

超声提取枸杞叶中总黄酮提取工艺 及其不同采收期含量变化研究

王汉卿^{1,2}, 王文苹^{1,2}, 闫津金¹, 隋宏^{1,3*}

(1. 宁夏医科大学药学院, 银川 750004; 2. 宁夏回药现代化工程技术研究中心, 银川 750004;
3. 宁夏医科大学宁夏医药研究所, 银川 750004)

[摘要] 目的: 优选超声辅助提取宁夏枸杞叶总黄酮的提取工艺并测定其不同采收期总黄酮含量。方法: 分别研究乙醇浓度, 乙醇用量, 超声时间, 超声温度 4 个单因素对提取效果的影响, 并设计正交试验, 所得结果采用方差分析。利用优选出的最佳超声提取工艺测定比较不同采收期枸杞叶中的总黄酮含量。结果: 确定了最佳单因素水平, 通过正交试验优选出超声辅助提取枸杞叶总黄酮的最佳工艺条件为乙醇体积分数 65%、乙醇用量 1:60、超声提取时间 35 min、超声温度 70 ℃。结论: 通过比较不同采收时期枸杞叶总黄酮的含量, 结果为 5 月中旬含量最高。

[关键词] 宁夏枸杞叶; 总黄酮; 超声辅助提取; 采收期

[中图分类号] P282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0044-04

Technical Study and Comparison of Total Flavonoids Extracted in *Lycium barbarum* Leaves of Different Picked Time by Ultrasonography

WANG Han-qing^{1,2}, WANG Wen-ping^{1,2}, YAN Jin-jin¹, SUI Hong^{1,3*}

(1. College of Pharmaceutics, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;
2. Ningxia Research Center of Modern Hui Medicine Engineering and Technology, Yinchuan 750004, China;
3. Ningxia Research Institute of Medicine & Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimally select the extraction technology of total flavonoids of *Lycium barbarum* leaves by ultrasonography and to determine the content of total flavonoids of *L. barbarum* leaves of different picked time. **Method:** The effects of four single-factors (including ethanol concentration, ethanol consumption, ultrasonic extraction time and temperature) on the extraction of total flavonoids of *L. barbarum* leaves have been studied. And the results of the orthogonal experiment were analyzed by variance analysis. Use the best extraction technology to determine the contents of total flavonoids in leaves of *L. barbarum* at different picked times. **Result:** The best single factor was determined and the best extraction of total flavonoids of *L. barbarum* leaves by ultrasonography with orthogonal experiment was optimized. The best extraction technology were as follows: using 65% ethanol as extractor with the ratio of material to liquid at 1:60 and extraction for 35 min in 70 ℃. **Conclusion:** By comparing the contents of total flavonoids in leaves of *L. barbarum* at different picked time, the contents of total flavonoids in leaves were decreased with the leaves growing. It is conclude that the best picked time of *L. barbarum* is the middle of May.

[Key words] leaves of *Lycium barbarum*; total flavonoids; ultrasonic extraction; picked time

[收稿日期] 20101208(014)

[基金项目] 宁夏医科大学青年基金项目(2009 年度)

[第一作者] 王汉卿, 硕士, 讲师, 从事天然药物研发, Tel:0951-6980192, E-mail:243248163@qq.com

[通讯作者] * 隋宏, 教授, 在读博士研究生, 从事生物药剂学及天然药物研发, Tel:13995103966, E-mail:wwwhhq@163.com

茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的叶,俗称天精草,具有补虚益精、滋肾补血、清热止渴、养肝明目之功效^[1],《本草纲目》记载枸杞叶有“除烦益志,补五劳七伤,壮心气,除热毒,散疮肿,除风明目”之功效。有研究表明,枸杞叶中总黄酮的质量分数高于枸杞果实^[2]。关于宁夏枸杞叶总黄酮提取工艺及其不同采收期总黄酮含量变化的研究未见系统报道,笔者进行该项研究对其开发应用具有重要意义^[3]。

1 材料

UV-2550(岛津)紫外分光光度计;KQ-500E型超声波清洗器;RE-52AA旋转蒸发器。试验样品采于宁夏枸杞研究所种植基地,宁夏枸杞工程技术研究中心安巍研究员鉴定为宁夏枸杞 *L. barbarum* 的叶(5~10月份),采摘阴干后粉碎过40目筛,备用。芦丁对照品(批号100080-200707)由中国药品生物制品检定所提供。

2 方法

2.1 测定波长的选择 芦丁对照品与枸杞叶提取物均在500 nm处有最大吸收值,故选择波长在500 nm^[4]。

2.2 标准曲线的制作 精密称取芦丁对照品,用70%乙醇溶解并定容于10 mL量瓶中,摇匀,得0.259 g·L⁻¹的芦丁对照品溶液。

精密量取芦丁对照品液0,0.40,0.80,1.20,1.60,2.00,2.40 mL,分别置于10 mL量瓶中,加水至2.4 mL,依次加入5% NaNO₂ 0.4 mL,摇匀,放置6 min,10% Al(NO₃)₃ 0.4 mL,摇匀,放置6 min,5% NaOH 4.0 mL,再加水至刻度,摇匀,放置15 min^[5]。以试剂空白为参比溶液,在500 nm波长处测定吸光度,得线性回归方程 $Y = 13.949X - 0.0115$ ($r = 0.9993$),结果表明芦丁在10~62 mg·L⁻¹线性关系良好。

2.3 枸杞叶中总黄酮的提取 称取枸杞叶1 g,用乙醇作为提取剂,通过单因素试验分别研究了乙醇体积分数、料液比、超声时间、超声温度等对枸杞叶中总黄酮提取率的影响。根据单因素试验结果选用A(乙醇体积分数)、B(料液比)、C(超声时间)、D(超声温度)4个因素作为变量进行L₉(3⁴)四因素三水平的正交试验,重复试验3次取其平均值并计算总黄酮的提取率。用SPSS软件进行正交试验数据分析,结果详见表1,2。

表1 枸杞叶总黄酮提取正交试验

No.	A/%	B/mL	C/min	D/°C	总黄酮提取率/%
1	55	40	25	60	6.69
2	55	50	30	70	7.02
3	55	60	35	80	7.14
4	65	40	30	80	7.10
5	65	50	35	60	7.27
6	65	60	25	70	7.26
7	75	40	35	70	6.96
8	75	50	25	80	6.67
9	75	60	30	60	7.02
K ₁	6.952	6.922	6.874	6.993	
K ₂	7.209	6.985	7.045	7.078	
K ₃	6.884	7.138	7.126	6.973	
R	0.325	0.216	0.252	0.105	

表2 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
A	0.177	2	0.088	88	<0.05
B	0.074	2	0.037	37	<0.05
C	0.099	2	0.049	49.5	<0.05
D	0.019	2	0.009	9.5	
误差	0.002	2	0.001		

2.4 不同采收期中黄酮含量

分别在5月中旬、6月中旬、7月中旬、8月中旬、9月中旬、10月中旬采集枸杞叶按2.3项下正交试验优选处理的最佳工艺超声提取,比较不同时期枸杞叶总黄酮含量。结果详见表3。

表3 不同采收期枸杞叶中总黄酮含量(n=3)

采收时间	提取率/%	总黄酮/mg·g ⁻¹
5月中旬	5.3423	53.423
6月中旬	3.7852	37.852
7月中旬	4.2240	42.240
8月中旬	4.7239	47.229
9月中旬	4.8068	48.068
10月中旬	4.7584	47.584

3 结果与分析

3.1 优选提取工艺

3.1.1 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响 从图1可知,在料液比为1:40、超声时间为20 min、超

声温度为 40 ℃ 的条件下改变乙醇体积分数。乙醇体积分数为 65% 时提取率达到最大值,而当乙醇体积分数超过 65% 时,提取率随体积分数的升高而下降,这可能是由于高体积分数乙醇使更多的杂质溶出,而导致黄酮类化合物溶解量的降低,所以选用 65% 的乙醇较为适宜。

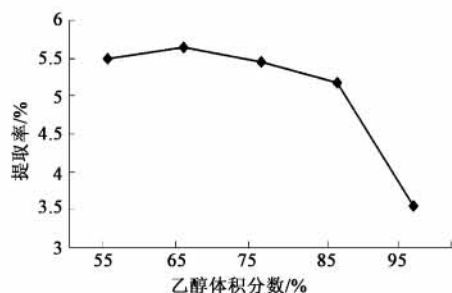


图 1 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

3.1.2 乙醇用量对总黄酮提取率的影响 从图 2 可知,以 65% 乙醇作为提取剂、超声时间为 20 min、超声温度为 40 ℃ 的条件下改变料液比。当料液比为 1:40 时提取率最大。当用量超过 40 mL 时提取率有所下降,所以超声提取枸杞叶总黄酮时选择料液比 1:40 较为合适。

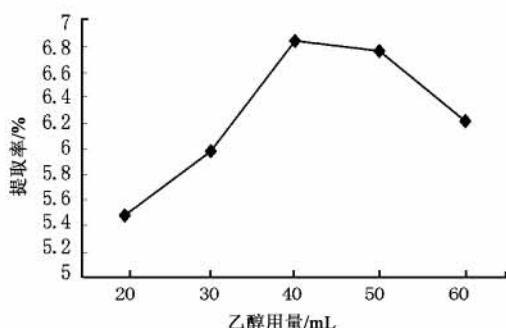


图 2 乙醇用量对总黄酮提取率的影响

3.1.3 超声提取时间对枸杞叶总黄酮提取率的影响 从图 3 可知,以 65% 乙醇作为提取剂、料液比为 1:20、超声温度为 40 ℃ 的条件下改变超声时间。在超声 25 min 是达到最高。此后逐渐下降,其原因可能是因为长时间超声波空化作用破坏了黄酮类化合物的结构而导致提取率下降。

3.1.4 超声温度对枸杞叶总黄酮提取率的影响 根据图 4 结果可以看出,以 65% 乙醇作为提取剂、料液比为 1:40、超声时间为 20 min 的条件下改变超声时温度发现超声时温度为 70 ℃ 时枸杞叶总黄酮提取率达到最大,但考虑到温度升高时乙醇挥发量增大,有可能造成较大误差,而影响总黄酮的提取,所

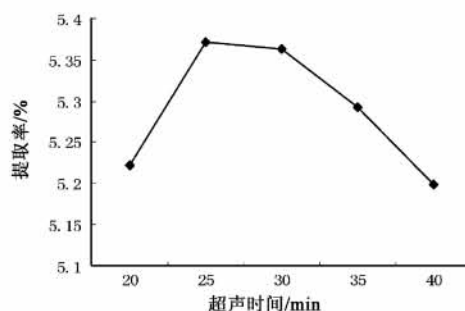


图 3 超声提取时间对枸杞叶总黄酮提取率的影响
以在超声提取时温度不宜过高。

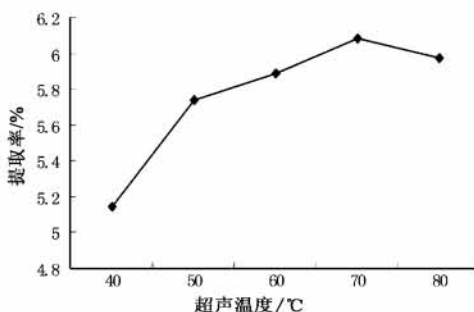


图 4 超声温度对枸杞叶总黄酮提取率的影响

3.1.5 正交试验分析 为进一步优化超声提取总黄酮的条件,在单因素试验的基础上进行了正交优化实验,由表 1 正交试验结果分析可知,影响枸杞叶总黄酮提取率的主次因素为 $A > C > B > D$,即乙醇体积分数 > 超声时间 > 料液比 > 超声温度。由表 2 方差分析结果可知,乙醇体积分数、料液比、超声时间对枸杞叶总黄酮的提取率有显著影响,而超声时温度对提取率影响不显著。综上所述实验结果分析,得出超声提取总黄酮的最佳工艺条件为 $A_2B_3C_3D_2$,即乙醇体积分数为 65%,料液比为 1:60,超声时间为 35 min,超声时温度为 70 ℃。由于 $A_2B_3C_3D_2$ 不在正交试验安排之内,需对其进行验证。验证结果表明,其提取率平均值为 7.295%,高于正交试验值, RSD 0.3% ($n = 5$),表明超声提取最佳工艺重复性较好。

3.2 不同采收期枸杞叶总黄酮含量测定

3.2.1 线性关系试验 在标准曲线的制作中,得线性回归方程为 $Y = 13.949X - 0.0115 (r = 0.9993)$,结果表明芦丁在 10 ~ 62 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

3.2.2 精密度试验 取对照品溶液,按 2.2 项下操作,重复测量 5 次,每次取样量为 0.4 mL,记录吸光度。结果芦丁吸光度值的 RSD 0.9%,表明精密度良好。

3.2.3 重复性试验 按最优提取方法,平行制备5份供试品溶液,分别测定,结果总黄酮提取率的平均值为7.295%,RSD 0.3%,表明重复性良好。

3.2.4 稳定性试验 由于本试验采用的硝酸铝-亚硝酸钠比色法测定,其最后吸光度值是与各反应物的反应时间呈相关性,因此要严格保证反应时间的一致性。按最优提取方法,平行制备5份供试品溶液,保证反应时间的一致性,分别测定,结果总黄酮提取率的平均值为7.295%,RSD 0.3%,表明供试品溶液在规定反应时间内稳定性良好。

3.2.5 对照品回收率的测定 已测定含量的样品,添加一定对照品芦丁,测定回收率。吸取已知总黄酮为 $1.4857\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的供试品提取液 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中,分别加不同量 $0.259\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 芦丁液,配制高中低3个质量浓度的芦丁液。高浓度应为样品浓度的120%左右、中浓度应为样品浓度的100%左右、低浓度应为样品浓度的80%左右,制成供试样品,结果回收率平均值100.25%,RSD 2.08%。

3.2.6 不同采收期总黄酮含量测定与比较 按照正交试验筛选出的最优提取工艺,对不同采收期枸杞叶总黄酮进行提取,采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法测定,每份样品平行测定3次。

表3的结果显示:不同采收期枸杞叶中总黄酮含量关系为5月中旬>9月中旬>10月中旬>8月中旬>7月中旬>6月中旬。

4 结果与讨论

4.1 超声波辅助提取工艺 本文通过超声辅助提取枸杞叶中总黄酮,对乙醇浓度,料液比,超声时间,

超声温度进行正交试验,优选出超声辅助提取枸杞叶总黄酮的最佳工艺条件为乙醇浓度65%、乙醇用量1:60、超声提取时间35 min、超声温度70℃。得到各因素对总黄酮提取效果影响的主次顺序为乙醇体积分数>超声时间>料液比>超声时温度。该工艺条件简单,操作控制容易,稳定性好,克服了常规方法提取时间长需要加热处理操作步骤繁琐等缺点。

4.2 不同采收期总黄酮含量变化 用上述提取工艺测定了枸杞叶不同采收时期(5~10月)总黄酮含量(表3),通过对5~10月不同采收期枸杞叶中总黄酮含量的比较,结果5月份含量最高($53.4\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$),6月、7月份最低($37.9,42.2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$),8月、9月、10月份含量($47.2,48.1,47.6\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)基本一致。该结果对枸杞叶的开发利用提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1980:11620.
- [2] 李国莉,黄元庆. 宁夏枸杞不同组分黄酮含量分析[J]. 宁夏医学院学报,1995,17(2):114.
- [3] 贺晓慧,贾孟辉,俞维,等. 宁夏枸杞叶基础研究述要及应用开发的前景[J]. 时珍国医国药,2007,18(5):1111.
- [4] 刘志勤,曹纬国,陶燕铎,等. 青海枸杞叶总黄酮含量的测定[J]. 青海科技,2004(1):46.
- [5] 王群立,张力,包玉敏. 超声波提取蒺藜总黄酮及测定[J]. 内蒙古民族大学学报,2007,22(1):30.

[责任编辑 邹晓翠]