

垂柳叶黄酮的微波提取工艺

刘可越¹,周斌²,刘海军¹ (1.九江学院医学院,江西九江 332000;2.江西科技师范学院,江西南昌 330013)

摘要 [目的]研究利用微波提取技术提取垂柳叶中总黄酮的方法,测定不同时期垂柳总黄酮含量,以确定垂柳的最佳采收期。[方法]采用正交试验,考察微波功率、提取溶剂浓度、提取时间对总黄酮含量的影响,确定微波萃取垂柳总黄酮的最佳工艺条件,并与超声波提取法、索氏提取法进行比较。[结果]微波萃取的最佳条件为:以70%乙醇为溶剂,微波功率2000 W,提取40 min。微波萃取40 min与索氏提取8 h、超声波提取2 h得率相当。[结论]微波萃取具有快速、高效、节能、选择性好的特点。

关键词 垂柳; 总黄酮; 微波萃取

中图分类号 O658.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)31-09813-01

Studies on the Extraction Technology and Determination of Total Flavonoids in *Salix babylonica* L.

LIU Ke-yue et al (Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000)

Abstract [Objective]Microwave-heated extraction (MHE) method was studied for the extraction of total flavonoids from *Salix babylonica* L. The contents of total flavonoids was determined in different time to select the optimal ingathering time. [Methods]Several factors, such as solvent, time and microwave power were investigated and the appropriate MHE conditions were obtained from the orthogonal test. The MHE method was compared with ultrasonic extraction methods, and soxhlet extraction. [Results]The optimum conditions of MHE is extracting for 40 minutes in 70% EtOH aqueous by microwave of 2000 W. The yield of total flavonoids was almost equal to that of Soxhlet extraction for 8 hr, and that of ultrasonic extraction for 2 hr. [Conclusion]The MHE method is a fast, efficient, energy saving and high-selective method, which is recommendable to the application to flavonoids extraction from *Salix babylonica* L.

Key words *Salix babylonica* L.; Total flavonoids; Microwave extraction

垂柳(*Salix babylonica* L.)为杨柳科柳属植物。《中药大辞典》将垂柳的叶、枝和絮收载为常用中药^[1]。据报道,垂柳中含有丰富的黄酮类化合物^[2]。黄酮类化合物的生理活性多样,如生物抗氧化性、抗衰老、治疗心脑血管疾病、降血脂、抗血栓、抗动脉硬化等^[3-4]。张晶等对48种中药进行抗血栓、抗动脉硬化活性的筛选,发现柳叶活性最强。这种活性可能与其中的黄酮类化合物有关^[5-6]。我国垂柳资源丰富,全国各地均有栽培,而它的药用价值尚未得到合理的开发利用。为了综合开发利用垂柳资源和深入研究垂柳黄酮,笔者运用正交设计方法建立了微波提取垂柳总黄酮的最佳工艺条件,并与超声波提取法、索氏提取法进行了比较研究。

1 材料与方法

1.1 材料 垂柳叶片,由吉林农业大学中药材学院刘霞教授鉴定;芦丁标准品由卫生部生物制品检定所提供。

1.2 方法

1.2.1 供试液的制备。称取垂柳干燥叶片50 g,加提取溶剂300 ml,设定提取功率和时间,取适量提取液过滤即得。

1.2.2 标准曲线的绘制。精密称取芦丁标准品5 mg,加30%乙醇于50 ml量瓶中稀释至刻度,再分别精密吸取标准液0.05、1.0、2.0、3.0、4.0 ml于刻度试管中,加30%乙醇稀释至5.0 ml后加入5% NaNO₂ 0.3 ml,放置6 min,继续加入10% Al(NO₃)₃ 0.3 ml,放置6 min,然后加入1 mol/L NaOH 4.0 ml,30℃水浴稳定10 min。采用比色法,用分光光度计于510 nm处测定吸光度。以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

$$A = 1.06C + 0.0018 \quad (R^2 = 0.9998)$$

式中,A为吸光度,C为对照品浓度。

1.2.3 垂柳叶总黄酮含量的测定。离心提取液,洗涤沉淀3次合并洗涤液,分离上清液并稀释至50 ml,从中吸取3.0 ml稀释至20.0 ml。吸取5.0 ml,按“1.2.2”项下操作,测定总黄酮含量。

作者简介 刘可越(1978-),女,吉林梨树人,博士,副教授,从事天然产物活性成分研究与开发。

收稿日期 2007-06-06

2 结果与分析

2.1 试验设计及结果 选择影响垂柳黄酮得率的主要因素,即微波功率、溶剂浓度、提取时间。确定不同的水平,以乙醇为提取溶剂,以垂柳总黄酮含量为指标,采用L₉(3⁴)正交试验方案(表1)。表2表明,各因素的主次顺序为B>A>C。方差分析结果表明,A和B因素的影响具有显著性意义,因此确定A₃B₃C₂为最佳工艺条件。

表1 因素水平

水平	微波功率(A) W	乙醇浓度(B) %	时间(C) min
1	667	30	30
2	1 333	50	40
3	2 000	70	50

表2 L₉(3⁴)正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	总黄酮含量//%
1	1	1	1	3.89
2	1	2	2	4.50
3	1	3	3	5.10
4	2	1	2	3.96
5	2	2	3	4.96
6	2	3	1	5.53
7	3	1	3	4.32
8	3	2	1	5.01
9	3	3	2	6.01
K ₁	4.501	4.059	4.812	
K ₂	4.820	4.826	4.835	
K ₃	5.116	5.551	4.819	
R	0.615	1.492	0.106	

2.2 验证试验 称取药材按A₃B₃C₂进行验证试验,结果与正交试验的结果相吻合,证明该工艺可行。

2.3 不同提取方法的比较 以70%乙醇为提取剂,微波萃取、超声波辅助提取和索氏提取的垂柳总黄酮含量分别为5.45%、5.52%、5.67%。研究表明,微波提取40 min、索氏提取8 h和超声波提取2 h得率相当。

3 小结与讨论

近年来,微波提取技术广泛应用于从植物中提取天然有效成分。该技术简便快速,可缩短试验和生产时间,降低能耗,节省溶剂^[7]。微波提取利用不同结构的物质吸收微

(下转第9823页)

的抑制率分别为 64.5%、54.5%、21.7%、4.3% 和 1.0%。

表 1 短短小芽孢杆菌 TW-2 对稻瘟病菌菌丝生长抑菌率

药剂	稀释倍数	药剂浓度 mg/L	菌落直径 mm	平均抑菌率 %
1.80 × 10 ¹⁰ CFU/g 生防菌 TW-2	1 000	100.0	7.000	90.2
	5 000	20.0	13.125	78.2
	10 000	10.0	31.875	46.8
	50 000	2.0	38.750	35.3
	100 000	1.0	47.125	21.5
3.00 × 10 ¹⁰ CFU/g 蜡质芽孢杆菌	5 000	200.0	21.250	64.5
	5 000	100.0	27.250	54.5
	10 000	20.0	47.000	21.7
	50 000	10.0	57.380	4.3
	100 000	2.0	59.375	1.0
CK(无菌水)			60.000	0.0

表 2 结果表明,生防菌 TW-2 对水稻稻瘟病菌的 EC₅₀ 值为 6.100 8 mg/L,95% 置信限为 0.280 1~20.349 1 mg/L,对照药剂蜡质芽孢杆菌的 EC₅₀ 值为 92.683 5 mg/L,95% 置信限为 65.851 6~129.748 3 mg/L,两种药剂 EC₅₀ 值的 95% 置信限不重叠,说明药剂间差异显著。生防菌 TW-2 对水稻稻瘟病菌的相对毒力指数为 15.2,其对稻瘟病菌的活性远远高于对照药剂蜡质芽孢杆菌。

表 2 生防菌 TW-2 对稻瘟病菌室内抑菌活性

药剂	毒力回归方程 $Y =$ mg/L	EC ₅₀ 值 6.100 8	95% 置信限 0.280 1~20.349 1	r ² 0.963 5	相对毒力指数 15.2
生防菌 TW-2	6.230 8 + 1.013 3 X	6.100 8	0.280 1~20.349 1	0.963 5	15.2
蜡质芽孢杆菌	5.044 5 + 1.348 7 X	92.683 5	65.851 6~129.748 3	0.943 2	1.0

2.2 生防菌 TW-2 对稻瘟病的田间防治

2.2.1 小区试验结果。1.25 × 10¹⁴ CFU/ml 生防菌 TW-2 发酵菌液稀释 10、50、100 和 200 倍后对水稻穗颈瘟的病株率防效分别为 89.33%、95.00%、96.68%、66.99%,对照药剂 75% 三环唑 WP 600 g/hm² 对穗颈瘟的病株率防效为 94.40%;1.25 × 10¹⁴ CFU/ml 生防菌 TW-2 发酵菌液稀释 10、50、100 和 200 倍后对水稻穗颈瘟的病株率防效分别为 86.94%、92.38%、93.96%、55.48%,对照药剂 75% 三环唑 WP 600 g/hm² 对穗颈瘟的病指防效为 90.57%。1.25 × 10¹⁴ CFU/ml 生防菌 TW-2 菌液稀释 10、50 和 100 倍对穗颈瘟的防效优异,防病效果都在 85% 以上,和对照药剂 75% 三环唑

(上接第 9813 页)

波能力不同,从而使基体物质的某些区域或萃取体系中的某些组分被选择性的加热,因而可使目标组份选择性的从基体或体系中分离出来^[8]。试验表明,以总黄酮含量为指标,A₃B₂C₂ 为最优组合。因此,垂柳叶总黄酮的最佳提取工艺为:以 70% 乙醇为溶剂,采用微波提取法,2 000 W 功率提取 40 min。在其他条件一致的情况下,微波提取 40 min 时,总黄酮的得率与索氏提取 8 h、超声提取 2 h 相当,说明微波提取具有快速、节能的优势,值得推广应用。

参考文献

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986:

WP 600 g/hm² 处理对穗颈瘟的防效没有显著差异(表 3)。

表 3 生防菌 TW-2 水稻穗颈瘟的防效 2005.10

药剂	稀释倍数或 用量 // g/hm ²	病指 %	防效 %	病株率 %	防效 %
1.25 × 10 ¹⁴ CFU/ml 生防菌 TW-2	10	2.22	89.33 a	2.81	86.94 a
50	1.04	95.00 a	1.64	92.38 a	
发酵母液	100	0.69	96.68 a	1.31	93.96 a
	200	6.87	66.99 b	9.58	55.48 b
75% 三环唑 WP	600	1.13	94.40 a	2.03	90.57 a
清水对照		20.81		21.25	

2.2.2 生防菌 TW-2 不同制剂对稻瘟病的防效。生防菌 TW-2 所有剂型对水稻穗颈瘟都有较好的防效,用生防菌 TW-2 的不同制剂 TW-2-1、TW-2-3 和 TW-2-5 处理后的防效均在 80% 以上,防效优良,75% 三环唑 WP 600 g/hm² 对穗颈瘟的防治效果为 90.00%(表 4)。

表 4 生防菌 TW-2 对水稻穗颈瘟防效 2006.10

示范地点	制剂及用量	品种	示范面积 平均病穗率 // %		
			hm ²	%	%
句容	TW-2-1 7 500 ml/hm ²	武运梗 13 号	4.73	0.10	97.70
后白镇	TW-2-3 1 500 ml/hm ²	武运梗 13 号	2.33	0.64	85.00
	75% 三环唑 WP 600 g/hm ²	武运梗 13 号	3.67	0.43	90.00
	清水对照	武运梗 13 号	0.20	4.28	
句容	TW-2-5 750 ml/hm ²	武运梗 7 号	1.27	1.00	83.90
二圣镇	清水对照	武运梗 7 号	0.20	6.20	

3 结论

(1) 生防菌 TW-2 对水稻稻瘟病病菌的菌丝生长具有较强的抑制效果,1.80 × 10¹⁰ CFU/g TW-2 可湿粉用无菌水稀释成 1 000 倍抑菌率达到 90.2%,与蜡质芽孢杆菌的相对毒力达 15.2。

(2) 生防菌 TW-2 对水稻穗颈瘟具有良好的防效,防治效果在 80% 以上,是水稻穗期用来防治稻瘟病的优良生防药剂。生防菌 TW-2 对水稻叶瘟的防治效果还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王巧兰,郭刚. 水稻稻瘟病生物防治研究进展 [J]. 河南农业科学, 2005 (10): 10~31.
- [2] 穆常青,潘玮,陆庆光,等. 枯草芽孢杆菌对稻瘟病的防治效果评价及机制初探 [J]. 中国生物防治, 2006(2): 158~160.
- [3] 彭化贤,刘波微,陈小娟,等. 水稻稻瘟病拮抗细菌的筛选与防治初探 [J]. 中国生物防治, 2002(1): 25~27.
- 1522.
- [2] THAPLIYAL R P, ISMALLI H. Fatty acids and flavonoids of salix linleyana [J]. Pharmacol, 1993, 31(2): 165~166.
- [3] 许腊英,毛维伦,江向东,等. 荷叶降血脂开发研究 [J]. 湖北中医杂志, 1996, 18(4): 42~43.
- [4] 彭芳. 黄酮类化合物的生物学作用 [J]. 大连医学院学报, 1998, 7(4): 52~54.
- [5] 张晶,郑毅男,韩立坤. 旱柳叶中抗血栓,抗动脉硬化活性成分的研究 [J]. 中药材, 1999, 22(3): 131~133.
- [6] 张晶,郑毅男,韩立坤. 旱柳叶的化学成分及其药理活性的研究 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(9): 536~541.
- [7] CHEN M, YUAN D X, XU P X, et al. Research progress on microwave extraction [J]. J Instrum Anal, 1999, 18(2): 82~86.
- [8] 刘川生,王平,王立飞,等. 微波萃取技术在天然药物提取中的研究进展 [J]. 中国天然药物, 2003, 1(3): 190~192.