

超声波提取紫苏叶黄酮的工艺研究

胡晓丹, 孙爱东, 张德权*

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100094)

摘要 采用单因素试验研究溶剂浓度、提取温度、超声波功率、料液比、提取时间、提取次数对超声波提取紫苏叶黄酮得率的影响。通过正交试验优化超声波提取紫苏叶黄酮的工艺条件。结果表明: 随着乙醇浓度的增加, 黄酮得率增加, 乙醇浓度大于 70% 时, 黄酮得率增加不明显。提取温度为 60℃ 时, 黄酮得率最大。随着超声波功率的增大, 黄酮得率呈上升趋势。料液比增大, 黄酮得率随之增大, 但不超过 1:20 (g/ml) 为宜。黄酮得率随提取时间的延长而增加, 但超过 30 min 后, 增加趋势不明显, 各因素对黄酮得率的影响依次为: 提取温度 > 提取时间 > 料液比 > 超声波功率。70% 乙醇为提取剂时, 超声波提取黄酮的最佳工艺为: 料液比 1:20 (g/ml), 提取温度 60℃, 超声功率 150 W, 提取次数 2 次 (每次 40 min), 该条件下紫苏叶黄酮的得率为 2.93%, 粗提物中黄酮含量为 15.46%。

关键词 超声波; 紫苏叶; 黄酮; 工艺

中图分类号 S567.21+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)05-02046-03

Research on Process of Extracting Flavonoids from Perilla Leaf by Ultrasonic Wave

HU Xiao-dan et al (College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract The single factor test was taken to study the effects of solvent concn., extraction temperature, ultrasonic power, ratio of material to liquid, extraction time and extraction times on yield rate of flavonoids from perilla leaf by ultrasonic wave. Through the orthogonal test, the process of extracting flavonoids by ultrasonic wave was optimized. The results showed that with the increase of ethanol concn, the yield rate of flavonoids increased, but when ethanol concn was more than 70%, the increase of yield rate of flavonoids was not obvious. When the extraction temperature was 60℃, the yield rate of flavonoids was the highest. With the increase of ultrasonic power, the yield rate of flavonoids increased. When the ratio of material to liquid increased, the yield rate of flavonoids increased, but the suitable ratio of material to liquid was not more than 1:20 (g/ml). The yield rate of flavonoids was increased with the prolonging of extraction time, but when extraction time was more than 30 min, the increasing trend was not obvious. The effects of each factor on yield rate of flavonoids in order was extraction temperature > extraction time > the ratio of material to liquid > ultrasonic power. When 70% ethanol was extractant, the optimum process of extracting flavonoids by ultrasonic wave was ratio of material to liquid of 1:20 (g/ml), extraction temperature of 60℃, ultrasonic power of 150 W, extraction times of 2 (each times was 40 min), under this condition the yield rate of flavonoids was 2.93%, and flavonoids content in crude extracts was 15.46%.

Key words Ultrasonic wave; Perilla leaf; Flavonoids; Process

紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Bitt] 属唇形科 1 年生草本植物, 是国家卫生部首批颁布的既是食品又是药品的 60 种中药之一^[1]。紫苏叶中含有 2 种黄酮和 9 种黄酮苷^[2], 黄酮主要是芹菜素和木犀草素, 黄酮苷主要是芹菜素-7-二葡萄糖苷、木犀草素-7-二葡萄糖苷、芹菜素-7-葡萄糖苷、芹菜素-7-咖啡酰葡萄糖苷等。国内外对紫苏叶的研究主要集中在紫苏色素、紫苏精油等方面^[3-4], 而对紫苏叶黄酮的研究较少, 利用现代提取分离技术研究紫苏叶黄酮的研究刚刚起步。笔者采用单因素及正交试验研究超声波提取紫苏叶黄酮的最佳工艺条件, 以期对紫苏叶的利用提供客观的试验依据。

1 材料与试验方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂。紫苏叶采自浙江杭州, 采收后冷冻干燥备用, 使用前磨碎过 60 目筛。乙醇、乙酸、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠等均为分析纯; 芦丁标准品(北京化学试剂厂, Huka 进口分装)。

1.1.2 仪器与设备。KQ 250D 型超声波仪(昆山市超声波仪器有限公司); 752 型分光光度计(上海光谱仪器有限公司); R 201 型旋转蒸发仪(上海申顺生物科技有限公司); ALPHA-4 型冷冻干燥机(德国 Christ 公司)。

1.2 方法

1.2.1 黄酮含量的测定。准确称取 50.0 mg 芦丁置于 100 ml 容量瓶中, 用 95% 乙醇溶解, 再用 30% 乙醇定容至刻度, 摇匀

得浓度为 500 ng/L 芦丁标准液。分别取标准液 0、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 ml 于 6 支 50 ml 的容量瓶中, 用 30% 乙醇补充至 25 ml, 加入 1.4 ml 5% NaNO₂, 摇匀, 放置 5 min 后加入 1.4 ml 10% Al(NO₃)₃, 6 min 后再加入 10 ml 1 mol/L NaOH, 混匀, 用 30% 乙醇定容至刻度, 10 min 后于波长 510 nm 处比色测定吸光度, 参比溶液为空白试剂。以吸光度值(A)为横坐标, 以浓度(C)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程: $C = 91.487A + 0.1939$, $r = 0.9996$, 线性范围为 10~80 μg/ml。称取适量样品置于 50 ml 容量瓶中, 加入 95% 乙醇, 置于超声波仪中振荡使其溶解, 再用 30% 乙醇定容至刻度, 精密吸取 1 ml, 用上述方法测定其吸光度, 根据标准曲线计算样品中黄酮的含量。

1.2.2 超声波提取试验。称取一定量的紫苏叶, 先提取花色苷, 再清洗并过滤, 滤渣干燥。称取一定量的紫苏叶残渣, 加入乙醇, 在一定温度下用超声波提取一段时间, 过滤, 滤液减压浓缩, 冷冻干燥得到紫苏叶黄酮粗提物。紫苏叶黄酮得率 = (粗提物中黄酮总量 / 紫苏叶质量) × 100%, 紫苏叶粗提物中黄酮含量 = (粗提物中黄酮总量 / 粗提物质量) × 100%。

分别考察乙醇浓度、提取温度、超声波功率、料液比、提取时间对紫苏叶黄酮得率的影响。在单因素试验的基础上, 对超声波提取黄酮的主要影响因素(即提取温度、超声波功率、料液比及提取时间)进行 L₁₆(4⁵) 正交试验, 各因素水平如表 1 所示。采用正交试验确定的最佳提取条件, 考察提取次数对紫苏叶黄酮得率的影响。

1.2.3 不同提取方法比较。称取 10.0 g 样品, 采用超声波提取法提取 2 次得到紫苏叶黄酮粗提物。同时, 按传统浸提法, 称取 10.0 g 样品, 以 70% 乙醇为提取剂, 料液比为 1:20

基金项目 “十一五”国家科技支撑计划课题“食品添加剂安全性评价研究”(2006BAK02A05)。

作者简介 胡晓丹(1974-), 男, 湖北宜昌人, 博士, 副教授, 从事食品化学与天然产物化学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-11-24

(g/ml), 在70℃下回流提取3次, 每次提取8h, 合并滤液, 减压低温浓缩, 冷冻干燥得到紫苏叶黄酮粗提物。分别称重, 测定紫苏叶黄酮的得率及粗提物中黄酮的含量。

表1 正交试验设计

Table 1 The design of the orthogonal test

水平 Level	A(提取温度 Extraction temperature)	B(超声波功率 Ultrasonic power W)	C(料液比 Material-liquid ratio g/ml)	D(提取时间 Extraction time min)
1	30	150	1:5	10
2	40	175	1:10	20
3	50	200	1:15	30
4	60	225	1:20	40

2 结果与分析

2.1 乙醇浓度对黄酮得率的影响 分别用30%、40%、50%、60%、70%和80%的乙醇溶液为提取剂提取紫苏叶黄酮, 结果见图1。由图1可知, 黄酮得率随乙醇浓度的增大而增大, 乙醇浓度为30%~70%时增加速率较快, 但大于70%以后增加速率缓慢。另外, 随着乙醇浓度的增加, 提取液中叶绿素等脂溶性杂质的浓度也增加, 这给后续处理带来了较大不便。因此, 经综合考虑选用70%的乙醇溶液进行试验。

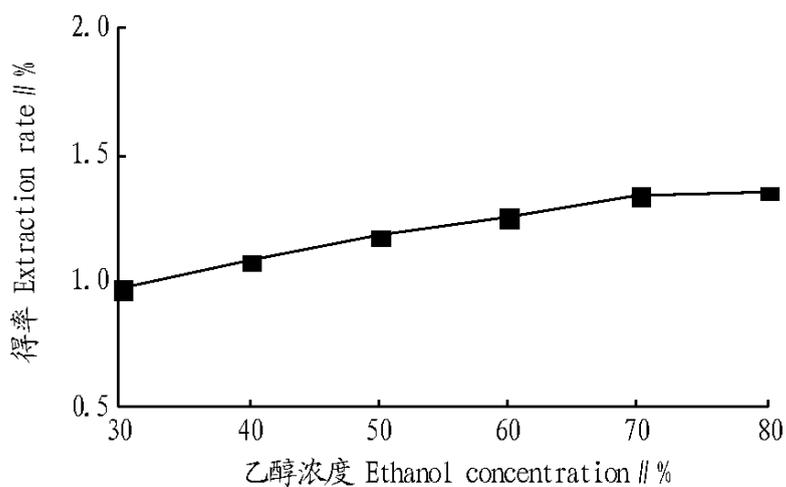


图1 不同浓度乙醇的提取效果

Fig.1 The extraction effects under different ethanol concentration

2.2 提取温度对黄酮得率的影响 分别在30、40、50、60和70℃条件下提取紫苏叶黄酮, 结果见图2。由图2可知, 随温度的上升黄酮得率增加, 但超过60℃后黄酮得率略有下降。这是因为, 温度升高, 一方面可以降低溶剂的粘度, 增大黄酮的溶解度, 从而使得率增大; 另一方面, 温度过高可能对黄酮造成一定程度的破坏, 使黄酮损失, 不利于提取, 从而使得率降低。由此可见, 最佳提取温度是60℃。

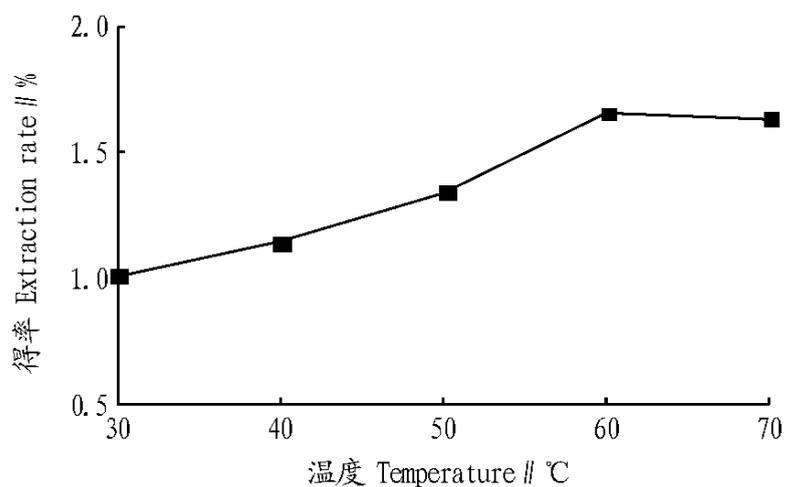


图2 不同温度的提取效果

Fig.2 The extraction effects at different temperature

2.3 超声波功率对黄酮得率的影响 分别在150、175、200、

225和250W超声波下提取紫苏叶黄酮, 结果见图3。由图3可知, 随着超声波功率的增大, 黄酮得率呈上升趋势, 但功率超过200W时, 黄酮得率上升速率明显减慢。超声波功率的增大会增加细胞的破碎程度, 从而增加黄酮的溶出量, 但是功率过大会增加能量的消耗, 增加生产成本。综合考虑, 超声波功率在150~225W范围内比较合适。

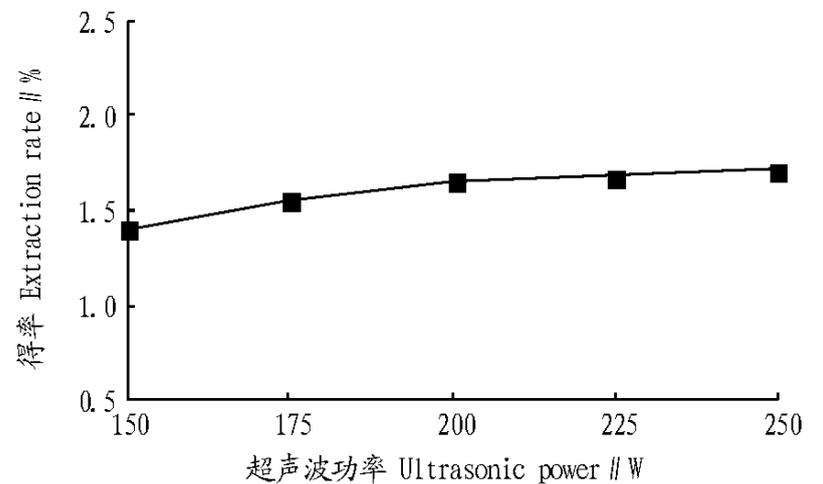


图3 不同超声波功率的提取效果

Fig.3 The extraction effects under different ultrasonic power

2.4 料液比对黄酮得率的影响 分别按料液比1:5、1:10、1:15、1:20和1:25(g/ml)提取紫苏叶黄酮, 结果见图4。由图4可知, 料液比增大黄酮得率也随之增大。料液比从1:5增加到1:15时, 黄酮得率增加速度较快, 但大于1:15时, 增加速率明显变小。另外, 料液比过大不但会增加溶剂的用量, 而且会增大去除溶剂所需负荷。因此, 料液比不宜过大, 应不超过1:20。

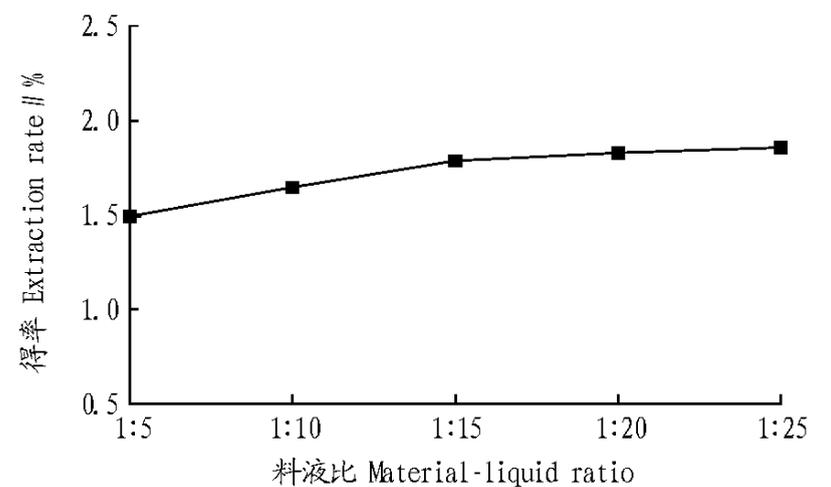


图4 不同料液比的提取效果

Fig.4 The extraction effects with different material-liquid ratio

2.5 提取时间对黄酮得率的影响 分别对紫苏叶黄酮提取10、20、30、40和50min, 结果见图5。由图5可知, 得率随提取时间的延长增大。但是, 当时间超过30min后得率增加的速度较慢。从节省时间的角度考虑, 确定提取时间在10~40min范围内比较合适。

2.6 正交试验结果 在单因素试验的基础上, 进行 $L_{16}(4^5)$ 正交试验, 以紫苏叶黄酮得率为试验指标, 试验结果见表2。由表2可知, 各因素对紫苏叶黄酮得率的影响由大到小依次为: 提取温度>提取时间>料液比>超声波功率。在试验设定的范围内, 最佳方案为 $A_4B_1C_4D_4$, 即以70%乙醇为提取溶剂, 料液比为1:20(g/ml), 在60℃下经150W超声波提取40min。

2.7 提取次数对黄酮得率的影响 在正交试验结果的基础上, 对紫苏叶黄酮分别提取1、2、3和4次, 结果见图6。由图6可知, 随着提取次数的增加, 黄酮得率增加, 但超过2次后得率变化不大。因此, 从节约成本及提高提取效率的角度考

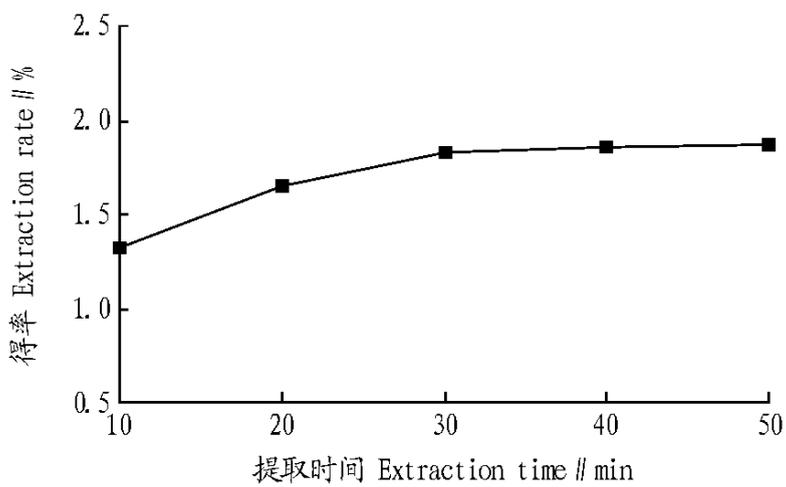


图5 不同提取时间的提取效果

Fig.5 The extraction effects of different extraction time

虑,以提取2次为宜。

表2 正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal experiment

序列号 No.	A 提取温度 Extraction temperature	B 超声波功率 Ultrasonic power W	C 料液比 Material-liquid ratio g/ml	D 提取时间 Extraction time min	黄酮得率 Extraction rate %
1	1	1	1	1	0.96
2	1	2	2	2	1.33
3	1	3	3	3	1.68
4	1	4	4	4	2.04
5	2	1	2	3	1.67
6	2	2	1	4	1.89
7	2	3	4	1	1.57
8	2	4	3	2	1.91
9	3	1	3	4	2.29
10	3	2	4	3	2.23
11	3	3	1	2	1.63
12	3	4	2	1	1.66
13	4	1	4	2	2.22
14	4	2	3	1	1.85
15	4	3	2	4	2.53
16	4	4	1	3	2.24
K ₁	6.01	7.14	6.72	6.04	
K ₂	7.04	7.30	7.19	7.09	
K ₃	7.81	7.41	7.73	7.82	
K ₄	8.84	7.85	8.06	8.75	
k ₁	1.50	1.79	1.68	1.51	
k ₂	1.76	1.83	1.80	1.77	
k ₃	1.95	1.85	1.93	1.96	
k ₄	2.21	1.96	2.02	2.19	
R	0.71	0.17	0.34	0.68	

2.8 不同提取方法比较 超声波提取与传统浸提法的提取效果见表3。由表3可知,采用超声波提取的黄酮得率比传

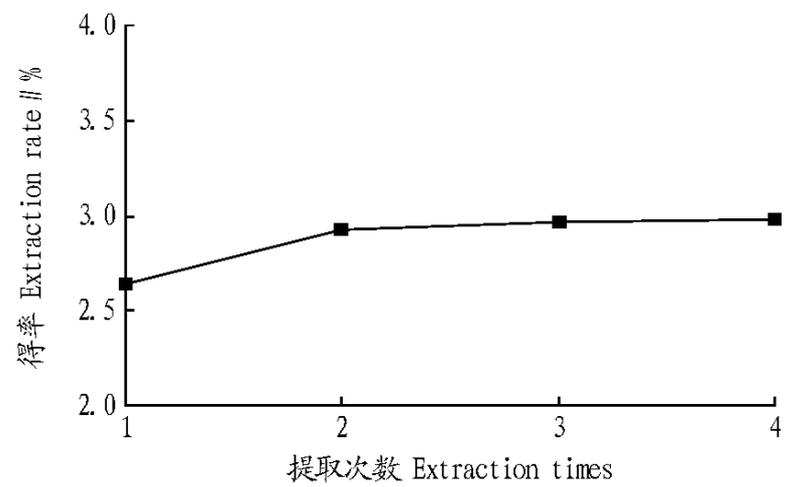


图6 不同提取次数的提取效果

Fig.6 The extraction effects of different extraction times

统浸提法高0.51个百分点,提取剂用量少1/3,而提取物中黄酮的含量相当。传统浸提法的提取时间为24 h,超声波提取时间为80 min,仅为传统浸提法的1/18。因此,超声波提取可大大缩短提取时间,提高提取效率。

表3 2种提取法比较

Table 3 The comparison between two kinds of extraction methods

提取方法 Extraction method	提取剂用量 ml Volume of extraction solvent	提取时间 h Extraction time	得率 % Extraction rate	黄酮含量 % Flavone content
超声波提取法 Ultrasonic extraction	400	1.33	2.93	15.46
传统浸提法 Traditional extraction	600	24.00	2.42	15.38

3 结论与讨论

与传统浸提法相比,超声波提取紫苏叶黄酮可有效缩短提取时间,提高提取效率,是一种行之有效的提取手段。通过单因素和正交试验,得到了超声波提取紫苏叶黄酮的最佳工艺条件:以70%乙醇为提取溶剂,料液比为1:20(g/ml),在60℃下经150 W超声波提取2次,每次40 min。在该条件下,紫苏叶黄酮得率为2.93%,粗提取物中黄酮含量为15.46%。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会. 中国药典(二部) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 301.
- [2] FUJITA T, NAKAYAMA M. Monoterpene glucosides and other constituents from *Peilla frutescens* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 34(6): 1545.
- [3] 刘建辉, 陈兰贵. 紫苏油中主要化学成分的分离和鉴定 [J]. 香料香精化妆品, 1998(1): 19-20.
- [4] YOSHIDA K, KAMEDA K, KONDO T. Digucuronolignans from purple leaves of *Peilla ocinoides* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 33(4): 917.

(上接第2032页)

降低,8月又开始逐渐增加,8月底达到最高,之后开始下降。水煎物和多糖含量的变化也有相似的规律。

由表2可知,1年生玉竹质地较嫩、水份含量较大,折干率较低,2、3年生玉竹的折干率、水煎物和多糖含量较高。

3 结论与讨论

根与根茎类药材多应在早春或晚秋季节采收,这时干物质积累较高。但具体采收时间与药材的种类及温度等有

关。温度低时,玉竹地上部枯萎较早,故应早采收。该试验结果表明,东北地区玉竹的适宜采收期为8月底至9月初。在这期间采收的玉竹质量好,折干率和多糖含量高。3年生玉竹质量最好,2年生玉竹次之。

参考文献

- [1] 刘塔斯. 玉竹 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 82.
- [2] 龚千锋. 中药炮制学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 392.
- [3] 张永清, 丁少纯. 干燥方法对玉竹药材质量的影响 [J]. 基层中药杂志, 1998(4): 14-16.