 ml 浓度 5% 的亚硝酸, 摇匀, 静置 6 min, 加入 2.0 ml 浓度 10% 硝酸铝, 摇匀, 放置 6 min; 再加入 20 ml 浓度 4% NaOH, 最后用浓度 50% 乙醇溶液定容, 摇匀, 静置 15 min; 以浓度 50% 乙醇溶液为空白, 在波长 510 nm 下测定吸光度值, 绘制标准曲线。

1.2.3 样品中总黄酮含量的测定。精密吸取样品黄酮提取液溶液 1.0 ml 置于 50 ml 容量瓶中, 按“1.2.2”项下方法显色, 于 510 nm 波长处测定吸光度值, 根据标准曲线计算提取液中的黄酮类化合物的浓度, 并通过下式计算总黄酮提取率:

总黄酮提取率 (%) = 滤液中黄酮含量 (g) / 鸡眼草细粉的质量 (g) × 100

1.2.4 单因素试验。(1) 乙醇浓度对鸡眼草黄酮提取率的影响。精密称取 2.000 g 鸡眼草, 共 5 份, 按料液比 1:30 分别添加不同浓度的乙醇溶液, 在 60℃ 恒温水浴锅中预热 1 h, 然后以 400 W 的微波功率, 60℃ 的微波温度, 处理 15 min, 过

滤,收集滤液并定容于 100 ml 容量瓶中。吸取 1.0 ml 样品溶液置于 50 ml 容量瓶中,按“1.2.2”的方法显色并测定吸光度值,并按“1.2.3”的公式计算鸡眼草中的总黄酮提取率。

(2)料液比对鸡眼草黄酮提取率的影响。精密称取 2.000 g 鸡眼草,共 5 份,分别按不同的料液比添加浓度 40% 乙醇,在 60 ℃ 恒温水浴锅中预热 1 h,然后以 400 W 的微波功率,60 ℃ 的微波温度,处理 15 min,过滤,收集滤液并定容于 100 ml 容量瓶中。吸取 1.0 ml 样品溶液置于 50 ml 容量瓶中,按“1.2.2”的方法显色并测定吸光度值,并计算鸡眼草中的总黄酮提取率。

(3)微波功率对鸡眼草黄酮提取率的影响。精密称取 2.000 g 鸡眼草,共 5 份,按料液比 1:30 添加浓度 40% 乙醇溶液,在 60 ℃ 恒温水浴锅中预热 1 h,然后以不同的微波功率,60 ℃ 的微波温度,处理 15 min,过滤,收集滤液并定容于 100 ml 容量瓶中。吸取 1.0 ml 样品溶液置于 50 ml 容量瓶中,按“1.2.2”的方法显色并测定吸光度值,计算鸡眼草中的总黄酮提取率。

(4)微波处理时间对鸡眼草黄酮提取率的影响。精密称取 2.000 g 鸡眼草,共 5 份,按料液比 1:30 添加浓度 40% 乙醇溶液,在 60 ℃ 恒温水浴锅中预热 1 h,然后以 400 W 的微波功率,60 ℃ 的微波温度,处理不同时间,过滤,收集滤液并定容于 100 ml 容量瓶中。吸取 1.0 ml 样品溶液置于 50 ml 容量瓶中,按“1.2.2”的方法显色并测定吸光度值,计算鸡眼草中的总黄酮提取率。

1.2.5 正交试验。根据单因素试验结果,以乙醇浓度、料液比、微波功率和微波处理时间为考察因素,鸡眼草总黄酮提取率为考察指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,各因素水平如表 1 所示。

表 1 正交试验因素水平设计

水平	因素			
	乙醇浓度 A//%	料液比 B//g/ml	微波功率 C//W	微波处理时间 D//min
1	30	1:20	200	15
2	40	1:30	300	20
3	50	1:35	400	25

1.2.6 最佳工艺条件验证试验。在最佳条件组合下,进行 5 次平行验证性试验,以考察最佳条件的合理性和可靠性。

2 结果与分析

2.1 线性关系的考察 以芦丁对照品溶液浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标作图,得到标准曲线。计算得线性回归方程为: $Y = 16.2681X - 0.0362$, $R = 0.9990$ 。试验结果表明,芦丁浓度在 0.008 8 ~ 0.052 8 mg/ml 范围内与吸光度值有良好的线性关系。

2.2 单因素试验

2.2.1 乙醇浓度对鸡眼草黄酮提取率的影响。图 1 表明,乙醇浓度对黄酮得率的影响明显。黄酮得率随着乙醇浓度的增加而先上升后下降。当乙醇浓度达到 40% 时,总黄酮得率最高,之后开始呈下降趋势。因此,初步确定乙醇浓度为 40%。

2.2.2 料液比对鸡眼草黄酮提取率的影响。图 2 表明,随着料液比的增加,总黄酮得率呈先增加后减少的趋势。当料液比达到 1:30 时,黄酮类化合物含量达到最大值,之后随着

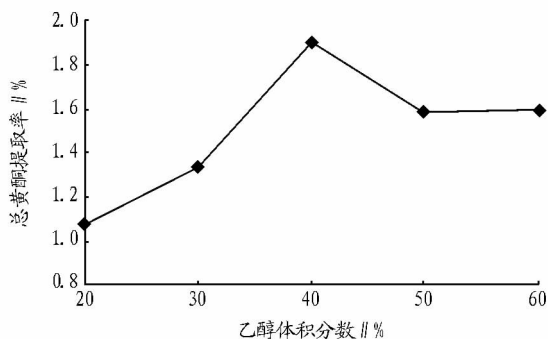


图 1 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

溶剂的增加,含量呈下降趋势。溶剂量较少时,可能会使黄酮类化合物提取不完全,溶剂量过多会提高生产成本。因此,料液比以 1:30 为宜。

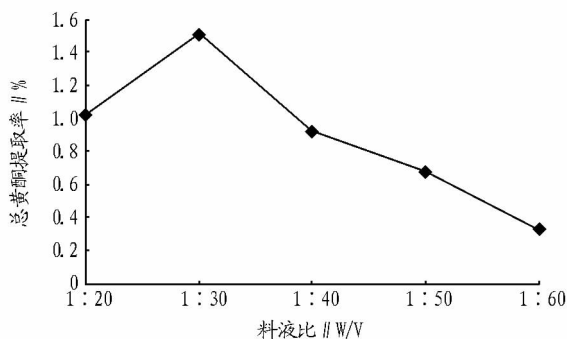


图 2 料液比对总黄酮提取率的影响

2.2.3 微波功率对鸡眼草黄酮提取率的影响。图 3 表明,随着微波功率的增加,总黄酮得率呈先增加后减少的趋势。当微波功率达到 300 W 时,黄酮类化合物含量达到最大值,之后随着微波功率的增加,含量呈下降趋势。微波功率过高,会造成样品中蛋白质变性,从而影响黄酮类化合物析出。因此,微波功率以 300 W 为宜。

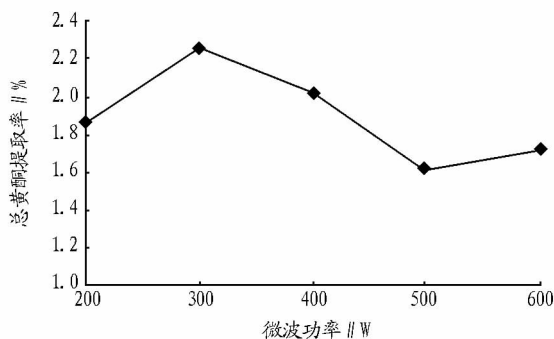


图 3 微波功率对总黄酮提取率的影响

2.2.4 微波处理时间对鸡眼草黄酮提取率的影响。图 4 表明,随着微波处理时间的增加,总黄酮得率呈先增加后减少的趋势。当微波处理时间达到 20 min 时,黄酮类化合物含量达到最大值,之后随着微波处理时间的增加,含量呈下降趋势。处理时间过长,微波辐射有可能破坏有效成分的结构,从而影响黄酮类化合物析出。因此,微波处理时间初步确定为 20 min。

2.3 正交试验 由表 2 可知,各因素对鸡眼草总黄酮提取率

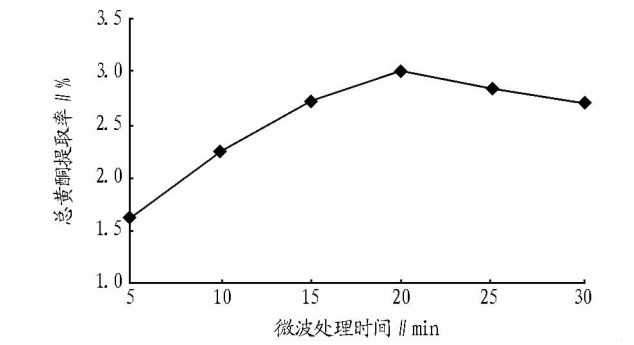


图4 微波处理时间对总黄酮提取率的影响

的影响从大到小依次为:乙醇浓度>微波功率>微波处理时间>料液比,最佳工艺条件为:A₃B₂C₂D₃,即乙醇浓度为50%、料液比为1:30、微波功率为300 W、微波处理时间为25 min。

试验号	因素				总黄酮得率 %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.26
2	1	2	2	2	2.27
3	1	3	3	3	2.36
4	2	2	1	3	2.44
5	2	3	2	1	2.64
6	2	1	3	2	2.73
7	3	3	1	2	2.55
8	3	1	2	3	3.14
9	3	2	3	1	2.96
k ₁	1.96	2.38	2.09	2.29	
k ₂	2.60	2.56	2.68	2.52	
k ₃	2.88	2.52	2.68	2.65	
R	0.92	0.18	0.59	0.36	

2.4 最佳工艺条件试验 由表3可知,在最佳提取条件下,5次测量结果精密度良好,且含量较高,为3.28%,RSD为3.7%,说明该提取工艺条件稳定、合理,适于提取鸡眼草中的黄酮类化合物。

表3 最佳工艺条件验证结果			
试验号	总黄酮得率/%	平均值/%	RSD/%
1	3.24	3.28	3.7
2	3.26		
3	3.33		
4	3.31		
5	3.27		

3 结论与讨论

试验采用微波辅助提取法探索了乙醇浓度、料液比、微波功率和微波处理时间4个单因素对鸡眼草总黄酮提取率的影响,并进行了L₉(3⁴)正交试验。通过极差分析得到最佳提取工艺条件组合为:乙醇浓度50%、料液比1:30、微波功率300 W、微波处理时间25 min;总黄酮提取率可达3.28%。该方法操作简单,成本低,用时短,稳定性好,是一种很好的提取鸡眼草中黄酮类化合物的方法。

参考文献

[1] 冼寒梅,邓家刚. 广西临床常用中草药[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2009:88.

[2] 胡雪茜,吴向峻. 优良饲药兼用植物——鸡眼草[J]. 温州农业科技, 2008(3):36–37.

[3] 侯贵传,徐立. 鸡眼草的综合利用[J]. 中国野生植物,1990(2):31.

[4] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[G]. 北京:人民卫生出版社,1975:432.

[5] 唐人九. 人字草黄酮类化学成分研究[J]. 华西药学杂志,1996,11(1):5–7.

[6] 张宝徽,陶君彦,胡则林,等. 鸡眼草乙醇提取物抗炎作用研究[J]. 时针国医国药,2011,22(10):2550–2553.

[7] 周玖瑶,黄桂英,韩坚. 三叶人字草抗炎镇痛作用研究[J]. 中国医药导报,2007,4(2):155–156.

[8] 周玖瑶,陈蔚文,黄桂英,等. 三叶人字草止血作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(3):65–66.

[9] 郑朝华,陈建秋. 葡萄皮总黄酮的提取及其对羟基自由基清除作用的研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(29):14486–14487,14492.

[10] 张宝徽,李芳芳,周牡娜,等. 鸡眼草属两种植物中总黄酮的含量测定[J]. 湖北中医药大学学报,2012,14(1):33–35.

(上接第77页)

2012年1月23日前)与田间休闲处理相比,分别提高了561.3和444.6 kg/hm²,早期平均单株产量分别提高了0.68和0.28 g。Duncan’s新复极差法进行差异显著性分析,结果表明,种植空心菜地块的草莓,其早期产量相互之间无显著差异,但与休闲地块相比有显著差异。各处理早期平均单株产量相互之间没有显著差异。

表3 水旱轮作对草莓产量的影响		
处理	春节前产量	早期平均单株
	kg/hm ²	产量/g/株
种植大叶空心菜	6 219.75 aA	76.67 aA
种植大叶纯白骨干菜	6 103.05 aA	76.27 aA
对照	5 658.45 bB	75.99 aA

注:采用Duncan’s新复极差法进行分析,同列数据后无相同小写字母表示差异显著(P<0.05),无相同大写字母表示差异极显著(P<0.01)。

3 小结与讨论

连续种植3年的草莓地块,即使当年休闲,其连作障碍现象也初步显现,具体表现在:①该地块种植草莓时,其植株

成活率最低,仅为89.3%,显著低于“红颊草莓—空心菜”水旱轮作地块,这同时也说明了水旱轮作有利于提高植株的存活率,有效克服连作障碍,与何圣米等^[3]调研结论相一致;②产量下降,这与杨祥田等^[4]研究结果相吻合。试验结果表明,草莓连作地块的早期产量显著下降,其早期产量仅为5 658.45 kg/hm²,与水生种植大叶空心菜相比,其产量下降高达561.3 kg/hm²,可能由于草莓地块连作时间不长的缘故,其产量下降与植株死亡率较高有关,受植株单产下降的影响还没有充分体现。

参考文献

[1] 孔樟良,童英富,张国珍,等. 设施栽培草莓新品种“红颊”引种初报[J]. 中国南方果树,2003,32(5):61.

[2] 赵密珍,王桂霞,钱亚明,等. 草莓种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京:中国农业出版社,2006.

[3] 何圣米,杨悦俭,李必元,等. 设施蔬菜—水生蔬菜水旱轮作模式的应用[J]. 浙江农业科学,2005(1):10–12.

[4] 杨祥田,周翠,李建辉,等. 不同轮作方式下大棚草莓产量及土壤生物学特性[C]//中国环境科学学会. 中国环境科学学会学术年会论文集(第二卷). 北京:北京航空航天大学出版社,2009:1081–1085.