

五味子叶中总黄酮最佳提取工艺研究

郑春英, 李宏涛, 陆欣媛, 周东坡*

(黑龙江大学生命科学学院, 微生物黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江 哈尔滨

150080)

摘 要: 用单因素试验和正交试验考察了料液比、提取时间、提取温度及乙醇浓度对五味子叶总黄酮含量的影响。结果表明: 料液比为 1:35, 75% 乙醇在 85℃ 超声提取 60min, 为最佳条件; 此条件下, 7 月份和 8 月份五味子叶的总黄酮平均含量分别为 6.0285mg/g 和 8.0714mg/g。

关键词: 五味子叶; 总黄酮; 最佳提取工艺

Study on Optimum Extracting Process of Total Flavones from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill Leaves

ZHENG Chun-ying, LI Hong-tao, LU Xin-yuan, ZHOU Dong-po*

(Heilongjiang Province University Key Laboratory of Microbiology, College of Life Science,
Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract: The optimum extracting conditions of flavones in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill leaves were investigated by single factor test with the orthogonal test design. The main factors affecting the content of total flavones extracted from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill leaves were the material-liquid ratio, the extraction temperature, the extraction time and the alcohol concentration. The results showed that the optimum conditions were: 85℃, 60min, 75% alcohol and material-liquid ratio 1:35. Under the conditions, the contents of total flavones in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill leaves collected in both July and August are 6.0285mg/g and 8.0714mg/g, respectively.

Key words *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill leaves; total flavones; optimum extracting process

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0139-04

五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill, 习称“北五味子”^[1], 木兰科植物, 是药食同源功能性保健食品。我国黑龙江地区, 五味子叶常以山野菜的形式在市场出售; 在欧洲, 五味子叶则被制成各种营养食品用于运动员的营养保健或是用于预防心血管疾病。五味子叶中主要活性成分是槲皮素、山奈酚等黄酮类成分^[2]。目

前, 关于五味子叶中总黄酮提取工艺及含量测定等方面的研究未见报道。为更好地开发利用五味子叶中的黄酮类物质, 本实验进行了提取工艺的研究, 以期筛选出较好的提取工艺, 为五味子叶的合理利用提供科学依据。

1 材料与amp;方法

收稿日期: 2006-09-20

*通讯作者

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11511289); 黑龙江大学杰出基金项目; 黑龙江大学博士启动基金项目
作者简介: 郑春英(1968-), 女, 副教授, 博士, 主要从事食品、药品有效成分分析。

坏、生物活性高, 适合与药品及保健品的开发研制;
(4) 生产能耗降低, 生产周期缩短, 更加经济; 综上所述可知: 酶解 + 热水浸提法是适合于提取茯苓多糖的理想方法。

参考文献:

[1] 林宇野, 杨虹. 酶法提取多糖的研究[J]. 食品与发酵工业, 1995(1): 13-17.

[2] 徐保梁. 食用菌多糖提取方法研究[J]. 食用菌, 1996(11): 6.

[3] 潘琦, 贾向云, 罗天浩, 等. 茯苓皮提取茯苓多糖实验方法研究[J]. 云南中医学院学报, 1997, 20(3): 13-16.

[4] 孙文基. 天然药物成分提取分离与制备[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1999: 288.

[5] 孙向军. 螺旋藻多糖提取新工艺的研究[J]. 食品科学, 2000(2): 32-34.

[6] 沈爱英, 谷文英. 复合酶法提取姬松茸子实体多糖的研究[J]. 食用菌, 2001(3): 7-9.

1.1 材料

五味子叶, 采自黑龙江省帽儿山。将五味子叶阴干后, 以粉碎机粉碎过 60 目筛, 备用。

槲皮素对照品 中国药品生物制品检定所; 无水乙醇(AR); 缓冲液: 醋酸-醋酸钠(pH4.5); 显色剂: 0.1mol/L 三氯化铝醇溶液; 蒸馏水。

1.2 仪器设备

752 型Spectrum 紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司; KQ-100DE 型医用数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; pH5-25 型电子 pH 计 上海精科雷磁; 电子天平 梅特勒公司。

1.3 方法^[3]

1.3.1 对照品溶液的制备

精密称取槲皮素对照品 1mg, 置 25ml 容量瓶, 加 75% 乙醇适量, 水浴溶解, 放冷后用 75% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 作对照品溶液。

1.3.2 线性关系考察

精密量取对照品 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml, 置 25ml 容量瓶, 用 5ml 75% 乙醇稀释, 加入醋酸-醋酸钠缓冲液 1ml 及三氯化铝醇溶液 1ml, 摇匀, 用 75% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 放置 40min, 用第一管作空白, 在波长 437nm 处测定吸收度, 以槲皮素浓度 C 为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程式为 $A=81.648C$, $r=0.9996$ 。对照品槲皮素在 0.00~0.2mg 范围内线性关系良好。

1.3.3 供试品溶液的制备

取五味子叶粉末 1.0g, 精密称定, 加入 75% 乙醇 35ml, 称重, 85℃ 水浴超声提 60min, 取出, 放冷, 称重, 以 75% 乙醇补足减失重量后, 滤过, 取滤液 10ml 置于 50ml 量瓶中作为供试品溶液。

1.3.4 五味子叶总黄酮含量测定

取 1.3.3 中供试品溶液 2ml 置于 25ml 量瓶中, 以下操作同 1.3.2 进行。每一试样重复测定三次, 取 OD_{437} 的平均值, 从上述标准曲线计算相应的总黄酮含量。

1.3.5 超声提取条件下五味子叶总黄酮最佳提取工艺的确定

考察了超声条件下提取温度、乙醇浓度、提取时间和料液比对五味子叶总黄酮提取效率的影响, 并确定在该条件下的最佳提取工艺。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 料液比对浸提的影响

用 75% 乙醇溶液对样品进行超声提取, 对不同的

料液比进行提取试验, 料液比(g/ml) 分别为 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 和 1:40, 提取时间为 60min, 结果见图 1。

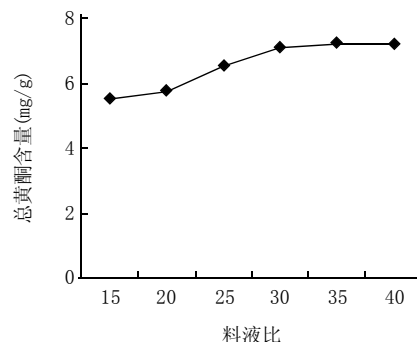


图1 料液比对提取率的影响

Fig.1 Effects of material-liquid ratio on extraction rate

从图 1 可知, 随着料液比的增加, 提取率增大, 当料液比在 1:35 与 1:40 时提取率数值最大, 但溶剂用量过大, 不仅增加了溶剂用量, 也增加了浓缩回收溶剂的能耗, 且增加了对环境的污染。因此从提取工艺角度出发, 本实验选择料液比 1:35。

2.1.2 提取温度对提取率的影响

称取一定量的样品分别在 45、55、65、75、85、95℃ 下超声提取 60min, 结果见图 2。

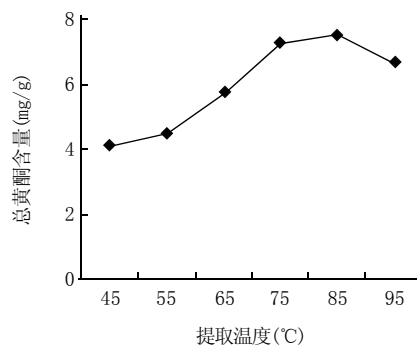


图2 提取温度对提取率的影响

Fig.2 Effects of temperature on extraction rate

从图 2 可知, 45℃ 到 85℃ 总黄酮含量有较大的增长, 而 85℃ 时总黄酮含量最大, 这是由于黄酮类物质在乙醇中的溶解度随着温度的升高而增大。当温度达到 95℃ 时, 总黄酮含量有所下降, 这可能是由于超声波清洗仪在高温时恒温不稳造成的。

2.1.3 提取时间对提取率的影响

在料液比 1:25、乙醇溶液 75% 的条件下, 每隔 15min 测定一次提取液的总黄酮含量, 结果见图 3。

图 3 实验结果表明, 当提取时间为 60min 时, 提取效果最好。当时间继续延长时, 总黄酮含量反而有所降低。这可能是提取时间太长, 有部分乙醇被挥发

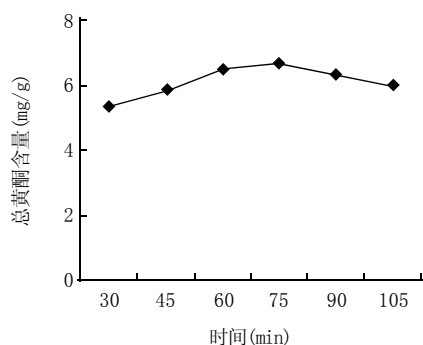


图3 提取时间对提取率的影响

Fig. 3 Effects of time on extraction rate

而导致沸点逐渐增大,从而破坏某些黄酮类化合物^[4]。

2.1.4 乙醇浓度对提取率的影响

分别用50%、55%、65%、75%、85%和95%乙醇溶液超声加热提取相同量的样品60min。测定提取液的总黄酮含量,结果见图4。

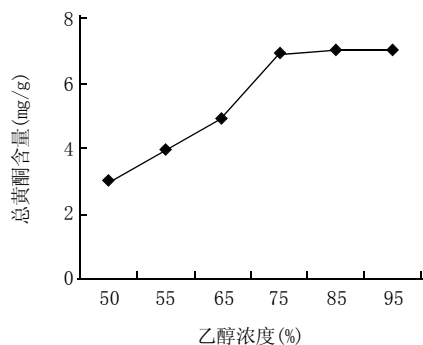


图4 乙醇浓度对提取率的影响

Fig. 4 Effects of alcohol concentration on extraction rate

从图4结果可以看出,随着乙醇浓度的提高,五味子叶总黄酮含量也随之增高,在75%~95%乙醇溶液提取液中总黄酮含量变化不大,而75%以上的乙醇易将叶绿素等杂质提取出来,而叶绿素等物质对紫外吸收有干扰,使测量结果偏高,因此乙醇浓度确定在75%。

2.2 正交试验

在实际操作中,由于各因素之间相互交叉影响,因此为全面考察工艺的最佳参数条件,根据单因素试验的结果,确定以料液比A、提取温度B、提取时间C、乙醇浓度D四种因素进行正交试验设计,以测定五味子叶样品中的总黄酮含量,正交实验因素水平见表1,试验结果见表2,方差分析见表3。

由分析可知,影响总黄酮含量的主要因素为D、B、C。A因素不显著。按最优组合A₃B₃C₂D₂,即料液比为1:35,提取温度85℃,提取60min,75%乙醇为提取溶剂为最佳工艺条件。

2.3 样品测定

表1 因素水平表L₉(3⁴)Table 1 Factors and levels of orthogonal test L₉(3⁴)

因素	料液比	提取温度(℃)	提取时间(min)	乙醇浓度(%)
1	1:15	45	30	50
2	1:25	65	60	75
3	1:35	85	90	95

表2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验次数	因素				总黄酮(mg/g)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.7194
2	1	2	2	2	7.8009
3	1	3	3	3	5.3966
4	2	1	2	3	2.2175
5	2	2	3	1	3.9649
6	2	3	1	2	6.5118
7	3	1	3	2	6.2624
8	3	2	1	3	3.9151
9	3	3	2	1	4.3539
K ₁	14.9169	10.1993	12.1463	10.0382	SY=42.1424
K ₂	12.6942	15.6819	14.3723	20.5751	CT=197.3313
K ₃	14.5314	16.2623	15.6239	11.5292	

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance of extraction rate of flavones

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	0.4707	2	0.2353	8.9955	>0.05
B	7.4720	2	3.7360	71.4340	<0.05
C	2.0693	2	1.0347	19.7839	<0.05
D	21.6763	2	10.8382	207.2314	<0.01
误差e	0.0523	2			

2.3.1 五味子叶黄酮稳定性实验

将五味子叶黄酮显色后,放置40min,并每隔10min测定一次吸光值,设定时间为60min。结果吸光度随着时间的变化略有下降,因此为准确测定,待测液现用现配,并避光保存。

2.3.2 加样回收实验

为了评价所用方法的准确度,根据前面测试条件,配置五份两个不同浓度的槲皮素对照品,按标准加入法加入对照品,测定回收率。结果见表4。

表4 回收率试验结果(n=5)

Table 4 Results of recovery (n=5)

测定次数	样品中总黄酮含量(mg)	加入槲皮素量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.0352	0.0900	0.1265	101.39		
2	0.0348	0.0900	0.1265	101.89		
3	0.0412	0.0600	0.1013	100.00	100.21	1.61
4	0.0413	0.0600	0.1013	100.00		
5	0.0427	0.0600	0.1013	97.75		

表4结果表明:五个样品的回收率在97.75%~101.89%之间,平均回收率为100.21%,RSD为1.61%。

尿素包合法提取酵母中不饱和脂肪酸的研究

赵丰丽, 陈 睿, 卢翠文

(广西师范大学生命科学学院, 广西 桂林 541004)

摘 要: 研究了实验室筛选出的高产油脂酵母菌(*Candida Yeast*-1-1)产脂的最佳条件, 在此基础上, 通过多因素正交试验得出尿素包合法提取酵母油脂中不饱和脂肪酸的最佳方法。试验结果表明, 在温度为 30℃, 摇床转速 120r/min 的条件下, 酵母菌产脂的最佳培养基为: 0.02% 的 $MnCl_2$ 、0.03% 的 $FeSO_4$ 、0.3% 的 $(NH_4)_2SO_4$ 、3% 的葡萄糖、pH6.5; 油脂提取的最佳尿素包合条件为: 尿素和脂肪酸的比例为 3:1, 回流时间 30min, 冷却析出温度 0℃。

关键词: 不饱和脂肪酸; 尿素包合法; 正交试验

Study on Extracting Yeast Saturated Fatty Acids with Urea Inclusion Method

ZHAO Feng-li, CHEN Rui, LU Cui-wen

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: The fat-producing optimum conditions of high-yield yeast (*Candida Yeast*-1-1) were studied in this experiment. An optimum method of yeast fat urea inclusion complex of saturated fatty acids using multi-criteria cross experiment was obtained. The optimized liquid fermentation mediums are as follows: 0.02% $MnCl_2$, 0.03% $FeSO_4$, 0.3% $(NH_4)_2SO_4$, 3% $C_6H_{12}O_6$ and pH6.5, at 120r/min and 30℃. The optimum extracting conditions of yeast fat urea inclusion complex are: ratio of urea and fatty acids(3:1), refluxing time (30min) and cooling temperature (0℃).

Key words unsaturated fatty acids; urea inclusion method; orthogonal test

中图分类号: Q547

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0142-04

收稿日期: 2006-06-06

作者简介: 赵丰丽(1961-), 女, 副教授, 研究方向为发酵工程及其功能性制品。

2.3.3 样品分析测定

按样品供试液制备方法制得五味子叶不同生长时期样品各五批, 用标准曲线法测定总黄酮的含量, 结果见表 5。

表 5 样品含量结果
Table 5 Total flavones content in samples

样品	总黄酮含量(mg/g)	RSD (%)
7 月份叶	6.0285	0.61
8 月份叶	8.0714	0.45

3 结 论

通过研究得到五味子叶总黄酮最佳提取工艺为: 乙醇浓度 75%, 提取时间 60min, 料液比 1:35, 提取温度 85℃, 在最佳的提取工艺条件下测得 7 月、8 月五味

子叶中总黄酮含量分别为 6.0285mg/g 及 8.0714mg/g。根据以上的结果与分析可知, 五味子叶中含有丰富的黄酮类化合物, 本文详细探讨了五味子叶中总黄酮的提取工艺, 为开发利用该资源提供有益的参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 44.
- [2] SLADKOVSKY R, SOLICH P, OPLETAL L. Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and (E)-cinnamic acid in vegetative organs of *Schisandra chinensis* Baill. by HPLC[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001, 24: 1049-1054.
- [3] 尹海波, 康廷国, 潘荣琛, 等. 老鹳草属两种老鹳草总黄酮的含量比较[J]. 中药材, 2006, 26(6): 541-542.
- [4] 蔡健, 王薇. 黄瓜叶中总黄酮含量的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 194-197.