

金线莲总黄酮提取工艺优化 及不同月龄、品系金线莲黄酮含量比较

陈莹,张巧云,任丽,王文义,黄锦芳,张雪,吴水生*

(福建中医药大学药学院,福建福州 350122)

摘要:目的:应用均匀设计法优化金线莲总黄酮提取工艺,并比较不同月龄和不同品系金线莲总黄酮的含量。方法:采用均匀设计法,考察乙醇浓度、液料比、提取时间和提取次数对金线莲总黄酮得率的影响,进行验证并测定不同月龄、不同品系金线莲总黄酮含量。结果:金线莲总黄酮最佳提取工艺为40倍量88%乙醇超声提取3次,每次80 min;验证试验总黄酮得率为1.68% (RSD=0.27%, n=3)。金线莲总黄酮含量与品系和月龄有关,组培金线莲总黄酮平均含量为11.091 mg/g,栽培4月龄和5月龄各品系金线莲总黄酮平均含量分别为14.359和18.730 mg/g,栽培4月龄的金线莲总黄酮含量由高到低为:大圆叶>尖叶>红霞>本地尖叶>本地圆叶>本地野生,组培金线莲经土壤种植其次级代谢产物总黄酮含量呈逐渐累积状态,在5月龄达到最高值。结论:优化的超声提取工艺合理、稳定、可行,为金线莲总黄酮测定和质量评价提供参考。组培金线莲和栽培金线莲总黄酮含量存在差异,土壤栽培有利于金线莲有效成分的积累,因此组培金线莲经土壤栽培是必要的。

关键词:金线莲,总黄酮,均匀设计,不同月龄

Optimization of Extraction Process and Comparison of Total Flavonoids Contents of Different Ages and Strains of *Anoectochilus roxburghii*

CHEN Ying, ZHANG Qiao-yun, REN Li, WANG Wen-yi, HUANG Jin-fang, ZHANG Xue, WU Shui-sheng*

(School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

Abstract: Objective: To optimize the extraction technology of total flavonoids from *Anoectochilus roxburghii*, the uniform design method was used and the total flavonoids contents of *A. roxburghii* of different months and various *Anoectochilus* spp were compared. Method: Uniform design method was applied to investigate the factors such as ethanol concentration, liquid material ratio, extraction time and extraction rate on total flavonoids extraction of *A. roxburghii*. The optimized extraction method from uniform design method was then validated by determined the flavonoid contents of different months *A. roxburghii* and other *Anoectochilus* spp. Results: Optimized extraction technology was found to be 40 volumes of 88% ethanol, 80 min ultrasonic extraction, and 3 times of repetition. The total flavonoids extraction rate in verification test was 1.68% (RSD=0.27%, n=3). The total flavonoid contents of *A. roxburghii* was correlated to its strain and month of ages. The average contents of total flavonoids in *A. roxburghii* tissue cultured was 11.091 mg/g, The average contents of total flavonoids in 4 and 5 cultivated month age of cultivated *A. roxburghii* were 14.359 and 18.730 mg/g, respectively. The amount of total flavonoids obtained from the 4 cultivated month age of *A. roxburghii* arranged in decreasing order as Da Yuanye > Jian Ye > Hong Xia > Local Jianye > Local Yuanye > Local Wild. The finding also suggested that the secondary metabolites contents especially flavonoid compound in cultivated *A. roxburghii* was believed to be increased gradually, and reached the highest value at the age of 5 month. Conclusion: The optimized ultrasonic extraction process was reasonable, stable, and feasible, would provide a reference for the determination and quality evaluation of total flavonoids in *A. roxburghii*. There had differences between tissue culture and cultivated *A. roxburghii* in the contents of total flavonoids. The soil cultivation was beneficial to the accumulation of the active constituents of *A. acuminata*. Therefore, it was necessary to cultivate the golden lotus seedlings through soil cultivation.

Key words: *Anoectochilus roxburghii*; total flavonoids; uniform design; different month ages

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)08-0184-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.08.031

引文格式: 陈莹,张巧云,任丽,等.金线莲总黄酮提取工艺优化及不同月龄、品系金线莲黄酮含量比较[J].食品工业科技,2019,40(8):184-189.

收稿日期:2018-07-23

作者简介: 陈莹(1991-),女,硕士研究生,研究方向:中药药效物质基础及作用机制研究,E-mail: ChenYing578119815@163.com。

* 通讯作者: 吴水生(1965-),男,博士,教授,研究方向:中药复方药效物质及其作用机制研究,E-mail: wushuishengwsstcm@163.com。

基金项目: 福建省财政厅专项科研资助课题(595291505)。

金线莲是兰科植物花叶开唇兰 *Anoectochilus roxburghii*(Wall.) Lindl. 的新鲜或干燥全草, 为多年生草本植物, 其味甘, 性平, 具有清热凉血, 祛风利湿等功效, 福建、浙江、江西、广西、广东等地均有分布, 是福建省重点保护野生药材物种之一, 也系闽台等省的民间珍稀草药^[1]。临床用于高尿酸血症, 2 型糖尿病, 慢性乙型肝炎等病症^[2-4]。已有研究表明, 金线莲主要化学成分为多糖、金线莲苷、黄酮及黄酮苷类、氨基酸、生物碱和有机酸等^[2,5-11], 其中黄酮类化合物具有清除自由基和抗氧化、抗肿瘤、保护肝脏以及治疗糖尿病的作用^[12-13], 是金线莲的主要活性成分之一。

随着人们生活水平的提高, 金线莲的药用价值和保健作用日益凸显, 市场需求量不断增加^[14]。近年来随着金线莲组织培养和人工栽培技术的成熟, 人工选育出适合栽培的尖叶、本地尖叶、本地圆叶、红霞等品系金线莲, 金线莲产业规模持续扩大^[15]。金线莲需经组织培养 4~6 个月, 转移至大棚驯化壮苗后, 再经土壤栽培 4~6 个月甚至更长时间采收。但组织培养金线莲与栽培金线莲外观形态相近^[16], 市场上存在金线莲组培苗直接当成品销售、同属植物掺假的现象, 严重影响金线莲的产品质量。目前尚未合适的质量评价体系对组培金线莲和不同月龄、不同品系金线莲的品质进行评估和区分, 对不同月龄和不同品系金线莲成分的比较研究鲜有报道。

因此, 本实验以金线莲主要活性成分总黄酮为检测指标, 应用均匀设计法优化金线莲总黄酮提取工艺, 并应用优化的工艺, 进一步比较不同月龄和不同品系金线莲总黄酮的含量, 为金线莲的合理开发和质量评价提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

金线莲 为组织培养生根阶段 4 个月药材幼苗, 栽培金线莲为下地种植月龄为 1、2、3、4、5、6、7、9、10、13 个月的采收品, 详细样品信息见表 1, 经福建中医药大学药学院范世明高级实验师鉴定为兰科开唇兰属花叶开唇兰 *Anoectochilus roxburghii*(Wall.) Lindl. 的新鲜全草; 芦丁 批号 100080-201610, 购于中国食品药品检定研究院; 亚硝酸钠 批号 1705032, 西陇科学股份有限公司; 硝酸铝 批号 20170706, 天津市恒兴化学试剂制造有限公司; 氢氧化钠 批号 G19852B, 上海泰坦科技股份有限公司; 实验用水 超纯水; 其余试剂 均为分析纯。

DV215CD 型十万分之一分析天平 奥豪斯公司 OHAUS; DFY-500A 粉碎机 上海四瑞仪器有限公司; GT-2120QTS 超声机 广东固特超声股份有限公司; TDL-40B 离心机 上海安亭科学仪器厂; DLSB-5/20 低温冷却循环泵、SHB-Ⅲ循环水式真空泵 郑州长城科工贸有限公司; RE-2000A 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; Milli-Q 超纯水仪 美国 MILLIPORE 公司; UV-1800 紫外可见分光光度计 日本岛津公司。

表 1 金线莲样品信息

Table 1 Information of *A.roxburghii* samples

样品 编号	样品产地	来源	月龄 (月)
S1	漳州南靖	组培金线莲(尖叶)	0
S2	漳州南靖	组培金线莲(大圆叶)	0
S3	漳州南靖	组培金线莲(红霞)	0
S4	漳州南靖	组培金线莲(本地尖叶)	0
S5	漳州南靖	组培金线莲(本地圆叶)	0
S6	漳州南靖	组培金线莲(本地野生)	0
S7	漳州南靖	栽培金线莲(尖叶)	1
S8	漳州南靖	栽培金线莲(大圆叶)	1
S9	漳州南靖	栽培金线莲(红霞)	1
S10	漳州南靖	栽培金线莲(本地尖叶)	1
S11	漳州南靖	栽培金线莲(本地圆叶)	1
S12	漳州南靖	栽培金线莲(本地野生)	1
S13	漳州南靖	栽培金线莲(尖叶)	2
S14	漳州南靖	栽培金线莲(大圆叶)	2
S15	漳州南靖	栽培金线莲(红霞)	2
S16	漳州南靖	栽培金线莲(本地尖叶)	2
S17	漳州南靖	栽培金线莲(本地圆叶)	2
S18	漳州南靖	栽培金线莲(本地野生)	2
S19	漳州南靖	栽培金线莲(尖叶)	3
S20	漳州南靖	栽培金线莲(大圆叶)	3
S21	漳州南靖	栽培金线莲(红霞)	3
S22	漳州南靖	栽培金线莲(本地尖叶)	3
S23	漳州南靖	栽培金线莲(本地圆叶)	3
S24	漳州南靖	栽培金线莲(本地野生)	3
S25	漳州南靖	栽培金线莲(尖叶)	4
S26	漳州南靖	栽培金线莲(大圆叶)	4
S27	漳州南靖	栽培金线莲(红霞)	4
S28	漳州南靖	栽培金线莲(本地尖叶)	4
S29	漳州南靖	栽培金线莲(本地圆叶)	4
S30	漳州南靖	栽培金线莲(本地野生)	4
S31	漳州南靖	栽培金线莲(大圆叶)	5
S32	漳州南靖	栽培金线莲(本地尖叶)	5
S33	漳州南靖	栽培金线莲(红霞)	5
S34	莆田仙游	栽培金线莲(尖叶)	4
S35	莆田仙游	栽培金线莲(尖叶)	5
S36	莆田仙游	栽培金线莲(尖叶)	6
S37	莆田仙游	栽培金线莲(尖叶)	7
S38	莆田仙游	栽培带花苞金线莲(尖叶)	9
S39	莆田仙游	栽培带花苞金线莲(尖叶)	10
S40	莆田仙游	栽培金线莲(尖叶)	13

1.2 实验方法

1.2.1 黄酮提取工艺 将 60 ℃ 干燥至恒重的金线莲, 粉碎, 过 60 目筛得金线莲药材粉末。精密称取金线莲粉末 0.5000 g, 置 50 mL 具塞三角瓶中, 按一定液料比加入一定浓度的乙醇, 60 ℃ 恒温超声提取(功率 250 W, 频率 50 kHz) 一定时间, 2500 r/min 离心 7 min, 取上清液, 提取一定次数, 合并上清液, 60 ℃ 真空减压浓缩至干, 加适量无水甲醇复溶并转

移至 25 mL 容量瓶中,用无水甲醇定容至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

1.2.2 标准曲线绘制 精密称取芦丁对照品 14.83 mg,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇超声(功率 250 W,频率 50 kHz)2 min 溶解后定容至刻度,摇匀,得质量浓度为 0.2966 mg/mL 的芦丁对照品溶液。精密量取芦丁对照品溶液 0、0.5、1、2、3、4、5、6 mL 分别置于 25 mL 容量瓶中,各加甲醇至 6 mL,分别加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,再加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,最后加 4% 氢氧化钠溶液 10 mL,混匀,甲醇定容至刻度,放置 15 min,以不加芦丁的试剂为空白对照,在 UV-1800 紫外可见分光光度计下进行 200~800 nm 全波长扫描,在最大吸收波长下测定吸光度。以浓度(X)为横坐标,以吸光度(Y)为纵坐标,建立标准曲线,得线性回归方程,相关系数和线性范围。

1.2.3 金线莲总黄酮得率测定 精密吸取供试品溶液 5 mL,置 25 mL 容量瓶中,按“1.2.2”项下方法,自“加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL”起,以不加样品溶液的试剂为空白对照,依法测定吸光度。结合“1.2.2”项线性回归方程和公式(1)计算总黄酮得率。

$$\text{总黄酮得率}(\%) = \frac{c \times 25 \times 5}{m \times 1000} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中,c:回归方程计算所得提取液总黄酮浓度,mg/mL;m:称取的样品粉末质量,g。

1.2.4 方法学考察

1.2.4.1 精密度实验 精密量取 2 mL 质量浓度为 0.2966 mg/mL 的芦丁标准品溶液,置于 25 mL 容量瓶中,按“1.2.3”项下方法平行测定 5 次吸光度。

1.2.4.2 稳定性试验 取供试品溶液(编号:S25)分别于 0、0.5、1、2 和 3 h,按“1.2.3”项下方法测定吸光度。

1.2.4.3 重复性试验 精密称取同一批金线莲(编号:S25)样品 6 份,按实验优化的方法制备供试品溶液,按“1.2.3”项下方法测定吸光度。

1.2.4.4 加样回收实验 精密称取“1.2.4.3”项已知含量的金线莲粉末(编号:S25),每份 0.5000 g,共 5 份,精密称定,分别精密加入已知样品含量的 100% 的芦丁对照品,按优化的提取工艺制备供试品溶液,按“1.2.3”项下方法测定吸光度,计算总黄酮含量。

1.2.5 单因素实验 以总黄酮得率为指标,通过预实验,对提取方法(回流提取和超声提取)、提取溶剂(水、乙醇、甲醇)进行考察。按张秀才等^[17]优化的金线莲总黄酮回流提取工艺(20 倍量的 95% 乙醇回流提取 3 次,每次 90 min)和按同样工艺超声提取的金线莲总黄酮得率结果差别不大,超声提取法在保证提取效率的前提下,操作方法更简便,所以本实验选择超声提取法。提取溶剂考察结果显示样品水提取液总黄酮得率最低,而乙醇和甲醇提取液总黄酮得率接近,考虑乙醇相对于甲醇价格低,无毒性,故选择乙醇为提取溶剂。

精密称取金线莲粉末(编号:S25)若干份于 50 mL 具塞三角瓶中,每份 0.5000 g,以总黄酮得率为指标,按“1.2.1”项方法,固定提取温度 60 ℃,超声提

取功率 250 W,提取 1 次,依次改变乙醇浓度、液料比、提取时间进行单因素考察。实验方法如下:乙醇浓度:按液料比 40:1 mL/g 分别加入浓度为 50%、60%、70%、80%、90%、95% 的乙醇溶液,超声提取 30 min;液料比:分别按液料比 10:1、15:1、20:1、30:1、40:1、60:1 mL/g 加入 95% 乙醇,超声提取 30 min;提取时间:按液料比 40:1 mL/g 分别加入 95% 乙醇溶液,分别超声提取 20、30、40、60、70、90 min。

1.2.6 均匀设计法优化总黄酮提取工艺 已有研究^[17-19]表明提取次数也是影响金线莲总黄酮提取率的主要因素之一,参考已有研究文献选择提取次数考察水平范围为 1~3 次。以乙醇浓度(X₁)、液料比(X₂)、提取时间(X₃)和提取次数(X₄)作为考察因素,以总黄酮得率(Y)为评价指标,每个因素在单因素考察确定的水平范围内各设 8 个水平,通过 DPS14.50 软件设计 U₈(8⁴)均匀设计试验方案,该均匀设计表的中心化偏差 CD=0.1533。精密称取金线莲粉末(编号:S25),每份 0.5000 g,按均匀设计实验方案提取样品,按“1.2.3”项下方法测定吸光度,计算总黄酮得率,每组试验重复 3 次。

1.2.7 不同品系、不同月龄金线莲总黄酮含量测定 分别精密称取不同品系、不同月龄金线莲样品粉末 0.5000 g,按“1.2.1”项方法,按优化的提取工艺制备供试品溶液,测定吸光度,计算总黄酮含量。

1.3 数据处理

采用 DPS 14.50 软件设计实验方案、构建模型和统计分析,应用 SPSS 20.0 软件和 Excel 处理数据。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长的确定

芦丁标准溶液在紫外可见分光光度计下波长扫描结果如图 1 所示,结果显示,其在 450~550 nm 之间有一个最大吸收峰,510 nm 为最大吸收波长,此处最大吸收峰与芦丁质量浓度有良好的响应关系。

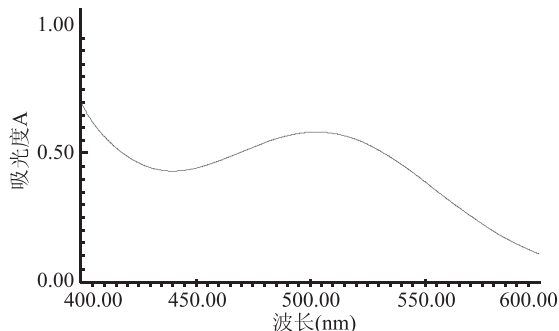


图 1 芦丁标准溶液吸收曲线

Fig.1 Absorption curve of rutin standard solution

2.2 标准曲线绘制

计算得金线莲总黄酮线性回归方程为 $Y = 12.0966 X - 0.0098$ ($r = 0.9999$),结果表明金线莲总黄酮在 0.0578~0.0712 mg/mL 内线性良好。

2.3 方法学考察结果

2.3.1 精密度实验 计算结果显示金线莲总黄酮吸光度的 RSD 值为 0.21%,表明仪器的精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 计算结果显示被测物吸光度 RSD 值为 2.33% ,表明供试液在 3 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 计算结果显示金线莲总黄酮质量浓度的 RSD 为 1.66% ,表明该法重复性良好。

2.3.4 加样回收实验 结果显示,总黄酮平均加样回收率为 97.71% ,RSD 为 3.20% ,表明金线莲总黄酮的加样回收率良好。

2.4 单因素实验结果分析

2.4.1 乙醇浓度对总黄酮得率影响 由图 2 可知,乙醇浓度小于 90% 时,总黄酮得率随着乙醇浓度的升高而逐渐增加,当乙醇浓度大于 90% 时,得率呈下降趋势。其原因可能为总黄酮包括黄酮及其苷类化合物,在乙醇浓度较低时,溶剂极性较大,根据相似相溶的原理,亲水性的黄酮醇苷类物质先溶出;随着乙醇浓度逐渐提高,溶剂极性逐渐降低,疏水性的黄酮类化合物逐渐溶出;当乙醇浓度达 90% 后,样品中其他脂溶性化合物竞争性溶出^[20],导致黄酮类化合物溶出度反而降低。综上选择乙醇浓度为 85% ~95% 为考察水平范围。

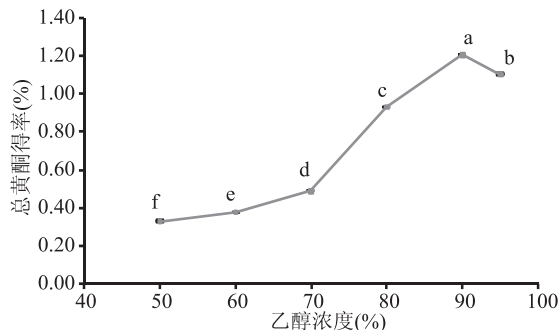


图 2 乙醇浓度对总黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on extraction percentage of total flavonoids

2.4.2 液料比对总黄酮得率影响 由图 3 可知,总黄酮得率随着液料比的升高,先升高后下降,在液料比为 30:1 mL/g 时达到最高值。可能原因是随着溶剂用量的增大,样品粉末颗粒与溶剂接触面的浓度差增加,随着渗透压的增大,黄酮类成分溶出率随之增加,并达到峰值;当液料比超过 30:1 mL/g 时,总黄酮得率下降可能与杂质成分溶出率增加有关^[21]。同时考虑节约溶剂用量,又能达到较高的提取率,故选择液料比为 20:1~40:1 mL/g 为考察水平范围。

2.4.3 提取时间对总黄酮得率影响 由图 4 可知,随着提取时间的升高,总黄酮得率逐渐升高,90 min 时达到最高值,并趋于平稳。可能因为超声波的空化作用加速植物细胞内黄酮类化合物的浸出^[22],随着提取时间的增加,黄酮类化合物的浸出达到最高值,并趋于动态平衡。提取 70 min 与提取 90 min 总黄酮得率均大于 1.3% ,趋近于 1.4% ,考虑到在保证提取效率的基础上又能节省提取时间,因此选择 70~90 min 中间值 80 min 为提取时间最高考察水平,40 min 为最低考察水平,即选择 40~80 min 为提取时间考察水平范围。

2.5 均匀设计优化金线莲总黄酮提取工艺试验结果 基于上述单因素实验结果,通过 DPS14.50 软件

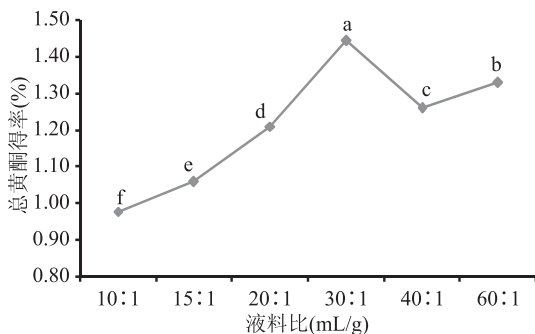


图 3 液料比对总黄酮得率的影响

Fig.3 Effect of ratio of liquor to material on extraction percentage of total flavonoids

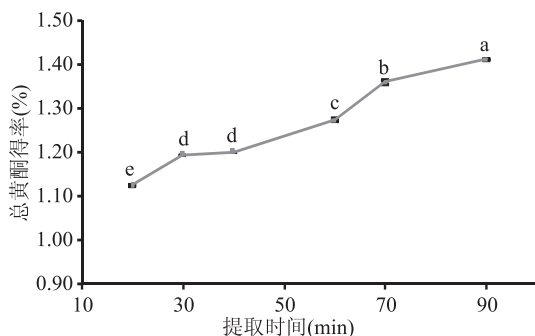


图 4 提取时间对总黄酮提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on extraction percentage of total flavonoids

设计 4 因素 8 水平的均匀试验,均匀试验设计方案与结果见表 2。

表 2 均匀试验设计与结果 ($\bar{X} \pm SD, n = 3$)

实验组	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y (%)
N1	85	26	51	3	1.399 ± 0.007
N2	92	29	80	2	1.270 ± 0.033
N3	86	37	74	2	1.163 ± 0.059
N4	91	40	40	2	1.198 ± 0.027
N5	88	31	57	1	0.841 ± 0.103
N6	89	20	69	2	1.149 ± 0.070
N7	94	23	46	1	0.859 ± 0.062
N8	95	34	63	3	1.158 ± 0.009

2.5.1 均匀试验结果统计分析 应用 DPS14.50 软件对试验结果(总黄酮得率)进行二次多项式逐步回归分析,各因素对 Y 的拟合回归结果见表 3,得回归方程为 $Y = -1057.6609 + 22.7685X_1 + 37.6017X_4 - 0.1217X_1^2 + 0.5676X_4^2 - 0.4092X_1X_4 + 0.0015X_2X_3$,调整后相关系数 $r = 0.9996, p = 0.0183 < 0.05$,Durbin-Watson 统计量 $d = 1.8851$,表明回归方程拟合度高,且具有统计学意义,其方差结果分析见表 4。各因素对 Y 的影响大小为: $X_4 (p = 0.0156) > X_1X_4 (p = 0.0192) > X_1 (p = 0.0270) > X_1^2 (p = 0.0274) > X_2X_3 (p = 0.0301) > X_4^2 (p = 0.0984)$, X_1 与 X_4 、 X_2 与 X_3 存在交互作用, X_1 、 X_4 、 X_4^2 、 X_2X_3 的系数为正值提示其与 Y 成正相关。均匀设计拟合得金线莲总黄酮最佳提

取工艺为乙醇浓度 88%、液料比为 40:1 mL/g、提取时间 80 min、提取 3 次,此时总黄酮预测值为 18.30 mg/g,即 Y 理论值为 1.830%。

表3 拟合回归结果

Table 3 Fitting regression results

	回归系数	偏相关	t 值	p 值
X_1	22.7685	0.9991	23.6014	0.0270
X_4	37.6017	0.9997	40.7342	0.0156
X_1^2	-0.1217	-0.9991	23.2142	0.0274
X_4^2	0.5676	0.9881	6.4168	0.0984
X_1X_4	-0.4092	-0.9995	33.1203	0.0192
X_2X_3	0.0015	0.9989	21.1033	0.0301

表4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	F 值	p 值
回归	25.5995	6	1744.9586	0.0183
残差	0.0024	1		
总变异	25.6020	7		

2.5.2 工艺优化验证 精密称取金线莲(编号:S25)粉末 0.5000 g,共 3 份,按优化的提取工艺条件进行验证实验。金线莲总黄酮得率分别为 1.643%、1.645%、1.715%,平均得率为 1.68%(RSD = 0.27%, n = 3),与预测值的相对误差为 8.2%,表明实测值与回归方程预测接近,优化后的提取工艺条件可靠,结果重现性好。

2.6 金线莲总黄酮含量测定结果

南靖产尖叶、本地圆叶、本地野生品系金线莲 0~4 月龄总黄酮含量见图 5,以及大圆叶、红霞、本地尖叶品系金线莲 0~5 月龄总黄酮含量见图 6。仙游产 4~13 月龄金线莲尖叶品总黄酮含量见图 7。

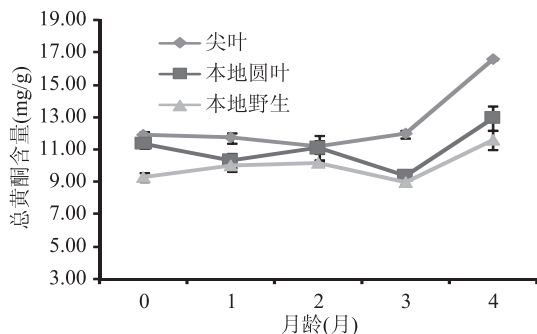


图5 1~4 月龄不同品系金线莲总黄酮含量比较

Fig.5 Comparison of total flavonoids content

in the 1 to 4 month ages of different strains of *A. roxburghii*

由图 5 和图 6 可知,南靖产不同品系金线莲总黄酮含量有一定差异,尖叶金线莲总黄酮含量在种植 2 月下降,之后随着栽培月龄的增加而增加;本地圆叶和本地野生金线莲在 3 月龄总黄酮含量较低,4 月龄达到高值;大圆叶、红霞和本地尖叶金线莲总黄酮含量均在 2 月龄较低,之后随着栽培月龄的增加逐渐升高,在 5 月龄达到高值。栽培 4 月龄的金线莲总黄酮含量由高到低为:大圆叶 > 尖叶 > 红霞 > 本地尖叶 > 本地圆叶 > 本地野生;栽培 5 月龄金线莲总黄

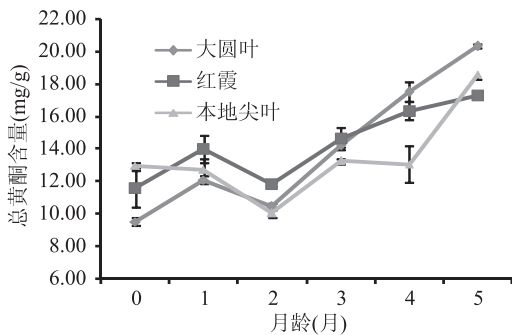


图6 1~5 月龄不同品系金线莲总黄酮含量比较

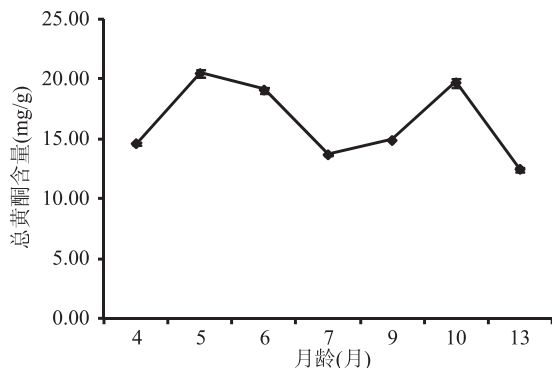
Fig.6 Comparison of total flavonoids content in the 1 to 5 month ages of different strains of *A. roxburghii*

图7 4~13 月龄金线莲尖叶品总黄酮含量比较

Fig.7 Comparison of total flavonoids content

in 4 to 13 month ages of *A. roxburghii*

酮含量由高到低为:大圆叶 > 本地尖叶 > 红霞,其中本地尖叶和红霞总黄酮含量较接近。组培金线莲总黄酮含量为 9.270~12.963 mg/g,栽培 4 月龄金线莲总黄酮含量为 11.572~17.521 mg/g,说明金线莲总黄酮含量与品系和栽培月龄有关。由图 7 可知,仙游产尖叶金线莲在栽培 4~7 月龄,总黄酮含量先增加后降低,在 5 月龄达到最高值,可能与金线莲中黄酮及其苷类成分的合成、分解转化有关;在栽培 7~13 月龄,尖叶金线莲总黄酮含量在 10 月龄前呈上升趋势,在 10 月龄达到最高值,在 10 月龄后呈降低趋势,其原因可能是栽培 10 月以上金线莲进入花期,黄酮类等次生代谢产物累积降低。总体上,金线莲尖叶品总黄酮含量在 5 月龄和 10 月龄均达到 19 mg/g 以上,说明金线莲总黄酮含量与栽培月龄不是简单的线性正相关,组培金线莲经土壤种植其次级代谢产物总黄酮含量呈逐渐累积状态,在 5 月龄达到最高值。

3 讨论

3.1 金线莲总黄酮提取工艺优化

目前已有正交试验^[18]、响应面法^[23]优化金线莲总黄酮提取工艺的报道,但未见均匀设计在金线莲总黄酮提取工艺优化的应用报道。均匀设计将实验点在高维空间内充分均匀分布,使实验点具有更好代表性,适用于因素和水平较多的试验^[24],相对于正交等试验设计法需要较少的试验次数就能获得更多信息,且能反映各因素间的交互作用,在水平范围较大的情况具有明显的优越性。本实验以总黄酮得率

为指标,在预实验的基础上优选超声提取法和乙醇为提取溶剂,通过单因素考察乙醇浓度、液料比、提取时间确定因素水平范围,对均匀试验结果进行偏最小二乘二次多项式回归(PLS)和二次多项式逐步回归建模统计分析,优选二次多项式逐步回归模型对金线莲总黄酮提取工艺的拟合结果,结果表明乙醇浓度和提取次数、液料比和提取时间存在交互作用,拟合值与实验值接近,方差分析 $p < 0.05$,具有统计学意义。故本实验优化的金线莲总黄酮超声提取工艺方法稳定、可靠,为金线莲的总黄酮含量测定和开发利用提供参考。

3.2 不同月龄、不同品系金线莲总黄酮含量比较分析

40 批次金线莲总黄酮含量均符合《地理标志产品永安金线莲》(DB35/T 13882013)黄酮含量不低于0.8% (8.0 mg/g)的规定。但组培金线莲和不同月龄栽培金线莲总黄酮含量存在差异,各品系组培金线莲总黄酮平均含量为 11.091 mg/g,栽培 4 月龄和 5 月龄各品系金线莲总黄酮平均含量分别为 14.359 和 18.730 mg/g,说明土壤栽培有利于金线莲次级代谢产物黄酮类化合物的积累^[15-16]。此外,同月龄不同品系金线莲总黄酮含量存在一定差异,表现为栽培 4 月龄大圆叶、尖叶和红霞品系金线莲总黄酮含量较高,均在 16 mg/g 以上,且 5 月龄大圆叶和尖叶金线莲总黄酮含量最高,均达 20 mg/g 以上。比较栽培 4 月龄以上金线莲尖叶品系总黄酮含量,结果表明栽培 5 月龄和 10 月龄金线莲总黄酮含量均能达到最高值,但金线莲每年 10 月期间开花,开花后药用价值降低,因此综合考虑金线莲品质和经济效益,建议栽培大圆叶、尖叶、红霞和本地尖叶品系金线莲^[25],栽培 5 月可采收。

4 结论

本实验应用单因素结合均匀设计法优化金线莲总黄酮提取工艺,优化最佳的工艺为乙醇浓度 88%、液料比为 40:1 mL/g、超声提取时间 80 min、提取 3 次。总黄酮含量测定结果表明,金线莲总黄酮含量与品系和栽培月龄有关,组培金线莲和栽培金线莲总黄酮含量存在差异,已有研究也表明土壤栽培金线莲黄酮类等成分^[16]和微量元素含量^[25]均比组培金线莲高,土壤栽培有利于金线莲有效成分的积累,因此组培金线莲经土壤栽培是必要的。总黄酮是金线莲的主要有效成分之一,但不能用于区分组培金线莲和不同栽培月龄金线莲,应结合多成分及特征指纹图谱进一步对不同月龄金线品质进行研究。

参考文献

[1] 福建省食品药品监督管理局. 福建中药材标准[S]. 福州: 海风出版社, 2006: 154-157.
[2] Shen Yi Ye, Qingsong Shao, Ailian Zhang. *Anoectochilus roxburghii*: A review of its phytochemistry, pharmacology, and clinical applications [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 209: 184-202.

[3] J G Zhang, Q Liu, Z L Liu, et al. Antihyperglycemic activity of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharose in diabetic mice induced by high - fat diet and streptozotocin [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 164: 180-5.
[4] 黄颖桢, 陈菁瑛, 赵云青, 等. 金线莲遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中草药, 2014, 45(15): 2230-2234.
[5] 何春年. 福建金线莲的化学成分研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2004.
[6] 张丽蓉. 金线莲化学成分的研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2015.
[7] 何春年, 王春兰, 郭顺星, 等. 福建金线莲的化学成分研究 II [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(10): 761-763.
[8] 关璟, 王春兰, 郭顺星, 等. 福建产金线莲中黄酮苷成分的研究[J]. 中草药, 2005, 36(10): 1450-1453.
[9] 胡光华. 金线莲苷保肝降酶活性及其全乙酰化物的合成研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2009.
[10] 蔡金艳, 张勇慧, 吴继洲. 药王金线莲挥发油及石油醚提取物的气相色谱-质谱-数据系统联用测定[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1550-1552.
[11] 张锦雀. 金线莲多糖的分离纯化、结构表征及其抗肿瘤活性[D]. 福州: 福建医科大学, 2010.
[12] 刘知远, 沈廷明, 吴仲玉. RP-HPLC 法同时测定福建产金线莲中槲皮素、山柰素、异鼠李素的量[J]. 中草药, 2015, 46(3): 432-434.
[13] 关璟. 金线莲质量研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2005.
[14] 洪琳, 邵清松, 周爱存, 等. 金线莲产业现状及可持续发展对策[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(3): 553-558.
[15] 黄瑞平, 黄颖桢, 陈菁瑛, 等. 不同月龄金线莲多糖和总黄酮含量的比较[J]. 热带生物学报, 2012, 3(2): 174-176.
[16] 李瑞安, 林军, 汪厦霞, 等. 基于不同栽培阶段金线莲的代谢组学分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4624-4630.
[17] 张秀才, 吴岩斌, 吴锦玉, 等. 金线莲总黄酮回流提取工艺研究[J]. 福建中医药, 2013, 44(4): 53-55.
[18] 关璟, 王春兰, 郭顺星, 等. 福建金线莲总黄酮提取工艺的研究[J]. 中国药学杂志, 2008(21): 1615-1617.
[19] 王澄林, 张勋, 陈抒云, 等. 金线莲总黄酮的最佳超声提取工艺[J]. 福建中医药, 2017, 48(1): 40-42.
[20] 曾俊美, 郑启翔, 刘杰凤, 等. 响应面法优化超声波-微波协同提取龙眼壳总黄酮[J]. 食品工业科技, 2018, 39(9): 154-158.
[21] 杨秋明, 宋江峰, 李大婧, 等. 响应面法优化超声波提取南瓜皮叶黄酮的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(1): 149-155.
[22] 郑丽, 彭雪, 张悦, 等. 超声波法提取紫薯茎叶中总黄酮的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 189-194.
[23] 刘辉辉, 迟惠荣, 沈岚, 等. 响应面分析法优化金线莲黄酮提取工艺的研究[J]. 药物生物技术, 2017, 24(4): 321-327.
[24] 唐启义. DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 324.
[25] 张海燕. 仿生态栽培金线莲的指纹图谱与微量元素研究[J]. 福建林业科技, 2018, 45(1): 44-46, 52.