



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109771475 A

(43)申请公布日 2019.05.21

(21)申请号 201910233147.8

(22)申请日 2019.03.26

(71)申请人 中北大学

地址 030051 山西省太原市学院路3号

(72)发明人 李会珍 张志军 谭永兰 崔丽霞

李晓君 陈铁

(74)专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限公司 11212

代理人 谈杰

(51) Int. Cl.

A61K 36/535(2006.01)

A61P 39/06(2006.01)

A61K 131/00(2006.01)

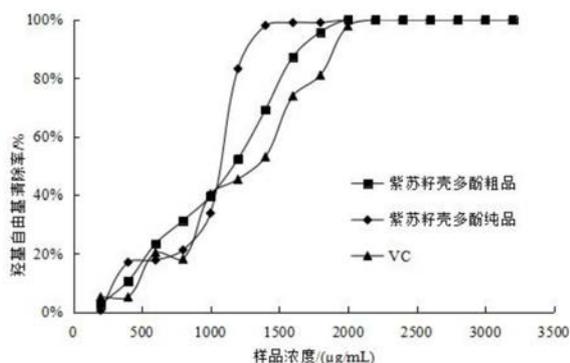
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54)发明名称

一种从紫苏籽壳中提取多酚的方法

(57)摘要

本发明公开了一种从紫苏籽壳中提取多酚的方法,将紫苏籽壳粉碎后置于乙醇水溶液中,所述紫苏籽壳与乙醇水溶液的液固比为10:1-30:1,在40-80℃下经超声提取15-75min得到提取液;将提取液离心,去除沉淀,得到上清液,将上清液旋蒸浓缩,浓缩液于50℃烘干,得到紫苏籽壳多酚粗品;将紫苏籽壳多酚粗品溶于去离子水,得到1-8mg/mL的上样液,上大孔树脂柱,以2-5BV/h流速进行上样,用3-5个柱体积的去离子水洗除杂质,用10-15个柱体积的50-80%乙醇进行洗脱,收集洗脱液,旋蒸浓缩,于50℃烘干,得到紫苏籽壳多酚纯品。与现有技术相比,本发明提取的多酚具有较强的抗氧化活性,且纯度高、提取率好、多酚活性保持良好,适合大规模工业化生产。



1. 一种从紫苏籽壳中提取多酚的方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、将紫苏籽壳粉碎后置于乙醇水溶液中,所述紫苏籽壳与乙醇水溶液的液固比为10:1-30:1,在40-80℃下经超声提取15-75min得到提取液;

S2、将提取液离心,去除沉淀,得到上清液,将上清液旋蒸浓缩,浓缩液于50℃烘干,得到紫苏籽壳多酚粗品;

S3、将紫苏籽壳多酚粗品溶于去离子水,得到1-8mg/mL的上样液,上大孔树脂柱,以2-5BV/h流速进行上样,用3-5个柱体积的去离子水洗除杂质,用10-15个柱体积的50-80%乙醇进行洗脱,收集洗脱液,旋蒸浓缩,于50℃烘干,得到紫苏籽壳多酚纯品。

2. 根据权利要求1所述的从紫苏籽壳中提取多酚的方法,其特征在于:所述S1中紫苏籽壳粉碎后过60目筛。

3. 根据权利要求1所述的从紫苏籽壳中提取多酚的方法,其特征在于:所述S1中乙醇水溶液与紫苏籽壳的液固比为20.76:1。

4. 根据权利要求1所述的从紫苏籽壳中提取多酚的方法,其特征在于:所述S1中乙醇体积分数为40-80%。

5. 根据权利要求1所述的从紫苏籽壳中提取多酚的方法,其特征在于:所述S1中超声提取时的温度为68.07℃。

6. 根据权利要求1所述的从紫苏籽壳中提取多酚的方法,其特征在于:所述S1中超声提取时间为46.23min。

7. 根据权利要求1所述的从紫苏籽壳中提取多酚的方法,其特征在于:所述S3中大孔树脂为XDA-8树脂。

## 一种从紫苏籽壳中提取多酚的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物提取物生产技术领域,特别是一种从紫苏籽壳中提取多酚的方法。

### 背景技术

[0002] 植物的多酚类提取物又称作单宁或鞣质,它是一类广泛存在于植物体内的具有多元酚结构的复杂酚类次生代谢物。植物多酚不仅具有抗氧化的能力和预防中风、抗血栓病和心血管等疾病发生的能力,而且还有抗癌和抑菌消炎抗病毒等作用,其在食品工业、化妆品、医药等领域均具有非常广阔的应用前景。

[0003] 在传统的紫苏籽榨油工艺中,紫苏籽壳经常被当做生产废弃物被丢掉,这不仅造成了环境的污染,而且也是极大的资源浪费,未将其充分的利用。紫苏籽壳的提取物中含有丰富的多酚类物质和黄酮类物质且具有非常强的抗氧化能力和还原能力。宋家乐研究发现紫苏籽壳提取物有很强的自由基清除能力和抗癌活性。李国清发现紫苏皮抽提物具有消除 $\text{NO}^{2-}$ ,对 $\text{Pb}^{2+}$ 有很强的吸附及一定的抗细胞膜氧化能力等保健作用。王天元通过实验证明紫苏籽壳提取物中含有丰富的黄酮及多酚类化合物,具有防止油脂氧化的功能。可用于代替化学合成抗氧化剂,不仅无毒,而且还具有保健作用。

[0004] 传统的多酚提取方法主要包括有机溶剂浸提法、热回流法。但是浸提法提取时间长且有溶剂残留,回流提取则容易时得多份化合物受热分解。近年来,超声和微波等新型萃取新技术被广泛应用于食品、生物和医药等领域。超声辅助提取法加热均匀、选择性高、设备简单、适用范围广、缩短实验和生产时间、减少溶剂耗量且提取的产品中杂质含量低、有效成分提取效率高,可以用于紫苏籽壳多酚的提取中。

[0005] 目前,关于紫苏活性物质提取与应用的研究越来越多,但是目前对紫苏的研究主要集中在紫苏叶及紫苏籽油方面,而关于紫苏籽壳的报道相对较少。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是要解决现有技术中存在的不足,提供一种从紫苏籽壳中提取多酚的方法,提取的多酚纯度高、提取率好、多酚活性保持良好。

[0007] 为达到上述目的,本发明是按照以下技术方案实施的:

[0008] 一种从紫苏籽壳中提取多酚的方法,包括以下步骤:

[0009] S1、将紫苏籽壳粉碎后置于乙醇水溶液中,所述紫苏籽壳与乙醇水溶液的液固比(v/m)为10:1-30:1,在40-80℃下经超声提取15-75min得到提取液;

[0010] S2、将提取液离心,去除沉淀,得到上清液,将上清液旋蒸浓缩,浓缩液于50℃烘干,得到紫苏籽壳多酚粗品;

[0011] S3、将紫苏籽壳多酚粗品溶于去离子水,得到1-8mg/mL的上样液,上大孔树脂柱,以2-5BV/h流速进行上样,用3-5个柱体积的去离子水洗除杂质,用10-15个柱体积的50-80%乙醇进行洗脱,收集洗脱液,旋蒸浓缩,于50℃烘干,得到紫苏籽壳多酚纯品。

- [0012] 作为本发明的进一步改进技术方案,所述S1中紫苏籽壳粉碎后过60目筛。
- [0013] 作为本发明的优选技术方案,所述S1中乙醇水溶液与紫苏籽壳的液固比(v/m)为20.76:1。
- [0014] 作为本发明的优选技术方案,所述S1中乙醇体积分数为40-80%。
- [0015] 作为本发明的优选技术方案,所述S1中超声提取时的温度为68.07℃。
- [0016] 作为本发明的优选技术方案,所述S1中超声提取时间为46.23min。
- [0017] 作为本发明的优选技术方案,所述S3中大孔树脂为XDA-8树脂。
- [0018] 与现有技术相比,本发明在超声波辅助作用下,采用乙醇水溶液提取多酚,经过离心、旋蒸、烘干制备得到紫苏籽壳多酚粗品,并经过纯化,得到高纯度的多酚产品,该方法生产所采用的提取时间短、操作简单、步骤较少、生产成本较低,提取的多酚具有较强的抗氧化活性,且纯度高、提取率好、多酚活性保持良好,适合大规模工业化生产。

### 附图说明

- [0019] 图1为超声提取中乙醇体积分数因素实验结果。
- [0020] 图2为液固比因素实验结果。
- [0021] 图3为提取时间因素实验结果。
- [0022] 图4为提取温度因素实验结果。
- [0023] 图5为液固比和提取时间对紫苏籽壳多酚提取得率影响的响应面3D图。
- [0024] 图6为液固比和提取温度对紫苏籽壳多酚提取得率影响的响应面3D图。
- [0025] 图7为提取温度和提取时间对紫苏籽壳多酚提取得率影响的响应面3D图。
- [0026] 图8为DPPH抗氧化活性分析实验结果。
- [0027] 图9为ABTS抗氧化活性分析实验结果。
- [0028] 图10为 $\cdot\text{OH}$ 抗氧化活性分析实验结果。

### 具体实施方式

- [0029] 为使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步的详细说明。此处所描述的具体实施例仅用于解释本发明,并不用于限定发明。
- [0030] 实验材料
- [0031] 实验原料
- [0032] 本实施例所用紫苏籽壳来自于中北大学实验田,成熟的紫苏种子脱壳。
- [0033] 实验药品
- [0034] DPPH、无水乙醇、浓盐酸、氯化铁、醋酸钠、冰醋酸、TPTZ、邻菲罗啉、硫酸亚铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液、铁氰化钾、三氯乙酸、ABTS、过硫酸钾、抗坏血酸、碳酸钠、福林酚。
- [0035] 实验仪器
- [0036] 超声波清洗机、恒温水浴锅、高速离心机、电子天平、可见分光光度计、分析天平、离心机、旋转蒸发仪、烘箱。
- [0037] 试验方法
- [0038] 单因素实验设计

[0039] 用万能粉碎机将紫苏籽壳粉碎后,过60目筛,保存备用。准确称取1.00g过60目筛的紫苏籽壳,放入烧杯中,按一定液固比加入乙醇,混匀,以超声功率300W进行提取,将提取液离心10min(5000r/min)。

[0040] 固定反应条件为乙醇体积分数50%,超声温度50℃,超声时间30min,考察不同液固比(v/m)(10:1、15:1、20:1、25:1、30:1)对紫苏籽壳多酚的影响。固定反应条件为液固比20:1,超声温度50℃,超声时间30min,考察不同乙醇体积分数(40%、50%、60%、70%、80%)对紫苏籽壳多酚的影响。固定反应条件为乙醇体积分数50%,液固比20:1,超声温度50℃,考察不同超声时间(15min、30min、45min、60min、75min)对紫苏籽壳多酚的影响。固定反应条件为乙醇体积分数50%,液固比20:1,超声时间30min,考察不同超声温度(40℃、50℃、60℃、70℃、80℃)对紫苏籽壳多酚的影响。

[0041] 多酚含量的测定方法

[0042] 本实施例采用福林-酚比色法,10mL试管中,加入1mL样品,6mL水,摇匀后加入0.5mL福林-酚试剂,充分混匀,在暗处放置5min后,接着加入1.5mL 7%的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液,立即用蒸馏水定容至10mL,加塞后充分摇匀,在室温下放置60min,在750nm波长下测定吸光度。根据标曲计算多酚含量。

[0043] 响应面试验设计

[0044] 根据单因素试验确定的各变量范围,选取液固比(X<sub>1</sub>)、超声时间(X<sub>2</sub>)和超声温度(X<sub>3</sub>)为自变量,多酚(Y)含量为响应值,通过Design Expert 8.0.6软件,采用Box-Behnken试验设计方法,进行三因素三水平的响应面分析试验。

[0045] 表1 Box-Behnken因素及水平表

[0046]

水平	因素		
	X <sub>1</sub> 液固比	X <sub>2</sub> 超声时间(min)	X <sub>3</sub> 超声温度(℃)
-1	15:1	30	60
0	20:1	45	70
1	25:1	60	80

[0047] 按照最佳条件提取紫苏籽壳多酚,旋蒸浓缩后,50℃烘干得粗品。

[0048] 紫苏籽壳多酚纯化

[0049] 称取6.5g经过预处理的XDA-8树脂,湿法装柱(酸式滴定管),柱高10cm,柱体积5mL。进行上样,上样吸附完毕,用洗脱剂洗脱,每1BV收集一次流出液,测定流出液中多酚浓度,以流出液体积和多酚浓度为横、纵坐标绘制动态曲线。1-8mg/mL的上样液,上大孔树脂柱,以2-5BV/h流速进行上样,用3-5个柱体积的去离子水洗除杂质,用10-15个柱体积的50-80%乙醇进行洗脱,收集洗脱液,旋蒸浓缩,于50℃烘干,得到紫苏籽壳多酚纯品。

[0050] 抗氧化活性测定

[0051] 清除DPPH·能力测定:取0.3mL待测液与2.7mL DPPH溶液(60μmol/L)于试管中,混匀,暗处静置30min,以无水乙醇为参比,在518nm测定吸光度,按照公式: $Y(\%) = [1 - (A_s - A_r) / A_0] \times 100$ 计算DPPH自由基清除率,式中:A<sub>0</sub>为0.3mL无水乙醇+2.7mL DPPH溶液的吸光

度;Ar为0.3mL样品+2.7mL无水乙醇的吸光度;As为0.3mL样品+2.7mL DPPH溶液的吸光度。并用GraphPad Prism 5软件计算IC<sub>50</sub>值。

[0052] 清除OH·能力测定:将1mL邻菲罗啉(5mmol/L)、0.5mL Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(7.5mmol/L)、1mL磷酸盐缓冲液(0.2mol/L,pH 7.4)、1mL样品及0.5mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>混合并用蒸馏水稀释至10mL。然后将混合物在37℃水浴1h。用蒸馏水作参比,在510nm测量吸光度,按照公式: $Y(\%) = [(A_s - A_r) / (A_r - A_0)] \times 100$ 计算·OH清除率,式中:A<sub>0</sub>为不加样品和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的吸光度,Ar为不加样品的吸光度,As为添加样品和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的吸光度。并用GraphPad Prism 5软件计算IC<sub>50</sub>值。

[0053] 清除ABTS+能力测定:取1mL待测液与3mL ABTS工作液(A734=0.70±0.02)于试管中,混匀,暗处静置6min,以无水乙醇为参比,在734nm测定吸光度,按照公式: $Y(\%) = [1 - (A_s - A_r) / A_0] \times 100$ 计算ABTS自由基清除率,式中:A<sub>0</sub>为1mL无水乙醇+3mL ABTS工作液的吸光度;Ar为1mL样品+3mL无水乙醇的吸光度;As为1mL样品+3mL ABTS工作液的吸光度。并用GraphPad Prism 5软件计算IC<sub>50</sub>值。

[0054] 结果与分析

[0055] 单因素实验结果

[0056] 由图1-4,可知,在乙醇体积分数为50%,液固比为20:1,提取时间为45min,提取温度为70℃时,多酚含量分别达到最大值,分别为16.98,21.39,17.90,18.78mg/g。因此,选择液固比(v/m)(15:1,20:1,25:1),提取时间(30,45,60min)和温度(60,70,80℃)进行进一步优化。

[0057] 响应面实验结果

[0058] 表2 响应面实验结果

[0059]

组别	X <sub>1</sub> 液固比	X <sub>2</sub> 时间(min)	X <sub>3</sub> 温度(℃)	Y 多酚含量 (mg/g)
1	25	60	70	21.2647
2	20	45	70	25.6478
3	25	45	80	20.8389

[0060]

4	20	45	70	26.0361
5	20	45	70	25.2242
6	25	30	70	20.8974
7	15	30	70	18.8748
8	20	30	80	18.565
9	20	30	60	20.565
10	20	60	80	21.2242
11	20	60	60	21.9655
12	15	60	70	18.9542
13	20	45	70	26.495
14	15	45	80	19.219
15	15	45	60	21.6751
16	25	45	60	22.4561
17	20	45	70	25.3885

[0061] 用Design-Expert 8.0.6软件对表1的结果进行分析,得到的二次多项回归方程为: $Y=25.76+0.84X_1+0.56X_2-0.85X_3+0.072X_1X_2+0.21X_1X_3+0.31X_2X_3-2.65X_1^2-3.11X_2^2-2.06X_3^2$ 。

[0062] 表3 回归模型

[0063]

方差来源	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 值	P 值
模型	112.86	9	12.54	26.02	0.0001**
X <sub>1</sub>	5.67	1	5.67	11.76	0.011*
X <sub>2</sub>	2.54	1	2.54	5.27	0.0554
X <sub>3</sub>	5.8	1	5.8	12.04	0.0104*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.021	1	0.021	0.043	0.8417
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.18	1	0.18	0.36	0.5648
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.4	1	0.4	0.82	0.3948
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	29.49	1	29.49	61.18	0.0001**
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	40.83	1	40.83	84.7	<0.0001**
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	17.95	1	17.95	37.23	0.0005**
残差	3.37	7	0.48		
失拟值	2.32	3	0.77	2.93	0.1626
纯误差	1.05	4	0.26		
总误差	116.24	16			

[0064] 由图5-7响应面3D图及表2、3分析,用软件拟合得出,紫苏籽壳多酚超声提取最佳工艺为液固比(v/m) 20.76:1,提取时间46.23min,提取温度68.07℃,此条件下多酚含量为25.59mg/g。根据实际情况进行调整,液固比:21:1,超声时间:47min,超声温度:68℃,多酚含量为25.11mg/g。

[0065] 抗氧化性试验结果

[0066] 由图8-10,以Vc为阳性对照,可以清楚的观察到,紫苏籽壳多酚粗品和纯品清除DPPH自由基的能力要弱于标准物质Vc;纯品清除ABTS的能力要强于标准物质Vc;在清除羟自由基能力的测定中,粗品和纯品都要强于标准物质Vc。整体来说,纯品的抗氧化能力要高于粗品。

[0067] 综上所述,通过本发明从紫苏籽壳提取的多酚具有很强的抗氧化能力,是很好地天然抗氧化剂,具有很高的经济利用价值和广阔的开发前景。

[0068] 本发明的技术方案不限于上述具体实施例的限制,凡是根据本发明的技术方案做出的技术变形,均落入本发明的保护范围之内。

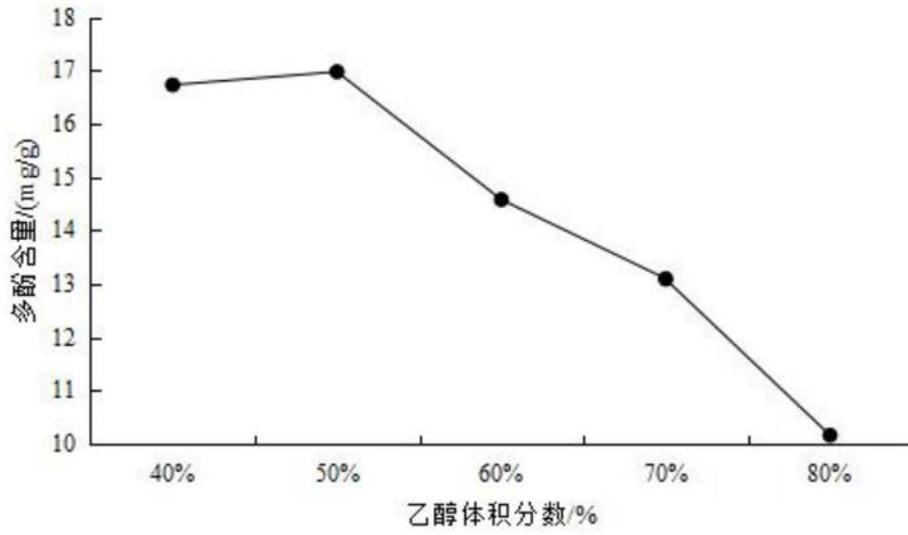


图1

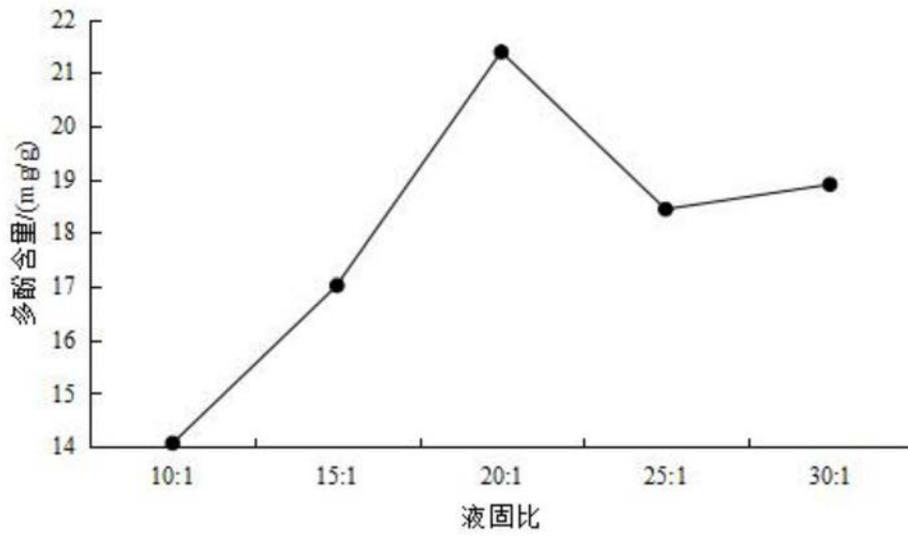


图2

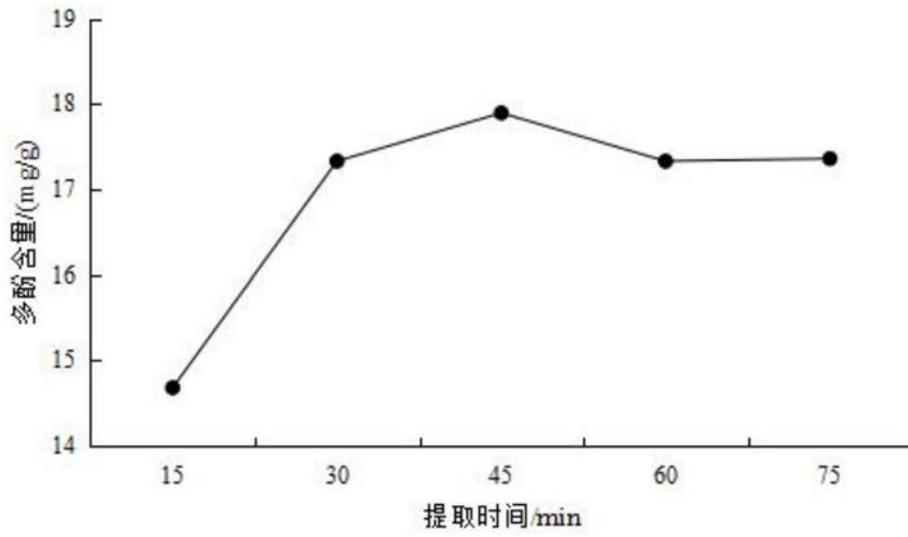


图3

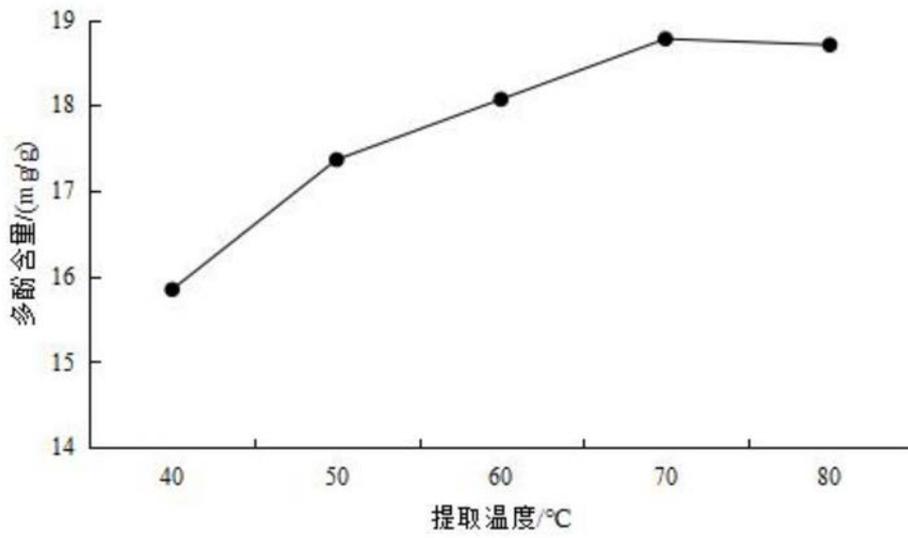


图4

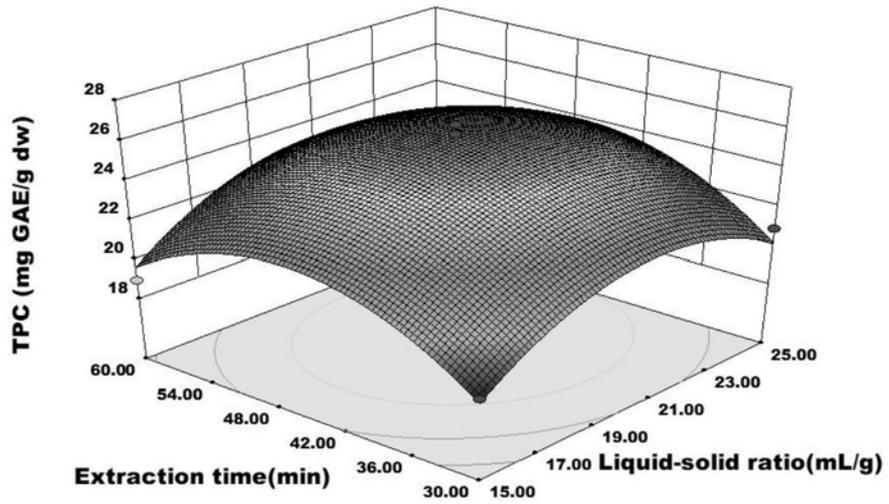


图5

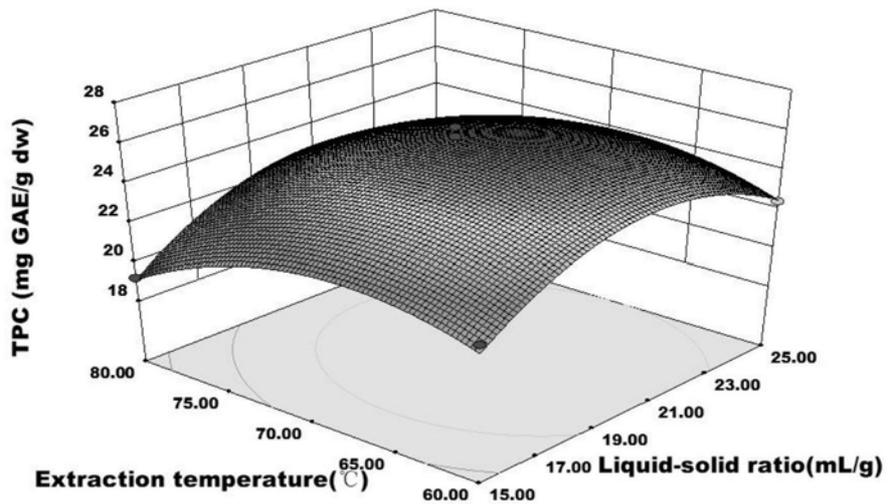


图6

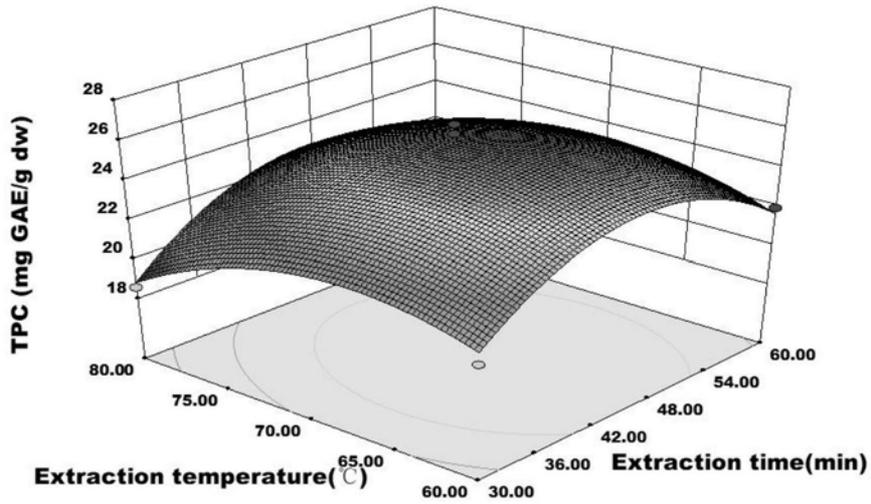


图7

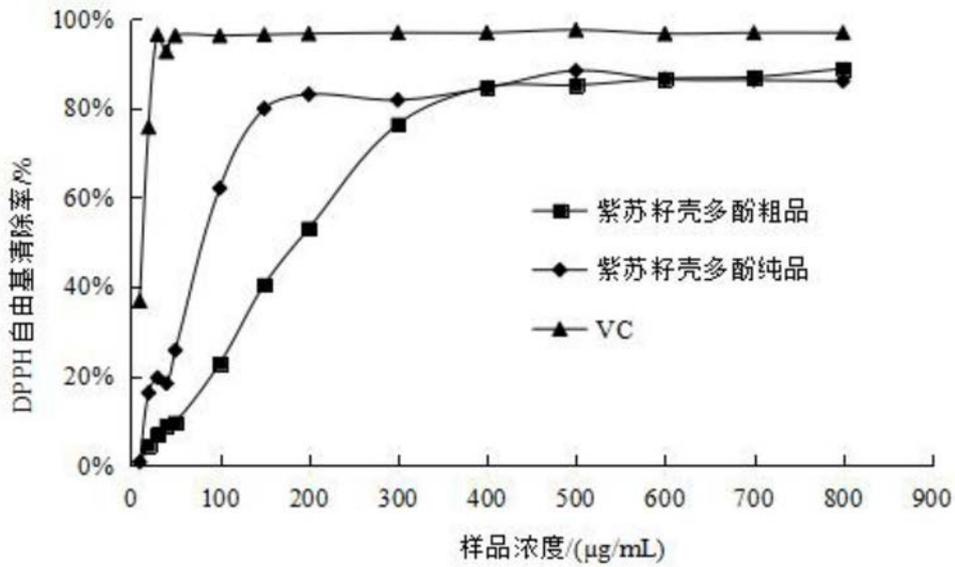


图8

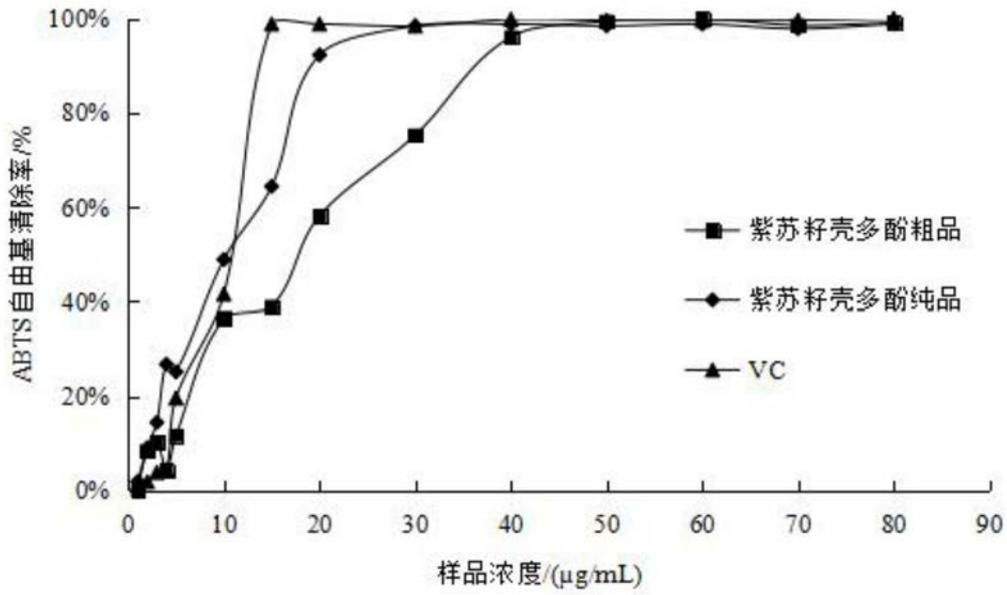


图9

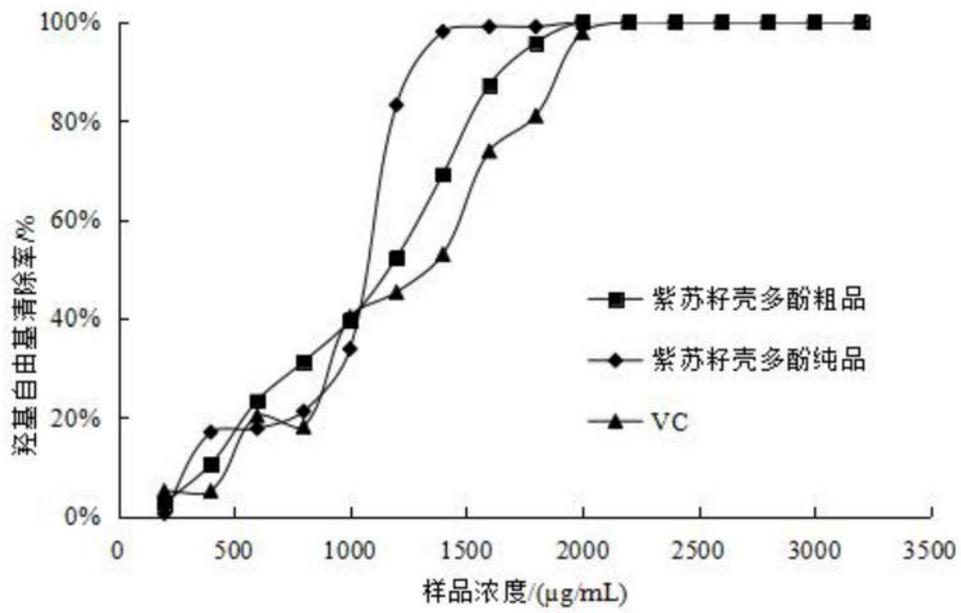


图10