

超声波法提取柿叶总黄酮的工艺研究

王宁¹, 李远志², 徐莉珍², 楠极²

(1. 北京加福得食品有限公司, 北京 100300) (2. 广州华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642)

摘要: 采用超声波法提取柿叶中的总黄酮, 在考察乙醇体积分数、料液比、超声波功率和提取时间四个单因素的基础上, 通过正交实验确定了柿叶总黄酮超声波法提取的最佳工艺: 柿叶粉浸泡 18 h, 乙醇体积分数 60%, 料液比 1:50, 超声波功率 250 W, 提取时间 45 min, 结果表明, 柿叶总黄酮总含量可达 2.59%。在此最佳提取工艺下提取两次, 可将柿叶中 90%以上的黄酮提取出来。

关键词: 柿叶; 总黄酮; 超声波提取

中图分类号: O636.9; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2008)07-0687-04

Research on Ultrasonic Extraction of Flavone from Persimmon Leaves

WANG Ning¹, LI Yuan-zhi², XU Li-zhen², NAN Ji²

(1. Beijing Jiafude Food Co. Ltd., Beijing 100300, China)

(2. College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou, 510642, China)

Abstract: The ultrasonic extraction of flavone from persimmon leaves was studied in this article. By orthogonal experiment, the optimal extraction conditions were obtained as follows: liquid-solid ratio of 50:1, ethanol concentration of 60%, ultrasonic power of 250 W, extraction time of 45 min and extraction times of twice, under which the extraction rate was above 90% and the average content of flavone in persimmon leaves was 2.59%.

Key words: persimmon; flavone; ultrasonic extraction

黄酮类化合物是一类存在于植物中的天然产物, 在自然界中分布广泛, 在植物的叶子和果实中大部分与糖结合成甙类, 以配基的形式存在。含有黄酮类化合物的植物很多, 如银杏叶、葛根、竹叶、蜂胶等^[1-4]。近年来, 黄酮类化合物由于具有抗氧化、降低脂质过氧化反应、预防心血管疾病、抗衰老、抗肿瘤等作用, 特别是清除自由基作用, 掀起了对其研究、开发、利用的热潮。柿叶中也富含黄酮类化合物, 迄今分离得到的黄酮类化合物, 大部分为槲皮素、山柰酚及其甙类^[5], 且鲜叶与干燥后存放三年的陈叶相比较, 粗黄酮含量不变, 可长期贮藏^[6]。此外, 有研究表明柿叶黄酮同样具有多种药理和临床作用^[7], 是一类极具开发前景的天然植物资源。为了利用柿叶中黄酮类物质, 本文利用乙醇作溶剂, 采用超声波提取, 研究了柿叶总黄酮的超声波最佳提取工艺条件, 为柿叶的开发提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

收稿日期: 2008-03-15

作者简介: 王宁, 女, 硕士

通讯作者: 李远志, 教授

1.1.1 实验材料与试剂

柿叶, 9 月份采自广东省从化市山区。经挑选、清洗, 于烘箱中 60~65 °C 烘干, 粉碎过 60~80 目筛试验用。

试剂: 芦丁(芸香叶苷), 生化试剂, 国药集团化学试剂有限公司; 无水乙醇, 亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠均为分析纯试剂。

1.1.2 实验仪器

旋转式超声波聚焦处理器, 广州市新栋力超声电子设备有限公司; UV755B 紫外可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 芦丁标准溶液的配制和标准曲线的制作

精密称取于 105 °C 下烘至恒重的芦丁标准试剂 0.0200 g, 用 60%(V/V) 乙醇溶解, 并完全转入 100 mL 容量瓶中, 用 60%乙醇定容, 摇匀, 得 0.200 mg/mL 的芦丁标准溶液。

分别吸取上述芦丁标准溶液 0 mL, 0.5 mL, 1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL, 2.5 mL, 3.0 mL, 3.5 mL, 4.0 mL 于 9 支 10 mL 比色管中, 用 60%乙醇补至约 5 mL, 加入 0.3 mL 5% NaNO₂ 溶液, 摇匀, 放置 5 min 后加入 0.3 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液, 摇匀, 放置 6 min 后再

加入 4 mL 1 mol/L NaOH 溶液, 摇匀, 用 60%乙醇补足至刻度, 放置 15 min 后在 506 nm 处(实验测得的最大吸收波长)测定其吸光值, 用空白试剂作参比。以芦丁浓度对吸光值作图, 并做线性回归, 得芦丁浓度 C 和吸光值 A 的标准曲线线性回归方程。

1.2.2 柿叶总黄酮的测定

吸取 2 mL 待测液于 10 mL 比色管中, 以下操作同 1.2.1 项, 由得到的标准曲线线性回归方程计算出每毫升提取液中的总黄酮量, 再换算成每克干柿叶粉中的总黄酮量, 并计算提取率。

$$\text{总黄酮含量 (mg)} = C \times 10 \times 100 / 2$$

式中: C-由标准曲线计算得到的黄酮浓度, mg/mL

$$\text{总黄酮提取率 / \%} = (\text{总黄酮含量} / \text{柿叶粉质量}) \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 芦丁标准曲线的制作

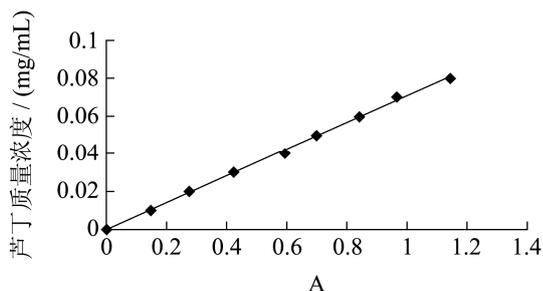


图 1 芦丁标准曲线

Fig.1 Calibration curve of rutin

芦丁标准曲线如图 1, 得到芦丁浓度 C (mg/mL) 和吸光值 A 的标准曲线线性回归方程是: $C=0.0709A-0.0001$ ($R^2=0.9984$)。

2.2 单因素实验

为了提高有效成分的浸出, 同时克服传统加热提取法提取时间较长的缺点, 本试验利用超声波法进行提取。试验发现, 原料经充分浸泡后, 提取率受浸泡时间影响很小, 本试验浸泡时间定为 18h。因此, 本试验主要讨论乙醇体积分数、料液比、超声波功率和提取时间对提取率的影响。

2.2.1 乙醇体积分数对提取率的影响

称取 1 g (精确至 0.1 mg, 下同) 柿叶粉, 加入 30 mL 不同浓度的乙醇浸泡 18 h 后在超声功率 200 W 下提取 30 min, 提取 1 次, 得乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响, 结果见图 2。

如图 2 所示, 当乙醇体积分数为 60% 时提取率最高, 浓度再增加提取率有所下降。根据相似相溶原理,

黄酮类化合物容易溶于乙醇中, 所以乙醇所占比例越大, 就越容易将黄酮类化合物提取出来。实验中发现, 当乙醇体积分数较低 ($\leq 40\%$) 时, 由于将一些水溶性成分如糖类或其它杂质也提取出来, 提取液粘稠, 抽滤或过滤较困难。但是当乙醇体积分数过高, 叶绿素等脂溶性物质溶出也增多, 干扰因素随之增大, 并会给提纯带来困难。故将乙醇体积分数定为 50%~60% 左右较好。

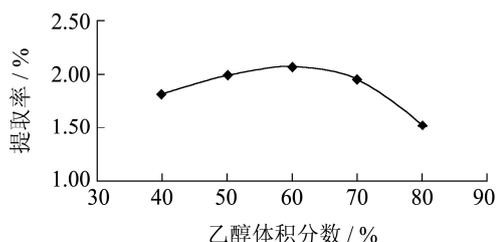


图 2 乙醇体积分数对提取率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on the extraction rate

2.2.2 料液比对提取率的影响

称取 1 g 柿叶粉, 分别加入 10 mL、20 mL、30 mL、40 mL、50 mL 60% 的乙醇, 浸泡 18 h 后在超声功率 200 W 下提取 30 min, 提取 1 次, 得料液比对总黄酮提取率的影响, 结果见图 3。

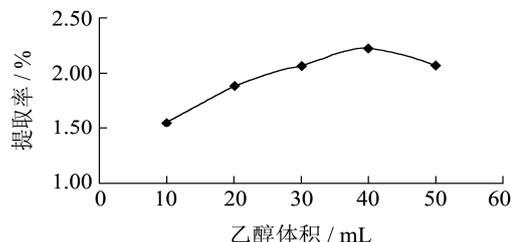


图 3 料液比对提取率的影响

Fig.3 Effect of liquid-solid ratio on the extraction rate

由图 3 可以看出, 提取率在料液比为 1:10~1:40 时, 随着料液比增大提取率较快地增大, 但当料液比大于 1:40 后, 提取率不再增加。所以当料液比为 1:40 时, 就可以达到很好的提取效果, 再增加提取溶剂的量对提取率增加的效果甚微。故料液比定在 1:30~1:40 之间较合适。

2.2.3 超声波功率对提取率的影响

称取 1 g 柿叶粉, 加入 30 mL 60% 的乙醇, 浸泡 18 h, 在不同的超声功率下提取 30 min, 提取 1 次, 得超声波功率对吸光值的影响, 结果见图 4。

如图 4 所示, 超声波的功率对提取率有很大影响。在试验范围内, 提取率随着超声波功率增大而增加。所以在本实验条件范围内, 超声功率最大取 250 W。

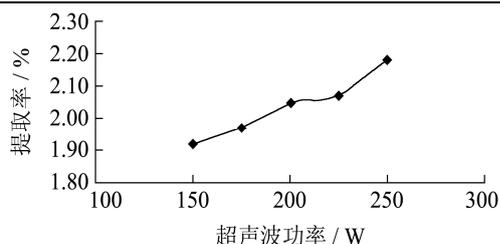


图4 超声波功率对提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic power on the extraction rate

2.2.4 提取时间对提取率的影响

称取 1 g 柿叶粉, 加入 30 mL 60% 的乙醇, 浸泡 18 h, 在 250 W 的超声功率下分别提取 15 min、30 min、45 min、60 min、75 min, 提取 1 次, 得提取时间对提取率的影响, 结果见图 5。

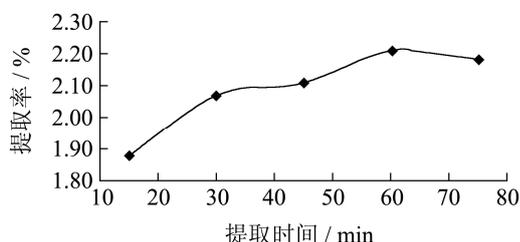


图5 提取时间对提取率的影响

Fig.5 Effect of extraction time on the extraction rate

由图 5 可看出, 提取时间越长, 提取率越高, 在 60 min 时基本达到平衡, 随着时间的进一步延长, 提取率还略有下降的趋势。考虑到尽量节约时间的关系, 将时间定在 30 min~60 min。

2.3 正交实验结果与方差分析

在综合前面所做单因素实验的基础上, 选择乙醇体积分数、料液比、超声波功率和提取时间作为考察因素, 以柿叶总黄酮提取率为考察指标, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。因素及水平设置见表 1, 结果见表 2~表 4。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表

水平	因素			
	A 乙醇体积分数/%	B 料液比	C 超声波功率/W	D 提取时间/min
1	50	1:30	200	30
2	60	1:40	225	45
3	70	1:50	250	60

由表 3 的方差分析可看出, 在考察的四个因素中, 影响提取率大小的次序依次为: 乙醇体积分数 > 超声波功率 > 提取时间 > 料液比, 且这四个因素对提取率均有显著影响。根据表 4 的多重比较结果, 确定最佳

提取工艺为 $A_2C_3D_2B_2$, 即浸泡 18 h, 乙醇体积分数 60%, 超声功率 250W, 提取时间 45 min, 料液比 1:50。

因最佳参数组合不在试验点以内, 所以做验证试验, 结果如表 5 所示。由表 5 得最佳工艺下总黄酮平均提取率为 2.59%。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	总黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	2.08
2	1	2	2	2	2.24
3	1	3	3	3	2.44
4	2	1	2	3	2.47
5	2	2	3	1	2.50
6	2	3	1	2	2.50
7	3	1	3	2	2.20
8	3	2	1	3	2.09
9	3	3	2	1	2.11

表 3 方差分析表

因素	平方和 SS	自由度 df	F 值	p
乙醇体积分数	0.2094	2	81.52	<0.0001
料液比	0.0126	2	6.64	0.0069
超声波功率	0.0456	2	15.71	0.0001
提取时间	0.0279	2	7.15	0.0052
误差	0.0075	2		

表 4 多重比较分析各因素水平间的差异性

因素	水平	平均值 Mean	差异显著性
A 乙醇体积分数/%	2	0.352222	a
	1	0.319778	b
	3	0.302222	c
B 料液比	3	0.332333	a
	2	0.321778	b
	1	0.320111	b
C 超声波功率/W	3	0.336889	a
	2	0.321333	b
	1	0.316000	b
D 提取时间/min	3	0.329889	a
	2	0.327333	a
	1	0.317000	b

注: 不同字母表示水平间差异显著。

表5 最佳提取条件验证实验

Table 5 Validation experiments of the optimal extraction

conditions		
处理	提取条件	提取率/%
1	乙醇体积分数 60%, 超声波功率 250 W, 提取时间 45 min, 料液比 1:50	2.52
2		2.61
3		2.63

2.4 提取次数的确定

称取 1 g 柿叶粉, 按照上述实验所得到的最佳提取工艺, 提取 1 次后, 抽滤, 将滤渣自然晾干后, 提取第 2 次, 再抽滤, 仍将滤渣自然晾干, 再提取第 3 次, 抽滤。分别将三次得到的抽滤液定容至 100 mL, 测其吸光值, 考察提取次数对提取率的影响。

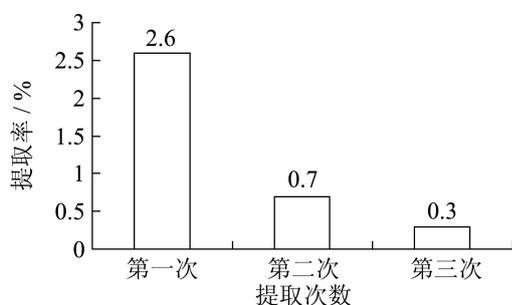


图6 提取次数对提取率的影响

Fig.6 Effect of extraction times on the extraction rate

由图 6 可见, 提取第三次时, 提取率已经很低, 且提取两次即可把柿叶中 90% 以上的黄酮提取出来, 所以在最佳工艺条件下提取次数为两次。

3 结论

超声波的空化效应、热效应、机械搅拌、强化扩散等作用使其在提取天然活性物质时具有快速、常温、能耗低、提取率高的特点^[8], 从而可降低生产成本, 提高经济效益。本试验得到的超声波法提取柿叶总黄酮最佳工艺条件是: 柿叶粉浸泡 18 h 后, 在乙醇体积分数 60%, 料液比 1:50, 超声波功率 250 W, 提取时间为 45 min 的条件下进行提取, 提取两次。

参考文献

- [1] 王延峰,李延清,郝永红等.超声波法提取银杏叶黄酮的研究[J].食品科学,2002,23(8):166-167
- [2] 彭菊艳,王俊儒,张义英等.葛根有效成分的含量测定与提取工艺优化[J].陕西农业科学,2005(3):52-53
- [3] 冯涛.竹叶总黄酮提取及纯化工艺的研究[D].天津科技大学,2003,3:19-22
- [4] 夏道宗,励建荣,陈明之等.蜂胶总黄酮的最佳提取工艺研究[J].食品科学,2005,26(1):153-157
- [5] 陈光.柿叶化学成分及生物活性的研究[D].沈阳药科大学,2003,6:113-114
- [6] 马桂荣,孙静,段普凡等.柿叶有效成分提取分离方法研究[J].河北省科学院学报,1991,(2):68-74
- [7] 林娇芬,林河通,谢联辉等.柿叶的化学成分、药理作用、临床应用及开发利用[J].食品与发酵工业,2005,31(7):90-94
- [8] 周斌.用超声波提取中药材[J].安徽科技,2005,(4):23-24

(上接第 697 页)

4 产品质量标准

感官指标: 淡棕色, 清亮无杂质, 酸甜爽口, 香味协调。

理化指标: 可溶性固形物 8%~10%, 总酸(以醋酸计) 0.8%~1.0%

微生物指标: 细菌总数≤100 个/mL, 大肠菌群≤3 个/100 mL, 致病菌不得检出。

5 结论

以元江芦荟为主要原料, 通过液态发酵生产的芦

荟果醋饮料澄清透明, 口味纯正, 酸甜爽口, 风味独特。具有较高的保健作用和开发价值。

参考文献

- [1] 饶国华,赵谋明.果醋研究开发与工业进展[J].食品工业,2004,(5):29-30
- [2] 刑志利.果醋的保健功效及加工工艺研究进展[J].中国调味品,2005,(4):42-44
- [3] 杨世华,高昆谊.云南元江芦荟资源的开发及产业对策[J].资源开发与市场,2000,16(1):25-26