

超声辅助萃取法提取北方地区早园竹中总黄酮的工艺研究

张珊珊¹, 赵晓红^{2,*}

(1. 首都师范大学生命科学学院, 北京

100037; 2. 北京联合大学应用文理学院, 北京

100083)

摘要: 研究了超声辅助萃取法提取北方地区早园竹叶中黄酮的工艺。通过单因素试验确定了影响总黄酮得率的主要因素及其最佳水平范围, 通过正交试验确定了最佳萃取条件。结果表明: 用物料比为 1:15 (原料质量比溶剂体积比) 80% 的乙醇, 在 70℃、500W 的超声强度下萃取 125min, 可以使总黄酮得率达到 2.4%。

关键词: 竹叶; 超声; 总黄酮; 提取

Ultrasonic-assisted Extraction Process of Flavones from North *Ph. praecox* Leaf

ZHANG Shan-shan¹, ZHAO Xiao-hong^{2,*}

(1. College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100037, China;

2. College of Art and Science, Beijing Union University, Beijing 100083, China)

Abstract: The ultrasonic-assisted extraction process of flavones from *Ph. praecox* leaf growing in the northern of China was studied. The main factors influencing the flavones extraction and their best levels were confirmed by the single factor analysis. And the optimum condition was confirmed by the orthogonal test. The results showed that the flavones extraction efficiency is 2.4% when the proportion of stuff mass is 1:15, ethanol volume is 80%, extraction time is 125 min, temperature is 70℃ and the power of ultrasonic is 500 W.

Key words bamboo leaf; ultrasonic; flavone; extraction

中图分类号: 0658.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0147-05

竹子是禾本科多年生常绿植物, 是当今世界上最具有使用价值的植物之一, 全世界约有 70 多属, 1200 多种, 竹林面积约 20000 万 hm^2 (约 3 亿亩)^[1]。

近年来的研究表明, 竹叶中含有大量的黄酮、酚酸、葱醒、多糖、香豆素类、特种氨基酸、芳香成分和锰、锌、硒等微量元素^[2]。竹叶黄酮的药理作用与银杏黄酮相似^[2]。具有明显的抗脂质过氧化、清除羟自由基、调节血脂及明显的抑菌作用^[3]。

竹叶黄酮制剂以 C-糖苷黄酮为主, 具有结构稳定、亲水性强、能深入病灶部位等特点, 工艺品质优良, 适宜于多种药物剂型的开发^[4]。现对竹叶黄酮的提取方法有很多种^[4]。大量文献报道了索氏提取法提取黄酮。近年也有报道用超声波法从槐花、蜂胶、花粉及南方地区竹叶中提取黄酮, 并表明超声波法优于索氏提取法。与热提取法相比, 超声波法在常温下提取, 有利

于对热不稳定的黄酮化合物的提取, 而且超声波提取速度较快^[5-7]。本研究采用超声辅助技术萃取竹叶黄酮, 找出最优的提取条件, 为对北方地区竹叶资源的利用及竹叶黄酮工业化生产工艺的建立提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

UV-2450 紫外分光光度计 日本岛津公司; 超声波发生器 昆山市超声仪器有限公司; HZS-H 恒温振荡水浴锅 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司; FW-100 万用植物样品粉碎机 天津泰斯特仪器有限公司; DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司; 5804R 冷冻离心机 德国 Eppendoyf 公司; LA612 型超纯水系统 美国 PALL 公司; KQ-500DE 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; 电子天平 北京赛

收稿日期: 2007-07-01

*通讯作者

基金项目: 北京市教育委员会科技发展计划面上项目 (KM200711417012)

作者简介: 张珊珊 (1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子细胞生物学。

多利斯天平有限公司; 加热磁力搅拌器 德国 IKA 公司。

1.2 试剂

芦丁标准品(供UV法, 91.7%含量测定用) 中国药品生物制品检定所; 无水乙醇、硝酸铝、NaOH 北京化工厂; 亚硝酸钠 中国上海试剂一厂。所用试剂均为分析纯。

1.3 材料

早园竹(*P. praecox* C. d. Chu et C. S. Chao), 2006年11月采摘于北京市鹰山森林公园。将竹叶按照新生竹叶、老生竹竹叶和落叶分别采摘分放。

1.4 方法

1.4.1 芦丁标准液的配制^[8]

准确称取芦丁标准品0.0273g(含量为91.7%)于30%乙醇溶解, 定容至25ml。准确吸取标准液0、0.4、0.8、1.6、2.4、3.2、4ml 分别置于10ml 容量瓶中, 加5% NaNO_2 溶液0.3ml 摇匀, 放置6min, 加10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液0.3ml 摇匀, 放置6min, 加入4% NaOH 溶液4ml, 再用30%乙醇定容并摇匀, 放置10min。置比色皿中在波长400~600nm 之间测定吸收光谱, 确定最大吸收波长为510nm, 在510nm 条件下测定吸光度。

1.4.2 竹叶总黄酮的萃取

按以下流程萃取竹叶黄酮: 竹叶→晒干→80目过筛→超声辅助提取→过滤→定容→定量分析

采摘的竹叶自然风干5d, 分别粉碎机粉碎, 80目过筛后分装于广口瓶, 于烘箱55℃烘10h。

准确称取2g 竹叶粉末于100ml 具塞三角烧瓶中, 按要求加入萃取溶剂, 在一定温度、超声强度、时间下萃取, 过滤。

1.4.3 提取样液测定与黄酮类物质提取量的计算

将提取液无损转入10、25、50ml 或100ml 容量瓶(以提取液的量为标准), 并以相应的浸提溶剂定容, 然后移取0.50ml 分别用上述芦丁标准液显色剂加入方法加入试剂, 于510nm 处测定吸光度。由回归方程计算出测定样品液黄酮浓度, 经计算得出提取竹叶干样所得黄酮类物质的量(mg/g)。

1.4.4 最佳提取条件的确定

采用正交试验来确定竹叶总黄酮类物质最佳提取条件。采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验表, 分别以超声提取时间、乙醇浓度、液料比、超声强度, 乙醇浓度作为试验因素, 各设置四水平试验, 以确定竹叶总黄酮物质的最佳提取条件。

2 结果与分析

2.1 工作曲线与线性回归方程

对1.4.1配制的芦丁标准溶液的不同浓度在510nm处测定吸光度, 以芦丁浓度C 为横坐标, 吸光度A 为纵坐标绘制标准测定点的散点图(见图1)。

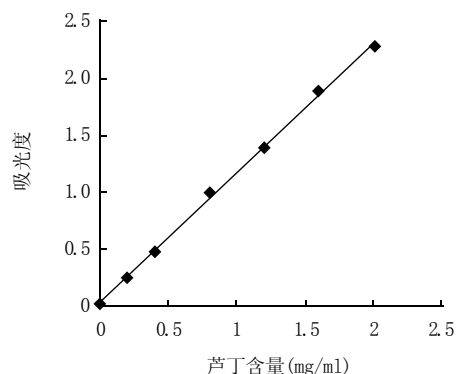


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 Standard curve of rutin

标准曲线方程: $Y=1.1442X+0.0237$, $R^2=0.9989$ 。

2.2 影响黄酮提取效率的单因素条件的确定

2.2.1 乙醇体积分数对黄酮类化合物提取的影响

取竹叶粉末2g, 加入物料比为1:10(质量比)的不同浓度的乙醇在60℃、300W 超声波功率下萃取50min, 萃取一次, 过滤, 定容, 计算总黄酮得率。不同乙醇浓度对黄酮提取率的影响见图2。由图2可以看出, 黄酮提取率随乙醇体积分数的增大而增大, 乙醇体积分数在40%~60% 范围内增加显著, 而大于60% 时, 黄酮收率增加开始趋于平稳, 在80% 时黄酮收率最大, 在80% 以后再次出现收率降低。

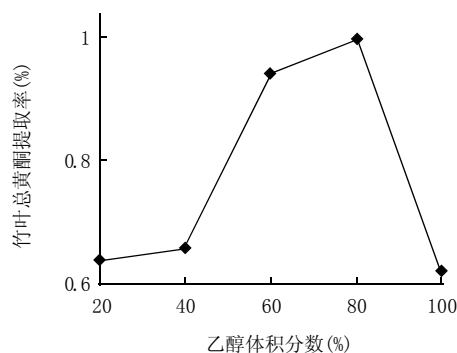


图2 乙醇体积分数对黄酮类化合物提取的影响

Fig.2 Effects of ethanol volume on flavonoids extraction efficiency

2.2.2 浸提温度对黄酮类化合物提取的影响

取竹叶粉末2g, 加入物料比为1:10(质量比)的60%乙醇在不同温度下、300W 超声波功率下萃取50min, 萃取一次, 过滤, 定容, 计算总黄酮得率, 得到黄酮提取率与浸提温度间关系(见图3)。结果显示, 黄酮提取

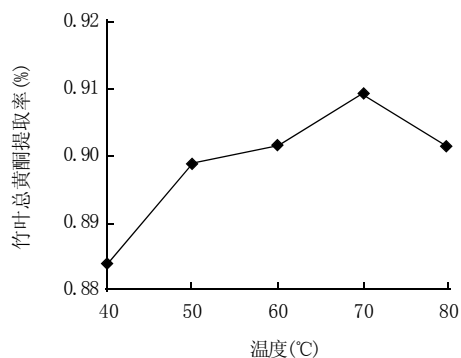


图3 浸提温度对黄酮类化合物提取的影响

Fig.3 Effects of temperature on flavonoids extraction efficiency

率随浸提温度的增大而增大,当浸提温度为70℃时,黄酮收率最高。从80℃以后黄酮收率反而有所下降。

2.2.3 浸提时间对黄酮类化合物提取的影响

取竹叶粉末2g,加入物料比为1:10(质量比)的60%乙醇在60℃、300W超声波功率下萃取50min,萃取一次,过滤,定容,计算总黄酮得率,得到得率与浸提时间的关系图(图4)。实验结果表明,黄酮收率随浸提时间的增加而增大。但在100min以后增长开始缓慢。

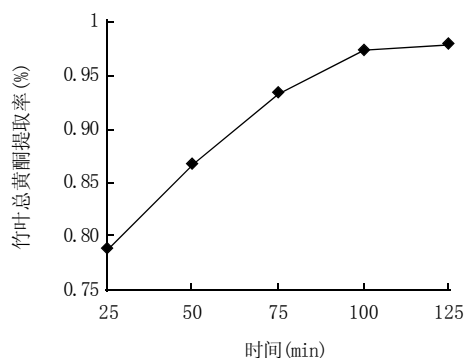


图4 浸提时间对黄酮类化合物提取的影响

Fig.4 Effects of extraction time on flavonoids extraction efficiency

2.2.4 物料液比对黄酮类化合物提取的影响

取竹叶粉末2g,加入不同物料比的60%乙醇,在60℃、300W超声波功率下萃取50min,萃取一次,过滤,定容,计算总黄酮得率,得到黄酮提取率与物料比的关系图(图5)。结果表明,当物料比超过1:15(质量比)时,黄酮收率趋于平稳。从节省溶剂角度出发,我们认为采取1:15的物料比为最佳条件。

2.2.5 超声强度对黄酮类化合物提取的影响

取竹叶粉末2g,加入物料比为1:10(质量比)的60%乙醇,在60℃、不同超声功率下萃取50min,萃取一次,过滤,定容,计算总黄酮得率,得到得率与

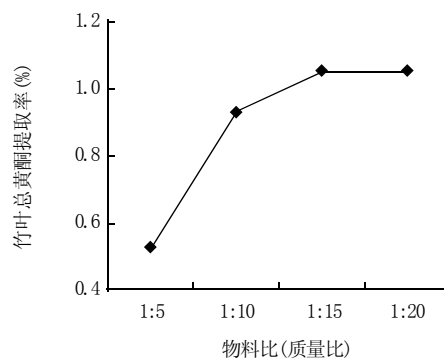


图5 物料液比对黄酮类化合物提取的影响

Fig.5 Effects of proportion of stuff mass on flavonoids extraction efficiency

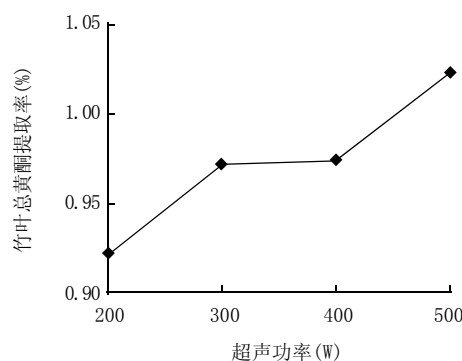


图6 超声强度对黄酮类化合物提取的影响

Fig.6 Effects of power of ultrasonic on flavonoids extraction efficiency

超声强度的关系图(图6)。结果表明,黄酮收率随超声强度的增大而增大,在我们的超声提取器的最大工作效率下(500W)总黄酮收率最高。

2.3 最佳提取条件的确定

根据以上单因素试验确定的各个因素大致范围,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验表设计正交试验(见表1),正交试验结果及分析见表2、3。

表1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素				
	浸提时间 (min)	浸提温度 (°C)	浓度 (%)	超声强度 (W)	物料比 (质量比)
1	50	80	80	500	1:5
2	75	70	60	400	1:10
3	100	60	40	300	1:15
4	125	50	20	200	1:20

由结果分析可以看出,各因素对总黄酮提取率影响的主次顺序为 $C > E > B > D > A$ 。即乙醇浓度>物料比>温度>超声强度>时间。最佳条件为 $A_4B_2C_1D_4E_3$,即在萃取时间为125min,萃取温度70℃,浓度80%,

表2 正交提取试验方案及结果分析
Table 2 Design and results of orthogonal test

试验号	因素					实验结果 (mg/g)
	A 浸提时间 (min)	B 浸提温度 (°C)	C 浓度 (%)	D 超声强度 (W)	E 物料比 (质量比)	
1	1	1	1	1	1	10.69
2	1	2	2	2	2	15.72
3	1	3	3	3	3	14.60
4	1	4	4	4	4	14.36
5	2	1	2	3	4	15.59
6	2	2	1	4	3	22.33
7	2	3	4	1	2	10.57
8	2	4	3	2	1	11.18
9	3	1	3	4	2	13.73
10	3	2	4	3	1	9.97
11	3	3	1	2	4	17.64
12	3	4	2	1	3	15.48
13	4	1	4	2	3	13.44
14	4	2	3	1	4	16.76
15	4	3	2	4	1	12.32
16	4	4	1	3	2	19.90
均值 1	13.842	13.363	17.640	13.375	11.040	
均值 2	14.918	16.195	14.778	14.495	14.980	
均值 3	14.205	13.783	14.068	15.015	16.462	
均值 4	15.605	15.230	12.085	15.685	16.088	
极差	1.763	2.832	5.555	2.310	5.422	

表3 正交试验各因素方差分析表
Table 3 Variance analysis of orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F	p
时间	7.334	3	1.000	>0.05
温度	20.534	3	2.800	>0.05
浓度	63.499	3	8.658	>0.05
超声强度	11.416	3	1.557	>0.05
物料比	73.969	3	10.086	<0.05
误差	7.33	3		

超声强度 500W，物料比为 1:15。分析结果也显示，五种因素对提取率的影响趋势与单因素试验结果所示趋势相同。其中物料比对试验具有显著性影响($p < 0.05$)。

2.4 正交最佳方法与回收率实验

将正交试验得到的最佳条件进行验证。在该条件下重复萃取三次实验，计算总黄酮提取量。

在上述样品中，分别加入 0.4ml 的芦丁标准品 (0.5mg/ml)，按 1.4.1 溶液制备方法，分别测定吸光度，计算回收率。

表4 最佳提取率及加标回收率
Table 4 Best extraction rate of total flavones and result of recovery test

样品号	总黄酮提取量 (mg/g)	平均提取量 (mg/g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	23.93		102	
2	24.18	24.39	96.7	98.6
3	25.08		97.1	

从表 4 可以看出，该方法的总黄酮的平均得率为 24.39mg/g，比正交表中最佳提取率 (22.33mg/g) 高 8.45%。平均回收率在 98.6%，说明我们的实验采用的分析方法的准确度较高。

3 讨论

文献[9]中报道不同竹叶总黄酮含量在 1.18%~2.02% 之间。我们实验中提取效率为 2.44%，明显高于文献 40% 左右。分析认为：首先超声有利于物质的溶出。其次，黄酮类物质是一类具有广泛生物活性的植物次生代谢产物，它们属于多酚类化合物家族，参与植物生长繁殖过程，有利于植物生存、防御病源或天敌的侵犯^[10]。竹子源产地为中国南方，为了适应北方寒冷的气候，需产生一定物质对抗寒冷。由于目前北方地区竹叶中黄酮含量还没有文献记载，我们推测实验原料的采集时间(冬天)和竹子生长地区对竹叶中黄酮类物质的含量有较大影响。接下来需要进行同品种的竹叶在不同季节、不同生长区的竹叶黄酮含量比较实验研究以论证推测。

从实验结果可以看出，在其他条件不变的情况下，提取时间 100min 和 125min 的提取效率相差不大，所以可以考虑在大量生产时，提取时间定在 100min，这样可以节省能源。同时实验纯化前的提取液中含有大量的叶绿素，在减压蒸馏蒸出乙醇的过程中，叶

盐渍对双孢菇多糖的影响

杨立红, 刘林德, 王晓洁, 屈慧鸽, 马秋慧, 蔡德华

(鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘 要: 将盐渍和未盐渍的双孢菇分别经热水提取、乙醇沉淀得粗多糖, 结果表明未盐渍双孢菇粗多糖的得率比盐渍双孢菇粗多糖高 2 倍。两份粗多糖经 Sevag 法除去蛋白质后上 DEAE-纤维素柱层析, 分别用蒸馏水和 0.05mol/L NaCl 溶液洗脱, 得到多糖纯品组分 Ab-I、Ab-I' 和 Ab-II、Ab-II'。SephacroseCL-4B 测得盐渍与未盐渍双孢菇多糖的 Ab-I 和 Ab-I' 分子量均为 7.79×10^4 。红外光谱分析表明盐渍处理对双孢菇多糖结构未产生显著影响。多糖抗氧化能力测定的结果表明未盐渍双孢菇多糖的粗品和纯品的抗氧化能力均比盐渍双孢菇多糖的高。

关键词: 双孢菇; 盐渍蘑菇; 多糖; 分离鉴定; 抗氧化

Effects of Salting on Extraction of *Agaricus bisporus* Polysaccharides

YANG Li-hong, LIU Lin-de, WANG Xiao-jie, QU Hui-ge, MA Qiu-hui, CAI De-hua

(College of Biological Science and Technology, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: The salted and the not-salted *Agaricus bisporus* were extracted by hot water and then deposited by ethanol. Determination results displayed that the extraction rate of crude polysaccharides of the not-salted *Agaricus bisporus* was 2 times higher than that of the salted. The DEAE cellulose column chromatography was used on polysaccharides purification after the protein was extracted with Sevag method. Pure polysaccharides namely Ab-I, Ab-I' and Ab-II, Ab-II' were isolated by distilled water and 0.05 mol/L solution of NaCl eluent respectively. The Sepharose CL-4B method showed that molecular weight of Ab-I and Ab-I' were both 7.79×10^4 . Infrared ray (IR) assays showed that the process of salting didn't change the structure of *Agaricus bisporus* polysaccharides obviously. The determination results of anti-oxidant capacity of polysaccharides indicated that the anti-oxidant capacity of the crude and pure polysaccharides of not-salted *Agaricus bisporus* were both higher than that of the salted.

Key words *Agaricus bisporus*; salted mushroom; polysaccharides; isolation and identification; anti-oxidation

中图分类号: TS205.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0151-04

收稿日期: 2007-07-11

基金项目: 山东省教育厅科技计划项目(J06N02)

作者简介: 杨立红(1959-), 女, 教授, 主要从事生物化学及生物活性物质开发应用研究。

绿素自然析出, 这是由于叶绿素溶于有机溶剂, 不宜溶于水中。叶绿素可以作为另一个副产物进行开发利用。

参考文献:

- [1] 张英. 天然功能性竹叶提取物——竹叶黄酮[J]. 中国食品添加剂, 2002(3): 54-58.
- [2] 陆志科, 谢碧霞. 竹叶活性成分分析及其提取物抗菌效果[J]. 中南林学院学报, 2004(4): 70-74.
- [3] 陆柏益, 张英, 吴晓琴. 竹叶黄酮的抗氧化性及其心脑血管药理活性研究进展[J]. 林产化学与工业, 2005(3): 120-124.
- [4] 李瑶, 齐晓丽, 孟祥颖, 等. 竹叶中黄酮提取纯化工艺研究[J]. 东北

- 师大学报: 自然科学版, 2006, 38(1): 91-94.
- [5] 许刚, 张虹. 竹叶中黄酮提取方法的研究[J]. 分析化学, 2000, 28(7): 857-859.
- [6] 梁惠花, 刘晓河, 王志宝. 坝上油菜蜂花粉中总黄酮的超声提取及含量测定[J]. 张家口医学院学报, 2003, 20(4): 8-9.
- [7] 兰昌云, 周崇松, 范必威, 等. 超声波法提取槐花中黄酮的最佳工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(1): 55-58.
- [8] 冯涛, 曹东旭, 吕晓玲. 竹叶总黄酮的测定[J]. 中国食品添加剂, 2002(6): 85-88.
- [9] 陆志科, 谢碧霞. 竹叶活性成分分析及其提取物抗菌效果[J]. 中南林学院学报, 2004, 24(4): 70-73.
- [10] 唐传核. 植物生物活性物质[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 171-176.