

## 沙棘果渣中异鼠李素超声辅助提取工艺研究

胡丹<sup>1,2</sup>, 何珺<sup>1</sup>, 杨佳年<sup>1</sup>

(1. 贵州省生化工程中心, 贵阳 550025; 2. 贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025)

**摘要:** 采用超声波法提取沙棘果渣中异鼠李素。首先采用单因素对超声频率、提取时间、次数、提取温度、提取料液比及提取溶剂进行筛选, 再对筛选提取条件进行正交验证试验。确定了该方法提取沙棘果渣中异鼠李素的参数, 即 50℃, 超声频率 40 kHz 的条件下用 V<sub>乙酸乙酯</sub>: V<sub>95%乙醇</sub> 为 4:6 的提取液超声 2 次, 每次 1 h, 料液比 1:25, 所得的异鼠李素含量可达 5.09 mg·g<sup>-1</sup>。

**关键词:** 沙棘果渣; 异鼠李素; 提取

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)04-0575-04

### Extraction of isorhamnetin from marc of *Hippophae rhamnoides* L. using ultrasound-assisted method

HU Dan<sup>1,2</sup>, HE Jun<sup>1</sup>, YANG Jianian<sup>1</sup>

(1. Research Center of Biochemistry Engineering of Guizhou Province, Guiyang 550025;

2. College of Life Sciences of Guizhou University, Guizhou University, Guiyang 550025)

**Abstract:** The ultrasound-assisted method was used to extract isorhamnetin from marc of the *Hippophae rhamnoides* fruits. A single factor experiment was conducted to select ideal ultrasonic frequency, extraction time and frequency, extraction temperature, solid-liquid ratio, and extraction solvent. These extraction conditions were then verified with an orthogonal experiment. The best conditions of the ultrasonic method for isorhamnetin extraction from *Hippophae rhamnoides* marc were: the ultrasonic frequency of 40 kHz, the extraction temperature of 50 °C, V<sub>ethyl acetate</sub>: V<sub>95% ethyl alcohol</sub> of 4:6 as the extraction solvent, two extractions with one hour each, and the solid-liquid of 1:25. Under these conditions, the yield of isorhamnetin extraction can reach 5.09 mg·g<sup>-1</sup>.

**Key words:** marc of *Hippophae rhamnoides* L.; isorhamnetin; extraction

沙棘为胡颓子科沙棘属, 多年落叶灌木或小乔木。沙棘果为沙棘的果实, 又名醋柳果、酸刺果、酸刺子、黑刺、醋柳、沙枣。我国是世界上沙棘资源最多的国家, 分布面积广, 约 133 万 km<sup>2</sup>, 主要分布于山西、西藏、青海、甘肃、陕西、内蒙等省区。沙棘中富含多种生物活性物质, 可抗癌、降血脂、降血压、对肝脏有保护作用, 是食药两用价值很高的天然食品<sup>[1]</sup>。

异鼠李素是一种已知的黄酮类化合物, 在沙棘中的含量十分丰富, 是沙棘中的主要黄酮单体之一。异鼠李素在沙棘的茎、叶、果实中均有分布, 含量叶>果实>茎, 茎及果实中异鼠李素含量高于槲皮

素, 叶中异鼠李素含量低于槲皮素<sup>[2]</sup>。由于大量沙棘果主要用于生产果汁或榨油, 而异鼠李素含量丰富的沙棘果渣却被白白废弃, 造成很大的资源浪费, 因此, 利用废弃沙棘果渣提取异鼠李素, 对于充分利用资源, 提高其综合利用程度有一定意义。

大量研究发现异鼠李素具有缓解心绞痛, 抗心肌缺氧, 抗心律失常, 清除氧自由基, 降低血清中胆固醇, 促进血流通畅, 抗肿瘤, 调节免疫功能等多种生物活性及药理作用<sup>[3]</sup>, 应用前景十分广阔。

国内对于沙棘研究多集中在沙棘总黄酮的提取工艺优化<sup>[5-6]</sup>, 对于沙棘中异鼠李素的提取研究较少, 苏伟等采取水解法提取异鼠李素, 但由于沙棘

收稿日期: 2013-12-20

基金项目: 贵州省科技计划项目[黔科合 SY 字[2013]3014]资助。

作者简介: 胡丹, 硕士研究生。E-mail: 379557380@qq.com

\* 通信作者: 何珺, 副教授。E-mail: hejun1016@163.com

果实中的黄酮主要以苷元形式存在,因此水解效果较差<sup>[7]</sup>,马养民等用超声辅助提取法从沙棘果中提取方法从沙棘果中提取异鼠李素,但采取的是提取总黄酮的提取工艺,并未对异鼠李素的提取工艺做研究<sup>[8]</sup>。因此,有必要对沙棘中异鼠李素的提取工艺做系统研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

沙棘果渣为2012年5月购于南京康普公司的沙棘榨汁榨油后废弃果渣。

### 1.2 仪 器

RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),SHB-III循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),BSA124S 电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司),KQ2200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),GZX-9140 MBE 电热鼓风干燥箱(上海博迅事业有限公司),HH·Sy21-Ni6 电热恒温水浴锅(北京长源实验设备厂),Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪。

### 1.3 方 法

**1.3.1 沙棘果渣中异鼠李素提取方法** 用超声波法提取异鼠李素的原理是超声在溶剂和样品之间产生空化作用,导致溶液内气泡的形成、增长、爆破压缩,有助于溶质扩散,提高目标物从固相转移到液相的传质速率。超声波法可大大缩短提取时间,提高有效成分提出率及原料利用率。

精确称取 1.0 g 左右的沙棘果渣→加入提取液→超声波提取→过滤→滤液定容→进行 HPLC 测定滤液中异鼠李素含量。

**1.3.2 异鼠李素 HPLC 测定** 高效液相色谱条件。Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-0.03% 磷酸溶液(47:53); 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 进样体积 10 μL; 柱温 45℃。

异鼠李素含量计算公式

$$C_{\text{样}} = (C_{\text{标}} \times A_{\text{样}} \times K \times V_{\text{样}}) / (A_{\text{标}} \times m_{\text{样}})$$

式中 C<sub>标</sub>: 标样溶液浓度,单位: mg·mL<sup>-1</sup>; A<sub>样</sub>: 样品峰面积; A<sub>标</sub>: 标样峰面积; V<sub>样</sub>: 样品溶液的体积,单位: mL; G<sub>样</sub>: 样品重量,单位: mg; K: 对照品纯度, K=0.98)

**1.3.3 单因素试验选择提取条件** (1) 提取液的选择。异鼠李素为黄酮苷元,易溶于甲醇、乙醇、乙醚、乙酸乙酯、等有机溶剂及稀碱水溶液,由于甲醇、乙醚毒性较强,碱液提取后杂质较多,不利于纯化,故本试验选用乙酸乙酯、乙醇、或其混合溶

剂进行异鼠李素提取。分别选取 V<sub>乙酸乙酯</sub>:V<sub>95%乙醇</sub> 为 10:0、8:2、6:4、4:6、2:8 和 0:10 的溶剂为提取液,料液比 1:10,提取温度 50℃,超声频率 40 kHz,超声 2 次,每次 30 min,进行异鼠李素含量测定。

(2) 提取温度的选择。以 V<sub>乙酸乙酯</sub>:V<sub>95%乙醇</sub> 为 4:6 的溶剂为提取液,提取温度分别为 40℃、50℃、60℃、70℃,料液比 1:10,超声频率 40 kHz,超声 2 次,每次 30 min,进行异鼠李素含量测定。

(3) 超声频率的选择。以 V<sub>乙酸乙酯</sub>:V<sub>95%乙醇</sub> 为 4:6 的溶剂为提取液,提取温度 50℃,超声频率分别为 32、36 和 40 kHz,料液比 1:10,超声 2 次,每次 30 min,进行异鼠李素含量测定。

(4) 料液比的选择。以 V<sub>乙酸乙酯</sub>:V<sub>95%乙醇</sub> 为 4:6 的溶剂为提取液,提取温度 50℃,超声频率 40 kHz,料液比分别为 1:5、1:10、1:15、1:20 及 1:25,超声 2 次,每次 30 min,进行异鼠李素含量测定。

(5) 提取时间选择。以 V<sub>乙酸乙酯</sub>:V<sub>95%乙醇</sub> 为 4:6 的溶剂为提取液,提取温度 50℃,超声频率 40 kHz,料液比 1:20,每次提取时间分别为 10 min、30 min、1 h、1.5 h、2 h,超声 2 次,进行异鼠李素含量测定。

(6) 提取次数的选择。以 V<sub>乙酸乙酯</sub>:V<sub>95%乙醇</sub> 为 4:6 的溶剂为提取液,提取温度 50℃,超声频率 40 kHz,料液比 1:20,每次 1 h,超声 3 次,进行异鼠李素含量测定。

**1.3.4 正交试验** 在单因素实验的基础上选择超声频率(A)、料液比(B)、提取液(V<sub>乙酸乙酯</sub>:V<sub>95%乙醇</sub>)(C)、提取时间(D),设计 3 个水平,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验,进一步考察提取异鼠李素的工艺参数。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取液的选择

如图 1 所示,随着提取液中 95%乙醇比例增大,异鼠李素含量也逐渐增加,在 V<sub>乙酸乙酯</sub>:V<sub>95%乙醇</sub> 为 4:6 时异鼠李素含量最高,继续增大 95%乙醇比例,异鼠李素含量下降,因此最佳提取液应选择 V<sub>乙酸乙酯</sub>:V<sub>95%乙醇</sub> 为 4:6 的提取液。

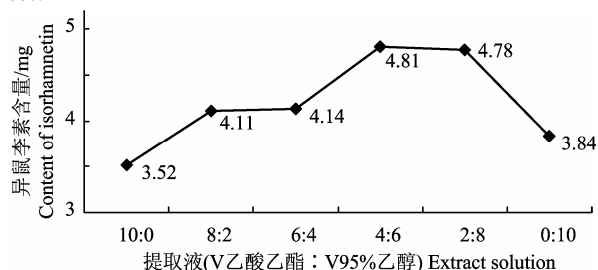


图 1 提取液对异鼠李素含量的影响

Figure 1 Effects of different extract solutions on the isorhamnetin contents

## 2.2 提取温度的选择

如图 2 所示, 提取温度从 40℃ 升高到 50℃, 异鼠李素含量也提高, 提取温度在 50℃ 到 70℃ 之间时, 随着温度的升高, 异鼠李素含量下降, 因此最佳提取温度为 50℃。

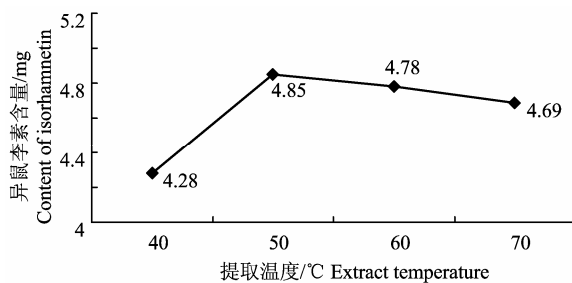


图 2 提取温度对异鼠李素含量的影响

Figure 2 Effects of different temperatures on the isorhamnetin contents

## 2.3 超声频率的选择

如表 1 所示, 随着超声频率的升高, 异鼠李素含量也提高, 在超声频率为 40 kHz 时, 异鼠李素含量最高, 因此提取的最佳超声频率为 40 kHz。

表 1 超声频率对异鼠李素含量的影响

Table 1 Effects of different ultrasonic frequencies on the isorhamnetin content

超声频率/kHz Ultrasonic frequency	异鼠李素含量/mg Isorhamnetin content
32	4.33
36	4.60
40	4.87

## 2.4 料液比的选择

如图 3 所示, 随着料液比升高, 异鼠李素含量提高, 但在料液比 1:20 之后, 曲线已基本平缓, 料液比 1:25 较料液比 1:20 提取效果而言, 异鼠李素含量只增加了 0.05 mg, 增加量并不大, 因此最佳料液比确定为 1:20。

## 2.5 提取时间的选择

如图 4 所示, 随着提取时间的增加, 异鼠李素含量增大, 当提取时间到达 1 h 之后, 曲线趋于平缓, 因此可确定最佳提取时间为 1 h。

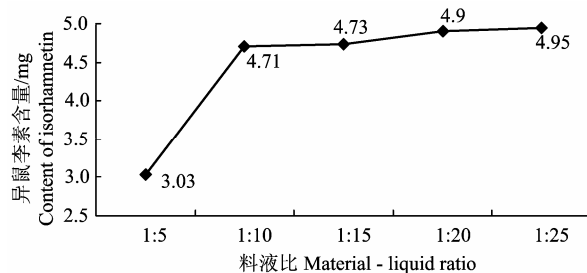


图 3 料液比对异鼠李素含量的影响

Figure 3 Effects of different solid-liquid ratios on the isorhamnetin content

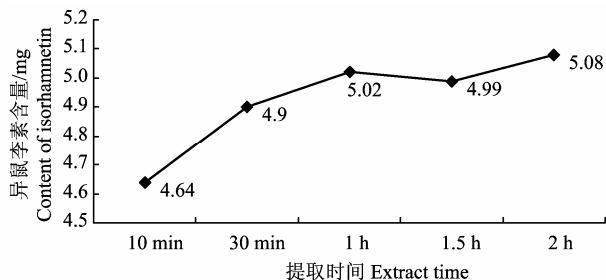


图 4 提取时间对异鼠李素含量的影响

Figure 4 Effects of different extraction time on the isorhamnetin content

## 2.6 提取次数的选择

如表 2 所示, 提取 2 次比提取 1 次异鼠李素含量增加 1.15 mg, 而提取 3 次比提取 2 次异鼠李素含量仅增加 0.06 mg, 因此最佳提取次数为 2 次。

表 2 提取次数对异鼠李素含量的影响

Table 2 Effects of different times on the isorhamnetin content

提取次数 Extract times	异鼠李素含量/mg Content of isorhamnetin
1	3.90
2	5.05
3	5.11

## 2.7 正交试验结果

根据单因素试验结果, 选择超声频率 (A)、料液比 (B)、提取液 ( $V_{\text{乙酸乙酯}} : V_{95\% \text{乙醇}}$ ) (C)、提取时间 (D), 设计 3 个水平, 以提取液中异鼠李素含量为指标, 采用  $L_9 3^4$  正交试验, 因素水平见表 3。

表 3 超声波提取法因素水平

Table 3 Levels of factors using ultrasonic extraction

水平 Level	因素 Factor			
	A 超声频率/KHz Ultrasonic frequency	B 料液比 Solid - liquid ratio	C 提取液 ( $V_{\text{乙酸乙酯}} : V_{95\% \text{乙醇}}$ ) Extract solution	D 提取时间/h Extract time
1	32	1:15	2:8	0.5
2	36	1:20	4:6	1
3	40	1:25	6:4	1.5

表4 超声波提取法正交试验结果

Table 4 Ultrasonic extraction results using orthogonal experiment

序号 Serial number	A	B	C	D	异鼠李素含量/mg Isorhamnetin content
1	1	1	1	1	3.77
2	1	2	2	2	4.81
3	1	3	3	3	5.02
4	2	1	2	3	3.87
5	2	2	3	1	3.69
6	2	3	1	2	4.52
7	3	1	3	2	4.75
8	3	2	1	3	4.90
9	3	3	2	1	5.09
K1	4.5337	4.1283	4.3955	4.1827	
K2	4.0244	4.4644	4.5882	4.7056	
K3	4.9101	4.8754	4.4845	4.5921	
R	0.8857	0.7471	0.1927	0.5229	

由表4可见,各因素对超声波提取法异鼠李素含量的影响程度各不相同,极差分析表明,影响次序依次为:超声频率(A)>料液比(B)>提取时间(D)>提取液 $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{95\%乙醇}$ (C)。结合K值可知最优化条件为 $A_3B_3D_2C_2$ ,即:超声频率40 kHz,料液比1:25,提取时间1 h, $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{95\%乙醇}$ 为4:6。

### 3 结论

通过单因素试验,确定比较好的因素水平是提取温度 $50^{\circ}\text{C}$ ,超声频率40 kHz,提取液为 $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{95\%乙醇}$ 为4:6,料液比为1:20,提取次数为2次,每次提取时间为1 h。

通过正交试验,本实验确定超声波辅助法提取沙棘果渣中异鼠李素的最佳工艺为:在 $50^{\circ}\text{C}$ 条件下,超声频率40 kHz,用 $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{95\%乙醇}$ 为4:6的提取液超声提取2次,每次1 h,料液比为1:25。以此方法提取所得异鼠李素含量可达 $5.09\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

本实验采用沙棘果渣作为原料,利用了废弃材料,且超声波法省时、操作简便、提取出的异鼠李素含量较高,是从沙棘果渣中提取异鼠李素的有效方法。

目前国际及国内对于异鼠李素生物活性的研究

十分活跃,异鼠李素在抗肿瘤、保护心血管等方面作用较强,但目前仍多集中在体外及动物实验,相信随着科学技术的进一步发展,会进一步开展人体和临床研究,充分发掘其对于癌症及人类心血管疾病的预防和治疗价值。

### 参考文献:

- [1] 闫涛, 罗丽梅, 谢竹田, 等. 沙棘的化学成分及生物功能的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2010, 31(1): 52-54.
- [2] 刘娟, 杨艳丽. HPLC法测定沙棘不同部位槲皮素和异鼠李素的含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(6): 16-17.
- [3] Murakami A. Mutitargeted cancer prevention by isorhamnetin[J]. Cancer Lett, 2008(3): 46-56.
- [4] 李炯, 王刚, 杜士明, 等. 异鼠李素抗肿瘤的作用及机制研究进展[J]. 山西医药杂志, 2011, 12(40): 1215-1217.
- [5] 张郁松, 罗仓学. 正价设计法优化沙棘果渣中总黄酮的提取工艺[J]. 沙棘, 2007, 20(6): 19-21.
- [6] 张冬雪. 水浸提沙棘果渣总黄酮工艺研究[J]. 国际沙棘研究与开发, 2008, 6(4): 10-13.
- [7] 苏伟, 翁佳燕, 李瑞霞, 等. 沙棘果中黄酮糖苷和黄酮配基的测定[J]. 国际沙棘研究与开发, 2007, 3(5): 33-37.
- [8] 马养民, 姜少娟, 史清华. 沙棘果渣中异鼠李素和槲皮素的提取与分离[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(5): 121-124.