

超声波辅助提取荆芥叶中总黄酮的方法研究

游新侠, 仇农学

(陕西师范大学 食品工程系, 陕西 西安 710062)

摘要: 本试验运用超声波辅助技术提取荆芥叶中的总黄酮, 用亚硝酸钠-硝酸铝比色法测定总黄酮的含量。通过单因素试验、正交试验、对照试验, 确定荆芥中总黄酮提取的最佳方案: 超声功率 700 W, 荆芥质量 2.00 g, 温度 45 ℃; 物料比 1:60, 乙醇浓度 70%, 提取时间为 15 min。最后得荆芥中总黄酮的最大提取率为 1.592%。

关键词: 超声波技术; 荆芥叶; 总黄酮

中图分类号: Q947.8

文献标识码: A

文章编号: 1008-3111(2006)01-0013-03

Study On Extraction of Total Flavone From Fineleaf Schizonepeta Herb by Ultrasonic wave

YOU Xin-xia and QIU Nong-xue

(Food Engineering Department, Shanxi Normal University, xi'an, shanxi 710062, China)

Abstract: The article introduce the best method of extracting total flavone in fineleaf schizonepeta herb with ultrasonic, and measure the total flavone content that was 1.703% in fineleaf schizonepeta herb with colorimetry. According to the result orthogonal design, the best reaction condition was: time of extracting 15 min, temperature 45 ℃, alcohol=70%, solid(g):liquid(mL) = 1:60, the reaction was fast and result is satisfied.

Key words: ultrasonic wave; Fineleaf schizonepeta herb; Total flavone

荆芥 (*Schizonepetatenuifolia* (Benth) Briq) 原名假苏, 始载于《本经》, 为唇形科植物裂叶荆芥和多裂叶荆芥的茎叶和花穗。来源广泛, 民间用于治疗祛风、解表、透疹和止血。近年研究表明荆芥具有解热降温、镇静、镇痛、抗炎、止血、抑制心肌收缩、祛痰平喘、抗氧化等药理作用。目前从荆芥中分离得到的主要化学成份有酚类、酸类、黄酮类化合物, 穗状花序含有单萜类化合物。

将超声波应用于提取植物的有效成分, 利用超声波产生的强烈振动、高加速度、强烈的空化效应、搅拌作用等, 都可加速有效成分进入溶剂, 从而提高提出率, 缩短提取时间, 并且避免高温对提出成分的影响。我们首次运用超声波技术辅助提取并测定荆芥叶中总黄酮的含量, 反应速度快, 试验结果令人满意。

1 材料和方法

1.1 试验仪器、材料 SHB-III 型循环水式多用真空泵; 郑州长城科工贸有限公司; RE-52AA 旋转蒸发

器; 上海亚荣生化仪器厂; 800B 离心机; 上海安亭科学仪器厂; JA1203 电子天平; 上海精科天平; WFJ 2000 型分光光度计; 尤尼柯仪器有限公司; JY98-3D 型超声波细胞粉碎机; 宁波新芝生物科技股份有限公司; 5% NaNO₂、10% Al(NO₃)₃、4% NaOH、石油醚 (60℃~90℃沸点) 等均为分析纯; 芦丁标准品: Sigma 公司; 荆芥: 购于西安农贸市场。

1.2 试验方法

1.2.1 测定方法原理 以芦丁为对照品测定荆芥叶中总黄酮含量, 加入铝离子试剂, 使黄酮化合物与铝盐形成络合物在可见区能获得稳定的特征吸收峰。

1.2.2 标准曲线绘制 精密称取芦丁对照品 10 mg, 置 25mL 容量瓶中加 80% 乙醇溶解, 定容, 精密吸取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中, 加 5% 亚硝酸钠 0.3 mL, 放置 6 min, 再加 10% 硝酸铝 0.3 mL, 放置 6 min, 加 4% 氢氧化钠 4 mL, 加水至 10 mL, 摇匀。510 nm 处测

收稿日期: 2005-09-01

作者简介: 游新侠 (1983-), 女, 河南周口人, 陕西师范大学在读硕士。

其吸光度。以 510 nm 处测得的吸收度 $A(y)$ 对浓度 $C(x)$ 回归, 得回归方程: $y = 9.5796x + 0.0029$, $R^2 =$

0.9995。在 8~64 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内, 浓度与吸收度有良好的线性关系。如表 1 所示:

表 1 芦丁标准溶液的吸光度值

标液浓度(mg/mL)	0.0000	0.0080	0.0160	0.0240	0.0320	0.0400	0.0480	0.0560	0.0640
吸光度值	0.0000	0.0750	0.1580	0.2409	0.3130	0.3871	0.4551	0.5396	0.6160

1.2.3 试验步骤 荆芥叶(2.00 g)→浸泡→超声提取→过滤→蒸发浓缩→萃取→定容(100 mL)→吸取 2 mL 定容至 10 mL, 测定吸光度值, 找出最优工艺, 测定黄酮提取量。

1.2.4 测定中主要影响因素的确定 试验选择乙醇为提取剂, 发现荆芥在乙醇中浸泡时间超过 24 h, 再延长浸泡时间则对黄酮提取率影响不大, 因此本试验主要讨论乙醇浓度, 物料比(物料质量/克与乙醇体积/毫升之比), 超声时间和温度对荆芥中黄酮提取率的影响。从试验过程中可看出, 0%~60%乙醇溶液提取液为棕黄色, 65%~95%的提取液为绿色至墨绿色。说明乙醇浓度超过 65%, 荆芥中的叶绿素也被提取了出来, 而叶绿素对紫外吸收有干扰, 使测量结果偏高, 故本试验采取以下措施避免这种现象: 将提取液浓缩, 用 60℃~90℃沸程的石油醚萃取 3 次, 去除叶绿素后再进行测定, 效果较好, 重现性和稳定性都有所提高。

2 试验结果

2.1 单因素的影响

2.1.1 物料比对黄酮提取率的影响 称取物料 2.00 g, 用 80% 的乙醇分别按 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 的物料比浸泡 24 h, 在超声功率 700 W、45℃条件下提取 15 min, 每个物料比分别取 3 次, 按 1.2.3 步骤测定, 求平均值。结果如图 1, 表明随着物料比的增大吸光度变大, 但是当 1:60 以后增加缓慢, 并且随着物料比的增大叶绿素干扰影响变大, 所以选择物料比为 1:60。

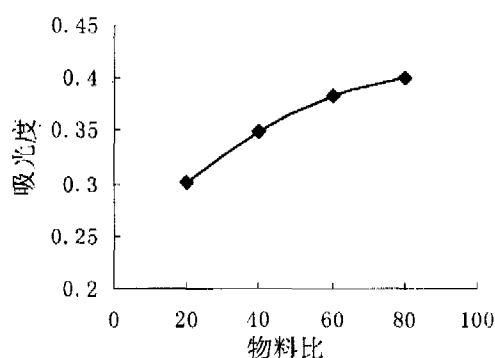


图 1 物料比和吸光度的关系

2.1.2 乙醇浓度对黄酮提取率的影响 称取物料 2.00 g, 分别用 20%, 40%, 60%, 80% 浓度的乙醇以 1:60 的物料比浸泡 24 h, 在超声功率 700 W、45℃下超声提取 15 min, 每一浓度的乙醇分别取 3 次, 按 1.2.3 步骤测定, 求平均值。结果如图 2, 表明随着乙醇浓度的增加吸光度变大, 但当乙醇浓度到 70% 以后增加缓慢, 并且随着乙醇浓度的增大叶绿素干扰影响变大, 故本试验选择 70% 的乙醇浓度。

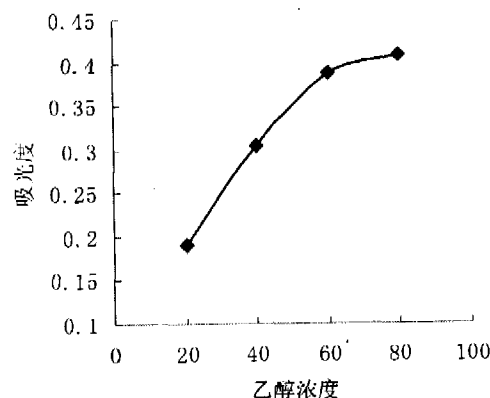


图 2 乙醇浓度对吸光度的影响

2.1.3 温度对黄酮提取率的影响 称取物料 2.00g, 用 70% 的乙醇按 1:60 的物料比浸泡 24 h, 在 700 W 的超声功率下, 分别以 30℃, 40℃, 45℃, 50℃ 的温度提取 15 min, 每一温度提取液分别取 3 次, 按 1.2.3 步骤测定, 求平均值。结果如图 3, 表明随着提取温度的升高吸光度有所增加但不明显, 当温度超过 45℃ 时增加更缓慢, 为了节省时间并且对提取物成分影响小, 本试验选择提取温度为 45℃。

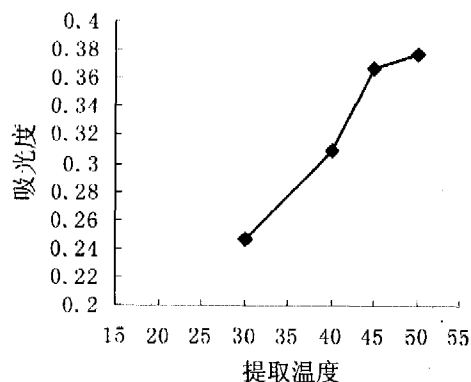


图 3 提取温度对吸光度的影响

2.1.4 提取时间对黄酮提取率的影响 称取物料

2.00 g,用70%的乙醇按1:60的物料比浸泡24 h,在超声功率700 W,提取温度45℃的条件下,分别提取10、15、20、25 min,每一提取液取3次,按1.2.3步骤测定,求平均值。结果如图4,表明随着时间的延长提取率变大,而后稍微有所降低,这可能是由于提取时间过长,荆芥叶中成分有所损失的缘故,但考虑提取效率,本试验选择提取时间为15 min。

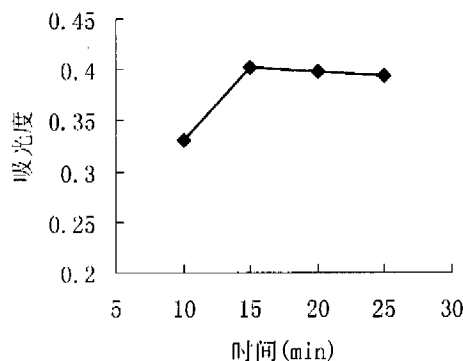


图4 时间对提取率的影响

2.2 正交试验确定提取的最佳条件 结合前面所做的单因素试验,选择物料比、乙醇浓度、提取温度、提取时间为影响因素,黄酮提取率为判断指标,做正交试验,其因素水平设置见表2。选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验方案设计,试验结果与方差分析见表3。

表2 因素水平表

水平	因素			
	时间/A (min)	物料比/B (g:mL)	乙醇浓度/C (%)	温度/D (℃)
1	10	1:40	60	40
2	15	1:60	70	45
3	20	1:80	80	50

表3 正交试验结果表

试验号	因素				吸光度 A
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.274
2	1	2	2	2	0.611
3	1	3	3	3	0.357
4	2	1	2	3	0.524
5	2	2	3	1	0.463
6	2	3	1	2	0.382
7	3	1	3	2	0.348
8	3	2	1	3	0.414
9	3	3	2	1	0.462
K_1	1.242	1.119	1.070	1.199	
K_2	1.369	1.388	1.597	1.340	$R_C > R_B > R_D > R_A$
K_3	1.221	1.201	1.168	1.296	
R	0.127	0.369	0.427	0.196	

由表2表3极差分析可知,正交试验中各因素

对提取结果的影响和前面的单因素试验结果趋势相同。4种因素对提取结果影响大小依次为:乙醇浓度C>物料比B>温度D>时间A,其中因素乙醇浓度对黄酮的提取率影响最大,其次是物料比,从表可以看出70%乙醇,1:60的物料比,15 min的超声时间,45℃温度提取的条件最好,提取率最高,所以最佳组合为 $A_2B_2C_2D_2$ 。

2.3 计算 在700 W的功率下,按最佳组合 $A_2B_2C_2D_2$ 的条件进行提取,提取后的溶液准确吸取2 mL,按1.2.3项中方法配制于10 mL的容量瓶中,于510 nm处测得吸光度为0.613。与标准曲线对照得到总黄酮浓度为0.0637 mg/mL,提取率按下式计算:

$$E\% = m/M \times 100\%$$

E%——提取率;

m——经换算后提取液中黄酮质量(g);

M——样品质量(g);

所以黄酮的最大提取率 $E\% = C \times 10 \times 50 / 2000 \times 100\%$

$$= 0.0637 \times 10 \times 50 / 2000 \times 100\%$$

$$= 1.592\%$$

3 结论

试验结果表明随着物料比的增大吸光度变大,但当1:60时以后增加缓慢且会使叶绿素提取出来,使吸光度偏高;随着乙醇浓度的增加吸光度变大,但当80%以后增加缓慢且也对叶绿素的影响较大,会使结果偏高;随着提取温度的增加吸光度有所增加但不是很明显,当超过45℃是增加更加缓慢,为了节省时间快速提取且提取物成分不受影响,一般选择45℃为好;试验结果表明随着时间的延长提取率变大,而后又稍微有所降低,可能是由于时间过长成分有所损失造成的,具体原因有待研究。

通过正交试验、验证试验和对照试验,确定荆芥总黄酮提取的最佳方案为:荆芥粉末2.00g;温度为45℃;物料比为1:60;乙醇浓度70%;提取时间为15 min,提取率最高可达1.592%。

参考文献:

- [1] 《中华本草》编委会.《中华本草》[M].上海:上海科学技术出版社,1999:194-199.
- [2] 王铮敏.超声波在植物有效成分提取中的应用[J].三明高等专科学校学报,2002,19(4):45-53.
- [3] 庄向平,虞杏英,杨更生,等.银杏叶中黄酮含量的测定和提取方法[J].中草药,1992,23(3):122-124.
- [4] 江相兰.楠竹叶黄酮类物质提取工艺的研究[J].四川师范大学学报,2005,28(4):231-234.