

狗枣猕猴桃叶黄酮提取工艺的研究

王倩, 常丽新*, 贾长虹, 唐红梅
(河北理工大学化工与生物技术学院, 河北唐山 063009)

摘要:以乙醇作为提取剂, 采用振荡提取法从狗枣猕猴桃叶中提取黄酮类化合物, 研究了乙醇浓度、样品粒度、料液比、浸提温度、浸提时间及浸提次数对提取效果的影响。结果表明, 料液比对黄酮提取效果影响最大, 其次为提取时间和提取温度, 而样品粒度和乙醇浓度影响较小。狗枣猕猴桃叶黄酮的最佳提取工艺条件为: 乙醇浓度 75%, 粒度 80 目, 料液比 1:15, 浸提温度 80℃, 浸提时间 2h, 浸提次数 3 次。在此条件下黄酮提取率可达 7.250%。

关键词:狗枣猕猴桃叶, 黄酮, 提取, 振荡

Study on the extraction technology of flavonoids from *Actinidia kolomikta* leaves

WANG Qian, CHANG Li-xin*, JIA Chang-hong, TANG Hong-mei

(Chemical Engineering and Biotechnology College, Hebei Polytechnic University, Tangshan 063009, China)

Abstract: Ethanol as extracting solvent, flavonoids was extracted from *Actinidia kolomikta* leaves using oscillating method. The influences of ethanol concentration, particle size, ratio of material to liquid, extracting temperature, extracting time and extracting times on extracting effect were studied. The results showed that ratio of material to liquid was the main influencing factor, then was extraction time and extraction temperature, particle size and ethanol concentration was the weakest ones. The optimum extracting conditions were ethanol concentration 75%, particle size 80, ratio of material to liquid 1:15, extracting temperature 80℃, extracting time 2h, extracting 3 times. In these conditions, the extraction yield of flavonoids was 7.250%.

Key words: *Actinidia kolomikta* leaves; flavonoids; extraction; oscillation

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2011)05-0235-04

狗枣猕猴桃为猕猴桃科猕猴桃属多年生落叶藤本植物, 别名深山木天蓼、狗枣子, 主要分布于我国东北、华北、华中、西北、西南以及朝鲜、日本、俄罗斯等地。狗枣猕猴桃果实和叶均可入药, 它自生山野, 具有较高的经济价值和药用价值。其果实含有丰富的蛋白质、V_C、脂肪、糖类、氨基酸等营养成分; 叶子和根含有咖啡酸、香豆素、生物碱、黄酮类等物质^[1-2]。研究发现狗枣猕猴桃叶黄酮对缺血后大鼠神经元形态和超微结构具有保护作用, 对急性缺血性脑细胞和心肌细胞具有保护作用且存在量效关系^[3-4]。目前国内外关于狗枣猕猴桃叶黄酮提取工艺的研究报道较少^[5-7]。本文以乙醇作为提取剂结合振荡浸提法, 通过单因素实验和正交实验对狗枣猕猴桃叶黄酮提取工艺进行了研究, 以期对狗枣猕猴桃的综合开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

收稿日期: 2010-04-15 * 通讯联系人

作者简介: 王倩 (1982-) 女, 在读硕士, 研究方向: 植物中天然活性成分的研究与开发。

基金项目: 河北省科技支撑计划项目 (07220701D-5)。

狗枣猕猴桃叶 2009 年 9 月底采自河北省雾灵山, 将采集的狗枣猕猴桃叶先用自来水洗净, 再用蒸馏水洗 3 遍, 用滤纸或纱布吸干表面水分, 于 90℃ 杀酶 15min, 在 60~65℃ 烘干至脆。将烘干的狗枣猕猴桃叶粉碎, 依次用 20、40、60、80、100、120 目的样品筛筛选, 备用; 无水乙醇、亚硝酸钠、芦丁 (中国药品生物制品检定所; 硝酸铝、氢氧化钠 均为分析纯。

202-0 台式电热干燥箱 中国天津泰斯特仪器有限公司; 标准检验筛 浙江上虞市道墟路达仪器厂; BM251 搅拌机 美的; JA2003 电子天平 上海上平仪器公司; SHA-B 水浴恒温振荡器 江苏省金坛市医疗仪器厂; 800-离心机 江苏金坛城西小阳电子仪器厂; 752 型可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的绘制^[8] 准确称取 105℃ 烘干至恒重的芦丁标准品 0.0250g 于 100mL 容量瓶中, 80% 乙醇溶解, 定容, 冷藏放置于冰箱中。准确吸取 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0、16.0mL 于 50mL 容量瓶中, 加 5% 亚硝酸钠 1.5mL, 混匀, 放置 6min, 加入 10% 硝酸铝 1.5mL, 混匀, 放置 6min, 加 4% 氢氧化钠 20mL, 加蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 放置 15min。

在波长 510nm 下测定吸光度。回归方程为: $Y = 0.2364X - 0.01024$, 式中: X 为芦丁含量 (mg), Y 为吸光度, $R = 0.99895$ 。

1.2.2 黄酮提取工艺流程 狗枣猕猴桃叶粉末 → 振荡提取 → 提取液 → 复提 → 合并提取液并定容 → 测定黄酮

1.2.3 黄酮提取率的计算 狗枣猕猴桃叶黄酮提取率 (%) = 狗枣猕猴桃叶黄酮含量 / 狗枣猕猴桃叶重量 × 100%

1.2.4 单因素实验设计 以乙醇浓度、样品粒度、料液比、浸提温度、浸提时间、浸提次数 6 个因素进行单因素实验。

1.2.5 正交实验设计 根据单因素实验结果,设计乙醇浓度、样品粒度、料液比、浸提温度、浸提时间五因素四水平的正交实验,确定狗枣猕猴桃叶黄酮的最佳工艺条件。

表 1 $L_{16}(4^5)$ 正交实验因素水平表

水平	因素				
	A 乙醇浓度 (%)	B 粒度 (目)	C 料液比 (g/mL)	D 浸提温度 (°C)	E 浸提时间 (h)
1	70	60	1:10	60	1
2	75	80	1:15	70	2
3	80	100	1:20	80	3
4	85	120	1:25	90	4

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果与分析

2.1.1 乙醇浓度对狗枣猕猴桃叶黄酮提取效果的影响 称取狗枣猕猴桃叶粉末 (60 目) 0.2000g, 按料液比 1:20 (g/mL) 分别加入浓度为 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 的乙醇溶液, 置于 20°C 水浴恒温振荡器中振荡浸提 1h, 离心, 再按同样条件浸提 1 次, 离心, 合并提取液, 定容至 25mL, 测定黄酮的提取率。

从图 1 可以看出, 随着乙醇浓度的增大, 黄酮提取率逐渐升高, 但当乙醇浓度超过 80% 时, 提取率有所下降, 这说明野生狗枣猕猴桃叶中的黄酮可能主要是以苷类的形式存在。因此确定乙醇溶液的最佳浓度为 80%。

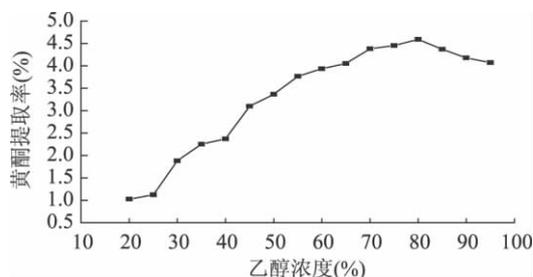


图 1 乙醇浓度对提取效果的影响

2.1.2 样品粒度对狗枣猕猴桃叶黄酮提取效果的影响 称取粒度为 20、40、60、80、100、120 目狗枣猕猴桃叶粉末各 0.2000g, 按料液比 1:20 (g/mL) 加入 80% 乙醇溶液, 置于 20°C 水浴恒温振荡器中振荡浸提 1h, 离心, 再按同样条件浸提 1 次, 离心, 合并提取液, 定容至 25mL, 测定黄酮的提取率。

从图 2 可以看出, 在 20~80 目, 随样品粒度的增

大, 黄酮提取率逐渐升高, 但当粒度超过 80 目时, 提取率呈下降趋势。这说明, 在一定粒度范围内, 随粒度的增加, 黄酮的溶解性增强, 但粒度过细, 会使黄酮在样品颗粒表面的吸附增加, 从而降低其在溶剂中的溶解性。因而选择 80 目为最佳粒度。

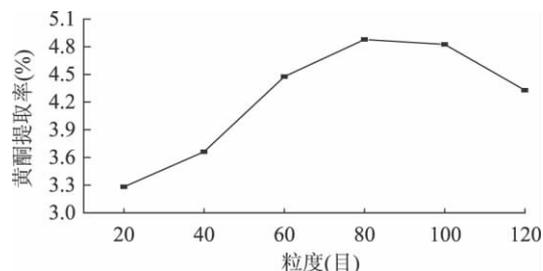


图 2 粒度对提取效果的影响

2.1.3 料液比对狗枣猕猴桃叶黄酮提取效果的影响

称取粒度 80 目的狗枣猕猴桃叶粉末 0.2000g, 按料液比 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 加入 80% 乙醇溶液, 置于 20°C 水浴恒温振荡器中振荡浸提 1h, 离心, 再按同样条件振荡浸提 1 次, 离心, 合并提取液, 定容至 25mL, 测定黄酮的提取率。

从图 3 可以看出, 随料液比的增大, 黄酮提取率呈上升趋势, 但料液比超过 1:15 时呈下降趋势。通常在样品量一定的情况下, 增加溶剂的量可以使原料颗粒周围的浓度降低, 增大细胞壁内外两侧的浓度差, 从而促进有效成分的溶出。因此在振荡的作用下, 溶剂量的适当增加有利于黄酮提取率的提高, 但增加到一定程度会减小恒温水浴振荡器的振荡作用, 降低了黄酮提取率。因此选 1:15 为最佳料液比。

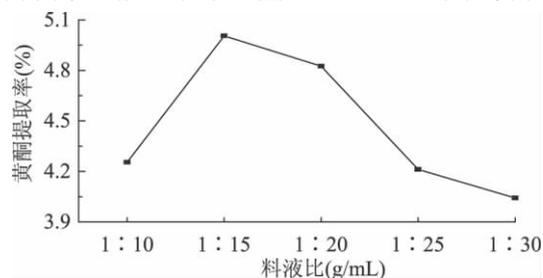


图 3 料液比对提取效果的影响

2.1.4 浸提温度对狗枣猕猴桃叶黄酮提取效果的影响

称取粒度 80 目的狗枣猕猴桃叶粉末 0.2000g, 按料液比 1:15 (g/mL) 加入 80% 乙醇溶液, 置于 20、30、40、50、60、70、80、90、100°C 水浴恒温振荡器中振荡浸提 1h, 离心, 再按同样条件浸提 1 次, 离心, 合并提取液, 定容至 25mL, 测定黄酮的提取率。

从图 4 可以看出, 随浸提温度的升高, 黄酮提取率逐渐增加, 但超过 80°C 时, 提取率增加不太明显, 一般情况下, 温度升高会使分子运动速度加快, 从而促进溶解, 但温度过高可能会引起黄酮类化合物被氧化破坏, 还会造成杂质溶出量的增加^[9], 因而选择 80°C 为最佳提取温度。

2.1.5 浸提时间对狗枣猕猴桃叶黄酮提取效果的影响

称取粒度 80 目的狗枣猕猴桃叶粉末 0.2000g, 按料液比 1:15 (g/mL) 加入 80% 乙醇溶液, 置于 20°C 水浴恒温振荡器中分别振荡浸提 1、2、3、4、5、6h, 离心, 再按同样条件浸提 1 次, 离心, 合并提取液, 定容至

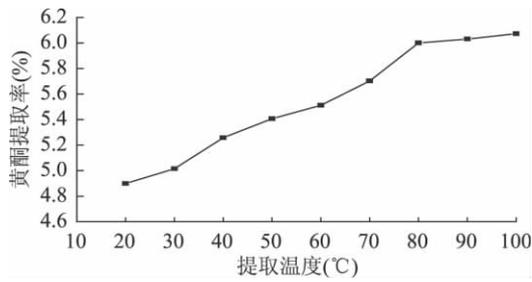


图4 浸提温度对提取率的影响

25 mL, 测定黄酮的提取率。

从图5可以看出,随浸提时间的延长,黄酮提取率呈上升趋势,但超过2h后,提取率的增加不太明显,通过方差分析,并从经济方面考虑,选择2h为最佳提取时间。

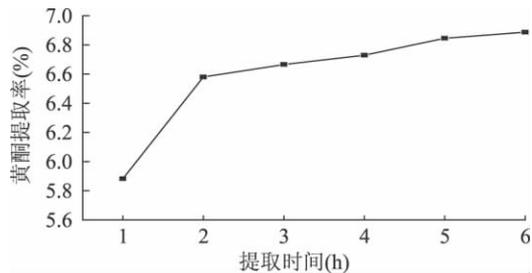


图5 浸提时间对提取效果的影响

2.1.6 浸提次数对狗枣猕猴桃叶黄酮提取效果的影响 称取粒度80目的狗枣猕猴桃叶粉末0.2000g,按料液比1:15(g/mL)加入80%乙醇溶液,置于80℃水浴恒温振荡器中振荡浸提2h,离心,再按同样条件分别提取1、2、3、4、5次,离心,合并提取液,定容至25 mL,测定黄酮的提取率。

从图6可以看出,随浸提次数的增加,黄酮提取率逐渐升高,当浸提超过3次时,黄酮提取率变化不大,通过方差分析,并从经济方面考虑,选择浸提3次为最佳浸提次数。

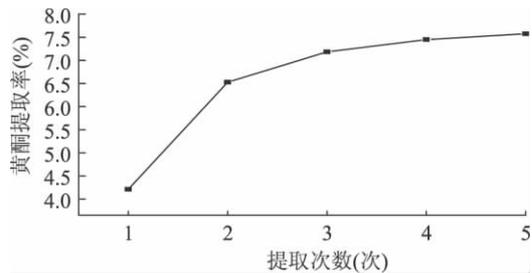


图6 浸提次数对提取效果的影响

2.2 正交实验结果与分析

从表2可以看出:各实验因素及其因素水平对狗枣猕猴桃叶黄酮提取率的影响表现出一定的差异,五个因素极差R值的大小排列顺序为:C>E>D>B>A,即影响黄酮提取率的主要因素是料液比,其次为浸提时间和浸提温度,而样品粒度和乙醇浓度影响较小。

由表3方差分析可以看出,各因素的P值均小于0.01,说明这五个因素对狗枣猕猴桃叶黄酮提取率的影响均极显著,通过F值的大小验证了正交实验极差分析的C>E>D>B>A结论,即影响狗枣猕猴桃叶黄酮提取效果的因素顺序:料液比>浸提时

间>浸提温度>样品粒度>乙醇浓度。通过正交实验和方差分析结果,可以确定最佳提取工艺条件组合为A₂B₂C₂D₃E₂,即乙醇浓度75%,样品粒度80目,料液比1:15,浸提温度80℃,浸提时间2h。

表2 正交实验结果分析表

实验号	A	B	C	D	E	黄酮提取率(%)
1	1	1	1	1	1	5.470
2	1	2	2	2	2	6.982
3	1	3	3	3	3	7.125
4	1	4	4	4	4	6.305
5	2	1	2	3	4	7.183
6	2	2	1	4	3	7.003
7	2	3	4	1	2	6.570
8	2	4	3	2	1	6.401
9	3	1	3	4	2	7.077
10	3	2	4	3	1	6.549
11	3	3	1	2	4	6.707
12	3	4	2	1	3	6.739
13	4	1	4	2	3	6.147
14	4	2	3	1	4	6.809
15	4	3	2	4	1	6.898
16	4	4	1	3	2	6.432
k ₁	6.470	6.469	6.403	6.397	6.329	
k ₂	6.789	6.836	6.950	6.559	6.765	
k ₃	6.768	6.825	6.853	6.822	6.754	
k ₄	6.572	6.469	6.393	6.821	6.751	
R	0.319	0.367	0.557	0.425	0.436	

表3 方差分析表

变异来源	偏差平方和	自由度	方差	F值	P值
A	0.865	3	0.288	96.419	P<0.01
B	1.549	3	0.516	172.684	P<0.01
C	3.063	3	1.021	341.480	P<0.01
D	1.574	3	0.525	175.488	P<0.01
E	1.611	3	0.573	179.609	P<0.01
误差	0.096	32	0.003		
总变异	8.757	47			

2.3 最佳工艺条件验证

准确称取一定量狗枣猕猴桃叶粉末,在上述工艺条件下对样品连续提取3次,并做三次平行实验,得黄酮平均提取率7.250%。

表4 最佳工艺条件验证结果

实验次数	1	2	3
提取率(%)	7.257	7.173	7.321
平均提取率(%)	7.250		

3 结论

以乙醇作为提取剂,结合振荡提取法提取狗枣猕猴桃叶黄酮,单因素实验和正交实验结果表明,影响狗枣猕猴桃叶黄酮提取的主要因素是料液比,其次是浸提时间和浸提温度,而粒度和乙醇浓度的影响较小。最佳提取工艺条件为:以75%乙醇溶液作为提取剂,在温度80℃,料液比1:15(g/mL)条件下,采用粒度80目的样品,浸提2h,连续提取3次,黄酮提取率可达7.250%。狗枣猕猴桃叶黄酮含量较高,因此狗枣猕猴桃叶有重要的开发利用价值。

(下转第241页)

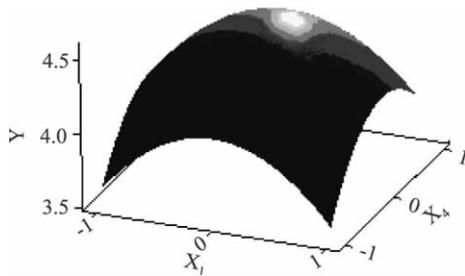


图7 微波功率及水浴时间交互影响核糖核酸得率的曲面图

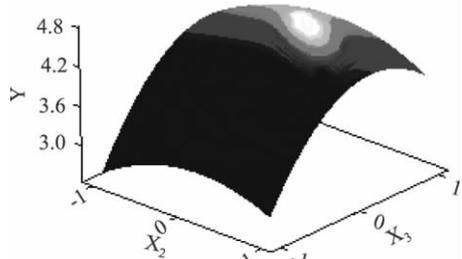


图8 微波时间及液料比交互影响核糖核酸得率的曲面图

2.02h,茶树菇核糖核酸得率理论值可达4.6638%。为检验该法的可靠性,考虑到实际操作的便利,将最佳工艺参数修正为:微波功率495W,微波时间7min,液料比18:1,水浴浸提时间2.0h。进行核酸提取的验证实验,经3次平行实验,实际得率分别为4.57%、4.46%及4.55%,实际得率平均值为4.53%,可见,实验结果与模型符合良好,说明该模型能较好地模拟和预测茶树菇核糖核酸得率。

2.2.4 与传统核糖核酸提取方法的比较 目前常用于工业上核糖核酸提取的方法主要有:浓盐法^[9]、稀碱法^[10]。选取最佳提取条件,以核糖核酸得率为指标,对微波法、盐法和碱法进行比较。

由图9可知,氨法和浓盐法核糖核酸得率分别为3.04%和3.83%,微波法辅助提取核糖核酸得率为

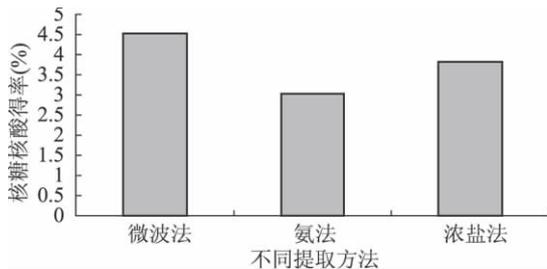


图9 微波法与浓盐法及氨法提取核糖核酸比较

(上接第237页)

参考文献

[1] 郑玉建,包晓玲,黄瑾,等.狗枣猕猴桃根对小鼠抗氧化作用[J].中国公共卫生,2008,24(1):75-76.
 [2] 赵瑞艳,付钧钧,张海军.狗枣猕猴桃的开发利用[J].中国林业,2007(12):42.
 [3] 王靖,杨东娜,陈嘉峰,等.狗枣猕猴桃叶提取物黄酮对大鼠局灶性脑缺血损伤组织病理结构的影响[J].中国卒中杂志,2006(12):842-845.
 [4] 金永日.狗枣猕猴桃叶黄酮类成分与生物活性研究[D].

吉林大学,2007.
 [5] 常晓丽,马冰如,何玲.狗枣猕猴桃叶化学成分的研究(I)[J].中草药,1993,24(6):283-285.
 [6] 金永日,桂明玉,李绪文,等.狗枣猕猴桃叶化学成分研究[J].高等学校化学学报,2007,28(11):2060-2064.
 [7] 陆娟.狗枣猕猴桃叶化学成分研究[D].吉林大学,2009.
 [8] 李志洲,刘军海.草莓中黄酮的提取及其抗氧化性研究[J].食品研究与开发,2007,28(7):31-34.
 [9] 周丽,李秉超.草本龙牙中总黄酮提取工艺的研究[J].氨基酸和生物资源,2007,29(1):15-17.

3 结论

将微波技术应用于核糖核酸的提取,通过单因素实验得出微波功率、微波时间、料液比、水浴浸提时间对总核酸得率有一定程度的影响。并用响应面分析法优化提取工艺,采用合理的实验设计,依据回归分析确定各因素对核糖核酸得率的影响,取得了比较好的结果,经优化后确定微波辅助提取茶树菇核糖核酸的最佳工艺条件为:微波功率495W,微波作用时间7min,液料比18:1,水浴浸提时间2h,茶树菇核糖核酸得率可达4.53%。同时,与工业上常用的提取核糖核酸方法相比,微波法辅助提取核糖核酸可大大缩短操作时间,精简实验过程,为食用菌及核酸的开发和应用提供了理论基础。

参考文献

[1] 董再珍,王龙,章君照.核酸对机体作用的研究[J].中国药理学杂志,1995,30(12):725-727.
 [2] 刘洁生,李校堃,姚成灿.外源性核酸对机体作用的研究进展[J].生命科学,2002,14(4):37-39.
 [3] 应国清,石陆娥,唐振兴,等.核苷酸的生产及其在医药食品中的应用[J].食品研究与开发,2004,25(4):120-123.
 [4] 毛宁,洪智勇,郑清鹤,等.利用啤酒酵母提取核酸工艺的研究[J].中国商办工业,1999,11(3):43-44.
 [5] 江玉姬,谢宝贵,陈文校.草菇DNA提取方法初探[J].福建农业学报,2000,15(2):61-64.
 [6] 唐迎滨.从天然植物细胞中提取核酸的生产工艺[P].中国专利:94115437.
 [7] 魏述众.生物化学[M].北京:中国轻工业出版社,1996.
 [8] 沈同,王镜岩.生物化学:上册[M].北京:高等教育出版社,1990:87-347.
 [9] 宋旭鹭,赵国峥,张洪林,等.浓盐法提取啤酒酵母中核苷酸的生产条件研究[J].酿酒科技,2006(5):89-91.
 [10] 李志东,李娜,宋旭鹭,等.氨解法提取啤酒酵母中RNA的研究[J].中国酿造,2006(12):33-35.