

川麦冬须根总黄酮和总皂苷提取和富集工艺研究

刘晓梅^{1,3},李沛霞²,甘蓝湘²,晋艳²,黄毅²,江洪波¹,金虹^{1*}¹四川中医药高等专科学校,绵阳 621000;²西南科技大学生命科学与工程学院,绵阳 621010;³成都中医药大学药学院,成都 611137

摘要:本研究采用响应面法优化川麦冬须根中总黄酮和总皂苷的提取工艺。在单因素试验的基础上,以乙醇浓度、料液比、提取时间和提取次数为自变量,以黄酮和皂苷的总得率为响应值,设计四因素三水平 Box-Behnken 响应面法优化工艺条件。再以吸附及解吸效果为指标筛选最优的大孔树脂,对总黄酮和总皂苷进一步富集。结果表明,最优提取工艺为:乙醇浓度 86%、料液比 1:15、提取时间 1.4 h、提取 3 次,在此条件下浸膏得率 26.17%,黄酮和皂苷总得率为 2.41% (其中总黄酮得率 0.46%,总皂苷得率 1.95%)。D101 树脂对麦冬须根黄酮和皂苷有较好的富集效果,富集后总黄酮和总皂苷回收率达到 88.69% 和 90.28%,纯度相比浸膏分别提升 7 倍和 9 倍。该工艺简单且稳定性好,对于川麦冬须根作为食品资源的开发利用具有重要的参考价值。

关键词:川麦冬须根;皂苷;黄酮;提取;富集

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)8-1285-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.8.003

Optimization on extraction and enrichment technology of total flavonoids and total saponins from fibrous roots of *Ophiopogon japonicus*

LIU Xiao-mei^{1,3}, LI Pei-xia², GAN Lan-xiang², JIN Yan², HUANG Yi², JIANG Hong-bo¹, JIN Hong^{1*}¹Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang 621000, China;²School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China;³College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: This study was to optimize the process of extracting total flavonoids and total saponins simultaneously from fibrous roots of *Ophiopogon japonicus* using response surface methodology. On the basis of single factor experiment, ethanol volume fraction, solid-liquid ratio, extraction time, and extraction times were selected as independent variables, the overall yield of flavonoids and saponins was used as the response value. Four factors and three levels tests were designed to optimize process conditions by the Box-Behnken experiment. Besides, the optimum macroporous resin was screened in the enrichment stage using adsorption and desorption effect as index. The results showed that the optimal extraction condition was ethanol concentration of 86%, solid-liquid ratio of 1:15, extraction time of 1.4 h, and extracted three times. The extraction rate was 26.17%, and the total yield of flavonoids and saponins was 2.41% (The yield of total flavonoids and total saponins was 0.46% and 1.95%, respectively). The D101 resin revealed a good ability to enrich flavonoids and saponins. After enrichment, the recovery rate of total flavonoids and total saponins was 88.69% and 90.28%, the content of total flavonoids and total saponins was 7 times and 9 times higher than the crude extract, respectively. The process was simple and stable. It has important reference value for the development and utilization of the fibrous roots of *O. japonicus* as food resources.

Key words: fibrous roots of *Ophiopogon japonicus*; saponins; flavonoids; extraction; enrichment

川麦冬,又名“绵麦冬”或“涪城麦冬”,为百合

科植物麦冬 (*Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker-Gawl) 的干燥块根,始载于《神农本草经》,列为上品,具有养阴生津,润肺清心的功效。临床多用于治疗肺燥干咳、喉痹咽痛和肠燥便秘等症^[1]。现代研究表明,麦冬主要化学成分为甙体皂苷、黄酮和多糖等,

收稿日期:2020-03-05 接受日期:2020-07-20

基金项目:四川省科技计划重点项目(2018SZ0083);绵阳市科技计划(2018YFZJ024);西南科技大学大学生创新基金项目精准扶贫资助专项(JZ19-062)

*通信作者 Tel:86-018081258966; E-mail:Jh1120@139.com

具有降血糖、保护心血管系统、抗氧化、抗肿瘤等药理作用^[2-5],本课题组在前期研究中还发现麦冬须根的皂苷及黄酮提取组分对小鼠肺部气道损伤具有明显的保护作用^[6]。

目前市售麦冬主产于四川、浙江和江苏等地,其中川麦冬产量最大。中国药典规定麦冬药用部位为块根。采摘加工 1 000 kg 块根会产生 300 kg 须根,后者在加工过程中作为非药用部位被弃用,造成极大的资源浪费^[7]。近年来,很多研究显示,麦冬须根的主要活性成分、安全性与块根相似,其中总皂苷、多糖等含量还明显高于麦冬块根^[8-12]。2019 年 4 月,四川省发布了《麦冬须根食品安全地方标准》^[13],将川麦冬须根正式列为新食品资源,显示出极大的食用开发价值和应用前景。

现有文献报道麦冬的提取工艺^[14,15],而有关川麦冬须根的提取富集工艺尚未见相关报道。本研究以国内麦冬最大的种植基地—四川三台县的川麦冬须根为研究对象,采用响应面法优化总皂苷及总黄酮提取工艺,并进一步通过大孔树脂富集这两类组分,为后续川麦冬须根资源的合理利用和新产品的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

川麦冬须根:2019 年 4 月采集于四川省绵阳市三台县花园镇川麦冬种植基地;鲁斯可皂苷元和芦丁对照品(纯度 $\geq 98\%$,成都曼斯特生物科技有限公司);正丁醇、无水乙醇、高氯酸、氨水、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠(均为分析纯,成都科龙化学有限公司);9 种大孔吸附树脂(D101、AB8、DM301、DA201、H103、HPD100、D3520、HP20 和 H1020,蚌埠市天星树脂有限责任公司);纯水为实验室自制。

1.2 仪器与设备

电子分析天平(Sartorius BP121s,德国 Sartorius 公司);紫外-可见分光光度计(UV-1100 型,中国上海天美科技有限公司);旋转蒸发器(RE-52AA,中国上海亚荣生化仪器厂);离心机(D1008E,美国赛洛捷克有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 总黄酮和总皂苷含量测定

1.3.1.1 总黄酮标准曲线

参考 Xu 等^[16,17]的方法制备芦丁标准曲线。精密量取芦丁对照品溶液(0.2 mg/mL)1、2、3、4、5、6 mL,分别置 25 mL 量瓶中,各加水至 6 mL,加 5%

亚硝酸钠溶液 1 mL,混匀放置 6 min 后,加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,并放置 6 min 后,加氢氧化钠试液 10 mL,再补水至刻度,摇匀放置 15 min,对照空白溶液在 500 nm 波长处测定吸光度。以芦丁标准品浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,得到标准品溶液浓度(X ,mg/mL)与吸光度(Y)的线性回归方程 $Y = 10.116X - 0.0144$ ($R^2 = 0.9999$),结果表明芦丁标准品溶液在 0.0163 ~ 0.0814 mg/mL 内具有良好的线性关系。

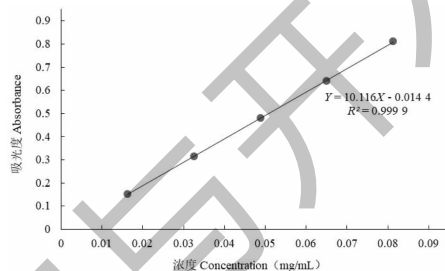


图1 芦丁标准品溶液的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of rutin solution

1.3.1.2 总皂苷标准曲线

参考 2015 版中国药典^[1]麦冬项下方法制作鲁斯可皂苷元标准曲线。精密量取鲁斯可皂苷元对照品溶液(50 $\mu\text{g/mL}$)0.5、1、2、3、4、5 和 6 mL,分别置具塞试管中于水浴下挥干溶剂,加入高氯酸 10 mL,摇匀,置热水中保温 15 min,冷却后对照空白溶液,在 397 nm 波长处测定吸光度。以鲁斯可皂苷元标准品浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,得到标准品溶液浓度(X ,mg/mL)与吸光度(Y)的线性回归方程 $Y = 0.016X - 0.0066$ ($R^2 = 0.9993$),结果表明鲁斯可皂苷元标准品溶液在 2.5 ~ 30 $\mu\text{g/mL}$ 内具有良好的线性关系。

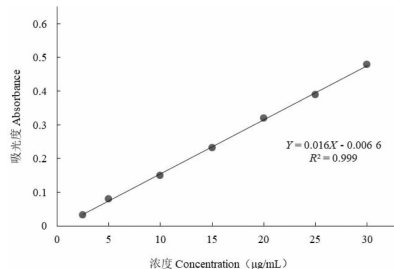


图2 鲁斯可皂苷元标准品溶液的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of ruscogenin standard solution

1.3.2 提取工艺优化

1.3.2.1 浸膏得率及提取率测定

麦冬须根浸膏得率和黄酮(或皂苷)的得率采

用公式(1)、(2)计算:

$$\text{浸膏得率} = \frac{M_1}{M_2} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{黄酮(或皂苷)得率} = \frac{C \times V}{1000 \times M_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中: C 为提取液中黄酮(或皂苷)的浓度,mg/mL; V 为提取液的体积,mL; M_1 为浸膏质量,g; M_2 为麦冬须根样品的质量,g。

1.3.2.2 单因素试验

以黄酮和皂苷总得率为指标,对乙醇浓度、料液比、提取时间和提取次数四个因素进行考察,为后面响应面法优化工艺确定各参数范围。根据前期预实

验结果,在固定其余参数情况下,考察了乙醇浓度:0%、20%、40%、60%、80%和100%;料液比(质量比体积):1:5、1:8、1:10、1:12、1:15和1:20;提取时间:0.5、1、1.5、2和2.5 h;提取次数:1、2、3、4和5次。

1.3.2.3 响应面优化试验

以单因素试验结果为基础,采用 Design Expert V8.0.6.1 软件,以皂苷和黄酮的总得率为响应值,以乙醇浓度、液料比、提取时间和提取次数为因素,进行响应面优化以便筛选最优提取条件。试验设计因素水平见表1。在获得最佳工艺条件后,结合实际应用修正工艺参数并进行三次验证试验。

表1 响应面试验设计因素水平表
Table 1 Factors and levels in the response surface design

水平 Level	因素 Factor			
	A 乙醇浓度 Ethanol volume fraction (%)	B 料液比 Solid-liquid ratio	C 提取时间 Extraction time (h)	D 提取次数 Extraction times
-1	70	1:10	1	1
0	80	1:12	1.5	2
1	90	1:15	2	3

1.3.3 大孔树脂富集

1.3.3.1 树脂筛选

取提取液,加入等体积无水乙醇,涡旋混匀,10 000 rpm 离心 30 min,取上清液旋至无醇味,加水溶解并通过 0.45 μm 滤膜过滤,即为上样液。

分别称取按说明书预处理后的9种大孔树脂各2 g,置于100 mL具塞锥形瓶中,加入30 mL上样液,于恒温摇床(25 $^{\circ}\text{C}$,180 rpm)振荡吸附12 h,取出滤液,测定滤液中黄酮和皂苷的含量,并按照公式(3)计算吸附率。将充分吸附后的9种树脂分别置于100 mL具塞锥形瓶中,各加入30 mL无水乙醇,于恒温摇床(25 $^{\circ}\text{C}$,180 rpm)振荡解析12 h,取出滤液,测定滤液中黄酮和皂苷的含量,并按照公式(4)计算解吸率。

$$\text{吸附率} = \left(\frac{C_0 - C_1}{C_0} \right) \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{解吸率} = \left(\frac{C_2 \times V_2}{V_1 (C_0 - C_1)} \right) \times 100\% \quad (4)$$

式中: C_0 为起始样品液中皂苷(或黄酮)质量浓度,mg/mL; C_1 为吸附12 h后滤液中皂苷(或黄酮)质量浓度,mg/mL; C_2 为解吸液中总皂苷(总黄酮)质量浓度,mg/mL; V_1 为样品液体积,mL; V_2 为解吸

液体积,mL。

1.3.3.2 最优洗脱剂体积分数摸索

取预处理好的大孔树脂10 g,湿法装柱,蒸馏水洗至无色,再分别用10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%和90%的乙醇溶液洗脱,流速为3.0 mL/min,洗脱体积为6个柱床体积(BV),收集洗脱液,测定其总黄酮和总皂苷含量,计算解吸率,筛选最优洗脱剂体积分数。

1.3.3.3 总皂苷和总黄酮的富集

称取预处理好的大孔树脂10、20和50 g,湿法装柱,上样吸附至饱和,蒸馏水洗至无色,再按上述最佳洗脱条件进行洗脱,收集洗脱液测定总黄酮和总皂苷含量,并计算纯度和回收率,验证工艺效果和稳定性。

$$\text{纯度} = \left(\frac{C_2 \times V_2}{M} \right) \times 100\% \quad (5)$$

$$\text{回收率} = \left(\frac{C_2 \times V_2 - C_1 \times V_1}{C_1 \times V_1} \right) \times 100\% \quad (6)$$

式中: C_1 为富集前黄酮(或皂苷)质量浓度,mg/mL; V_1 为富集前溶液体积,mL; C_2 为富集后总黄酮(或总皂苷)质量浓度,mg/mL; V_2 为富集后定容体积,mL; M 为富集后样品质量,g。

1.3.4 数据处理

所有试验均重复三次,采用 Excel 2010、SPSS 20.0 和 Design Expert 8.0.6 软件对数据进行处理及统计分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇浓度对黄酮和皂苷总得率的影响

当乙醇浓度在 0~80% 时,麦冬须根中黄酮和皂苷总得率随乙醇浓度的增大而增加(图 3)。当乙醇浓度继续增加后,总得率反而降低,这可能是因为乙醇浓度过大,会使部分醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分溶出量增加,影响黄酮和皂苷的总提取效率。方差分析结果表明,60% 与 80%、100% 之间没有显著性差异,其余各水平之间均有显著性差异。因此,选择乙醇浓度 70%、80%、90% 为响应面设计的三个水平。

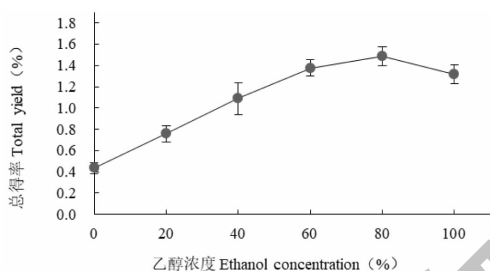


图 3 乙醇浓度对皂苷和黄酮总得率的影响

Fig. 3 Effect of ethanol concentration on the total yield of saponins and flavonoids

注:料液比 1:20;提取 1 h;提取 1 次。Note:Solid-liquid ratio is 1:20;Extraction time is 1 h;Extraction times is one time.

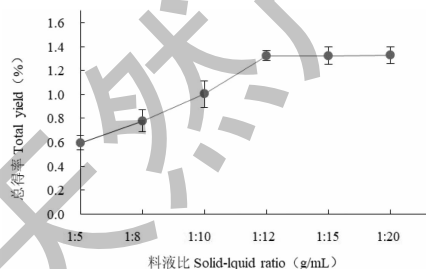


图 4 料液比对皂苷和黄酮总得率的影响

Fig. 4 Effect of solid-liquid ratio on the total yield of saponins and flavonoids

注:乙醇浓度为 100%;提取 1 h;提取 1 次。Note:Ethanol concentration is 100%;Extraction time is 1 h;Extraction times is one time.

2.1.2 料液比对黄酮和皂苷总得率的影响

由图 4 可知,随着溶剂体积的增加,麦冬须根中黄酮和皂苷总得率逐渐升高,当料液比达到 1:12

(g/mL)时,其总得率趋于平衡,再增加溶剂体积,黄酮和皂苷的得率变化不大。方差分析结果表明,料液比 1:12 与 1:15、1:20 之间,1:15 与 1:20 之间没有显著性差异,其余各水平均有显著性差异。因此,选择料液比 1:10、1:12、1:15 (g/mL) 为响应面设计的三个水平。

2.1.3 提取时间对黄酮和皂苷总得率的影响

由图 5 可知,随着热回流时间的增加,黄酮和皂苷总得率呈现先升后降的趋势,当提取时间达到 1.5 h 时,其总得率最高,但随着时间的延长,黄酮和皂苷类物质稳定性变差,会导致得率降低。方差分析结果表明,0.5 h 与 1 h 之间,1.5 h 与 2 h、2.5 h 之间,2 h 与 2.5 h 之间没有显著性差异,其余各水平均有显著性差异。因此,选择热提取时间为 1、1.5、2 h 为响应面设计的三个水平。

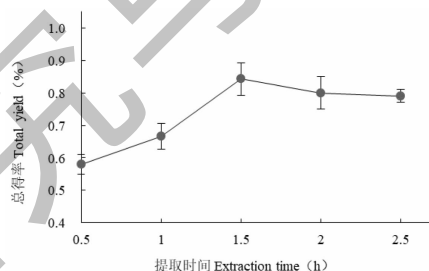


图 5 提取时间对皂苷和黄酮总得率的影响

Fig. 5 Effect of extraction time on the total yield of saponins and flavonoids

注:乙醇浓度为 100%;料液比 1:10;提取 1 次。Note:Ethanol concentration is 100%;Solid-liquid ratio is 1:10;Extraction times is one time.

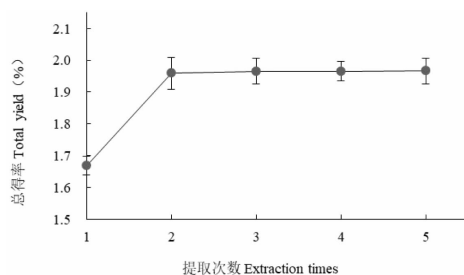


图 6 提取次数对皂苷和黄酮总得率的影响

Fig. 6 Effect of extraction times on the total yield of saponins and flavonoids

注:乙醇浓度为 100%;料液比 1:10;提取 1 h。Note:Ethanol concentration is 100%;Solid-liquid ratio is 1:10;Extraction time is 1 h.

2.1.4 提取次数对黄酮和皂苷总得率的影响

由图 6 可知,随着提取次数的增加,黄酮和皂苷总得率逐渐升高。方差分析结果表明,2、3、4、5 次

之间均没有显著性差异,1次与2、3、4、5次之间均有显著性差异,说明次数为2时,其总得率趋于平衡,再增加提取次数,其总得率没有显著性增加。因此,选择提取次数1、2、3次为响应面设计的三个水平。

2.2 麦冬须根总黄酮和总皂苷提取工艺优化

表2 响应面试验设计方案与试验结果

Table 2 Matrix and experiments results of response surface methodology

编号 No.	A	B	C	D	得率 Yield(%)		总得率 Total yield(%)
					总皂苷 Saponins	总黄酮 Flavonoids	
1	0	0	1	-1	1.450	0.400	1.850
2	1	0	1	0	1.647	0.423	2.070
3	0	1	0	-1	1.543	0.413	1.956
4	0	0	-1	1	1.709	0.502	2.211
5	1	0	0	-1	1.403	0.444	1.847
6	0	-1	-1	0	1.520	0.401	1.921
7	1	0	-1	0	1.413	0.441	1.854
8	1	0	0	1	1.672	0.494	2.166
9	0	0	0	0	1.751	0.383	2.134
10	0	0	0	0	1.714	0.444	2.158
11	0	-1	1	0	1.638	0.420	2.058
12	0	1	-1	0	1.820	0.425	2.245
13	1	-1	0	0	1.532	0.421	1.953
14	0	-1	0	-1	1.440	0.391	1.831
15	1	1	0	0	1.705	0.466	2.171
16	0	0	0	0	1.762	0.457	2.219
17	0	1	0	1	1.901	0.369	2.270
18	0	-1	0	1	1.788	0.460	2.248
19	-1	0	0	-1	1.310	0.447	1.757
20	0	0	0	0	1.733	0.422	2.155
21	0	0	0	0	1.714	0.437	2.151
22	0	0	1	1	1.896	0.374	2.270
23	-1	0	1	0	1.415	0.395	1.810
24	0	1	1	0	1.582	0.520	2.102
25	-1	-1	0	0	1.453	0.349	1.802
26	-1	0	0	1	1.309	0.500	1.809
27	0	0	-1	-1	1.603	0.228	1.831
28	-1	0	-1	0	1.316	0.460	1.776
29	-1	1	0	0	1.333	0.480	1.813

利用 Design-Expert V8.0.6.1 软件对表2中数

据进行二次多元回归拟合,得到总得率 Y 与 A 、 B 、

C 、 D 二次多项式回归方程为 $Y = 2.18 + 0.12A + 0.062B + 0.017C + 0.16D + 0.054AB + 0.045AC + 0.067AD - 0.074BC - 0.020BD + 0.01CD - 0.21A^2 - 0.033B^2 - 0.066C^2 - 0.060D^2$ 。

对表 2 中的试验结果进行统计分析,所得方差分析结果见表 3。结果表明,该模型极显著 ($P < 0.01$),其中 $R^2 = 0.9485$,表明模型响应值变化的 94.85% 来自考察的变量。回归方程失拟项 $F = 4.05$, $P = 0.0951 > 0.05$,失拟项不显著,说明该方

程对试验拟合情况好,误差小,表明应用响应面法优化麦冬须根中总皂苷和总黄酮的提取工艺是可行的。由 F 值可知,各因素对皂苷和黄酮总得率影响大小顺序为提取次数 (D) > 乙醇浓度 (A) > 液料比 (B) > 提取时间 (C),且一次项 A 、 B 、 D 对总含量的影响极显著, C 影响不显著;二次项中 A^2 对总含量影响极显著, C^2 、 D^2 影响显著,其余不显著;交互项中 AD 、 BC 对总含量影响显著,其余不显著。

表 3 模型方差分析结果

Table 3 ANOVA for response surface model

方差来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
模型 Model	0.86	14	0.062	18.43	<0.000 1	**
A	0.15	1	0.15	45.19	<0.000 1	**
B	0.046	1	0.046	13.80	0.002 3	**
C	0.003 3	1	0.003 3	0.99	0.337 3	
D	0.28	1	0.28	82.84	<0.000 1	**
AB	0.01	1	0.012	3.61	0.078 3	
AC	0.008 3	1	0.008 3	2.48	0.137 8	
AD	0.018	1	0.018	5.33	0.036 7	*
BC	0.022	1	0.022	6.67	0.021 7	*
BD	0.001 7	1	0.001 7	0.51	0.487 2	
CD	0.000 4	1	0.000 4	0.12	0.734 5	
A^2	0.29	1	0.29	87.57	<0.000 1	**
B^2	0.006 5	1	0.006 5	1.95	0.184 1	
C^2	0.028	1	0.028	8.50	0.011 3	*
D^2	0.023	1	0.023	7.02	0.0190	*
残差 Residual	0.047	14	0.003 3			
失拟值 Lack of fit	0.043	10	0.004 3	4.05	0.0951	
纯误差 Pure error	0.004 2	4	0.001 1			
总误差 Cor total	0.91	28				

注: $R^2 = 0.9485$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

2.2.2 响应面各因素交互作用分析

通过 Design-Expert V8.0.6.1 软件处理,得到两因素间的交互作用响应面分析图,见图 7~12。响应面坡度越陡峭,说明响应值对于该因素的改变越敏感,而曲面坡度越平滑,该因素对响应值的影响也就越小。图 7、8、11、12 曲面较平滑,说明该两因素之间交互作用影响不显著。图 9 和图 10 的响应面坡度陡峭,说明该两因素之间交互作用影响显著,该结果与表 3 分析结果一致。

2.3 最佳提取工艺条件的验证试验

由试验和分析数据预测,热回流提取麦冬须根中总皂苷和总黄酮最佳条件为:乙醇浓度为 85.372%,料液比 1:15,提取 1.4 h,提取 3 次,此条件下皂苷和黄酮总含量 2.35%。这里需要注意一个问题,3 次提取次数与单因素实验结果(2 次)不一致,这主要是因为单因素实验限定了其它参数范围,没有考虑相互作用。实验最终结果 2.35% 也高于单因素实验的最高结果 2.27%,说明响应面优化更有效。

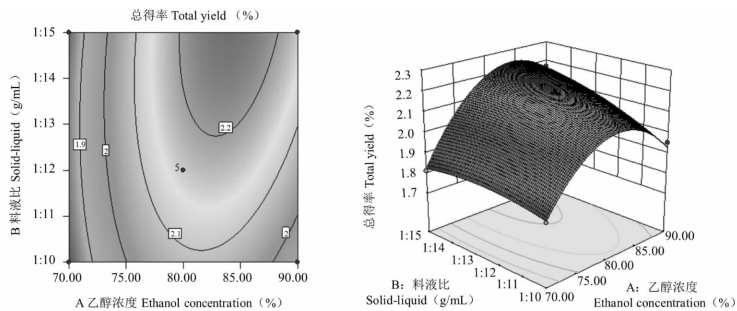


图 7 乙醇浓度(A)和料液比(B)对麦冬须根中黄酮和皂苷总得率影响的等高线和响应面图

Fig. 7 Contour map and response surface plots showing the mutual effects of different ethanol concentration (A) and solid-liquid ratio (B) on the total yield of saponins and flavonoids

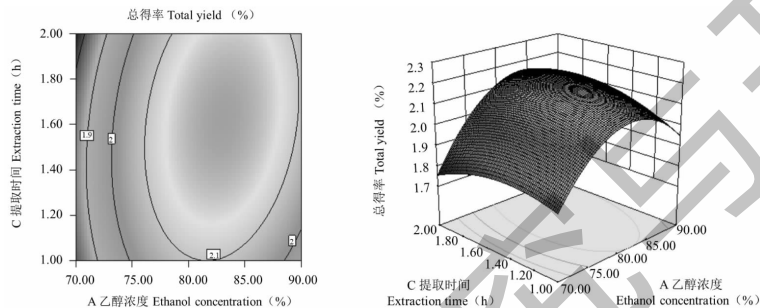


图 8 乙醇浓度(A)和提取时间(C)对麦冬须根中黄酮和皂苷总得率影响的等高线和响应面图

Fig. 8 Contour map and response surface plot showing the mutual effects of different ethanol concentration (A) and extraction time (C) on the total yield of saponins and flavonoids

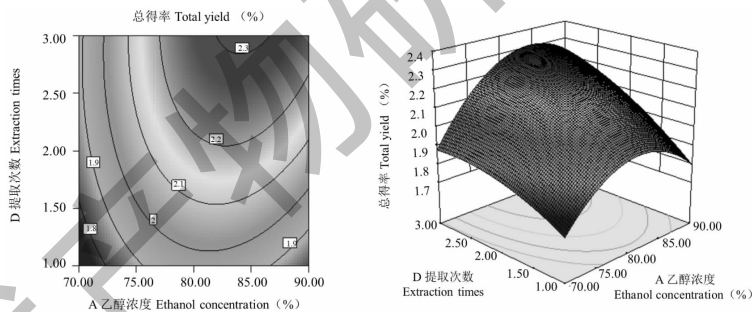


图 9 乙醇浓度(A)和提取次数(D)对麦冬须根中黄酮和皂苷总得率影响的等高线和响应面图

Fig. 9 Contour map and response surface plots showing the mutual effects of different ethanol concentration (A) and extraction times (D) on the total yield of saponins and flavonoids

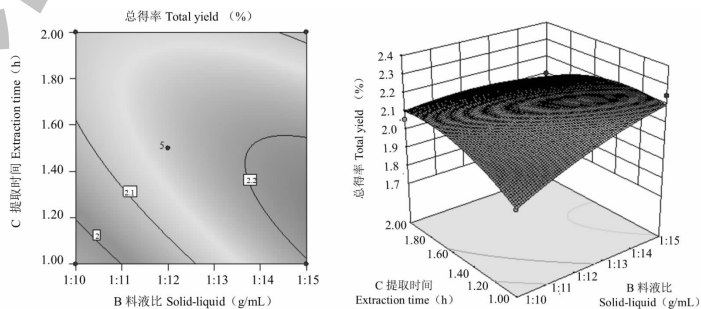


图 10 料液比(B)和提取时间(C)对麦冬须根中黄酮和皂苷总得率影响的等高线和响应面图

Fig. 10 Contour map and response surface plots showing the mutual effects of different solid-liquid ratio (B) and extraction time (C) on the total yield of saponins and flavonoids

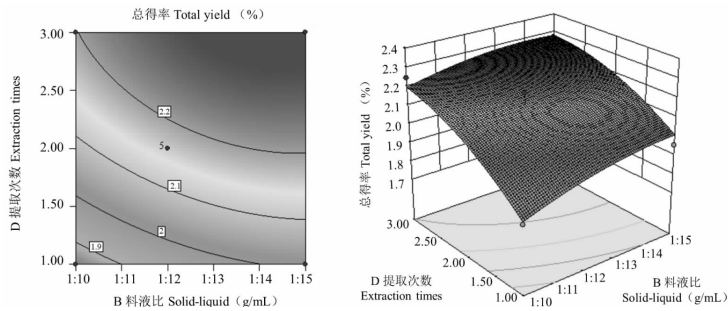


图 11 料液比 (B) 和提取次数 (D) 对麦冬须根中黄酮和皂苷总得率影响的等高线和响应面图
Fig. 11 Contour map and response surface plots showing the mutual effects of different solid-liquid ratio (B) and extraction times (D) on the total yield of saponins and flavonoids

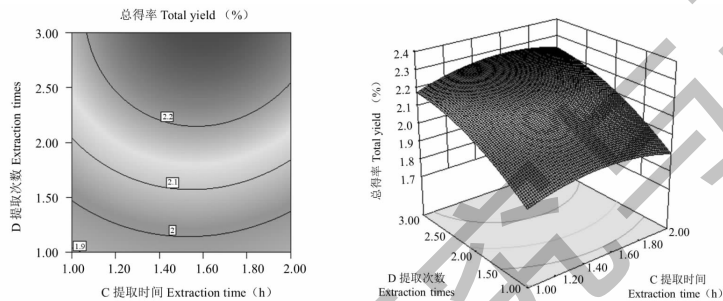


图 12 提取时间 (C) 和提取次数 (D) 对麦冬须根中黄酮和皂苷总含量提取的影响
Fig. 12 Contour map and response surface plots showing the mutual effects of different extraction time (B) and extraction times (D) on the total yield of saponins and flavonoids

按照优化工艺条件,结合实际情况,将热回流最佳参数修正为:乙醇浓度为 86%、料液比 1:15、提取 1.4 h、提取 3 次,实验结果见表 4。浸膏得率为 26.17%,总黄酮和总皂苷平均得率分别为 0.46%

和 1.95%,总得率为 2.41%,相对标准偏差为 1.90%,与理论预测值 2.35% 的偏差为 2.60%,小于 5%,说明建立的模型预测性良好,优选的工艺稳定可行。

表 4 验证试验结果

Table 4 Results of verification tests

序号 No.	浸膏得率 Yield of extract (%)	平均值 Average value (%)	黄酮 Flavonoid (%)	皂苷 Saponin (%)	总得率 Total yield (%)	平均值 Average value (%)	相对标准偏差 RSD (%)
1	27.11		0.47	1.98	2.45		
2	25.25	26.17	0.45	1.91	2.36	2.41	1.90
3	26.15		0.47	1.95	2.42		

2.4 大孔吸附树脂的筛选

对 9 种树脂进行静态吸附和解吸试验结果见表 5。在吸附率上,D101、AB-8 和 H103 排名前三,这三种树脂对黄酮和皂苷均表现很好的吸附效果;而在洗脱过程中,D101 型树脂对黄酮和皂苷均表现出很好的解吸效果。综合吸附率与解吸率两项指标,本研究选用 D101 大孔树脂富集纯化麦冬须根中的黄酮和皂苷。

2.5 大孔树脂富集结果

2.5.1 洗脱剂浓度

图 13 所示,随着乙醇体积分数的增加,D101 大孔树脂对黄酮和皂苷解吸率逐渐增加,当乙醇体积分数达到 70% 时,解吸率达到最高。继续增加乙醇体积分数,解吸率趋于平衡。由于洗脱剂对黄酮和皂苷类化合物的解吸效果基本具有一致性,所以不易通过分段洗脱分别收集总皂苷和总黄酮部分,故

表5 9种大孔吸附树脂静态吸附和解吸率

Table 5 Static adsorption and desorption rate of nine kinds of macroporous resins

树脂型号 Resin type	极性 Polarity	比表面积 Specific surface area (m ² /g)	黄酮 Flavonoid		皂苷 Saponin	
			吸附率 Adsorption rate (%)	解吸率 Desorption rate (%)	吸附率 Adsorption rate (%)	解吸率 Desorption rate (%)
D101	非极性 Nonpolar	500 ~ 600	74.51	84.27	79.08	78.2
AB-8	弱极性 Weak polarity	480 ~ 520	72.68	84.54	79.86	61.5
DM301	中极性 Medium polarity	330 ~ 380	70.01	81.12	68.68	68.41
DA201	非极性 Nonpolar	450 ~ 500	69.29	82.21	73.34	47.71
H103	非极性 Nonpolar	900 ~ 1100	74.75	74.28	77.64	62.26
HPD100	非极性 Nonpolar	500 ~ 550	71.84	75.24	65.45	69.8
D3520	非极性 Nonpolar	480 ~ 520	70.39	85.83	50.33	69.21
HP20	非极性 Nonpolar	550 ~ 600	67.84	78.61	63.44	46.89
H1020	非极性 Nonpolar	700 ~ 1 000	70.02	80.02	56.66	45.45

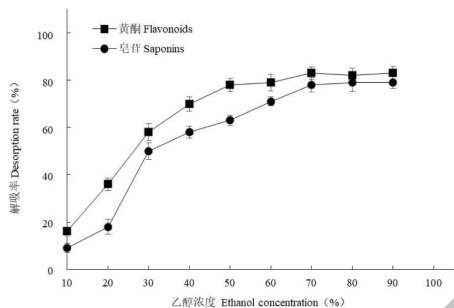


图13 洗脱剂浓度对解吸率的影响

Fig. 13 Effect of eluent concentration on desorption ratio

选取最优洗脱剂乙醇体积分数为70%。

2.5.2 富集工艺放大验证

选取 D101 大孔树脂,湿法装柱,蒸馏水洗至无色,再以70%乙醇溶液洗脱,流速为2.0 mL/min,洗脱体积5 BV。结果表明,经过不同树脂量的大孔树脂柱富集后,黄酮和皂苷纯度达到12.18%和45.74%,相对于提取液(黄酮纯度1.77%,皂苷纯度4.85%)分别提高了约7倍和9倍,回收率也分别达到了88.69%和90.28%,说明D101富集结果稳定可行。

表6 富集工艺试验结果

Table 6 Results of enrichment process test

序号 No.	树脂量 Resin quality (g)	总黄酮 Flavonoids		总皂苷 Saponins	
		纯度 Purity (%)	回收率 Recovery rate (%)	纯度 Purity (%)	回收率 Recovery rate (%)
1	10	12.14	89.12	46.25	91.07
2	20	12.27	88.45	45.97	90.34
3	50	12.13	88.49	44.99	89.44
平均值 Average value		12.18	88.69	45.74	90.28

3 结论与讨论

Yin 等^[18]、Chen 等^[19]报道了麦冬块根中总黄酮提取率为0.13%和0.23%,Li 等^[14]报道总皂苷提取率为0.23%,这些文献仅考察了单一组分的提取,并没有考察同时提取黄酮和皂苷,目前也无文献报道川麦冬须根中这两种组分的提取工艺。本实验首次对川麦冬须根的总黄酮和总皂苷提取工艺进行研究,在单因素试验基础上,采用响应面法对麦冬须

根中总黄酮和总皂苷的提取工艺进行了优化,确定最佳提取工艺条件为:乙醇体积分数86%、料液比1:15、提取1.4 h、提取3次。在此条件下,总黄酮得率0.46%,总皂苷得率1.95%,结果均优于上述文献。

大孔树脂对活性成分的富集和分离有较好的效果,可同时针对不同类型化合物的分离^[20]。本试验中的总黄酮和总皂苷具有洗脱一致性而不易分开,该结果在一些文献中也有报道^[21],这可能与大孔树

脂品种及样品差异有很大关系。本试验通过比较9种不同型号大孔树脂对麦冬须根黄酮和皂苷的静态吸附和解析性能,选择D101大孔树脂作为富集树脂,洗脱剂为70%乙醇、洗脱流速为2 mL/min、洗脱剂用量5 BV。富集后总黄酮和总皂苷回收率达到88.69%和90.28%,纯度相比浸膏分别提升7倍和9倍。利用这套参数,实验组在后续的30 kg级别的中试上也取得了相似的结果,显示该工艺对川麦冬须根中最具价值的黄酮和皂苷类有效组分的提取富集效果,操作简单且稳定性好,适用于产业化生产,对于川麦冬须根这一新食品资源的开发利用提供了重要的有效途径。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing:China Medical Science Press,2015:155
- Peng W, Ma X, Wang J, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Ophiopogon japonicus*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2018,49:477-488.
- Jiang HB, Huang J, Huang L, et al. A new homoisoflavonoid from *Ophiopogon japonicus*[J]. West China J Pharm Sci(华西药理学杂志),2012,27:501-502.
- Zhou Y F, Jin Q, Zhu D, et al. Homoisoflavonoids from *Ophiopogon japonicus* and its oxygen free radicals (OFRs) scavenging effects[J]. Chin J Nat Med,2008,6:201-204.
- Zhou C X, Zou L, Mo J X, et al. Homoisoflavonoids from *Ophiopogon japonicus*[J]. Helv Chim Acta,2013,96:1397-1405.
- Xiang XX, Jin H, He L, et al. Protective effect and mechanism of extracts from fibrous root of sichuan *Ophiopogon japonicus* on tobacco smoke induced airway injury mice[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床),2018,34(6):98-102.
- Zou GY. Comprehensive development and utilization from fibrous roots of *Ophiopogon japonicus*[J]. Food Sci(食品科学),1992(2):33-36.
- Huang TJ, Jin H. Comparative study on the constituents of roots and rootlets of *Ophiopogon japonicus*[J]. Chin Pharmacol J(中国药理学杂志),1990,25(1):11-13.
- Ma SJ, Bie JM, Jin H. Determination of polysaccharides and flavonoids in *Ophiopogon japonicus* and its fibrous root[J]. J Southwest Univ Sci Tech(西南科技大学学报),2001,23(1):83-85.
- He L, Jin H, Liang XL, et al. Determination of ophiopogonin D in the tuber root and fibrous root of *Ophiopogon japonicus* by HPLC[J]. West China J Pharm Sci(华西药理学杂志),2014,29:583-584.
- Jin H, Wang HD, He L, et al. Comparison on histology of root tubers and fibrous roots of *Ophiopogon japonicus* and ophiopogonins content[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2014,52(7):106.
- Wu F, Huang SW, Luo LM, et al. Comparison of main compositions in tuberous and fibrous roots of *Ophiopogon japonicus*[J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报),2016,24:215-222.
- DBS51/007-2019. Local Food safety standards fibrous roots of *Ophiopogon japonicus*[S].
- Li Y, Zhu ZJ, Li YL, et al. Extraction process optimization of ophiopogon based on multi-index weight analysis and uniform design[J]. China Pharm(中国药师),2019,22(1):48-51.
- Lin YH, Li CM, Li XB, et al. Study on extraction and purification technology of Hubei ophiopogon saponins[J]. J Chin Med Mater(中药材),2014,36:803-806.
- Xu HB, Li B, Tang ZS, et al. Optimization of extraction of total flavonoids from *Hovenia acerba* and its xanthine oxidase inhibitory activity[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31:595-600.
- Zhu MM, Gao TY, Xu ZZ, et al. Isolation, purification and antioxidant-activity-determination in vitro of flavonoids from *Thlaspi arvense* Linn seeds[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,40:75-79.
- Yin L, Zhang JH, Peng Y, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from ophiopogonis radix by central composite design-response surface methodology[J]. Pharma Clin Chin Mater Med(中药与临床),2012,3(4):20-23.
- Chen JZ, Lyu GY, Ye L, et al. Study on microwave-assisted extraction technique of flavonoid from *Ophiopogon japonicus*[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志),2009,24:216-218.
- Wang ZP, Cui YH, Yang K, et al. Study on purification of kudzu flavonoids and saponins with macroporous resin[J]. J Chin Med Mater(中药材),2013,3(4):47-50.
- Zhang J, Zhang XQ, Li CF, et al. Purification process of total ginsenoside from *Panax ginseng* and total flavonoid from *Pueraria omeiensis* in Shuangshengen Capsules[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志),2017,37:587-589.