

· 中药工业 ·

超声联合酶法提取玫瑰花总黄酮工艺条件优化

何效平, 王柏强*, 曾芝兰, 罗飞, 罗巧林

川北医学院附属医院 药剂科, 四川 南充 637000

[摘要] 目的: 探索超声联合酶法提取玫瑰花总黄酮的最佳工艺条件。方法: 以总黄酮提取率作为评价指标, 分别考察酶解温度、酶质量分数、固液比、乙醇浓度、超声提取时间及超声提取温度对提取效果的影响。在单因素考察的基础上, 采用正交试验设计优化提取工艺条件。结果: 优化得到的工艺参数为固液比 1:25, 酶解温度 50 ℃, 酶质量分数 0.4%, 超声时间 30 min。结论: 优选的工艺合理、可行, 具有提取率高、节能等优点, 可为工业化生产提供参考。

[关键词] 玫瑰花; 超声波; 纤维素酶; 总黄酮

[中图分类号] R284.2; R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)01-0099-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20171017001

Optimization on Extraction Technology of Flavonoids from *Rosa rugosa* by Ultrasound Combined with Cellulose Enzyme

HE Xiao-ping, WANG Bai-qiang*, ZENG Zhi-lan, LUO Fei, LUO Qiao-lin

Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China

[Abstract] **Objective:** The extraction process of flavonoids in *Rosa rugosa* by ultrasound combined with cellulose enzyme was optimized. **Methods:** The extraction rate of flavonoids was used as index. Based on the effects of some factors such as enzymatic temperature, enzyme mass concentration, ratio to solid, the concentration of ethanol, ultrasonic time and ultrasonic temperature, orthogonal design was applied to decide the best extraction process. **Results:** The optimal extraction technology was as follows: ratio to solid was 1:25, enzymatic temperature was 50 ℃, enzyme mass concentration was 0.4%, ultrasonic time was 30 min. **Conclusion:** The optimized process is reasonable and feasible, which can enhance extract-efficiency and is energy-saving. It provides reference for industrial production.

[Keywords] *Rosa rugosa*; ultrasound; cellulose enzyme; flavonoids

玫瑰花为蔷薇科蔷薇属多年生灌木玫瑰的干燥花蕾, 是一种药食同源的花卉, 具有良好的食用价值与保健功能。玫瑰花中含有多种生物活性物质, 黄酮类化合物就是其中之一。黄酮类化合物具有抗氧化、抗菌、降糖、抗病毒、抗抑郁等生物活性。国内对玫瑰花总黄酮的提取进行了大量研究, 常见提取方法主要有水提取法、有机溶剂提取法、超声波提取法、微波提取法等^[1-4]。但国内采用超声波联合纤维素酶提取玫瑰花总黄酮的研究尚未见报道, 本文以总黄酮提取率作为评价指标, 采用超声波联合纤维素酶提取玫瑰花总黄酮, 在单因素考察的基础上, 采用正交试验设计优化提取工艺条件, 为进一步开发玫瑰深加工产品提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

760CRT 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); PHS-SB 型 pH 计(成都瑞驰分析控制仪器有限公司); TP-114 电子分析天平(德国赛多利斯股份有限公司); SB-25-12DT 型超声波提取器(宁波新芝生物科技股份有限公司); HH-2 数显恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 试剂

玫瑰花由重庆源邦医药公司提供, 经川北医学院药学院李生茂老师鉴定为蔷薇科植物玫瑰 *Rosa rugosa* Thunb. 的干燥花蕾。

* [通信作者] 王柏强, 副主任药师, 研究方向: 药物制剂, 电话: (0817)2262244, E-mail: 31618187@qq.com

芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:0080-200707);纤维素酶(活性单位 $\geq 15 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,上海伯奥生物科技有限公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材前处理

将玫瑰花筛选去除杂质后剪碎,置于烘箱中 40°C 下干燥至恒重,粉碎后过20目筛,备用。

2.2 玫瑰花总黄酮的测定方法

2.2.1 芦丁对照品溶液的制备 将芦丁对照品于 105°C 下干燥至恒重,精密称取20 mg,转移至50 mL棕色量瓶中,60%乙醇溶解并定容,得到质量浓度为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦丁对照品溶液。

2.2.2 测定波长的选择 精密量取对照品溶液1.0 mL置于25 mL容量瓶中,按顺序依次加入5%亚硝酸钠溶液1 mL,混匀,静置6 min;加10%硝酸铝溶液1 mL,混匀,静置6 min;10%氢氧化钠溶液10 mL,60%乙醇定容至刻度,静置15 min。同法配制空白溶液^[5-8]。用紫外-可见分光光度计在400~800 nm波长范围内扫描,结果显示,最大吸收波长为510 nm。见图1。

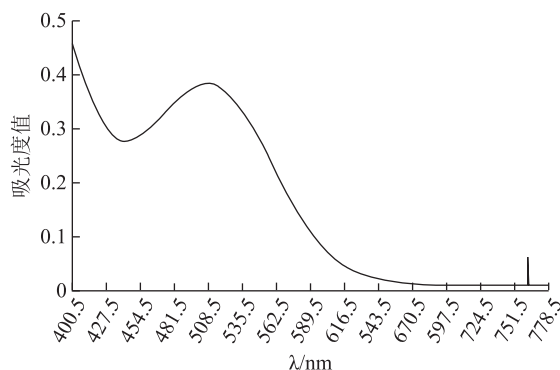


图1 芦丁对照品显色后扫描图

2.2.3 方法学考察 线性关系考察^[8]:精密量取上述芦丁对照品溶液0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mL,转移至6支25 mL量瓶中,按2.2.2项下显色方法依法操作。用添加0.0 mL对照品溶液的试管做空白对照,在510 nm波长处测定不同浓度溶液的吸光度,对不同芦丁质量浓度和对应吸光度作图,线性回归得到芦丁标准曲线: $Y = 2.8384X - 0.0261$, $r = 0.9998$,芦丁浓度在0.2~2.4 mg线性关系良好。

精密度试验:精密量取对照品溶液1 mL,置于25 mL容量瓶中,采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法,在510 nm波长处重复测定6次,吸光度值的RSD值为0.6%。

稳定性试验:精密量取药材提取液1 mL,置于25 mL容量瓶中,采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法,于静置15 min后0、1、2、4、6、8 h依法测定,结果吸光度值的RSD值为1.2%。

重复性试验:精密量取药材提取液1 mL,置于25 mL容量瓶中,同法操作6份。采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法显色后依法测定,结果显示吸光度值的RSD值为0.9%。

加样回收试验:精密吸取适量药材提取液置于25 mL量瓶中,分别加入对照品溶液(质量浓度为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)5.0、2.0、0.5 mL,然后采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法测定吸光度值,计算回收率。结果平均回收率为99.41%,RSD=1.5%。

2.2.4 样品总黄酮含量测定 精密吸取待测玫瑰花总黄酮粗提液1 mL置于25 mL容量瓶中,采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法,在510 nm波长处测得粗提液的吸光度,根据标准曲线得出粗提液中总黄酮的质量浓度。然后,按照公式(1)计算玫瑰花中总黄酮的提取率。

$$\text{总黄酮提取率}(\%) = \frac{\text{提取液中总黄酮总量}}{\text{所用原料总量}} \times 100\% \quad (1)$$

2.3 单因素考察

2.3.1 酶质量分数对玫瑰花总黄酮提取的影响 称取5 g干燥至恒重的玫瑰花粉末,按固液比1:20的比例加入到60%乙醇溶液中,浸泡15 min后分别加占玫瑰花质量0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%的纤维素酶溶解,调节溶液pH为5,在 40°C 恒温水浴锅中酶解90 min,30 min搅拌一次。待酶解完成后再置于超声波提取器中 60°C 超声提取30 min,抽滤,滤液定容,取样测总黄酮含量,然后计算总黄酮提取率。结果见图2。

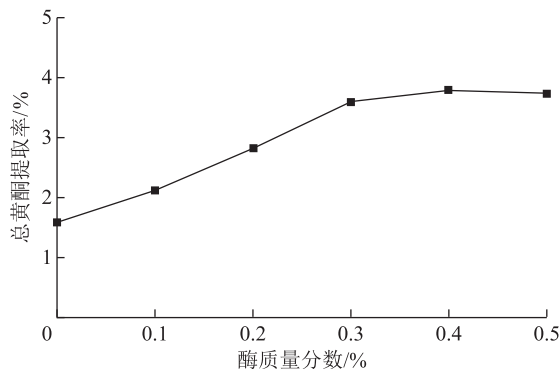


图2 酶质量分数对玫瑰花总黄酮提取的影响

由图可知,随着纤维素酶质量分数的提高,总黄酮提取率逐渐增大,当纤维素酶用量占玫瑰花质量的0.4%时,酶解反应效率和总黄酮提取率最高;超过0.4%后总黄酮提取量反而有所下降,故适宜的纤维素酶质量分数为0.3%~0.5%。

2.3.2 酶解温度对玫瑰花总黄酮提取的影响 称取5 g干燥至恒重的玫瑰花粉末,按1:20的固液比加入到60%乙醇溶液中,浸泡15 min后加占玫瑰花质量0.4%的纤维素酶溶解,调节溶液pH为5,分别在20、30、40、50、60℃恒温水浴锅中酶解90 min,每30 min搅拌一次。酶解完成后置于超声波提取器60℃超声提取30 min,抽滤,滤液定容,取样测总黄酮含量,然后计算总黄酮提取率。结果见图3。

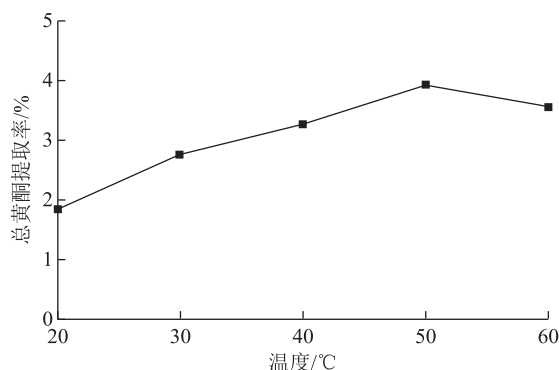


图3 酶解温度对紫苏叶总黄酮提取效果的影响

由图可知,在20~50℃,随着酶解温度的提高,玫瑰花总黄酮提取率逐渐增加,达到50℃后继续升高温度,总黄酮提取率反而呈下降趋势。适宜的温度有利于保持酶的活性,温度过高易导致酶变性失活。因此,酶解温度在40~60℃为宜。

2.3.3 固液比对玫瑰花总黄酮提取的影响 称取5 g干燥至恒重的玫瑰花粉末,分别按1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30的固液比加入到60%乙醇溶液中,浸泡15 min后加占玫瑰花质量0.4%的纤维素酶溶解,调节溶液pH为5,在50℃温度恒温水浴锅中酶解90 min,30 min搅拌一次。酶解完成后于超声波提取器中60℃超声提取30 min,抽滤,滤液定容,取样测总黄酮含量,然后计算总黄酮提取率。结果见图4。

由图可知,随着提取溶剂用量的增加,玫瑰花总黄酮提取率逐渐增大,当固液比达到1:20后再增加料液比,提取率增加不明显。考虑到经济性及后

处理过程,选择固液比为1:15~1:25较为合理。

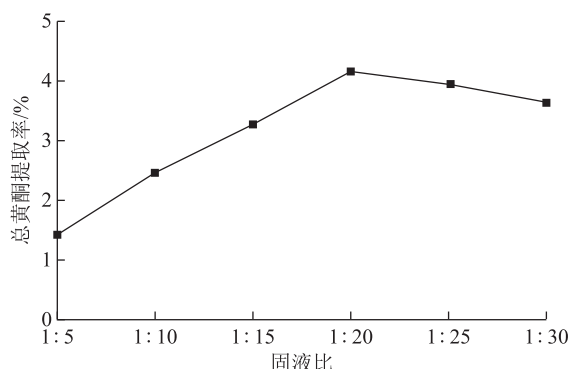


图4 固液比对玫瑰花总黄酮提取效果的影响

2.3.4 乙醇浓度对玫瑰花总黄酮提取的影响 称取5 g干燥至恒重的玫瑰花粉末,按1:20的固液比分别加入到30%、40%、50%、60%、70%、80%乙醇溶液中,浸泡15 min后加占玫瑰花质量0.4%的纤维素酶溶解,调节溶液pH为5,在50℃温度恒温水浴锅中酶解90 min,30 min搅拌一次。酶解完成后于超声波提取器中60℃超声提取30 min,抽滤,滤液定容,取样测总黄酮含量,然后计算总黄酮提取率。结果见图5。

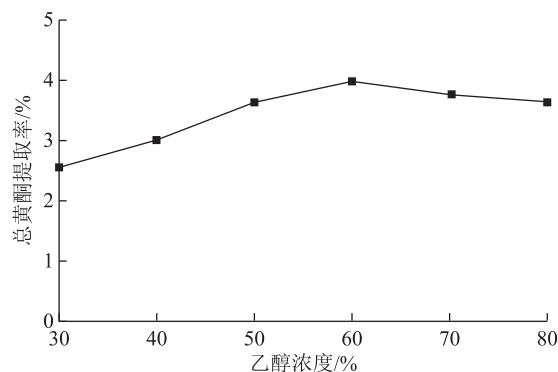


图5 乙醇浓度对玫瑰花总黄酮提取效果的影响

由图可知,随着乙醇浓度的增大玫瑰花黄酮提取率逐渐增大,乙醇浓度为30%~60%时增加速率较快,70%以后醇溶性杂质溶出明显增多,同时抑制纤维素酶的活性,导致总黄酮提取率反而有所下降。故选择乙醇浓度60%为宜。

2.3.5 超声提取时间对玫瑰花总黄酮提取的影响 称取5 g干燥至恒重的玫瑰花粉末,按1:20的固液比加入到60%乙醇溶液中,浸泡15 min后加占玫瑰花质量0.4%的纤维素酶溶解,调节溶液pH为5,在50℃温度恒温水浴锅中酶解90 min,30 min搅拌一次。待酶解完成后于60℃分别超声提取

10、20、30、40、50 min, 抽滤, 得到滤液, 定容, 取样测总黄酮含量, 然后计算总黄酮提取率。结果见图 6。

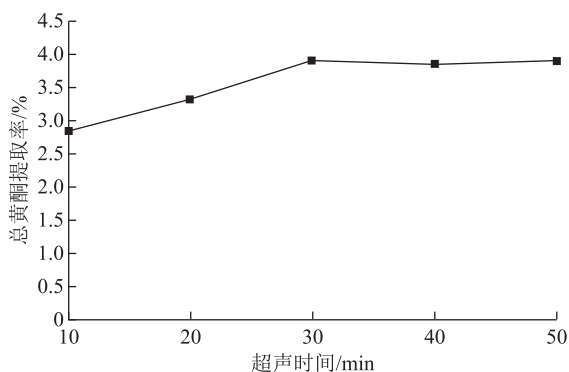


图 6 超声时间对玫瑰花总黄酮提取效果的影响

由图可知, 当超声时间在 10 ~ 30 min 时, 随着时间的延长, 玫瑰花总黄酮提取率逐渐增加, 超过 30 min 后增加效果不明显, 同时杂质溶出量也逐渐增大。因此超声时间控制在 20 ~ 40 min 为宜。

2.3.6 超声温度对玫瑰花总黄酮提取的影响 称取 5 g 干燥至恒重的玫瑰花粉末, 按 1:20 的固液比加入到 60% 乙醇溶液中, 浸泡 15 min 后加占玫瑰花质量 0.4% 的纤维素酶溶解, 调节溶液 pH 为 5, 在 50 °C 温度恒温水浴锅中酶解 90 min, 30 min 搅拌一次。待酶解完成后分别于 40、50、60、70、80 °C 超声提取 30 min, 抽滤, 得到滤液, 定容, 取样测总黄酮含量, 然后计算总黄酮提取率。结果见图 7。

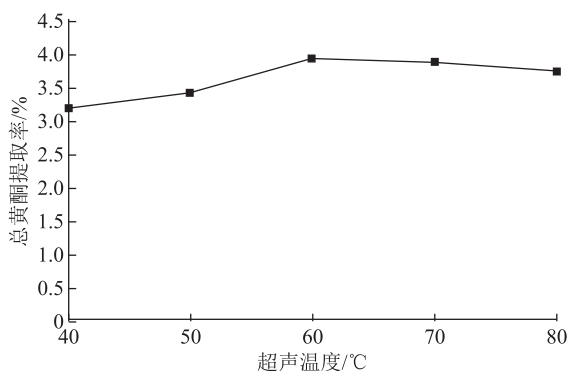


图 7 超声温度对紫苏叶总黄酮提取效果的影响

由图可知, 随着超声温度的提高, 玫瑰花总黄酮提取率逐渐上升, 到 60 °C 后再升高温度, 总黄酮提取率变化缓慢, 70 °C 后由于温度过高, 杂质溶出量也逐渐增大, 导致后续处理困难。因此, 超声提取温度选择在 60 °C 比较合适。

2.4 正交试验优化

根据以上单因素考察结果, 选取影响因素较大的固液比、酶解温度、酶质量分数、超声时间 4 个因素作为考察因素, 以总黄酮提取率为评价指标, 选择 $L_9(3^4)$ 正交试验表(见表 1)设计正交试验, 并对结果进行直观分析(见表 2)和方差分析(见表 3)。

表 1 因素水平表

水平	因素			
	A 固液比	B 酶解温度/°C	质量分数 C/%	D 超声时间/min
1	1:15	40	0.3	20
2	1:20	50	0.4	30
3	1:25	60	0.5	40

表 2 正交试验结果

编号	A	B	C	D	总黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	2.41
2	1	2	2	2	2.90
3	1	3	3	3	2.83
4	2	1	2	3	3.62
5	2	2	3	1	3.55
6	2	3	1	2	3.32
7	3	1	3	2	3.95
8	3	2	1	3	3.58
9	3	3	2	1	3.82
k_1	2.713	3.327	3.103	3.260	
k_2	3.497	3.343	3.447	3.390	
k_3	3.783	3.323	3.443	3.343	
R	1.070	0.020	0.344	0.130	

表 3 方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
A	1.841	2	1841	<0.05
B	0.001	2	1	>0.05
C	0.233	2	233	<0.05
D	0.026	2	26	<0.05
误差	0.001	2		

由表 2 直观分析可知, 各因素对超声联合纤维素酶法提取玫瑰花总黄酮的影响依次为固液比 > 酶质量分数 > 超声时间 > 酶解温度; 方差分析结果表明, 固液比、酶质量分数、超声时间对提取工艺差异有统计学意义($P < 0.05$), 酶解温度对提取工艺差异无统计学意义($P > 0.05$)。根据正交试验及方差

分析结果确定最佳工艺条件为 $A_3B_2C_2D_2$, 即固液比 1:25, 酶解温度 50 ℃, 酶质量分数 0.4%, 超声时间 30 min。按优选的提取工艺条件进行 5 次验证试验: 称取 5 g 干燥至恒重的玫瑰花粉末, 按 1:25 的固液比加入到 60% 乙醇溶液中, 浸泡 15 min 后加占玫瑰花质量 0.4% 的纤维素酶溶解, 调节溶液 pH 为 5, 在 50 ℃ 温度恒温水浴锅中酶解 90 min, 30 min 搅拌一次。待酶解完成后于 60 ℃ 超声提取 30 min, 抽滤, 得到滤液, 定容, 测定指标。结果总黄酮提取率平均值为 $(4.06 \pm 0.93)\%$, 表明该提取工艺条件稳定、可行。

3 讨论

本实验在充分研究各因素对总黄酮提取率影响的基础上, 通过正交试验对玫瑰花总黄酮提取的工艺条件进行了优化, 取得了较好的效果, 使总黄酮提取率达到 4.06%, 是一种较高效的提取方法。

超声联合酶法可从多方面促进药材有效成分的提取, 首先运用纤维素酶破坏细胞壁中的纤维素, 以加快有效成分的释放。其次, 利用超声波的机械效应、空化效应及热效应, 通过增大介质分子的运动速度, 增大介质的穿透力以提取中药有效成分^[9]。该法提取条件温和, 提取中所采用的酶安全、价廉, 同时还可减少有机溶剂的使用量, 所以本工艺比传统提取工艺更加经济、环保。

参考文献

- [1] 田洋. 玫瑰花总黄酮的研究进展[J]. 农业科技与装备, 2015, 257(11): 39-40.
- [2] 宋珂珂, 陈红艳, 廖蓉芬, 等. 不同品种玫瑰花中黄酮的提取及抗氧化性[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(5): 59-63.
- [3] 吕操, 杜丽芬, 宋红萍. 玫瑰花总黄酮对乳腺增生大鼠上皮-间质转换的影响[J]. 中国医学院药理学杂志, 2016, 36(16): 1362-1365.
- [4] 黄文书, 常雪花, 曹利花, 等. 响应面法优化微波辅助提取玫瑰花总黄酮工艺[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(5): 37-40.
- [5] 谢琼, 张益娜, 李敏, 等. 紫外分光光度法测定玫瑰花和玫瑰花渣中的总黄酮含量[J]. 农产品加工学刊, 2007(4): 19-20.
- [6] 丁凤伟, 刘红燕, 李洪芹, 等. 正交试验法优化玫瑰花总黄酮的提取工艺[J]. 山东中医药大学学报, 2011, 35(3): 255-257.
- [7] 李淑芳, 桑小军. 玫瑰花中总黄酮提取方法比较研究[J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(8): 12-13.
- [8] 王柏强, 何效平, 曾芝兰. 酶法协同超声提取紫苏叶总黄酮工艺条件优化[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(7): 1741-1743.
- [9] 邵圣娟, 李晓, 卫静莉. 超声波辅助纤维素酶解法提取马尾松花粉中的总黄酮[J]. 中成药, 2016, 38(1): 204-207.
- [10] 王柏强, 刘福, 江承平, 等. 正交试验优选杜仲叶绿原酸的提取工艺[J]. 中国药房, 2014, 25(27): 2527-2529.

(收稿日期: 2017-10-17 编辑: 王笑辉)

(上接第 89 页)

- [5] 王新玲, 王晓梅, 胡君萍, 等. 新疆丹参总二萜醌类化合物提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(3): 652-653.
- [6] 邓韵, 蔡妙颜, 田野, 等. 溪黄草不同溶剂提取物中总二萜含量的测定[J]. 现代食品科技, 2005, 21(2): 153-154.
- [7] 李婷, 侯晓东, 陈文学, 等. 超声波萃取技术的研究现状及展望[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(13): 3188-3190.
- [8] Romdhane M, Gourdon C. Investigation in solid-liquid extraction; influence of ultrasound [J]. Chem Eng J, 2002, 87(1): 11-19.
- [9] Li H, Pordesimo L, Weiss J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans[J]. Food Res Int, 2004, 37(7): 731-738.
- [10] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国际药学研究杂志, 2000, 27(5): 292-298.
- [11] 段志芳, 陈庆华. 超声波法提取溪黄草中总二萜的最佳工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(12): 2436-2438.
- [12] 韩瑞亭, 万国盛, 孙博航, 等. 苦石莲中总二萜的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 84-86.
- [13] 孙庆磊, 梁月荣, 陆建良. 超声波在茶叶提取中的应用[J]. 茶叶, 2006, 32(2): 79-82.
- [14] 成英, 何兴金. 续随子种子中两种大环二萜类物质的提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1267-1269.

(收稿日期: 2018-05-11 编辑: 王笑辉)