

正交试验优化罗布麻茎中总黄酮的提取工艺

杨永涛, 潘思源, 田英姿*, 韦世鹏 (华南理工大学轻工科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要 [目的]优化罗布麻茎中总黄酮的提取工艺。[方法]采用乙醇浸提法从罗布麻茎中提取总黄酮。在单因素试验基础上,采用正交试验对罗布麻茎中总黄酮的提取工艺进行优化。[结果]罗布麻茎中总黄酮的最佳提取工艺为乙醇浓度50%、提取温度50℃、提取时间1.5 h、料液比1:40(g:mL)、样品目数100,此条件下的提取率达2.033%。[结论]该研究为罗布麻的开发利用奠定基础。

关键词 罗布麻茎;总黄酮;提取工艺;正交试验

中图分类号 R284.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)29-0114-03

Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoids from Stems of *Apocynum venetum* L. by Orthogonal Experiment

YANG Yong-tao, PAN Si-yuan, TIAN Ying-zi* et al (Institute of Light Industry Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640)

Abstract [Objective] The research aimed to optimize the extraction technology of total flavonoids from *Apocynum venetum* stems. [Method] Total flavonoids from *Apocynum venetum* stems were extracted by ethanol extraction. On the basis of single factor experiment, orthogonal experiment was used to optimize the extraction technology of total flavonoids from *Apocynum venetum* stems. [Result] The optimum extraction technology of total flavonoids from *Apocynum venetum* stems were ethanol concentration 50%, extraction temperature 50℃, extraction time 1.5 h, solid-liquid rate 1:40 (g:mL), sample number 100, the extraction rate under this condition was 2.033%. [Conclusion] The study laid the foundation for the development and utilization of *Apocynum venetum*.

Key words Stems of *Apocynum venetum* L.; Total flavonoids; Extraction technology; Orthogonal experiment

罗布麻为夹竹桃科白麻属大花罗布麻,维吾尔族语也称其为“野苏其干”“陶格其干”等^[1-2]。在我国新疆、青海和甘肃等省区广泛分布,新疆有丰富的野生罗布麻资源,主要分布在罗布泊、塔里木河及阿克苏地区^[3],可以防止土地沙漠化,全株可入药,被誉为“沙漠瑰宝”^[4]。

罗布麻在烟草工业^[5]、纺织^[6]、成分鉴定^[7-9]、药理^[10]等方面均有研究。研究者对罗布麻叶中总黄酮的含量测定、提取工艺进行了大量的探索,陈彦云等^[11]采用超声波辅助的方法提取罗布麻中总黄酮;阿依古丽·塔什波拉提等^[12]采用近红外光谱法快速测定罗布麻叶中总黄酮含量。工艺条件的探索中,溶剂、料液比、提取温度常被作为总黄酮提取效率的主要因素^[11-13],而对样品目数这一因素考虑研究较少。目前,罗布麻叶大多制成茶叶或者药材,而茎被大量遗弃^[14]。通过对罗布麻茎的研究,可为罗布麻茎的深度开发利用提供理论指导,以期达到废弃资源的综合利用。该研究采用乙醇浸提法提取罗布麻茎中总黄酮,在单因素试验基础上,应用正交试验设计对影响总黄酮提取工艺较大的5个因素(乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间及样品目数)进行优化,拟获得科学可行的工艺条件,以期为罗布麻的开发利用奠定基础,同时对其他天然产物的提取具有一定的借鉴作用。

1 材料与方法

1.1 试材 罗布麻茎(购自新疆国药集团);芦丁标准品(上海源叶生物科技有限公司, HPLC ≥ 98%);无水乙醇、硝酸铝、氢氧化钠等均为分析纯。

1.2 仪器 DR6000型紫外可见分光光度计, 哈希(上海)仪

器有限公司; TDL-80-2B 低速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; 其他一些常规的试验设备。

1.3 试验方法

1.3.1 罗布麻茎中总黄酮的提取。取少量罗布麻茎,室内晾干,粉碎、过40目筛。采用乙醇浸提法对罗布麻茎中总黄酮进行提取。

1.3.2 单因素试验。采用“1.3.1”方法提取罗布麻茎中总黄酮。采用单因素试验,固定其他提取条件,分别考察乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间及样品目数对罗布麻茎中总黄酮提取率的影响。

1.3.3 正交试验设计。在单因素试验的基础上,以总黄酮的提取率为考察指标。通过 $L_{16}(4^5)$ 正交试验确定溶剂浓度、料液比、提取温度、提取时间及样品目数等因素的最佳组合,从而优化罗布麻茎中总黄酮的提取工艺。

1.3.4 罗布麻茎中总黄酮的测定。

1.3.4.1 标样溶液配制。称取在110℃真空干燥至恒重的芦丁标准品20 mg于100 mL容量瓶中,加60%的乙醇溶解。定容至刻度,即为0.2 mg/mL的芦丁对照品溶液,摇匀,冷藏备用。

量取25 mL上述0.2 mg/mL芦丁对照品溶液于50 mL容量瓶中,60%乙醇稀释至刻度,即可得到0.1 mg/mL的芦丁对照品溶液。

1.3.4.2 标准曲线的绘制^[15]。量取芦丁对照品溶液(0.1 mg/mL)0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置于10 mL容量管中,加入5% NaNO₃溶液0.3 mL,摇匀,静置4 min;再加10% Al(NO₃)₃溶液0.3 mL,摇匀,静置4 min;移液枪移取4% NaOH溶液4 mL,超纯水稀释至10 mL,摇匀,静置15 min。

编号为0、1、2、3、4、5,以0号样品溶液为空白对照。在510 nm波长处测定吸光度^[16],以芦丁对照品溶液浓度为横坐标、吸光度为纵坐标,用最小二乘法进行线性回归,得标准

基金项目 广东中烟工业有限责任公司科技项目(粤烟工05XM-QK[2015]001)。

作者简介 杨永涛(1992—),男,湖北广水人,硕士研究生,研究方向:植物资源综合利用。*通讯作者,教授,硕士,硕士生导师,从事植物资源综合利用研究。

收稿日期 2017-08-09

曲线方程。

1.3.4.3 总黄酮的测定。将提取液离心、过滤,移取一定量澄清液。精确量取 1.00 mL,移至 10 mL 容量管中。按照“1.3.4.2”中方法测定提取液吸光度。

总黄酮提取率 $Y = [(C \times V_2) / (V_1 \times m \times 1000)] \times 100\%$ 式中, C 为由标准曲线计算得到的提取液总黄酮质量浓度 (mg/mL), V_1 为测定用提取液体积 (mL), V_2 为样品提取液总体积 (mL), m 为样品绝干重量 (g)。

2 结果与分析

2.1 芦丁标准品的标准曲线 由图 1 可知,芦丁标准曲线回归方程为 $y = 13.034x - 0.0075$ ($R^2 = 0.9993$),经检验 $P < 0.01$ 。因此,该回归方程可用于定量测定。

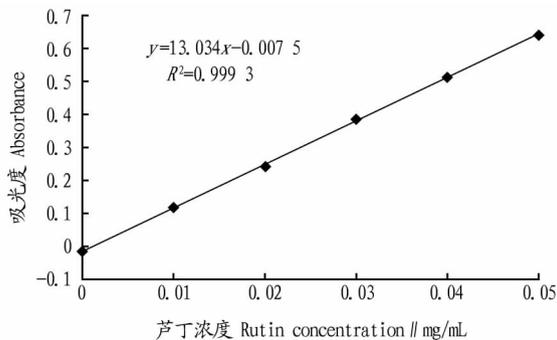


图 1 芦丁标准曲线

Fig.1 The standard curve of rutin

2.2 单因素试验

2.2.1 乙醇浓度对罗布麻茎中总黄酮提取率的影响。由图 2 可知,随着乙醇浓度的增加,罗布麻茎中总黄酮的提取率也随之提高。当浓度高于 60%,总黄酮的提取率呈现下降趋势,反而不利于总黄酮的提取。考虑到乙醇浓度过大会浪费原料,将浓度控制在 50% ~ 70% 较为合适。

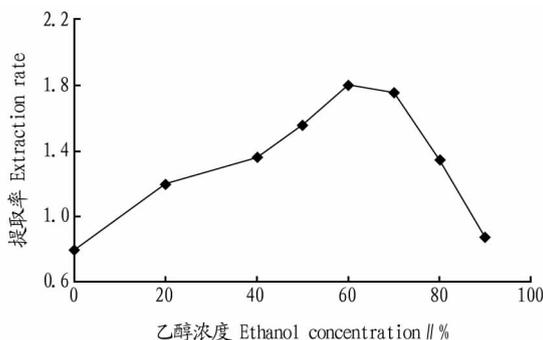


图 2 乙醇浓度对罗布麻茎中总黄酮提取率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of total flavonoids from *Apocynum venetum* stems

2.2.2 料液比对罗布麻茎中总黄酮提取率的影响。由图 3 可知,总黄酮提取率随料液比的改变呈现先增大后降低的趋势,料液比在 1:40 (g:mL) 时,提取率达到最大值,之后随料液比增大而平缓下降。增加浸提液体积,传质速率增大,更多的黄酮溶出,提取率增大。提取剂过多时,多余的提取剂稀释了提取液,传质速率减小,提取率减小。故将料液比控制在 1:20 ~ 1:40 较为合适。

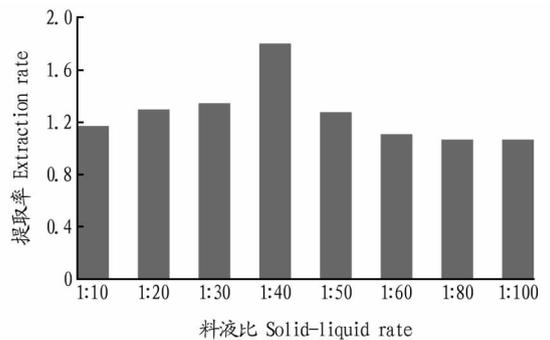


图 3 料液比对罗布麻茎中总黄酮提取率的影响

Fig.3 Effect of solid-liquid rate on the extraction rate of total flavonoids from *Apocynum venetum* stems

2.2.3 提取温度对罗布麻茎中总黄酮提取率的影响。由图 4 可知,温度较低时,总黄酮的提取率随温度升高而升高;温度高于 60 °C 时,提取率增加缓慢并趋于平缓。可能温度过高会破坏黄酮类化合物的结构,导致部分黄酮类物质分解,故将温度控制在 50 ~ 70 °C 较为适宜。

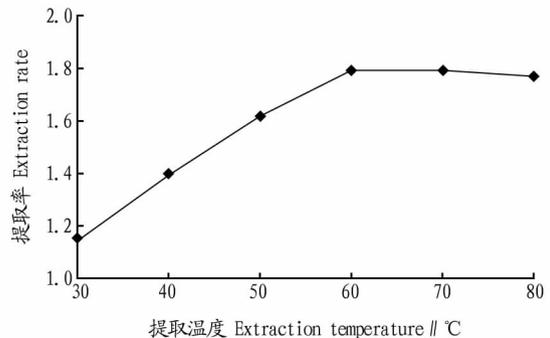


图 4 提取温度对罗布麻茎中总黄酮提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on the extraction rate of total flavonoids from *Apocynum venetum* stems

2.2.4 提取时间对罗布麻茎中总黄酮提取率的影响。由图 5 可知,0 ~ 2 h 时,总黄酮提取率随时间增加而显著提高;在 2 h 时,提取率达到最大值。2 h 后,提取率出现缓慢下降,可能是一些黄酮类物质因受热时间较长而分解破坏。浸提时间过长杂质溶出增加,因此将提取时间控制在 1.5 ~ 2.0 h 较为合适。

2.2.5 样品目数对罗布麻茎中总黄酮提取率的影响。由图 6 可知,总黄酮提取率随样品目数的增大而呈现先增加后趋于平缓的趋势。样品目数越大,罗布麻茎粉末与浸提液的接触面积越大,接触愈加充分。当样品目数小于 80 时,提取率明显增加;当样品目数大于 80 目时,提取率基本保持平稳,可能是总黄酮的提取率已达到最大值;继续增大样品目数,反而会增加样品处理的难度。故将样品目数控制在 80 ~ 100 目较为合适。

2.3 正交试验 在单因素试验的基础上,每个因素选取 4 个对总黄酮提取率影响较大的水平,建立五因素四水平的正交试验因素和水平表(表 1)。用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计对罗布麻茎中总黄酮的提取工艺进行优化,结果表明(表 2),各因素对提取率的影响程度从大到小依次为 D、A、B、E、C,即料

液比为主要影响因素,其次为乙醇浓度,提取温度、样品目数和提取时间对提取率影响较小。

对 $L_{16}(4^5)$ 正交设计试验结果进行方差分析,结果发现,料液比对总黄酮提取率的影响显著,而乙醇浓度、提取温度、样品目数、提取时间对总黄酮提取率的影响不显著。

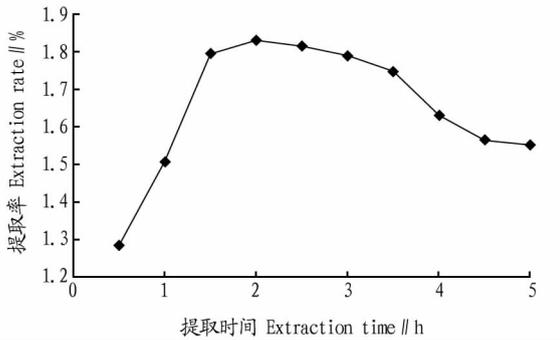


图5 提取时间对罗布麻茎中总黄酮提取率的影响

Fig.5 Effect of extraction time on the extraction rate of total flavonoids from *Apocynum venetum* stems

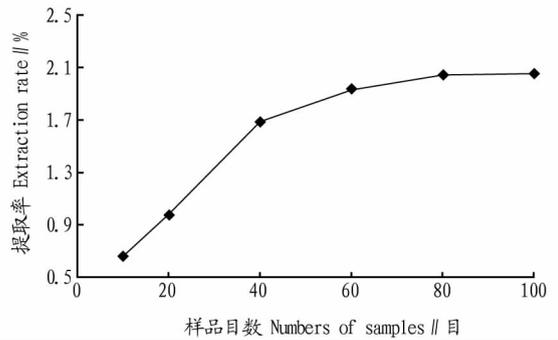


图6 样品目数对罗布麻茎中总黄酮提取率的影响

Fig.6 Effect of numbers of samples on the extraction rate of total flavonoids from *Apocynum venetum* stems

2.4 验证试验 为了验证正交试验结果,按照正交试验所得到的最佳工艺条件,即乙醇浓度 50%、提取温度 50℃、提取时间 1.5 h、料液比为 1:40、样品目数 100,重复试验 6 次。结果表明,罗布麻茎中总黄酮的平均提取率为 2.036%,相对标准偏差 RSD 为 0.321%,表明该工艺具有可重复性。

表1 $L_{16}(4^5)$ 正交试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of $L_{16}(4^5)$ orthogonal experiment

水平 Level	A(乙醇浓度 Ethanol concentration // %)	B(提取温度 Extraction temperature // °C)	C(提取时间 Extraction time // h)	D(料液比 Solid - liquid rate)	E(样品目数 Numbers of samples // 目)
1	40	50	1.0	1:20	40
2	50	60	1.5	1:30	60
3	60	70	2.0	1:40	80
4	70	80	2.5	1:50	100

表2 正交试验方案及结果

Table 2 Orthogonal experimental scheme and results

试验号 Test No.	因素 Factors					提取率 Extraction rate // %
	A	B	C	D	E	
1	1	1	1	1	1	0.768
2	1	2	2	2	2	1.004
3	1	3	3	3	3	1.047
4	1	4	4	4	4	1.605
5	2	1	2	3	4	2.033
6	2	2	1	4	3	1.502
7	2	3	4	1	2	0.733
8	2	4	3	2	1	1.342
9	3	1	3	4	2	1.970
10	3	2	4	3	1	1.796
11	3	3	1	2	4	1.379
12	3	4	2	1	3	0.990
13	4	1	4	2	3	1.609
14	4	2	3	1	4	0.854
15	4	3	2	4	1	1.894
16	4	4	1	3	2	1.600
k_1	1.106	1.595	1.312	0.836	1.450	
k_2	1.402	1.289	1.480	1.333	1.327	
k_3	1.534	1.263	1.303	1.619	1.287	
k_4	1.489	1.384	1.436	1.743	1.468	
R	0.428	0.332	0.177	0.907	0.181	

3 结论

单因素试验得到各个因素的适宜范围,但是单因素未考虑到各因素之间的相互作用,需要正交试验进一步优化工

艺条件。

采用正交试验设计对影响总黄酮提取率的乙醇浓度、提取温度、提取时间、料液比、样品目数进行研究,结果表明,各因素对提取率的影响从大到小依次为料液比、乙醇浓度、提取温度、样品目数、提取时间,即料液比对提取率影响最大,样品目数对提取率影响最小。

正交试验优化得出罗布麻茎中总黄酮的提取工艺为:乙醇浓度 50%,提取温度 50℃,提取时间 1.5 h,料液比为 1:40,样品目数为 100 目,提取率达到 2.033%。经验证,在该工艺条件下重复 6 次试验,罗布麻茎总黄酮的平均提取率为 2.036%,相对标准偏差 RSD 为 0.321%,表明该工艺条件重复性良好。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1977: 157-158.
- [2] 张卫明, 肖正春, 顾襄平, 等. 罗布麻资源利用与罗布麻植物分类问题 [J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(2): 15-19.
- [3] 陈敏, 赵学勇, 左小安, 等. 荒漠生境罗布麻 (*Apocynum venetum*) 传粉生物学比较 [J]. 中国沙漠, 2016, 36(1): 124-130.
- [4] 刘斌, 陈孝娟, 于萍. 新疆栽培种和野生种罗布麻叶中总黄酮含量分析 [J]. 海峡药学, 2017, 29(2): 41-43.
- [5] 赵翠. 罗布麻全秆纤维烟草薄片纸基应用研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [6] 顾秦榕, 谢春萍, 王广斌, 等. 罗布麻纤维结构与性能测试研究 [J]. 丝绸, 2017, 54(2): 11-15.

构体系。要建立权威性的农村土地流转有形市场,明确职能职责,严格操作程序,积极探索创新新型农业经营主体管理、生活、仓库等附属设施占用耕地的相关政策,确保农村土地流转工作得以正常开展。二是加快建立临泉县(区、镇、村)三级农村土地承包经营权流转服务平台。要为农村土地承包经营权流转提供信息登记发布、土地产权评估、合同签订鉴证、法律政策咨询、纠纷调解等服务,推进农村土地流转纠纷调解仲裁工作走向制度化、标准化与规范化。三是不断通过新型农业经营主体规模化经营的发展态势,政府引导健全农村劳动力市场的供给结构平衡,把部分有劳动能力的困难群体纳入其中,给予他们公平参与农业发展、实现发家致富的平等权利。

3.3 创新农村金融制度 加快推进农村金融制度创新,使之成为加快培育新型农业经营主体的重要供给,并为精准帮扶困难户参与带资入股或贷款创业提供资金保障。一是扎实开展临泉县涉农信贷政策导向评估工作,加大对金融机构贯彻执行支农政策的考核力度,以评估考核引导带动金融机构支持新型农业经营主体发展。要鼓励地方政府和民间出资设立融资性担保公司,为新型农业经营主体提供贷款担保服务,切实破解家庭农场等新型农业经营主体融资难的问题。二是建议本区域各银行业金融机构要针对不同类型、不同经营规模家庭农场等新型农业经营主体的差异化资金需求,提供多样化的融资方案,切实满足新型农业经营主体的多层次融资需求。三是整合涉农项目资金,优化财政涉农资金供给,最大限度地向贫困村地区倾斜。建立县级财政专项扶贫资金稳定增长机制,将每年财政收入增量的20%以上增列专项扶贫预算。

3.4 加大政府扶持力度,与困难户结成合作关系 加大对新型农业经营主体的政策扶持力度,使之成为加快培育新型农业经营主体的有力保证,并与精准帮扶困难户结成利益共享、风险共担、互惠互利的合作关系。一是要加大财政扶持力度。建议政府将每年良种补贴、农资综合补贴和农机具购置补贴的增量主要用于规模种粮的新型经营主体。建议政府设立新型农业经营主体发展专项资金,支持新型农业经营主体完善生产服务设施、扩大生产规模等;要支持品牌建设,对获得全国驰名商标、市著名商标、市名牌农产品、“三品一标”认证的给予财政支持。二是要落实税收用地用电政策。对新型农业经营主体实行税收优惠政策,完善所得税减免政

策。要为新型农业经营主体因生产、经营需要兴建的简易仓(机)库、生产管理用房、晒场等农业生产配套设施用地提供保障。三是建议政府大力发展农产品物流业和建立“互联网+”相关农产品市场销售信息渠道。依托全县各地特色产业,打造不同类型农产品批发市场,鼓励建设农产品产地市场,形成农村淘宝式生产和销售服务网络体系。

3.5 强化宣传保障与政策引导,提高政策落实的实效性和执行力 进一步强化宣传保障和政策引导,实现精准扶贫信息通畅、政策到位,提高政府政策落实的实效性和执行力,提振新型农业经营主体、困难户和基层群众发家致富的信心。一是要重视政策宣传动员工作,注重通过会议动员、集中宣教、入户引导、参观学习等形式宣传政策,把精准扶贫信息政策真实完整地传递到基层,特别是新型农业经营主体、困难群体。二是探索形成联席会议制度,摆正政府职能,依法办事、依规办事,加强干部思想教育,实施责任清单。为新型农业经营主体茁壮成长、困难群体发家致富创造公平竞争、规范有序、科学发展的良好环境,特别是“政府需要继续加大对新型农业经营主体的扶持力度,为新型农业经营主体的发展提供有效的配套服务,鼓励贫困地区新型农业经营主体与贫困户建立稳定的带动关系”^[5-6]。三是坚持落实好全县精准扶贫政策的政令统一,根据各镇办园区的实际需要和发展要求,制定与其配套的各自重点精准扶贫政策,把政策的统一性和灵活性发挥出来,因地制宜,按需施策,提高实效。四是积极发挥民政兜底保障职能,发挥慈善事业积极作用,完善最低生活保障制度,不断加大医疗救助力度,提高新农合报销比例,加快社会养老服务体系,增加重度残疾人护理补贴,为农村困难户切实解决问题,体现社会保障的公平正义、救死扶伤的担当和职责。

参考文献

- [1] 周忠艳. 我国农村经济发展现状的相关思考[J]. 农村经济与科技, 2016, 27(2): 118.
- [2] 彭建涛, 杜俊涛. 当前我国农业供给侧改革面临的问题与对策[J]. 湖北经济学院学报(人文社会科学版), 2016, 13(7): 36-37.
- [3] 甄雪刚. 论我国农村经济发展的瓶颈及前景[J]. 商, 2015(49): 278-279.
- [4] 车文斌. 农村, 产业融合与供给革新[J]. 当代县域经济, 2016(2): 25-27.
- [5] 张琛, 高强. 论新型农业经营主体对贫困户的脱贫作用[J]. 西北农林科技大学学报(社会科学版), 2017(2): 73-79.
- [6] 王慧敏, 龙文军. 贫困地区新型农业经营主体培育研究[J]. 区域经济评论, 2015(4): 139-142.

(上接第116页)

- [7] KASIMU R, ZHEN Z Z, WANG X L, et al. Anti-platelet aggregation activities of different fractions in leaves of *Apocynum venetum* L. [J]. Journal of ethnopharmacology, 2015, 168: 116-121.
- [8] 李赛男. 液相色谱-质谱联用测定罗布麻叶化学成分[J]. 当代化工研究, 2017(2): 114-115.
- [9] SONG R J, ZHOU J. Microemulsion liquid chromatographic method for simultaneous separation and determination of six flavonoids of *Apocynum venetum* leaf extract [J]. Journal of chromatography B, 2015, 995/996: 8-14.
- [10] ZHENG M Z, FAN Y J, SHI D F, et al. Antidepressant-like effect of flavonoids extracted from *Apocynum venetum* leaves on brain monoamine levels and dopa-minergic system [J]. Journal of ethnopharmacology, 2013,

147: 108-113.

- [11] 陈彦云, 任艳丽. 用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计优化罗布麻总黄酮提取工艺 [J]. 食品科技, 2010, 35(11): 214-218.
- [12] 阿依古丽·塔什波拉提, 海热尼沙·黑提甫, 李慕春, 等. 近红外光谱法快速测定罗布麻叶中总黄酮含量 [J]. 中兽药, 2015(6): 634-637.
- [13] 盛萍, 王新铃, 杨学斌, 等. 罗布麻总黄酮提取工艺的优选 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(4): 587-588.
- [14] 郑梅竹, 吴山力, 时东方, 等. 罗布麻叶总黄酮抗抑郁作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2468-2470.
- [15] 蔡明招. 分析化学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 177-178.
- [16] 林志钦. 莲子心总黄酮的提取纯化及其功能性研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.