

文章编号:1673-1689(2006)01-0027-04

元宝枫叶总黄酮的提取研究

李云志, 曾凡骏*, 李帆

(四川大学 食品学院, 四川 成都 610065)

摘要: 用乙醇作为溶剂,采用常规浸提法及超声辅助法对元宝枫叶总黄酮的提取进行了对比研究。通过单因素及正交试验结果得到浸提法的优化条件为:溶剂为体积分数 50% 的乙醇溶液,料液比 1 g : 25 mL,提取时间 1.5 h,浸提温度 70 ℃。按照此条件提取两次,第一次提取率 94.16%,第二次 1.36%;超声辅助法的优化条件为:溶剂为体积分数 50% 的乙醇溶液,料液比 1 g : 15 mL,提取时间 0.5 h,浸提温度 60 ℃。按照此条件提取两次,第一次提取率为 96.29%,第二次提取率为 3.11%。

关键词: 元宝枫叶;总黄酮;提取;超声波

中图分类号: Q 949.755.3

文献标识码: A

The Extraction of Flavonoids From the Leaves of *Acer truncatum* Bunge

LI Yun-zhi, ZENG Fan-jun*, LI Fan

(School of Food Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: Two methods were applied to extract flavonoids from the leaves of *Acer truncatum* Bunge, the ethanol extraction methods with and without ultrasonic wave. The results of the orthogonal experiment showed the optimum condition of ethanol extraction without ultrasonic wave is as follows: soaking the raw material with ethanol (50%, v/v)-water solution (1 g : 25 mL) for 1.5 h at 70 ℃. Under the same condition, the raw material was extracted twice. The extraction rate was 94.16% in the first time, and 1.36% in the second time. The optimum condition of ethanol extraction with ultrasonic wave was to soak the raw material with ethanol (50%, v/v)-water solution (1 g : 15 mL) for 0.5 h at 60 ℃. Under the same condition, the raw material was also extracted twice. In the first time, the extraction rate was 96.29%, and 3.11% in the second time.

Key words: leaves of *Acer truncatum* Bunge; total flavonoids; extraction; supersonic

元宝枫^[1] (*Acer truncatum* Bunge) 为槭树科槭树属的落叶乔木,因翅果形状像中国古代金锭“元宝”而得名。《中国植物志》定名为“元宝槭”,河北称为元宝树,陕西又名五角枫。研究发现元宝枫叶

中含有糖、氨基酸、蛋白质、黄酮、有机酸、鞣质、酚等各类化学成分,其中黄酮类含量较高^[2]。为了开发利用其中的生物活性成分,作者用常规有机溶剂提取法和超声波辅助溶剂提取法对元宝枫叶

收稿日期:2005-03-09; 修回日期:2005-05-09.

基金项目:国家科技部科技基础性工作专项基金资助项目(2001DEA20022).

作者简介:李云志(1974-),男,安徽铜陵人,食品科学与工程硕士研究生;* 通讯作者.

中总黄酮提取进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与主要仪器

元宝枫叶:四川元宝公司提供;芦丁标准品:SIGMA 公司产品; $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 NaOH 、 NaNO_2 为分析纯;TG328A 分析天平:上海精密科学仪器有限公司产品;752 紫外光栅分光光度仪:上海精密科学仪器有限公司产品;KQ-100DE 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司产品,超声功率 100 W,工作频率 40 kHz。

1.2 元宝枫叶前处理及实验方法

用烘箱在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下把元宝枫叶烘干,粉碎,过 60 目筛,备用。然后准确称取 2.00 g 元宝枫叶粉末于 250 mL 圆底烧瓶中,加入石油醚, $50\text{ }^\circ\text{C}$ 回流至醚相无色。挥发除净石油醚,加入一定量的乙醇,在一定的温度下提取或超声辅助提取一定时间,趁热减压过滤,加体积分数 30% 的乙醇定容于 100 mL 容量瓶中,作为待测液,测定其中黄酮质量,计算得率。

得率(%) = (浸提液中黄酮质量/元宝枫叶质量) $\times 100\%$

1.3 分析方法

以芦丁为标样,用亚硝酸钠-硝酸铝显色法测定元宝枫叶提取物中的黄酮含量^[3]。将一定量提取液置 25 mL 比色管中,用 30% 体积分数的乙醇补充至 12.5 mL,加入 0.7 mL 质量分数 5% 的 NaNO_2 溶液,摇匀,静置 5 min 后加入 0.7 mL 质量分数 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,6 min 后再加入 5 mL 质量分数 4% 的 NaOH 溶液,摇匀,分离、纯化并进行结构鉴定。

用体积分数 30% 的乙醇溶液稀释至刻度,10 min 后于 510 nm 进行比色,试剂作为空白参比。测吸光度,根据标准曲线算出黄酮含量,计算出提取率。

1.4 标准曲线绘制

准确称取芦丁标准试剂 35.2 mg, $105\text{ }^\circ\text{C}$ 烘干 1.5 h,用甲醇配置成 100 mL 溶液,分别取 1, 2, 4, 6, 8 mL 置于 25 mL 比色管中,根据测定方法测定吸光度,标准曲线回归方程为: $A = 11.401Y - 0.0052$, 相关系数 $r = 0.9996$, 式中: A 为吸光度, Y 为芦丁质量浓度(mg/mL)。

1.5 索氏法提取枫叶总黄酮

取元宝枫叶 5.0 g,用体积分数 70% 的乙醇溶液进行索氏提取 10 h 至无色,提取液过滤,定容。

测定总黄酮质量分数为 6.532% (以此作为元宝枫叶总黄酮的参照含量比较标准。)

2 结果与分析

在材料粉碎度一定的情况下,所用的溶剂以及溶剂的体积分数、提取时间、溶剂用量,溶剂体积分数等因素都对枫叶中黄酮的提取率有影响。用水浸提,提取物杂质多,产物不易保藏,后处理麻烦。经试验发现:甲醇、乙醇、丙酮作为提取剂,提取率都较高,但作为食品开发,不适宜使用,乙醇的渗透性较好,浸出率较高,因此作者选择一定体积分数的乙醇作为提取剂,考察乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取温度对黄酮提取率的影响。

2.1 常规有机溶剂提取

2.1.1 单因素实验

1) 溶剂体积分数 准确称取元宝枫叶干粉(2 g),经过石油醚脱蜡后,选择料液比为 1 g : 25 mL,在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴条件下,以乙醇体积分数分别为 40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 进行回流提取 2 h,减压过滤,定容,测其吸光度,得得其得率与乙醇体积分数的关系,结果如图 1。从图 1 可知,提取得率随乙醇体积分数的增大而提高,但当乙醇体积分数大于 60% 以后,提取得率开始下降。根据“相似相溶原理”,极性相似可达到最大溶出度,在乙醇体积分数 60% 时,实验得率达到峰值 5.1%,即此时溶剂与溶质极性相似。根据结果,乙醇体积分数控制在 50% ~ 70%。

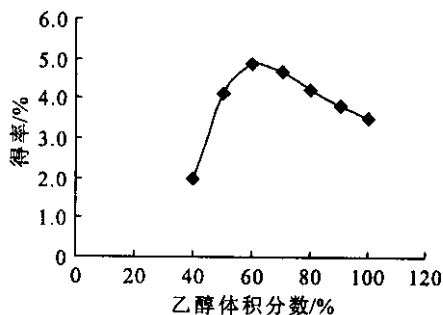


图 1 乙醇体积分数对提取率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on extraction rate

2) 料液比 2 g 元宝枫叶干粉经过石油醚脱蜡后,在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴条件下,以料液比分别为 1 g : 10 mL, 1 g : 15 mL, 1 g : 20 mL, 1 g : 25 mL, 1 g : 30 mL, 1 g : 35 mL, 选择乙醇体积分数 60%,回流提取 2 h。得黄酮得率与料液比的关系,结果见图 2。可以看出:料液比在 1 g : 10 mL ~ 1 g : 25 mL 时,提取率随料液比增高而增长较快,当料液比大于 1 g : 25 mL 时,提取率增长不大从提取成本及减少

后处理工作考虑料液比以 1 g : 15 mL~1 g : 25 mL 合适。

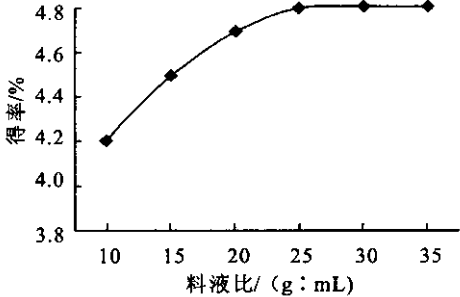


图 2 料液比对得率的影响

Fig. 2 Effect of rate of solid to solution on extraction rate

3) 提取时间 2 g 元宝枫叶干粉经过石油醚脱蜡后,在 70 ℃水浴条件下,用体积分数 60%乙醇,料液比为 1 g : 25 mL,分别回流提取 1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,得黄酮得率与提取时间的关系。图 3 可见:提取时间在 1.0~1.5 h 提取率增长较快,2 h 后基本变化不大,从生产周期考虑,提取时间 1.0~2.0 h 为合适。

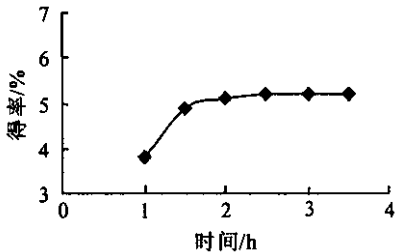


图 3 提取时间对得率的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on yield

4) 提取温度 2 g 元宝枫叶干粉经过石油醚脱蜡后,分别在 40,50,60,70,80,90 ℃下用体积分数的 60%乙醇溶液,料液比为 1 g : 25 mL,浸提 2 h,得黄酮得率与提取温度关系,结果见图 4。随温度升高,黄酮得率增高,但温度超过 70 ℃以后,有下降趋势,原因是温度升高,分子的运动速度加快,有效成分渗透和溶解速度加快,黄酮溶出度加大。所以一般加热浸提比冷浸效率要高。但温度过高可能造成黄酮化学结构变化所致,同时杂质的溶出量增加,给后续操作带来不便,还会造成溶剂损失。综合考虑,提取温度以 50~70 ℃为宜。

2.1.2 正交实验 由于提取率实际上受到以上 4 个因素的交叉影响,为了全面考察这 4 个因素的综合影响,设计四因素三水平正交实验 $L_9(3^4)$,结果见表 1。可以看出最佳提取条件为 $A_3B_2C_1D_3$,即溶剂使用体积分数为 50%的乙醇溶液,料液比为 1 g : 25 mL,提取时间为 1.5 h,浸提温度为 70 ℃;各

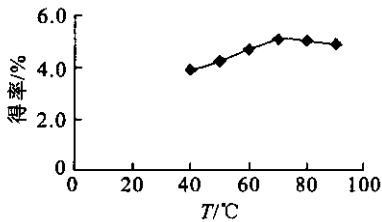


图 4 提取温度对得率的影响

Fig. 4 Effect of extraction temperature on yield
因素对黄酮得率的影响的主次顺序依次为乙醇体积分数 $C>$ 提取温度 $A>$ 料液比 $D>$ 提取时间 B 。

表 1 常规溶剂提取正交实验及其结果的直观分析
Tab. 1 Orthogonal experimental $L_9(3^4)$ and analytical result of polar difference

编号	提取温度 $A/^\circ\text{C}$	提取时间 B/h	乙醇 体积分数 $C/\%$	料液比 $D/(\text{g}:\text{mL})$	得率/ $\%$
1	50(1)	1.0(1)	50(1)	1 : 15(1)	5.68
2	50(1)	1.5(2)	60(2)	1 : 20(2)	5.49
3	50(1)	2.0(3)	70(3)	1 : 25(3)	4.89
4	60(2)	1.0(1)	60(2)	1 : 25(3)	5.54
5	60(2)	1.5(2)	70(3)	1 : 15(1)	5.24
6	60(2)	2.0(3)	50(1)	1 : 20(2)	6.12
7	70(3)	1.0(1)	70(3)	1 : 25(2)	5.84
8	70(3)	1.5(2)	50(1)	1 : 25(3)	6.15
9	70(3)	2.0(3)	60(2)	1 : 15(1)	5.84
K_1	16.06	17.06	17.95	16.76	
K_2	16.90	16.88	16.87	17.45	
K_3	17.83	16.85	15.97	16.58	
均值 1	5.35	5.69	5.98	5.59	
均值 2	5.63	5.63	5.62	5.82	
均值 3	5.94	5.62	5.32	5.53	
极差 R	0.59	0.07	0.66	0.29	

2.1.3 浸提级数的确定 在最佳浸提条件下,提取 2 次,结果见表 2。

表 2 浸提次数实验数据

提取 次数	总黄酮 得率/ $\%$	相对 提取率/ $\%$	累计 提取率/ $\%$
1	6.151	94.16	94.16
2	0.089	1.36	95.52

第一次提取率 94.16%,已经将元宝枫叶中总黄酮基本提取完全。

2.2 超声波辅助提取

2.2.1 单因素实验 选择溶剂体积分数,超声时间,提取温度,料液比 4 因素作单因素实验为正交实验选择最佳实验范围。

1) 溶剂体积分数 2 g 元宝枫叶干粉经过石油醚脱蜡后,选择料液比为 1 g : 20 mL,在提取温度 40 ℃条件下,以乙醇体积分数分别为 30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,超声作用 15 min,结果见图 5。在体积分数 50%时,得率达到峰值,故选择溶剂体积分数在 40%~60%较为合适。

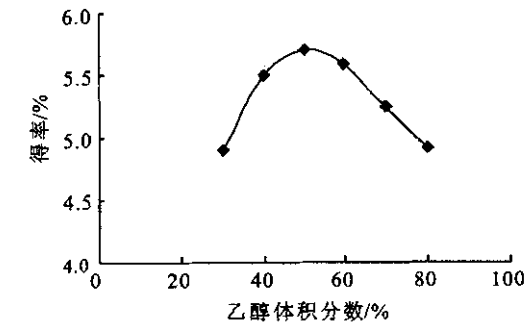


图 5 乙醇体积分数对得率的影响

Fig. 5 Effect of ethanol concentration on yield

2) 料液比 2 g 元宝枫叶干粉经过石油醚脱蜡后,选择乙醇体积分数 40%,在提取温度 40 ℃下,分别以料液比 1 g : 10 mL,1 g : 15 mL,1 g : 20 mL,1 g : 25 mL,1 g : 30 mL,1 g : 35 mL,超声作用 15 min,结果见图 6。随料液比增大,得率增高,但料液比达到 1 g : 20 mL 以后增幅不大,选择 1 g : 15 mL,1 g : 20 mL,1 g : 25 mL 为正交实验范围较为合适。

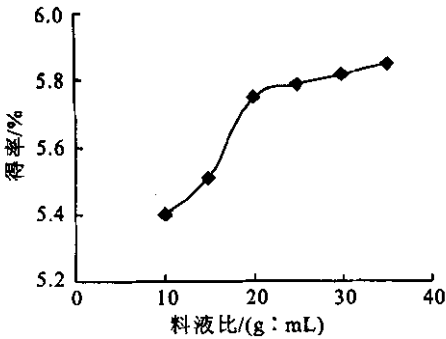


图 6 料液比对得率的影响

Fig. 6 Effect of rate of solid to solution on extraction yield

3) 超声提取时间 2 g 元宝枫叶干粉经过石油醚脱蜡后,选择乙醇体积分数 40%,料液比 1 g : 20 mL,在提取温度 40 ℃下,分别用超声作用 10,15,20,30,40,50 min。结果见图 7,选择 15~30 min 较为合适。

蜡后,选择实验条件乙醇体积分数为 40%,料液比 1 g : 20 mL,分别在提取温度 30,40,50,60 ℃下超声作用 30 min,结果见图 8。选择 40~60 ℃作为正交实验范围。

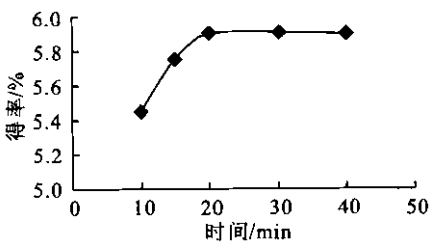


图 7 超声时间对得率的影响

Fig. 7 Effect of ultrasonic time on yield

2.2.2 正交实验 由以上单因素实验设计正交实验 $L_9 3(4)$ 正交表。结果见表 3。可以看出最佳提取条件为 $A_3 B_3 C_2 D_1$,即溶剂使用体积分数 50%乙醇,料液比为 1 g : 15 mL,提取时间为 30 min,浸提温度为 60 ℃为合适;正交实验 4 个因素对浸提效果影响的主次顺序为浸提温度→超声作用时间→料液比→乙醇体积分数。料液比与提取时间、提取温度较溶剂浸提法都有减少,原因是超声波的空化作用。超声波在液体中形成微小气泡,经过形成、生长、崩溃的过程,气泡的崩溃产生一个极短暂的强压内脉冲,可以有效地破碎细胞壁,或者包埋结构的外层,有利于细胞内物质释放到细胞外,同时由于其产生的类似于搅拌作用,快速达到溶解平衡,所以可以有效减少提取时间,降低提取温度。^[4,5]

表 3 超声辅助正交实验及其结果的直观分析

Tab. 3 Orthogonal experimental $L_9 (3^4)$ and analytical result of polar difference

编号	提取温度 A/℃	超声时间 B/h	乙醇体积分数 C/%	料液比 D/ (g : mL)	得率/ %
1	40(1)	15(1)	40(1)	1 : 15(1)	2.38
2	40(1)	20(2)	50(2)	1 : 20(2)	3.79
3	40(1)	30(3)	60(3)	1 : 25(3)	4.53
4	50(2)	15(1)	50(2)	1 : 25(3)	5.33
5	50(2)	20(2)	60(3)	1 : 15(1)	5.01
6	50(2)	30(3)	40(1)	1 : 20(2)	5.44
7	60(3)	15(1)	60(3)	1 : 20(2)	6.04
8	60(3)	20(2)	40(1)	1 : 25(3)	6.08
9	60(3)	30(3)	50(2)	1 : 15(1)	6.29
K_1	10.7	13.75	13.9	13.68	
K_2	15.78	14.88	15.41	15.27	
K_3	18.41	16.26	15.58	15.94	
均值 1	3.57	4.58	4.63	4.56	
均值 2	5.26	4.96	5.14	5.09	
均值 3	6.14	5.42	5.19	5.31	
极差 R	2.57	0.84	0.56	0.75	

4) 提取温度 2 g 元宝枫叶干粉经过石油醚脱

mg/mL 时,酯化反应的速率保持稳定;肌醇和烟酸的最适摩尔比为 1 : 6;而烟酸的浓度在低于 6. 0 mmol/L 时,产物生成率较高,为 89. 0%,且基本保持不变。

参考文献:

[1] 杜伟,宗敏华,凌均建,等. 反应介质对酶选择性的影响[J]. 工业微生物,2000,30(2):58—60.
[2] 梁峰,程浩文. 烟酸肌醇酯的合成[J]. 应用化工,2001,30(3):19—20.
[3] 王书勤. 世界有机药物专利制备方法大全(第二卷)[M]. 北京:科学技术文献出版社,1996. 5.
[4] Ame L D,Trani M, Robert L. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,1998,22:212—216.
[5] Gillies B, Yamada H , Armstrong D W. Production of flavor esters by immobilized lipase[J]. **Biotechnology Letters**,1987, 9(10):709—714.
[6] Han D , Rhee S J. Characteristics of lipase catalyzedglycerolysis of triglyceride in AOT-iosctane reversed micelles[J]. **Biotech Bioengin**,1986,28:1250—1255.
[7] Pleiss J,Fisher M, Schmid R D. Anatomy of lipase binding sites:the scillile fatty acid binding site[J]. **Chemistry and Physics of Lipids**,1999,41(2):404—407.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 30 页)

按最佳条件提取两次,第一次提取率 96. 29%,第二次提取率 3. 11%,两次即可提取完全。

3 结 论

1) 常规有机溶剂浸提法提取元宝枫叶中总黄酮物质的优化条件为:溶剂体积分数 50%乙醇,料液比为 1 g : 25 mL,提取时间为 1. 5 h,浸提温度为 70 ℃。正交实验 4 个因素对浸提效果影响的主次顺序为乙醇浓度→提取温度→料液比→提取时间。

2) 超声辅助法提取元宝枫叶中总黄酮物质的优化条件为:溶剂为体积分数 50%的乙醇溶液,料液比为 1 g : 15 mL,提取时间为 30 min,浸提温度为 60 ℃。几个因素对浸提效果影响的主次顺序为浸提温度→超声作用时间→料液比→乙醇浓度。

3) 两种方法都可以有效地提取元宝枫总黄酮;两种方法第一次提取率差别不大,但超声辅助法提取时间缩短 1 h,料液比减少 40%,温度低 10 ℃。

参考文献:

[1] 牛春山. 陕西树木志[M]. 北京:中国林业出版社,1990.
[2] 尉芹,王兰珍,马希汉,等. 元宝枫开发利用研究[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1996.
[3] 庄向平. 银杏叶中总黄酮含量的测定和提取方法[J]. 中草药,1992,23(3):122—124.
[4] 李红兵,孙立华,孙国才. 超声波提取法在中国药典中的应用探讨[J]. 中国药品标准,2001,2(4):18—20.
[5] 尹莲. 超声法提取茶多酚的实验研究[J]. 食品工业,1999,(3):10—11.

(责任编辑:朱 明)