

甜杨桃中总黄酮提取最佳工艺的研究

晏全, 刘卫兵, 朱秋燕

(玉林师范学院化生系, 广西 玉林 537000)

摘要: 本文通过利用甲醇浸提、单因素试验和正交试验探讨了从甜杨桃中提取黄酮的最佳工艺条件。实验结果表明: 提取时间为 3 h, 料液比为 1:80, 提取温度为 70 °C。总黄酮提取效率最好。

关键字: 甜杨桃; 黄酮类化合物; 提取工艺; 正交试验

中图分类号: TS201.1; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2007)12-0047-04

Optimization of Extraction Conditions of Total

Flavonoids from Sweet Carambola

YAN Quan, LIU Wei-bing, ZHU Qiu-yan

(Department of Biochemistry, Yulin Teacher College, Yulin 537000, China)

Abstract: In this paper, the methanol extraction conditions of total flavonoids from sweet carambola were optimized by single factor and orthogonal tests. The results showed that the best extraction time, ratio of solid to liquid and temperature were 3 h, 1:80 and 80 °C, respectively.

Key words: sweet Averrhoa carambola; Flavonoids; extracting technology; orthogonal test

到目前为止, 从甜杨桃中提取黄酮类化合物方法的研究鲜有报道, 本文利用实验数据建立一元线性回归方程、回归直线, 并用方差分析法和相关系数法检验回归方程的有效性。采用单因素试验与正交试验方法, 对用无水甲醇提取甜杨桃中总黄酮的工艺进行了探讨。为甜杨桃中黄酮类化合物成分的提取提供了理论基础。

1 材料与仪器

1.1 试验材料

芦丁: 中国医药(集团)上海化学试剂公司(生化试剂); 无水甲醇(AR): 洛阳市化学试剂厂; 甜杨桃: 采集于广西玉林市博白县。

1.2 仪器设备

分析天平; 电热恒温水浴锅; 722-光栅分光光度计; 101 A-2 型数显电热鼓风干燥箱; 高速万能粉碎机。

2 实验方法

2.1 原料的预处理

把新鲜采集回来的酸杨桃叶放入干燥箱中, 用 60 °C 的温度干燥 3 h, 然后再用粉碎机粉碎, 干燥至

恒重后冷却备用。

2.2 黄酮类化合物含量的测定方法

2.2.1 分光光度法

黄酮类化合物具有特定的紫外吸收带, 其结构中的肉桂酰环产生的 I 带在 300~400 nm 内, 由苯甲酰环产生的 II 带在 240~285 nm 内, 不同类型的黄酮类化合物在这两个吸收带的吸收强度不同。对照品芦丁在这两个吸收带都有强吸收, 含黄酮类化合物的原料经提取纯化后, 可直接于最大吸收波长处测定其吸光度, 以芦丁为对照品对照计算其含量^[1]。但由于在紫外低波长区容易会有溶剂干扰, 可能引起误差, 故选择芦丁在 I 带的最大吸收波长 359 nm 作为测量酸杨桃叶中总黄酮含量的波长。

2.2.2 工作曲线回归方程的建立

准确称取标准芦丁对照品 97.0 mg, 用无水甲醇溶解, 转移入 100 mL 容量瓶中, 用无水甲醇定容, 摇匀。精确移取 10.00 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 用无水甲醇定容, 摇匀。此时芦丁对照品溶液浓度为 0.0970 g/mL, 准确吸取浓度 0.0970 g/mL 芦丁对照品溶液 0.00 mL、1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL、4.00 mL、5.00 mL、6.00 mL, 分别置于 25 mL 容量瓶中, 用无水甲醇定容, 在 359 nm 波长处测其吸光度。结果如表 1 所示。

收稿日期: 2007-08-31

作者简介: 刘卫兵, 男, 博士, 研究方向: 药物的合成, 研究生阶段的研究方向: 天然药物的研究与开发

表1 芦丁标准浓度与吸光度的关系

Table 1 The relation between the standard density of rutin and absorb

标准溶液体积/mL	0.00	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00
相应浓度 x / (mg/L)	0	3.88	7.76	11.64	15.52	19.40	23.28
吸光度 y	0	0.114	0.216	0.324	0.422	0.519	0.618

2.2.2.1 一元线性回归方程的确定

以浓度 x 为自变量, 吸光度 y 为因变量, 设有多个实验点, $x_1y_1, x_2y_2, x_3y_3, \dots, x_ny_n$, 则线性回归方程可用下式表示: $y=a+bx$

式中 a 为截距, b 为回归系数, 只要参数 a, b 确定了, 回归方程也就确定了。参数 a, b 确定的依据是: 使实验测定值 y_i 与相应的回归直线上的理论响应值 Y_i 之差的平方和为 $\sum (y_i - Y_i)^2$ 为最小, 即最小二乘法。因此, 根据这个原理, 用求极值的方法导出 a 和 b 的计算式:

$$b = \frac{n \sum x_i y_i - (\sum x_i) \cdot (\sum y_i)}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} = \frac{\sum x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{\sum x_i^2 - n \bar{x}^2}$$

$$a = \bar{y} - b \bar{x}, \text{ 其中 } \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}, \bar{y} = \frac{\sum y_i}{n}$$

把表1的实验数值代入上式, 即可分别算出 a 和 b 值:

$$b = \frac{n \sum x_i y_i - (\sum x_i) \cdot (\sum y_i)}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} =$$

$$\frac{7 \times 36.89492 - 81.48 \times 2.213}{7 \times 1369.9504 - 81.48^2} = 0.026417525 \approx 0.02642$$

$$a = \bar{y} - b \bar{x} = \frac{2.213}{7} - 0.026417525 \times \frac{81.48}{7} = 0.00864$$

则其一元回归方程为: $y = 0.00864 + 0.02642x$

2.2.2.2 作回归线

根据表1结果用最小二乘法作线性回归, 得出芦丁标准浓度 C 与吸光度 A 的关系。结果如图1所示。其回归方程为 $A = 0.00864 + 0.02642C$, $r = 0.9997$ 。

2.2.2.3 回归方程的有效性检验

回归方程的有效性检验就是对所求得的回归方程进行显著性检验, 看它是否真实地反映了变量间的线性关系。

(1) 相关系数法

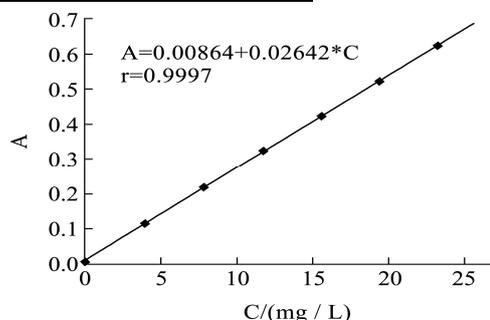


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 The standard working curve of rutin

在实际中只有当 x 和 y 间存在某种线性关系时, 配出的直线才有意义。两个变量 (x 和 y) 线性关系的密切程度可用相关系数 r 来衡量:

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum (x_i - \bar{x})^2 - \sum (y_i - \bar{y})^2)}} = b \sqrt{\frac{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}{n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}} =$$

$$0.026417525 \times \sqrt{\frac{7 \times 1369.9504 - 81.48^2}{7 \times 0.993997 - 2.213^2}} = 0.9997$$

表2 相关系数的临界值

Table 2 The critical value of related coefficient

$f=n-2$	置信水平				
	90%	95%	98%	99%	99.9%
1	0.998	0.997	1.00	1.00	1.00
2	0.900	0.950	0.980	0.990	0.999
3	0.805	0.878	0.934	0.959	0.991
4	0.729	0.811	0.882	0.917	0.974

$f=n-2=7-2=5$, 查表2可知 r 的临界值为 0.951, 置信水平为 99.9%, 而计算得到的相关系数 $r=0.9997 > 0.951$, 则其置信水平在 99.9%以上, 故回归方程的 A 和 C 之间存在显著的线性关系。这也表明芦丁浓度在 3.88~23.28 mg/L 范围内线性关系显著。

(2) 方差检验法

运用方差 (F) 检验的方法是判断回归均方 (MS_R) 是否显著大于误差均方 (MS_E)。若 MS_R 显著大于 MS_E , 则表明总变异中回归显著, 亦即 x 与 y 的线性关系显著或回归方程显著, 表明回归方程在整体上成立, 进一步检验了变量 x 和 y 是否存在线性关系。下面对上述的回归方程进行方差检验: $y=0.00864+0.02642x$

$$SS_T(\text{总平方和}) = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{N} = 0.993997 - \frac{2.213^2}{7} = 0.29437$$

$$SS_R(\text{回归平方和}) = b^2 \left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N} \right] = 0.0264175$$

$$25^2 \times (1369.9504 - \frac{81.48^2}{7}) = 0.29417$$

对所有 y 值而言, 自由度为 N-1, 即 $df_T = N-1$; $df_E = N-2$; 所以 $df_R = df_T - df_E = 1$

$$SS_E(\text{误差平方和}) = SS_T - SS_R = 0.29437 - 0.29417 = 0.00020$$

$$MS_R(\text{回归均方}) = \frac{SS_R}{df_R} = \frac{0.29417}{1} = 0.29417$$

$$MS_E(\text{残差均方}) = \frac{SS_E}{df_E} = \frac{0.00020}{5} = 0.00004$$

$$F = \frac{MS_R}{MS_E} = \frac{0.29417}{0.00004} = 7354.25$$

查 F 表得 $F_{0.001}(1, 5) = 47.2$; $F > F_{0.001}$, 方差分析结果如表 3 所示。

表 3 方差分析结果

Table 3 The analytical results of variance

变异来源	自由度	平方和 SS	均方 MS	F	$F_{0.001}(1,5)$
回归	1	0.29417	0.29417	7354.25**	47.2
残差	5	0.00020	0.00004		
总计	6	0.29437			

注: **表示在 0.001 水平上的差异具有统计意义。

因此可以证明, 所建立的回归方程是有效的或者说 x 与 y 之间有显著的线性关系。

3 结果与分析

3.1 单因素试验

本研究以无水甲醇作为提取溶剂, 探讨提取温度、提取时间、溶剂用量对总黄酮提取率的影响。

3.1.1 温度对总黄酮提取率的影响

准确称取 0.5000 g 样品 6 份, 加入无水甲醇 40 mL, 分别在 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 下进行水浴回流提取 2 h, 然后抽滤, 定容, 测定其吸光度, 结果见图 2。由图 2 可见总黄酮的提取率随温

度的升高而增大, 当温度超过 70 °C 时总黄酮的提取率随温度升高的幅度相对较小。然而从高温对总黄酮的提取所带来的有效成分易被破坏、溶剂易挥发等缺点考虑, 选择温度在 70 °C 左右为宜。

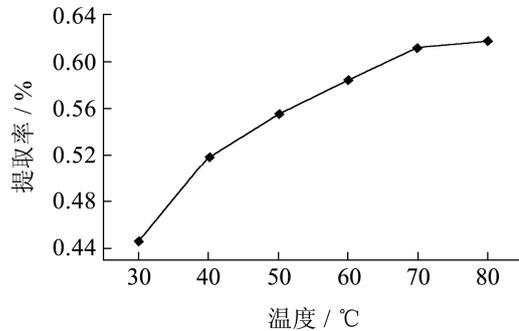


图 2 温度对总黄酮提取率的影响

Fig.2 Effects of the temperature on the rate of extracting flavonoids

3.1.2 时间对总黄酮提取率的影响

准确称取 0.5000 g 样品 5 份, 在 70 °C 下分别进行水浴回流 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h, 然后抽滤, 定容, 测定其吸光度, 结果见图 3。由图 3 可知, 随着水浴回流时间的增加, 提取率逐渐增大, 但 3 h 后增加的幅度相对较小, 显然采用 3~4 h 作为提取时间比较合适。

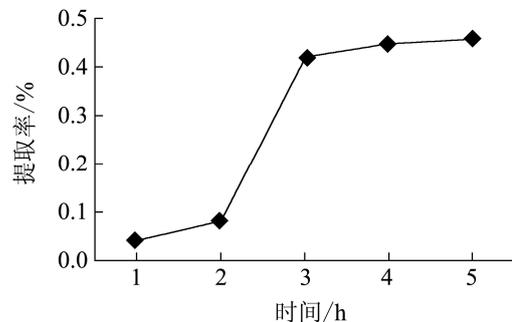


图 3 时间对总黄酮提取率的影响

Fig.3 Effects of the time on the rate of extracting flavonoids

3.1.3 溶剂用量对总黄酮提取率的影响

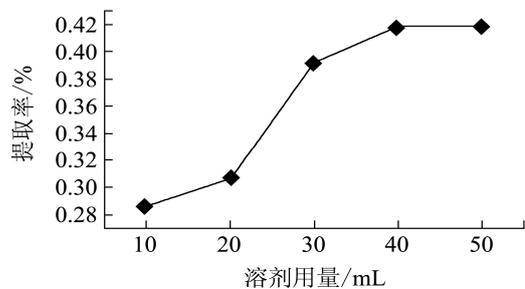


图 4 溶剂用量对总黄酮提取率的影响

Fig.4 Effects of the solvent dosage on the rate of extracting flavonoids

准确称取 0.5000 g 样品 5 份, 在 70 °C 下分别加入

10 mL、20 mL、30 mL、40 mL、50 mL 的无水甲醇，进行水浴回流 4 h，然后抽滤，定容，测定其吸光度，结果见图 4。由图 4 可见总黄酮提取率随溶剂用量的增加而提高，当溶剂用量大于 40 mL 时，即当溶剂用量与甜杨桃叶质量之比大于 80 倍时，总黄酮提取率增加的幅度相对较小，但从经济方面考虑，宜选取溶剂用量为酸杨桃叶质量的 80 倍左右。

表4 正交实验因素水平

Table 4 The different levels of the factors in orthogonal experiments

编号	A(提取温度/°C)	B(溶剂用量/mL)	C(提取时间/h)
1	60	30	2
2	70	40	3
3	80	50	4

表5 正交实验结果

Table 5 The results of the orthogonal experiments

实验号	A	B	C	样品质量/g	吸光度	总黄酮含量/%
1	A1	B1	C1	0.5005	0.021	0.1168
2	A1	B2	C2	0.5006	0.054	0.4287
3	A1	B3	C3	0.5011	0.044	0.3339
4	A2	B1	C1	0.5009	0.070	0.5802
5	A2	B2	C2	0.5005	0.065	0.5328
6	A2	B3	C3	0.5002	0.059	0.4763
7	A3	B1	C1	0.5003	0.060	0.4857
8	A3	B2	C2	0.5004	0.064	0.5234
9	A3	B3	C3	0.5006	0.067	0.5518
k ₁	0.2931	0.394	0.3722			
K ₂	0.5298	0.4950	0.5202			
K ₃	0.5203	0.4540	0.4508			
R	0.2367	0.1008	0.1480			

最佳工艺: A₂B₂C₂

3.2 实验因素对总黄酮提取效果的影响

由于实际操作受温度、溶剂用量、提取时间三个

因素交叉影响，为了考察各因素对总提取效果的影响，我们选用三因素、三水平进行正交试验。因素水平设计见表4，各实验处理及总黄酮的提取率见表5。

从表 5 可知：各实验因素及其因素水平对酸杨桃叶中总黄酮的提取率大小的影响表现出一定的差异性。三因素的 R 值大小排列为：A>C>B。由此可以看出，三个因素中影响总黄酮提取率大小的主次顺序为：提取温度>提取时间>溶剂用量。而比较 k 值，则可选出最好值。在本试验中最大的 k 值为最好值。各平均结果 k 的最好值对应的水平为最好水平。把各因素的最好水平组合在一起，就是选出的较优水平组合。因此从表 5 可以得出，甜杨桃叶中总黄酮提取的最佳工艺条件为：A₂B₂C₂，即用无水甲醇为溶剂，以 1:80 的料液比在 70 °C 的恒温水浴中回流 3 h。

3.3 实际生产中工业条件的确定

采用甲醇回流提取法，对影响提取效果的 3 因素：提取时间、提取温度、甲醇用量。进行正交试验，得出 3 因素影响的主次为：提取温度，提取时间，溶剂用量。通过验证实验，综合考虑经济因素、时间因素、消耗能源方面，应选择 A₂B₂C₂，即：提取温度为 70 °C，甲醇用量为 40 mL，提取时间为 3 h。

4 结论

4.1 甜杨桃叶中含有丰富的黄酮类化合物，本文详细地研究了甜杨桃叶中黄酮类化合物的提起工艺，为开发利用提供了有益的参考。

4.2 甜杨桃叶中总黄酮最佳提取工艺条件为：料液比 1:80、提取时间 3 h、提取温度 70 °C。

参考文献

[1] 梁生旺.中药制剂分析[M].北京:中国中医药出版社,2003

[J].保鲜与加工, 2002, 2(5): 17-19

[2] 石志平,梁丽雅.巨峰与红地球葡萄贮藏特性比较[J].保鲜与加工.2002, 1(4):18

[3] 葛毅强,张维一.鲜食葡萄保鲜采后 SO₂熏蒸及检测方法的概述[J].食品科学,1997,4(18):59-61

[4] 田金强,红提葡萄贮藏保鲜过程中 SO₂伤害的防止技术研究[D].河北农业大学硕士论文,2004

(上接第 27 页)

化还原反应， $2I^- + H_2O_2 + 2H^+ \rightarrow I_2 + 2H_2O$ ，一方面，使过氧化物分解，消除了自由基，另一方面，生成的 I₂ 又可参与 $I_2 + H_2O + SO_3^{2-} \rightarrow 2I^- + 2H^+ + SO_4^{2-}$ 的反应。以上也是 KI 减轻 SO₂ 伤害的机理。

参考文献

[1] 张华云,王善广,高海燕,等.葡萄 SO₂ 伤害与影响因素研究