文章编号: 1673-1689(2011)03-0348-05

新疆沙棘果实中总黄酮超声辅助提取工艺研究

曹红, 杨金凤, 单丽娜, 曹丽梅, 李 静
(石河子大学 化学化工学院, 新疆 石河子 832000)

摘 要: 研究了超声辅助提取新疆沙棘果实中的总黄酮。建立并运用三波长分光光度法测定沙棘总黄酮的含量; 采用正交试验方法确定沙棘果实总黄酮的超声辅助提取最佳条件。最佳工艺参数是超声波功率为 150W(超声波频率为 20 kHz), 提取剂乙醇溶液的体积分数为 60%, 料液比为 1∶20(g∶mL), 温度为 65 ℃, 超声处理时间 40 min, 提取次数为 2 次。相同提取条件下, 与传统的热回流提取法相比, 超声辅助提取法总黄酮得率提高了 0.73%。

关键词: 新疆沙棘果实; 总黄酮; 超声辅助提取; 三波长分光光度法
中图分类号: S 38 文献标识码: A

Study on Extraction Technology of Total Flavonoids from Xinjiang Seabuckthorn Fruit by Ultrasonic-assisted Method

CAO Hong, YANG Jin-feng, SHAN Li-na, CAO Li-mei, Li Jing
(Chemistry and Chemical Engineering College, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: In this study, the the extraction process of total flavonoids from in the Xinjiang Sea buckthorn fruit was developed. Total flavonoids in sea buckthorn was determined by three wavelength spectrophotometry. The extraction conditions of total flavonoids in seabuckthorn was optimized by orthogonal experiment and the results listed as as follows: ultrasonic power of 150 W(ultrasonic waves frequency of 20 kHz), ethanol concentration of 60%, solid-liquid ratio of 1∶20(g∶mL), temperature of 65 ℃, ultrasonic extraction time of 40 min, extracting for 2 times. With this optimum conditions, the yield of ultrasound-assisted extraction process increased 0.73% than that of the conventional heating backstreaming process.

Key words: Xinjiang seabuckthorn fruit, total flavonoids, ultrasound-assisted extraction, three wavelength spectrophotometry

---

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.), 又名醋柳, 胡秃子科(*Elaeagnaceae*) 沙棘属落叶灌木或小乔木。沙棘果实中富含多种生物活性物质, 其中黄酮类化合物是沙棘中非常重要的生物活性成分, 具有清除体内的自由基、抗氧化、抗衰老、防治心血管疾病、抗肿瘤及增强免疫力、抗辐射等医药保健功效[1-6], 此外, 在植物资源中, 沙棘具有重要的生态功能。沙棘根蘖繁殖, 根系发达, 能够有效地防止水土流失和防风固沙。沙棘的根系寄生根瘤菌, 能固定游离氮素, 而且根能将不溶性的有机物和矿物

收稿日期: 2010-05-12
基金项目: 兵团应用基础研究计划博士基金专项项目(2009JC13)。
* 通信作者: 曹红(1969-), 女, 安徽庐江人, 医学博士, 副教授, 主要从事食品与药物分析及生物催化与酶工程等方面的研究。Email: chyf_ch@sina.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

质转变为可溶的状态, 有利于改良土壤。因此, 沙棘是西部生态治理的优选植物。

在中国, 天然生长的沙棘有 4 个种 5 个亚种, 新疆天然分布的沙棘是沙棘的 2 个亚种, 即蒙古沙棘亚种和中亚沙棘亚种。目前对新疆沙棘的研究, 中国国内报道得不多。本文为了有效消除干扰组分的吸收光谱具有线性吸收和吸收峰不对称给定量分析造成的影响, 首先建立三波长分光光度法测定沙棘果实中总黄酮含量, 然后探讨采用超声辅助乙醇溶液提取新疆沙棘果实中总黄酮, 优选最佳工艺条件, 为全面研究和开发新疆的优势沙棘资源提供科学依据和方法。

1　材料与方法

1.1　试验材料

沙棘果实(中亚沙棘, *H. rhamnoides* L. *subsp turkestanica Rousi in. Ann.*): 新疆和田产, 芦丁对照品: 中国药品生物制品检定所产品; 其余试剂均为 AR 级试剂。

1.2　主要仪器

LabTech Blue Star 紫外/可见分光光度计: 美国莱伯泰科公司生产; BS2000S 电子天平: 赛多利斯仪器有限公司生产; KQ5200 型超声仪: 昆山市超声仪器有限公司生产。

1.3　三波长分光光度法

1.3.1　三波长的确定方法　准确移取 0.2 mg/mL 芦丁对照品溶液 1.00 mL 注入 10 mL 容量瓶中, 加 1 g/dL 的三氯化铝溶液, 充分混匀, 定容, 用 1 cm 的比色皿在波长 200~ 600 nm 范围内扫描, 绘制出其吸收曲线, 并用作图法确定 3 个测定波长 λ_1、λ_2 和 λ_3。

1.3.2　标准曲线的绘制方法　分别精密移取 0.60、0.80、1.00、1.20、1.40 和 1.60 mL 的 0.2 mg/mL 芦丁对照品溶液, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入 1 g/dL 的三氯化铝溶液至刻度, 充分混匀。用 1 cm 的比色皿分别在选定的 3 波长处测定其吸光度, 参照文献[7-9] 报道方法计算 ΔA, 以 ΔA 对浓度 C 进行线性回归。

1.3.3　精密度和回收率计算　精密移取已准确测知含量的供试品溶液 5 mL, 分别加入 0.50、1.00、1.50 mL 0.1 mg/mL 芦丁对照品溶液, 按照 1.3.2 项下方法分别重复测定 3 份, 计算其总黄酮含量。

1.4　实验方法

1.4.1　沙棘果实处理　将沙棘果实在 60 ℃烘箱中烘干至恒重, 粉碎后过 60 目筛备用。

1.4.2　超声提取　准确称取一定量沙棘果实粉碎物, 按一定料液比加入一定体积分数的乙醇, 在一定温度下经超声提取一定时间后, 过滤, 滤渣在同样条件下可再继续提取, 合并滤液, 测定其总黄酮的含量, 3 次重复。

先采用单因素试验分别考察乙醇体积分数、提取料液比、超声波功率(超声波频率为 20 kHz)、超声处理时间、提取温度和提取次数对提取效果的影响。然后根据单因素实验结果, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察最佳提取纯化工艺, 因素水平见表 1。

表 1　正交试验因素及水平

Tab. 1　Factors and levels of the orthogonal experiment

水平	因素			
	乙醇体积分数/% *A*	提取温度/℃ *B*	料液比/(g:mL) *C*	提取次数/次 *D*
1	55	65	1∶10	2
2	60	70	1∶15	3
3	65	75	1∶20	4

1.4.3　传统热回流提取　提取温度除外, 其余均采用正交试验优选的最佳条件, 利用传统加热回流方法提取沙棘果实粉碎物中的总黄酮, 并测定其含量, 3 次重复。

1.5　总黄酮得率计算

根据线性回归方程计算提取液的含量, 再计算沙棘果实中总黄酮提取得率。公式如下:

$$\text{总黄酮得率}=\frac{nm}{M}\times 100\%$$

其中: n 为提取液稀释倍数; m 为提取液中总黄酮的质量(g); M 为沙棘果实的质量(g)。

2　结果与分析

2.1　三波长分光光度法的建立

2.1.1　三波长的确定　用作图法确定出 3 个测定波长分别为 λ_1= 495 nm, λ_2= 415 nm, λ_3= 368 nm。

2.1.2　标准曲线的绘制　参照文献[3-4] 报道方法计算 ΔA, 并以 ΔA 对浓度 C 进行线性回归, 得回归方程为 $\Delta A = 1.9957C + 0.0062$, r= 0.9996。

2.1.3　精密度和回收率　该测定方法的回收率为 95.7%~ 101.9%, 平均回收率为 97.8%; 精密度(RSD) 为 0.7~ 2.4%, 平均精密度(RSD) 为 1.4%, 说明测定方法的准确度和精密度均较高。

2.2　单因素试验

2.2.1　乙醇体积分数对总黄酮得率的影响　准确称取沙棘果实粉碎物 5 份, 每份约 10 g, 按照料液

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

比1∶20(g∶mL)加入体积分数分别为40%、50%、60%、70%、80%乙醇,在20kHz、150W功率下,分别室温超声处理30 min,考察乙醇体积分数对总黄酮得率影响(见图1)。

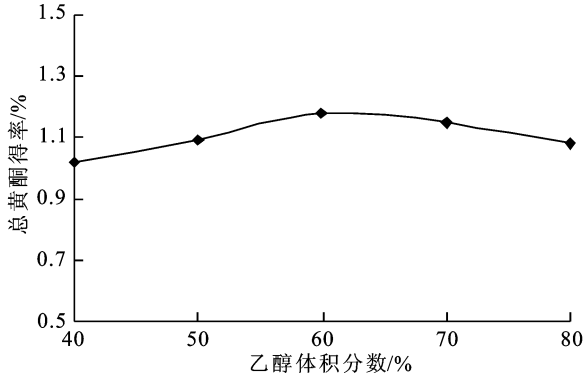


图1 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of total flavonoids

从图1可知,在乙醇体积分数小于60%时,总黄酮得率随溶剂体积分数增大而增大,当乙醇体积分数超过60%以后略呈下降趋势,说明乙醇体积分数过高或过低提取率都不利。这是由于不同体积分数的乙醇极性不同,黄酮类化合物具有中等偏上的极性。

2.2.2 *不同料液比对总黄酮得率的的影响* 称量沙棘果实粉碎物5份,每份约10 g,以体积分数为60%的乙醇为提取剂,料液比分别为1∶5、1∶10、1∶15、1∶20、1∶25(g∶mL)条件下,在20 kHz、150 W功率下,分别室温超声处理30 min,考察不同料液比对提取效果的影响(见图2)。

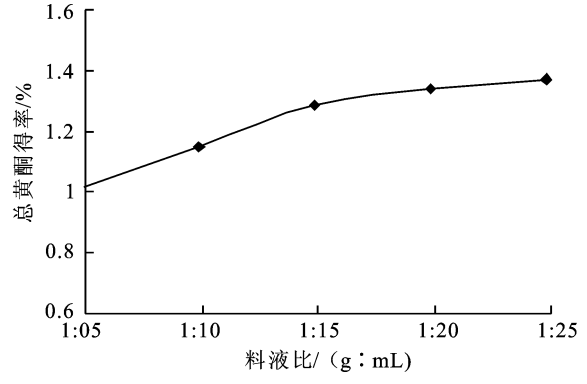


图2 料液比对总黄酮得率的影响

Fig. 2 Effect of solid-liquid ratio on the extraction rate of total flavonoids

图2显示,料液比越高,总黄酮得率越高,当料液比达到1∶20(g∶mL)的时候,得率趋于稳定,若继续增加料液比,对总黄酮得率影响逐渐减小。

2.2.3 *超声波功率的影响* 称量沙棘果实粉碎物5份,每份约10 g,以体积分数为60%的乙醇为提取剂,料液比为1∶20(g∶mL),超声波频率为20kHz条件下,分别在100、125、150、175、200 W功率下,室温超声处理30 min,考察不同超声功率对提取效果的影响(见图3)。

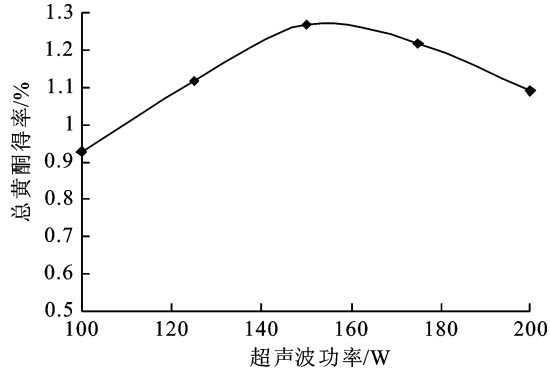


图3 超声波功率对总黄酮得率的影响

Fig. 3 Effect of ultrasonic power on the extraction rate of total flavonoids

由图3可见,超声波功率在< 150 W时,沙棘总黄酮得率随着功率的增大而增加,在> 150 W,提取率随着功率的增加反而减少。这可能是由于超声功率越低,超声产生的机械作用越弱,而功率过高时,产生的空化效应弱,有效成分的溶出不充分。在空化作用与机械作用的最佳结合点上,有效成分溶出最完全,总黄酮得率最大。因而确定150W为适宜的提取功率。

2.2.4 *超声波处理时间的影响* 准确称取沙棘果实粉碎物5份,每份约10 g,按照料液比1∶20(g∶mL)加入体积分数为60%乙醇,在20kHz、150W功率下,分别室温超声处理10、20、30、40、50 min,考察超声处理时间对总黄酮得率的影响(见图4)。

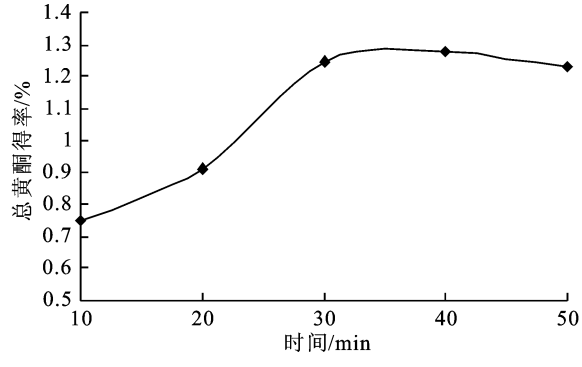


图4 超声处理时间对总黄酮得率的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic processing time on the extraction rate of total flavonoids

图4表明,随着提取时间的增加,总黄酮得率呈上升趋势,但在40 min之后,总黄酮得率随着提取时间的增加而呈下降趋势。造成总黄酮得率下降的原因可能是在长时间超声作用下,有效成分发

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生降解, 致使提取率降低。因而确定 40 min 为适宜的提取时间。

2 2 5 提取温度对总黄酮得率的影响　准确称取沙棘果实粉碎物 5 份, 每份约 10 g, 按照料液比 1∶20(g∶ mL) 加入体积分数为 60% 乙醇, 在 20kHz、150W 功率下, 分别在温度为 40、50、60、70、80 ℃条件下超声处理 30 min 后, 考察温度对总黄酮得率得影响(见图 5)。

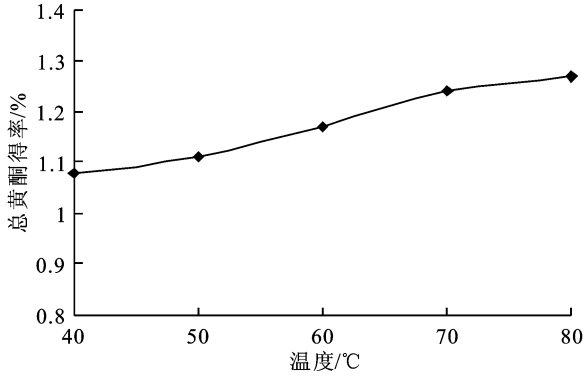


图 **5**　提取温度对总黄酮得率的影响

Fig. 5　Effect of extraction temperature on the extraction rate of total flavonoids

由图 5 可以看出, 随着提取温度的增加, 总黄酮得率呈上升趋势, 当温度达到 70 ℃后, 总黄酮得率随温度的增加而趋于稳定。并且温度升高和加热时间的延长, 提取液得颜色会逐渐的加深, 黄酮类物质会被氧化。因此, 提取温度不易太高。

2 2 6 提取次数对提取效果的影响　称量沙棘果实粉碎物 5 份, 每份约 10 g, 按照料液比 1∶20(g∶ mL) 加入体积分数为 60% 乙醇, 在 20kHz、150W 功率下, 分别室温超声处理 1、2、3、4、5 次(每次 30 min) , 考察提取次数对提取效果的影响(图 6)。

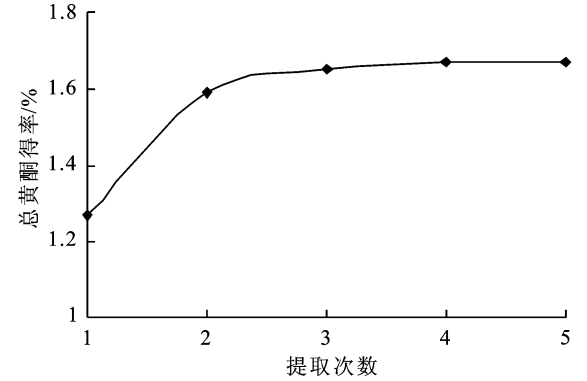


图 **6**　提取次数对总黄酮得率的影响

Fig. 6　Effect of the repeated extraction times on the extraction rate of total flavonoids

由图 6 可见, 随提取次数的增加, 总黄酮的得率也在增加, 且逐渐趋于稳定, 继续增加提取次数, 对总黄酮得率的影响很小。

2 3　沙棘果实中总黄酮超声辅助提取工艺优化正交试验

在上述单因素试验的基础上, 将正交因素实验提取时间固定为 40 min、超声波功率固定为 150W (超声波频率为 20 kHz) 。为了综合考察乙醇浓度、提取温度、料液比和提取次数对总黄酮提取率的影响, 选用 $L_9(3^4)$ 进行正交试验(见表 1、表 2) 。

表 **2**　正交试验结果

Tab. 2　The result of the orthogonal experiment

试验号	乙醇的体积分数/ % *A*	提取温度/ ℃ *B*	料液比/ (g∶ mL) *C*	提取次数/次 *D*	总黄酮得率/ % *D*
1	55	65	1∶ 10	2	0. 96
2	55	70	1∶ 15	3	1. 38
3	55	75	1∶ 20	4	1. 54
4	60	65	1∶ 15	4	1. 63
5	60	70	1∶ 20	2	1. 71
6	60	75	1∶ 10	3	1. 35
7	65	65	1∶ 20	3	1. 67
8	65	70	1∶ 10	4	1. 20
9	65	75	1∶ 15	2	1. 29
K_1	3. 88	4. 26	3. 51	3. 96	
K_2	4. 69	4. 29	4. 30	4. 40	
K_3	4. 16	4. 18	4. 92	4. 37	
R	0. 81	0. 11	1. 41	0. 44	

表 **3**　方差分析

Tab. 3　Analysis of varianc

方差来源	料液比 *C*	乙醇的浓度 *A*	提取次数 *D*	提取温度(误差) *B*
平方和	0. 332 9	0. 112 8	0. 040 3	0. 020 1
自由度	2	2	2	2
均方	0. 166 4	0. 056 4	0. 020 2	0. 001 11
F	57. 27	51. 27	18. 36	
显著性	*P*< 0. 01	*P*< 0. 05	*P*> 0. 05	

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$; $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

正交试验极差及方差分析结果表明, 各因素对总黄酮提取的影响次序为: 料液比(*C*) > 乙醇的体积分数(*A*) > 提取次数(*D*) > 提取温度(*B*) 。从正交表中总黄酮得率比较分析, 可以直观的判断的最优工艺是: $A_2B_2C_3D_1$, 得率为 1. 71%; 而从正交表中不同水平总黄酮得率累加值 *K* 的比较分析得到最佳提取条件是 $A_2B_2C_3D_2$; 方差分析结果表明料液比(*C*) 为高度显著性因素, 乙醇的浓度(*A*) 为一般显著性因素, 其它因素均不显著, 从降低能耗、减少试剂消耗、缩短提取时间考虑, 最佳的工艺为: $A_2B_1C_3D_1$。考虑到提取效率和成本的问题, 则选定最优

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

工艺为 $A_2B_1C_3D_1$。

2.4 精密度测定

称量沙棘果实粉碎物 5 份, 每份约 10 g, 在乙醇体积分数为 60%, 料液比 1∶ 20(g∶ mL), 温度 65 ℃, 超声波功率 150 W(超声波频率为 20 kHz), 提取时间 40 min 条件下超声辅助连续提取 2 次, 测定提取率分别为: 1.65%、1.71%、1.68%、1.70%、1.72% , 平均为 1.69%, RSD 为 1.65%, 提示该提取工艺方法比较稳定。

2.5 超声波辅助提取与传统热回流提取的比较

分别采用超声辅助提取和传统热回流提取法提取沙棘果实中的总黄酮, 结果显示超声辅助提取法总黄酮得率为 1.67%, 传统热回流提取法总黄酮得率为 0.94%。即超声辅助提取法总黄酮得率提高了 0.73%。

3 结 语

通过上述对沙棘黄酮类化合物超声辅助提取工艺的研究, 得到以下结论:

1) 天然产物中总黄酮含量常采用分光光度法进行监测和评价。一般常用的分光光度法存在一定缺陷, 加入铝盐使黄酮类化合物与铝离子形成稳定的配合物, 则吸收带Ⅰ会明显产生红移, 同时吸光度也大大增加, 但干扰成分会使吸收峰不对称, 给定量分析造成一定的影响[3]。为了有效消除干扰组分的吸收光谱具有线性吸收和吸收峰不对称给定量分析造成的影响, 本文建立了三波长分光光度法测定沙棘总黄酮含量。实验结果表明, 三波长法准确度、精密度均较高。

2) 在单因素试验的基础上进行正交试验, 充分考虑到工作效率和成本的问题, 优选沙棘总黄酮的最佳提取工艺: 超声波功率 200W(超声波频率为 20 kHz), 乙醇溶液体积分数为 60%, 料液比为 1∶ 20 (g∶ mL), 温度 65 ℃, 超声处理时间 40 min, 提取次数 2 次。

3) 超声波辅助提取法与回流提取法的比较试验显示, 超声辅助提取法具有提取速度快, 溶剂用量相对较少, 能有效避免因高温带来的有效成分损失, 处理简单等优点, 所以从经济效益上来说, 超声波提取也是一种较好的工艺方法。

参考文献(References):

[1] Geetha S, Sairam M, Singh, et al. Anti-oxidant and immunomodulatory properties of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) an in vitro study[J]. **Journal of Ethnopharmacology,** 2002, 79(3): 373-378.

[2] Cheng J, Kondo K, Suzukiy, et al. Inhibitory effects of total flavones of Hippophae rhamnoides L. on thrombosis inmouse femoral artery and in vitro platelet aggregation[J]. **Life Sciences,** 2003, 72(20): 2263-2271.

[3] 田晓艳, 刘延吉, 祝寰宇, 等. 沙棘多糖 HRPⅠa 纯化及鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(1): 23-26.
TIAN Xiao-yan, LIU Yan-Ji, ZHU Huan-Yu, et al. Purification identification of polysaccharide HRPⅠa of hippophae rhamnoides L[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2010, 29(1): 23-26. (in Chinese)

[4] Xiufeng Pang, Jingjing Zhao, Wen Zhang, et al. Antihypertensive effect of total flavones extracted from seed residues of Hippophae rhamnoides L. in sucrose-fed rats[J]. **Journal of Ethnopharmacology,** 2008, 117(2): 325-331.

[5] D. Gutzeit, V. Wray, P. Winterhalter, et al. Preparative isolation and purification of flavonoids and protocatechuic acid from sea buckthorn juice concentrate (Hippophae rhamnoides L. ssp. rhamnoides) by high-speed counter-current chromatography[J]. **Chromatographia,** 2007, 65, 1-7.

[6] Asheesh Gupta, Ratan Kumar, Karan Pal, et al. Influence of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L) flavone on dermal wound healing in rats[J]. **Molecular and Cellular Biochemistry,** 2006, 290: 193-198.

[7] 肖坤福. 三波长分光光度法测定多穗柯叶中黄酮的含量[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(6): 980-981.
XIAO Kun-fu. Determination of flavonoids in lithocarpus polysachyus rehd leaves by three-wave-length spectrophotometry[J]. **Lishizhen Medicine and Materia Medica Research,** 2006, 17(6): 980-981. (in Chinese)

[8] 张兰杰, 辛广, 陈华, 等. 三波长分光光度法测定山楂叶、果总黄酮的含量[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 483-486.
ZHANG Lan-jie, XIN Guang, CHEN Hua, et al. Determination of total flavonoids in hawthorn leaves and fruits by three-wavelength spectrophotometry[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2009, 28(4): 483-486. (in Chinese)

[9] 旷春桃, 王清华. 毛冬青根中总黄酮的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(1): 180-181.
Kuang Chun-tao, Wang Qing-hua. Study on extraction process of total flavonoids from pubescent holly root[J]. **Journal of Anhui Agri Sci,** 2009, 37(1): 180-181. (in Chinese)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net