

超声波-酶法提取虎杖中白藜芦醇的工艺研究

刘 超, 杨 青 青

(吉林农业科技学院 长白山动植物资源利用与保护吉林省高校重点实验室, 吉林 吉林 132101)

摘 要:以中药材虎杖为试材,利用纤维素酶酶解虎杖粗制品,以乙醇浓度、料液比、超声时间、超声温度为考察因素,进行单因素试验和正交实验,研究了超声波-酶法提取虎杖中白藜芦醇的最佳提取工艺。结果表明:虎杖中白藜芦醇提取的最佳工艺为乙醇浓度 80%、料液比 1:25 g/mL、超声时间 30 min、超声温度 60℃,在此条件下,白藜芦醇的得率为 0.328%。

关键词:虎杖;白藜芦醇;超声波提取;工艺

中图分类号:R 284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)07-0127-04

白藜芦醇(Resveratrol)又名芪三酚,在自然界中常以游离态或结合态的形式存在。白藜芦醇主要存在于葡萄、虎杖、花生、桑椹、买麻藤、朝鲜槐等植物中,尤以虎杖中含量较高^[1]。白藜芦醇具有很强的抗炎、抗氧化活性^[2]及降血脂、抗血栓、预防动脉硬化、增强免疫功能等重要调节作用,是一种极具开发价值的天然多酚类物质。刘涛等^[3]研究表明,法国人冠心病发病率低与长期饮红葡萄酒有关,因为红葡萄酒中富含白藜芦醇。在日本,已将含有白藜芦醇植物提取物作为食品添加剂使用;在我国,也有将白藜芦醇植物提取物制成降脂、美容、减肥和抗癌等天然保健食品及胶囊^[4]。

虎杖(*Polygonum cuspidatum*)为我国传统中药,用于血瘀诸症,具有活血散瘀、祛风通络、清热利湿、解毒等功效^[5]。古人很早便将其用于治疗妇女闭经、痛经、产后恶露不下、症瘕积聚、跌打损伤、风湿痹痛、湿热黄疸、淋浊带下、疮疡肿毒、毒蛇咬伤、水火汤伤等症。现代药学研究也表明其具有多种药理作用^[6]。近年来,随着对虎杖有效成份的深入研究,发现其在抗肿瘤、抗氧化、抗休克和强心、扩血管等方面都有很好的功效。毛永芬等^[7]研究表明,这些药理作用均与白藜芦醇苷、白藜芦醇有关,而在众多植物中,虎杖中白藜芦醇和白藜芦醇苷的含量最高。目前我国植物提取相关生产企业技术条件相对较差,采用工艺较陈旧,导致了环境污染、资源浪费、加工质量不稳定、生产成本低、经济效益低等问题^[8-9]。现以中药材虎杖为试材,通过单因素试验和

正交实验,研究超声波-酶法提取虎杖中白藜芦醇的工艺,以期快速高效提取和分离及进一步充分利用虎杖资源、开发系列功能保健食品、医药原料和制品提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试中药材虎杖购自吉林市中药房;纤维素酶由江苏锐阳生物科技有限公司提供(酶活 5 万 U/g);乙醇为分析纯。

供试仪器:超声波提取器(上海宁商超声仪器有限公司 SY-360);UV-1100 紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);电热鼓风干燥箱(上海源长实验仪器设备厂 DHG-9035A);电子天平(AL204)(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);旋转蒸发仪(上海亚龙生化仪器厂 RE52CS);离心机(上海安亭科学仪器厂 800B);电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司 DK-S24 型)。

1.2 试验方法

1.2.1 工艺路线 虎杖→烘干→粉碎→酶解→超声波浸提→离心→减压浓缩→白藜芦醇产品。

1.2.2 原料制取 将虎杖用清水洗净装入载物盘,放入鼓风干燥烘箱中,恒温烘干 6 h 取出。用粉碎机粉碎至 200 目,贮存于干燥器中,备用。

1.2.3 白藜芦醇的提取 称取 0.5 g 虎杖粉末,放入 150 mL 锥形瓶中,在 pH 4.8、50℃ 条件下,按照纤维素酶与虎杖粗粉质量配比为 1:500 加入适量水和纤维素酶进行酶解,酶解 90 min。酶解后加入乙醇溶液,进行超声波提取,取出后 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,浓缩蒸发后得白藜芦醇产物。将其用乙醇溶解,置于容量瓶中并定容到 10 mL,摇匀、备用。

1.2.4 白藜芦醇吸光度值的测定 准确称取白藜芦醇

第一作者简介:刘超(1982-),女,博士,讲师,研究方向为生物活性物质研究。E-mail:liuchaocarrol@163.com.

基金项目:长白山动植物资源利用与保护吉林省高校重点实验室资助项目(吉农院合字[2012]第 703 号)。

收稿日期:2013-11-14

产品配制的溶液,以 1 cm 比色皿为乙醇参比,在 200~350 nm 波长范围内进行扫描,用紫外-可见分光光度计测定吸光度值,以判断最佳吸收波长。发现白藜芦醇的乙醇溶液在 306 nm^[10]下有强吸收峰,其最大吸收峰的位置与陈易彬等^[10]研究结果一致。

1.2.5 白藜芦醇含量测定 将最终得到的白藜芦醇产品于电子天平上称重,得出白藜芦醇含量,计算提取率(W)。提取率 $W(\%) = \text{白藜芦醇提取量(g)} / \text{虎杖用量(g)} \times 100\%$ 。

1.2.6 单因素试验 乙醇浓度对提取白藜芦醇含量的影响:在料液比 1:20 g/mL,超声温度 70℃条件下,超声 30 min,分别以 50%、60%、70%、80%、90%浓度的乙醇对白藜芦醇进行提取。料液比对提取白藜芦醇含量的影响:于 80%浓度乙醇,超声温度 70℃条件下,超声 30 min,分别按料液比为 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 g/mL 的料液比对白藜芦醇进行提取。超声时间对提取白藜芦醇含量的影响:以 80%浓度乙醇,料液比 1:20 g/mL,超声温度 70℃条件下,分别超声 10、20、30、40、50 min 对白藜芦醇进行提取。超声温度对提取白藜芦醇含量的影响:选取乙醇浓度 80%,料液比 1:20 g/mL,分别在超声温度为 50、60、70、80、90℃条件下,超声时间 30 min,对白藜芦醇进行提取。

1.2.7 正交实验 根据单因素试验结果,以料液比、乙醇浓度、超声时间、超声温度为因素,选取每个因素中白藜芦醇得率最高的 3 个水平进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,以白藜芦醇得率为考察指标,确定白藜芦醇的最佳工艺参数。正交实验因素与水平见表 1。

表 2 正交实验因素与水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiments

| 水平 Level | 因素 Factor | | | |
|-------------|--------------------------------------|--|----------------------------------|---------------------------------------|
| | A 乙醇浓度 Ethanol concentration/% | B 料液比 Solid-liquid ratio /g · mL ⁻¹ | C 超声时间 Ultrasonic time/min | D 超声温度 Ultrasonic temperature/℃ |
| 1 | 70 | 1:20 | 20 | 60 |
| 2 | 80 | 1:25 | 30 | 70 |
| 3 | 90 | 1:30 | 40 | 80 |

2 结果与分析

2.1 虎杖中白藜芦醇含量标准曲线的确定

由图 1 可知,虎杖中白藜芦醇含量的标准曲线方程: $y=31.84x+0.0081$, $R^2=0.9996$,其中, y 为 OD 值; x 为白藜芦醇浓度($\mu\text{g/mL}$)。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 乙醇浓度对提取虎杖中白藜芦醇含量的影响

由图 2 可知,随着乙醇浓度的增加,白藜芦醇提取率不断增加,而在乙醇浓度大于 80%后,提取率反而降低,这主要是因为随乙醇浓度的增加一些醇溶性杂质和亲脂

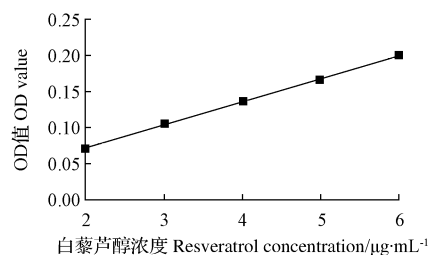


图 1 白藜芦醇测定的标准曲线

Fig. 1 Standard curve for determination of resveratrol

性成分溶出量也随之增加,其与白藜芦醇竞争与乙醇水分子结合,从而导致白藜芦醇提取率下降。

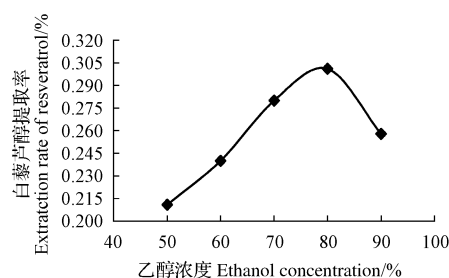


图 2 乙醇浓度对白藜芦醇提取率的影响

Fig. 2 Effects of ethanol concentration on resveratrol extraction rate

2.2.2 料液比对提取虎杖中白藜芦醇含量的影响 从图 3 可以看出,当料液比增大时,虎杖中白藜芦醇提取率随之增大。当料液比为 1:20 g/mL 时,虎杖中白藜芦醇提取率达到最大值,而随着料液比逐步增大,提取率开始下降。在料液比为 1:20~1:35 g/mL 时,白藜芦醇提取率变化较小。所以选取提取料液比 1:20 g/mL 较为适宜。

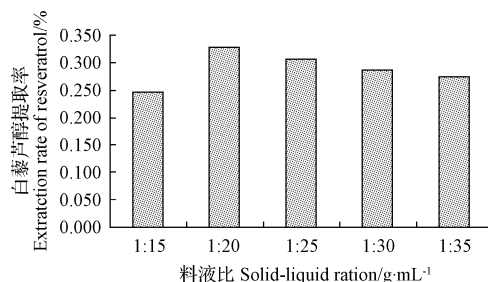


图 3 料液比对白藜芦醇提取率的影响

Fig. 3 Effects of the solids-liquid ratio on resveratrol extraction rate

2.2.3 超声时间对提取虎杖中白藜芦醇含量的影响

由图 4 可知,白藜芦醇的提取率随着超声波作用时间延长呈先增长后降低的变化规律。当功率一定时,随着超声波提取时间的延长,白藜芦醇的提取率也在逐渐增加,但当超声时间达到 30 min 后,白藜芦醇提取率迅速

下降。这可能是因为超声 30 min 已能较完全地提取白藜芦醇;由于白藜芦醇热敏性较强,过长的时间会使产生的热量积聚,导致温度过高,部分成分有所分解,故提取效果有所降低。

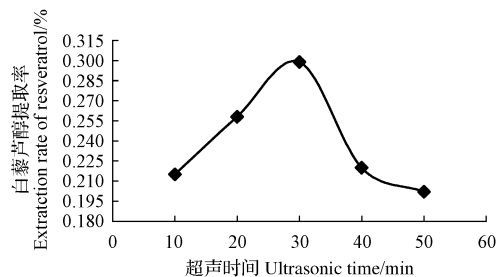


图4 超声时间对白藜芦醇提取率的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic treatment time on resveratrol extraction rate

2.2.4 超声温度对提取虎杖中白藜芦醇含量的影响

由图5可知,随着超声温度的升高,白藜芦醇的提取率先缓慢增加,再快速增加,当温度达到70℃时提取率最高,之后虎杖中的白藜芦醇含量开始逐渐降低。这是因为随着超声温度的升高,提取物中的多酚类物质有一部分发生了分解。

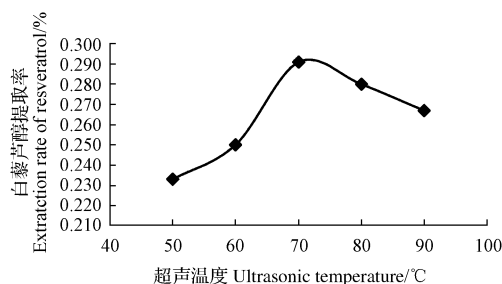


图5 超声温度对白藜芦醇提取率的影响

Fig. 5 Effect of extraction temperature on resveratrol extraction rate

2.3 正交实验结果

由表3可知,影响虎杖中白藜芦醇得率的因素大小依次为B>D>A>C,即料液比>超声温度>乙醇浓度>超声时间。根据正交实验并结合单因素试验结果,得出的最佳工艺参数为A₂B₂C₂D₁。即乙醇浓度80%,料液比1:25 g/mL,超声时间30 min,超声温度60℃。

2.4 验证试验

为了验证正交实验最优化的条件,在此工艺条件下进行3次平行试验,白藜芦醇的提取率分别为0.325%、0.327%、0.332%,平均值为0.328%,RSD值为1.10%(n=3)。结果表明,该条件下的提取率均高于表3中最优A₂B₂C₂D₁组合,是试验范围的最高值,说明该工艺的重现性较好。

表3 正交实验结果

Table 3 Results of orthogonal experiments

| 试验号 Experiment No. | A 乙醇浓度 Ethanol concentration /% | B 料液比 Solid-liquid ratio /g·mL ⁻¹ | C 超声时间 Ultrasonic time /min | D 超声温度 Ultrasonic temperature /℃ | 白藜芦醇 提取率 Extraction rate of resveratrol/% |
|--------------------------|--|---|--------------------------------------|---|---|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.226 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0.275 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 0.243 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 0.251 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 0.320 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 0.233 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 0.206 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 0.305 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0.262 |
| K ₁ | 0.744 | 0.683 | 0.764 | 0.808 | |
| K ₂ | 0.804 | 0.900 | 0.788 | 0.714 | |
| K ₃ | 0.773 | 0.738 | 0.769 | 0.799 | |
| k ₁ | 0.248 | 0.228 | 0.255 | 0.269 | |
| k ₂ | 0.268 | 0.300 | 0.263 | 0.238 | |
| k ₃ | 0.258 | 0.246 | 0.256 | 0.266 | |
| R | 0.020 | 0.072 | 0.008 | 0.031 | |

3 结论

该试验结果表明,通过单因素试验和正交实验,确定采用超声波法提取的最佳工艺条件为乙醇浓度80%、料液比1:25 g/mL、超声时间30 min、超声温度60℃。在此条件下,虎杖中白藜芦醇的最大提取率为0.328%。在原料酶解的基础上,使用超声波法提取,既可缩短提取时间,又可降低生产成本,取代了传统乙醇提取虎杖中的白藜芦醇的工艺,为虎杖中的白藜芦醇的大量工业化生产提供了参考。

参考文献

- [1] 王庆华,吕振岳.白藜芦醇的制备和检测[J].食品科技,2002(12):67-68.
- [2] Leonard S S, Xia C, Jiar B H, et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular response[J]. Bio-chem Biophys Res Commun, 2003, 309(4):1017.
- [3] 刘涛,马龙,堵年生.葡萄的生物学作用研究进展[J].自然杂志,2002,24(2):81-87.
- [4] 张博. HPLC法测定紫金胶囊中白藜芦醇的含量[J].中草药,2001,32(1):35.
- [5] 芦丽,李建青.虎杖药理作用研究进展[J].临沂医学专科学校学报,2003,25(1):46.
- [6] 衣洪福.虎杖的质量研究[D].广州:第二军医大学,2002.
- [7] 毛永芬,窦夏睿.虎杖的性能特点及临床应用[J].河北中医,2003,25(8):634.
- [8] 肖凯,宣利江,许亚明,等.虎杖的化学成分研究[J].中国药杂志,2003,38(1):12.
- [9] Yoshiyuki K, Mitsugi K, Kimige B, et al. New constituents of roots of *Polygonum cuspidatum* [J]. Planta Medica, 1983, 48(3):164-168.
- [10] 陈易彬,陈奎.白藜芦醇提取工艺的研究[J].食品科学,2007,28(12):197-198.

微波法提取甘草中类黄酮的工艺研究

余 蕾

(厦门海洋职业技术学院 生物技术系, 福建 厦门 361100)

摘 要:以甘草根茎为试材,以微波处理强度、微波处理时间、提取液乙醇浓度和料液比为考察因素,研究了微波法各提取因素对甘草中类黄酮得率的影响。结果表明:从甘草中提取类黄酮的最佳提取工艺为微波处理强度 600 W、微波处理时间 3 min、提取液乙醇浓度 70%、料液比 1:25 g/mL,此条件下类黄酮得率为 61.17 mg/g。

关键词:类黄酮;甘草;微波法;提取工艺

中图分类号:S 567.7⁺1 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2014)07-0130-03

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)属豆科多年生草本植物,是一种补益中草药,药用部位是根及根茎,具有清热解毒、祛痰止咳、脘腹等功效^[1]。甘草的根及根茎中含有 20 余种皂苷类物质,总含量达 6%~14%,其中甘草甜素含量最大。大量的研究表明,甘草根茎内含有大量的类黄酮成分,是甘草中重要的生理活性物质^[2]。类黄酮为三元环化合物,是一类植物色素的总称,具有保护心脏的功效,此外,类黄酮可以抑制有害的低密度脂蛋白的产生,还有减小血栓形成的作用,目前,类黄酮已广泛用于治疗冠心病^[3]。微波提取技术又称微波萃取技术,该技术具有试剂用量少、节能、污染小、过程易于控制、提取效率高、省时等特点,目前,已广泛应用于药用植物有效成分的提取^[4]。该试验采用微波法从甘

草中提取类黄酮,通过单因素试验和正交实验研究甘草中类黄酮的最佳提取工艺,以期类黄酮的提取提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为市售甘草根茎。

供试仪器:水浴锅、UV-1700 型紫外可见分光光度计、AL204 型电子天平、JH-210K 宇普食品加工机、格兰仕微波炉 G80F23CN2L-A9(SO)、移液器、TDL-4 型台式离心机等。

1.2 试验方法

1.2.1 提取工艺 将甘草根茎风干至恒重,研磨成细粉,称取 1 g 的甘草细粉装入锥形瓶,加入蒸馏水用玻璃棒搅拌,然后放入微波炉中加热,一段时间后取出,再注入定量乙醇进行回流提取 2 h,提取温度 70℃。得到的提取液经过滤后取出适量进行测定^[5]。

1.2.2 类黄酮含量测定 取 1 mL 的待测提取液用甲

作者简介:余蕾(1970-),女,福建厦门人,硕士,副教授,现主要从事食品加工和食品卫生与安全及营养功能成分等的教学与科研工作。E-mail:82642444@qq.com。

收稿日期:2013-11-19

Study on Technology of Resveratrol Extraction From *Polygonum cuspidatum* by Ultrasonic Wave

LIU Chao, YANG Qing-qing

(Jilin Province Key Laboratories in Universities for Using and Protecting of Animal and Plant Resources in Changbai Mountain, Jilin Agriculture Science and Technology College, Jilin, Jilin 132101)

Abstract: Taking Chinese traditional medicine *Polygonum cuspidatum* as materil, and its crude product was evrymed by cellulase, the effect of ethanol concentration, solid-liquid ratio, ultrasonic time, and ultrasonic temperature at different levels for resveratrol extraction were studied by ultrasonic wave. The results showed that the optimal extraction conditions were as follows: the *Polygonum cuspidatum* was extracted by 80% alcohol at 60℃ for 30 min and the ratio of liquid to solids was 1:25 g/mL, the yield of resveratrol was 0.328%.

Key words: *Polygonum cuspidatum*; resveratrol; ultrasonic wave extraction; technology