

纤维素酶-乙醇协同提取黄芩总黄酮

魏凤玉*, 王欣

合肥工业大学化工学院, 合肥 230009

摘要:以黄芩总黄酮的得率为指标, 比较了乙醇回流提取、酶-缓冲水溶液提取、纤维素酶-乙醇提取等方法对黄芩总黄酮提取的影响, 发现纤维素酶对细胞壁的水解和乙醇溶液对黄酮类物质的浸出产生了协同效应。采用单因素实验法, 优化了纤维素酶-乙醇协同提取黄芩总黄酮的工艺条件。结果表明, 乙醇体积分数 50%, 提取温度 50 °C, 提取时间 6 h, 加酶量 50U/g(干原料), 液固比 15 时, 纤维素酶-乙醇回流法提取黄芩总黄酮的得率达 19.85%, 较单一的乙醇回流法提取提高了 1.38%。纤维素酶-乙醇回流法可用于黄芩总黄酮的提取。

关键词:黄芩总黄酮; 提取率; 乙醇; 纤维素酶;

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Extraction of Total Flavonoids from *Scutellaria* by Cellulose Assisted Aqueous Ethanol

WEI Feng-yu*, WANG Xin

School of Chemical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China

Abstract: In order to optimize the extraction process of *Scutellaria* and increase the extraction yield of total flavonoids, ethanol reflux extraction, cellulose-aqueous buffer solution extraction and cellulose assisted aqueous ethanol extraction were compared using the yield of total flavonoids as index. The results showed that there was a synergistic effect between enzymatic hydrolysis of cell walls and the flavonoids leaching in ethanol aqueous solution. The optimal conditions of cellulose assisted aqueous ethanol extraction was as follows: extraction temperature 50 °C, ethanol 50% (v/v), liquid to solid ratio 15, extraction time 6 h, cellulose dosage 50 U/g (dry ingredients). Under the optimal conditions, the extraction yield of the flavonoids was 19.85%, 1.38% higher than the extraction yield without enzymatic hydrolysis. Hence, it was concluded that cellulose assisted aqueous ethanol extraction method can be used for the extraction of the total flavonoids from *Scutellaria*.

Key words: total flavonoids of *Scutellaria*; extraction rate; ethanol; cellulose

黄芩是一种常用的中草药, 具有抗菌、抗病毒等生物活性, 其主要有效成分为黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等黄酮类化合物^[1]。乙醇回流提取^[2]和水煎煮^[3]等传统的黄芩总黄酮提取方法存在温度高、提取率低等问题。酶解是一种新型高效绿色提取技术, 具有快速、高效、反应条件温和等优点, 人们已将纤维素酶用于天然产物中有效物质如黄酮的提取和分离^[4-6]。高声传等^[7]用纤维素酶酶解黄芩药材后再进行乙醇高温回流提取, 发现黄芩素的提取率比传统的水煎法及单纯的醇提法显著提高。一般情况下, 酶法提取天然产物均在水溶液中进行。毕会敏等^[8]发现用适当体积分数的乙醇溶液作为酶反应溶剂可以加快酶解速度, 乙醇溶液和

纤维素酶的协同作用使得红景天总黄酮的浸出率远高于其他提取方法。本文以乙醇水溶液作为酶解反应溶剂提取黄芩总黄酮, 并对其工艺参数进行了优化, 为酶法提取黄芩总黄酮的应用提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄芩饮片(内蒙黄芩)购自合肥大药房; 黄芩苷标准品及黄芩素标准品购自中国食品药品检定研究所; 纤维素酶(绿色木霉, 酶活力 15000 U/g)购自国药集团化学试剂有限公司; 除高效液相色谱所用试剂为色谱纯外, 其余试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 主要仪器

HH-2 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); RE-52 旋转式蒸发器(上海安亭电子仪器厂); DHG-

9146A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);G1310 高效液相色谱(安捷伦科技有限公司);UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 黄芩总黄酮的测定

采用紫外可见分光光度法进行黄芩总黄酮的测定^[2]。

(1) 标准曲线的制备

精密移取黄芩苷标准品 3.3 mg,置于 25 mL 容量瓶中,用 70% 乙醇水溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为黄芩苷储备液。分别取储备液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL,用无水乙醇定容至 10 mL 容量瓶中。用紫外可见分光光度计于 277 nm 处测定吸光度(A)。以 A 对浓度(C)进行线性回归,得到标准曲线方程为 $A = 0.0642C - 0.01368$ ($R = 0.9998$)。

(2) 样品测定

将提取液稀释后,按照标准曲线制备的步骤测定样品的吸光值,从标准曲线上求其浓度。

1.3.2 黄芩总黄酮的提取

将黄芩饮片清洗除杂,烘干粉碎,过 10~20 目筛备用。

1.3.2.1 乙醇回流提取:取黄芩粉末 5.0 g 加入到 100 mL 60% 乙醇水溶液中,50 °C 下回流提取 3 h,离心,滤液定容后测吸光度。

1.3.2.2 酶-缓冲水溶液提取:将 5.0 g 黄芩粉末加入到 100 mL 溶有 50 U/g(干原料)纤维素酶的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液中(pH5.0),50 °C 下回流提取 3 h,其余同(1)。

1.3.2.3 酶预处理-醇提:采用方法(2)进行酶预处理,于 85 °C 下灭酶 5 min,离心,将离心后的滤液进行 UV 检测;滤渣按(1)的方法回流提取 3 h,离心,滤液定容后进行 UV 检测。

1.3.2.4 纤维素酶-乙醇协同提取:以 50 U/g(干原料)黄芩的纤维素酶-乙醇水溶液为提取剂,其余实验条件同(1)。

为减少实验误差,所有实验均重复 2 次。

1.3.3 黄芩总黄酮提取效果评价

黄芩总黄酮的得率 η 按公式(1)计算

$$\eta = \frac{C_1 \times V_1}{1000m_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中为提取液黄芩总黄酮的浓度(mg/mL),为

提取液体积(mL),为原料质量(g)。

2 实验结果与讨论

2.1 提取方法的选择

实验首先考察了不同提取方法对黄芩总黄酮提取的影响,结果见表 1。从表 1 中可以看出纤维素酶-缓冲溶液提取黄芩总黄酮的得率最小,酶-乙醇提取的得率最高。黄芩药材中含有大量的黄芩苷、少量的黄芩素和汉黄芩素;黄芩苷和汉黄芩苷均为葡萄糖醛酸苷,分子中含有羧基,故易溶于热水或稀乙醇水溶液中;而黄芩素属亲脂性成分,溶于乙醇,难溶于水。因此采用乙醇-水溶液比缓冲水溶液有利于黄芩总黄酮的提取。在黄芩总黄酮提取中加入纤维素酶后,一方面酶破坏黄芩细胞壁结构,增加有效成分的溶出速率提取;另一方面,酶又会使黄芩苷分解成黄芩素和汉黄芩素^[1,7],黄芩苷分解成黄芩素和汉黄芩素的同时生成较多葡萄糖醛酸^[1,5,7]。因此,酶预处理再乙醇提取效果反而不如乙醇提取。当在乙醇水回流提取时,酶对细胞壁的水解和乙醇溶液对黄酮类物质的浸出产生协同效应,使总黄酮浸出率明显增加。

表 1 不同提取方法对黄芩总黄酮得率的影响

Table 1 Effect of different extraction methods on the yield of total flavonoids

实验方法 Experimental methods	η Yield (%)
酶-缓冲溶液提取 Cellulose-aqueousbuffer solutionextraction	3.01
酶预处理-醇提 Cellulose pretreatment-ethanol reflux extraction	12.85
乙醇提取 Ethanol reflux extraction	14.83
纤维素酶-乙醇提取 Cellulose assisted aqueous ethanolextraction	16.64

2.2 纤维素酶-乙醇法协同提取黄芩总黄酮

2.2.1 提取时间的影响

在 50 °C、乙醇水溶液浓度 50%、液固比 15 时,分别进行醇提和加酶量 50 U/g(干原料)时协同提取黄芩总黄酮实验,考察提取时间对黄芩总黄酮得率 η 的影响,结果见图 1。

由图 1 可见,总黄酮得率随着提取时间的增长而上升,提取 5.5 h 时得率最大,此后延长提取时间得率基本不变。为保证反应进行完全,后续试验均提取 6 h。

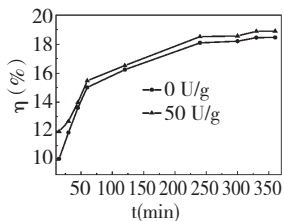


图1 不同提取时间下的总黄酮得率

Fig. 1 Effects of extraction time on the flavonoids yield

2.2.2 乙醇水溶液浓度的确定

为研究乙醇水溶液浓度对黄芩总黄酮得率的影响,在 50 ℃、液固比 15 时,改变乙醇水溶液浓度为 0 ~ 70%,分别进行醇提和加酶量 50 U/g(干原料)的黄芩总黄酮协同提取实验,实验结果见图 2。

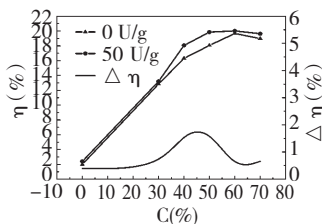


图2 乙醇浓度对总黄酮率的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on the flavonoids yield

从图 2 中可以看出无论加酶与否,黄芩总黄酮得率均随着乙醇水溶液浓度的增大而增大,在 60% 时达最大,然后又下降。文献也报道醇提黄芩总黄酮的最佳浓度为 50% ~ 60%^[2,7,9],此时乙醇水溶液的极性与黄芩黄酮较为相似,根据“相似相溶”原理,黄酮得率较高。由图 2 还可以看出,不同醇浓度下纤维素酶乙醇提取的得率均高于单一的醇提,这是由于酶对细胞壁的水解和乙醇溶液对黄酮类物质的浸出产生协同效应。为进一步考察两者的协同作用效果,将纤维素酶乙醇协同提取的产品得率与相同条件下醇提得率的差随乙醇水溶液浓度的变化关系作图,结果也标绘在图 2 中。从图 2 中可以看出最大时的乙醇水溶液浓度为 50%,此时协同作用最好,总黄酮得率为 19.85%;同时,考虑到醇浓度增大时酶活性可能会下降^[6,8],选择协同提取的乙醇水溶液浓度为 50%。

2.2.3 加酶量的确定

在 50 ℃、液固比 15 时,考察加酶量 (U/g) 对黄芩总黄酮得率 η 的影响,实验结果见图 3。从图 3 中可以看出,总黄酮得率随酶用量的增大而增大,达到 50 U/g(干原料)后,增加酶用量得率反而下降。

这是由于协同提取中酶一方面破坏细胞壁结构,与乙醇溶液产生协同作用;另一方面可能使黄芩苷分解成黄芩苷元和较多葡萄糖醛酸^[1,5,7],使得总黄酮得率下降。故选择加酶量 50 U/g(干原料)。

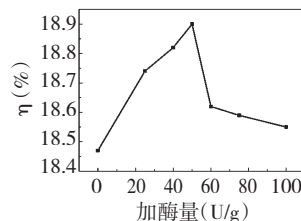


图3 不同酶用量下的总黄酮得率

Fig. 3 Effects of enzyme amount on the flavonoids yield

2.2.4 提取温度的确定

在液固比 15、加酶量 50 U/g 干原料、乙醇水溶液浓度为 50% 时,提取温度控制在 30、40、50、60 ℃ 下进行黄芩总黄酮提取实验,实验结果见图 4。

图 4 表明,醇提时总黄酮得率随温度的升高而增加,这是由于温度升高分子扩散加快,浸提速率增加^[9]。但酶乙醇协同提取时,总黄酮得率随温度的升高先增大后减小,在 50 ℃ 时最大。这是由于温度过高反而会使酶的活性降低,纤维素酶提取天然产物有效成分的适宜温度为 30 ~ 60 ℃^[1,6-8]。另外,从随 T 的变化曲线中可以看出 50 ℃ 时协同作用最好,故选择提取温度为 50 ℃。

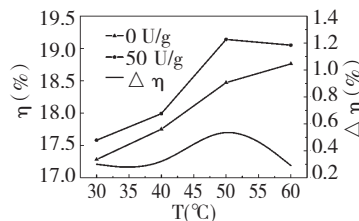


图4 温度对总黄酮得率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the flavonoids yield

2.2.5 液固比的确定

实验研究液固比 S (mL/g) 对黄芩总黄酮提取的影响,结果见图 5。

从图 5 中可以看出醇提时总黄酮的得率随液固比的增大而

增大。这是由于增大液固比,传质界面积加大,反应推动力加大,浸提速度加快^[2,7,14]。而协同提取时总黄酮得率随着液固比的增大先增加后减少,液固比 15 时达最大值。这是因为当酶用量一定时,酶浓度随液固比的增加而变小,酶的协同作用下降。

从随 S 的变化曲线中可以看出 S 为 15 时的协同作用最好,此时黄芩总黄酮的得率为 19.85%,比单一醇提增加了 1.38%。综合考虑,选择液固比为 15。

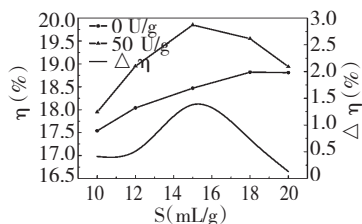


图5 液固比对总黄酮得率的影响

Fig. 5 Effect of the ratio of liquid to solid on the flavonoids yield

3 结论

本文比较了不同提取方法对黄芩总黄酮提取的影响,发现采用适当体积分数的乙醇溶液作为酶反应溶剂时,乙醇溶液对黄酮类物质的浸出和酶对细胞壁的水解产生了协同效应,可使总黄酮浸出率明显增加。并采用单因素实验优化了乙醇-纤维素酶协同提取工艺,有效地提高了黄芩总黄酮的提取率。

参考文献

1 Wang HZ(王宏志). Enzymatic extracted the active ingredients of *Skullcap*. Tianjin: Tianjin University(天津大学), MSC. 2007.

2 Zhou F(周芳). Extracted total flavones from *Skullcap* and separated the *Baicalin*. Wuhan: Wuhan Engineering University(武汉工程大学), MSC. 2007.

3 Zhang WF(张福维), Lin C(林春). Study the extraction technology of the *Baicalin*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2006, 18: 295-297.

4 Wei FY(魏凤玉), Fang C(方春). Enzyme assisted aqueous extraction of *sapindussaponins*. *App Chem Ind*(应用化工), 2010, 39: 1149-1151.

5 Liu YH(刘云华), Huang ZF(黄志芳), Chen Y(陈燕). Extraction of *Baicalein* in *Scutellaria baicalensis* by enzymatic dissolution. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2007, 19: 688-691.

6 Chen S, Xing XH. Enzyme-assisted extraction of flavones from *Ginkgo biloba* leaves; improvement effect of flavone *transglycosylation* catalyzed by *Penicillium decumbence cellulose*. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 48: 100-105.

7 Gao SC(高声传), Wang TC(王童超), Xiao JN(肖江宁). Study on extraction of *Baicalin* in *Scutellaria Baicalensis*. *Pharm J Chin PLA*(解放军药理学学报), 2011, 27: 502-505.

8 Bi HM(毕会敏), Zhang SQ(张守勤), Liu CJ(刘长姣). Extract the total flavones from *Rhodiola sachalinensis* by cellulose and ethanol solution. *Jilin Univ*(吉林大学学报), 2007, 37: 480-483.

9 Liang Y(梁英). Study on extraction kinetics and techniques of flavones from *Scutellaria Radix*. Beijing: China Agricultural University(中国农业大学), PhD. 2005.

(上接第 600 页)

6 Yang QF(杨琴芳), Yuan HY(袁红宇), Qian YL(钱雅璐). Inhibitory activity of extracts from *Gnctum montanum markgr* on the xanthine oxidase. *Jiangsu J Tradit Chin Med*(江苏中医药), 2009, 41(12): 77-78.

7 Li Y(李英), Chen J(陈君), Li P(李萍). Inhibitory activity of the flavonoids and phenolic acids from *Jinyinhua* on the xanthine oxidase. *J Chin Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2011, 42: 407-411.

8 Wu N, Zu Y, Fu Y, et al. Antioxidant activities and xanthine oxidase inhibitory effects of extracts and main polyphenolic compounds obtained from *Geranium sibiricum* L. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 4737-4743.

9 Rahman AU, Naz H, Fadimatou, et al. Bioactive constituents from *Boswellia papyrifera*. *J Nat Prod*, 2005, 68: 189-193.

10 Li L(黎莉), Dai LZ(戴立珍), Yang J(杨靖), et al. Study

on xanthine oxidase inhibitory activity of the extracts from Chinese herbal medicines. *J Wuhan Inst Tech*(武汉工程大学学报), 2010, 32(3): 44-46.

11 Konga LD, Zhanga Y, Pand X, et al. Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57: 500-505.

12 Zhao XM(赵雪梅), Tang CH(谭昌恒), Zhang H(张辉), et al. The xanthine oxidase inhibitory activity of the extracts from *Orthosiphonari status*. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床), 2009, 25(3): 45-47.

13 Zhu TM(朱田密), Chen KL(陈科力), Li L(黎莉), et al. Study on xanthine oxidase inhibitory activities *in vitro* of biflavonoids from *Selaginella pulvinata*. *Pharm Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床), 2007, 23(4): 33-34.