

山楂叶总黄酮提取的主要影响因素研究

李志霞, 吕德国, 鲁巍巍, 秦嗣军

(沈阳农业大学 园艺学院 国家果树种质沈阳山楂圃, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 采用超声波提取和紫外分光光度法对山楂品种‘甜水’叶片中总黄酮提取的主要影响因素进行了比较分析。结果表明: 山楂叶片总黄酮的提取效果与提取溶剂、乙醇浓度、料液比、粉碎粒度、提取方法和提取时间有关。甲醇、乙醇和丙酮3种提取溶剂中以乙醇最好, 且浓度为70%的乙醇提取效果明显优于60%、80%和90%乙醇。不同料液比和粉碎粒度的提取率也不同, 1:10、1:20、1:30和1:40的料液比中, 以选择1:30为宜, 且中粉提取率高于细粉和粗粉。超声波法比冷浸法和热回流法取得的效果更有优势, 应用潜力大。超声波提取时间为30 min时黄酮得率最高。

关键词: 山楂叶; 总黄酮; 超声波法

中图分类号: S 661.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)05-0024-03

山楂(*Crataegus pinnatifida* Bge.)资源丰富, 叶片中含有的黄酮类化合物具有降压、降血脂、软化血管、增加冠状动脉流量、助消化等药理作用^[1-4]。随着人们健康观念的更新以及黄酮类化合物越来越广泛的生物活性被发现, 其开发利用已成为目前的一个研究热点^[5,6]。但是, 影响总黄酮提取率的因素众多且复杂, 成为限制山楂叶总黄酮提取工业化的一个重要原因, 因此探究影响总黄酮提取率的一些相关因素显得尤为重要。研究证实, 山楂叶和果含有相近的营养及药用成分, 特别是总黄酮含量远高于果实, 有很高的利用价值^[7]。为了充分开发利用山楂叶这一丰富的资源, 该试验对提取山楂叶总黄酮的主要影响因素进行了研究, 为进一步开发利用山楂资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于2006年进行, 山楂(*Crataegus pinnatifida* Bge.)叶片采自国家果树种质沈阳山楂圃, 品种为25年生‘甜水’大树, 株行距3 m×4 m。按东南西北4个方向取树冠外围叶片, 洗净、烘干备用。

1.2 主要仪器和试剂

KQ-5000DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 754型紫外可见分光光度计(上海光谱仪

器有限公司); JA-5003A型千分之一电子天平; DHG-9146A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); RE-52A型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。芦丁(上海试剂二厂)乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠等均为分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的建立 参照药典^[8]方法, 略加改进。准确称取烘干至恒重的芦丁标准品配成0.2 mg/mL的对照溶液, 分别量取0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL, 各加70%乙醇至5.0 mL, 加入显色剂显色, 于510 nm处测其吸光度值, 绘制标准曲线。

1.3.2 重复性试验和稳定性试验 称取0.500 g充分混匀的山楂叶片, 按照1.3.1方法提取并测定总黄酮含量。取9次重复的平均值验证其重复性试验; 测定同一提取液0、2、4、6、8、12、24 h内的吸光度值, 取3次重复的平均值验证其稳定性。

1.3.3 样品的测定 称取0.500 g烘干的‘甜水’叶片, 按照1.3.1方法提取并测定总黄酮的含量。根据总黄酮提取的工艺流程, 试验分别设计不同提取溶剂(选择甲醇、乙醇、丙酮3种溶剂)、不同乙醇浓度(设计60%、70%、80%、90%4个梯度)、不同料液比(设计1:10、1:20、1:30、1:404个梯度)、不同粉碎粒度(设计细粉、中粉、粗粉3个梯度)、不同提取方法(选择冷浸法、热回流法、超声波法3种提取方法)和不同提取时间(设计10、20、30、40 min4种强度)6个因素, 比较其提取效果。每份样品均重复3次, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 山楂叶黄酮提取方法的验证

由标准曲线所得的回归方程为: $y = 1.1175x + 0.0145$, 其中 y 为吸光度, x 为芦丁, 浓度 mg/mL, $r = 0.9998$ 。结果表明, 芦丁浓度在0.2~1.0 mg/mL范围

第一作者简介: 李志霞(1981-), 女, 博士, 现主要从事果树栽培与生理生态研究。E-mail: lizhixia128@126.com。

通讯作者: 吕德国(1967-), 男, 教授, 博士生导师, 现主要从事果树栽培与生理生态研究。E-mail: lvdeguo@163.com。

基金项目: 国家科技基础条件平台建设资助项目(2007DK A21002-29); 农业部种质资源保护资助项目(NB08-2130135-20)。

收稿日期: 2009-10-10

内具有良好的线性关系。重复性试验中,总黄酮平均含量为 6.08%,RSD = 0.93%。说明该方法测定山楂叶黄酮重现性良好。稳定性试验结果表明,RSD = 1.98%,吸光度值在 0~24 h 内基本不变,有效控制时间较长,稳定性较好。

2.2 山楂叶总黄酮超声波法提取工艺条件的筛选

2.2.1 不同提取溶剂对山楂叶总黄酮提取效果的影响

黄酮类化合物为亲水性物质,易溶于甲醇、乙醇或丙酮等有机溶剂中。采用此 3 种溶剂进行总黄酮的提取,由图 1 可以看出,乙醇和丙酮提取效果明显优于甲醇,提取率分别是前者的 2.1 倍和 2.2 倍,而丙酮的提取率略高于乙醇。但是,由于丙酮的提取率仅比乙醇高出 5.96%,考虑到丙酮成本较高且含有有毒成份,生产中一般不予采用,故选择使用乙醇为最佳提取溶剂。

2.2.2 不同乙醇浓度对山楂叶总黄酮提取效果的影响

乙醇浓度的不同也会影响提取效果。由图 2 可以看出,70%乙醇提取效果最好,分别比其它 3 个浓度的提取率高出 44.25%、39.90%、34.89%,高浓度乙醇提取率反而下降。究其原因,可能是因为浓度低时溶剂还不足以能够进入叶片细胞将有效成分溶出,浓度高时乙醇会增加对脂类物质的溶解,以致降低了对黄酮类物质的提取效果。

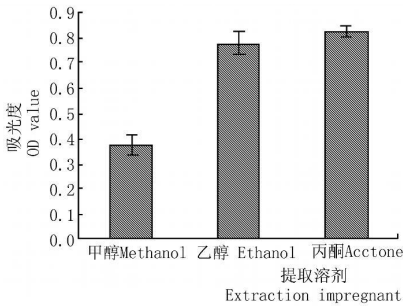


图 1 不同提取溶剂对山楂叶总黄酮提取效果的影响
Fig. 1 Extraction effects of the total flavonoids in *C. pinnatifida* leaves with different extracting impregnant

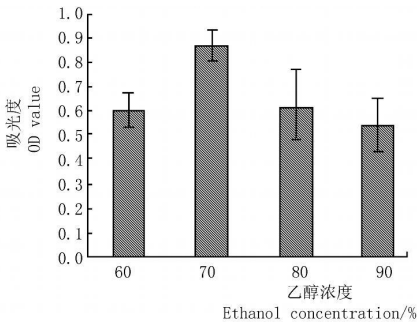


图 2 不同乙醇浓度对山楂叶总黄酮提取效果的影响
Fig. 2 Extraction effects of the total flavonoids in *C. pinnatifida* leaves at different ethanol concentrations

2.2.3 不同料液比对山楂叶总黄酮提取效果的影响
以样品质量和溶剂体积的比值为料液比,不同料液比对山楂叶总黄酮的提取效果不同。由图 3 可以看出,加入样品的量一定时,随着溶剂量增加提取率升高。

1 : 40、1 : 30 和 1 : 20 料液比的提取率分别比 1 : 10 增加了 14.56%、46.10%和 52.32%,但是料液比超过 1 : 30 以后提取率增加幅度趋于平稳,1 : 40 仅比 1 : 30 的提取率提高 4.26%。从节约溶剂方面考虑,以选择 1 : 30 料液比为宜。

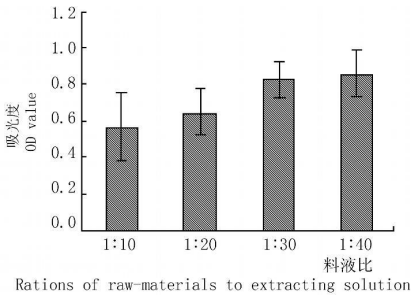


图 3 不同料液比对山楂叶总黄酮提取效果的影响
Fig. 3 Extraction effects of the total flavonoids in *C. pinnatifida* leaves with different ratios of raw materials to extracting solution

2.2.4 不同粉碎粒度对山楂叶总黄酮提取效果的影响

将烘干的山楂叶分别过 80、40、20 目筛,分别作为细粉、中粉、粗粉。由图 4 可以看出,粉碎粒度为中等时提取效果最好,中粉的提出率分别为细粉和粗粉的 1.32 倍和 1.22 倍。粉碎过细或较粗都会使提取率下降。原因可能是粉碎过细时将叶片中的有效黄酮物质结构破坏而降低了提取率,粉碎过粗则由于接触面积小而不容易使其充分溶出。

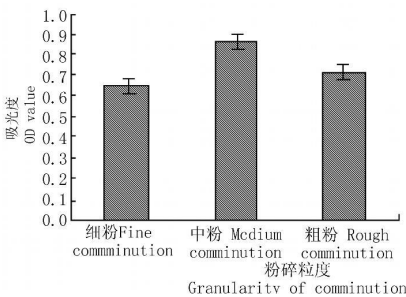


图 4 不同粉碎粒度对山楂叶总黄酮提取效果的影响
Fig. 4 Extraction effects of the total flavonoids in *C. pinnatifida* leaves with different granularity of comminution

2.2.5 不同提取方法对山楂叶总黄酮提取效果的影响

总黄酮的提取方法很多,选择其中最常用的 3 种进行比较,由图 5 可知,超声波法提取效果明显优于冷浸法和热回流法,提出率分别提高了 3.69 倍和 2.50 倍。冷浸法费时且提取率低,不适合用于生产,热回流法由于方法成熟且无污染,目前在生产上还有所应用,但是提取效果明显较超声波法低,而超声波法是其中应用潜力最大的一种提取方法,以省时高效见长。

2.2.6 不同提取时间对山楂叶总黄酮提取效果的影响

提取时间的长短也会影响黄酮得率。对叶片分别进行 10、20、30、40 min 的超声波提取,由图 6 可以看出,超声波提取 30 min 效果最好,分别比其它 3 个时间的黄酮得率高出 184.25%、87.64%和 42.12%。可见,时间过长提取率反而下降,可能是因为提取时间太长,超声波将总

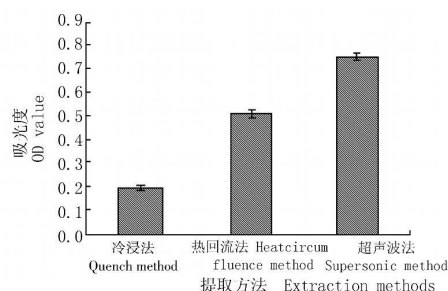


图5 不同提取方法对山楂叶总黄酮提取效果的影响

Fig. 5 Extraction effects of the total flavonoids in *C. pinnatifida* leaves with different extracting methods

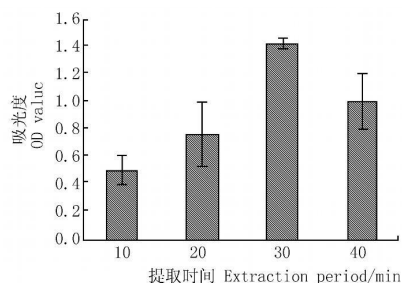


图6 不同提取时间对山楂叶总黄酮提取效果的影响

Fig. 6 Extraction effects of the total flavonoids in *C. pinnatifida* leaves with different extraction periods

黄酮的结构进一步分解,使得吸光度值降低。

3 讨论

山楂叶黄酮的提取方法常见的有渗漉法、热回流法、索氏提取法、逆流萃取法、半仿生法等^[9-10],近年来超声波法也广泛用于黄酮类物质的提取。前人研究^[11-12]表明,超声波法提取时间大大缩短,产率较高,且试验可在室温下进行,设备简单,操作方便,明显优于它法,是提取山楂中黄酮类物质的一种有效方法。该试验采用超声波法提取山楂叶总黄酮的效果良好。以往大多试验^[13-14]表明70%乙醇为最佳溶剂,生产上可以作为有

效参考。有关最适料液比的选择则说法不一^[13-15],可能是试验材料不同导致结果不一致,所以实际操作时应该选择适合自己试验材料的溶剂量。该试验采用超声波法提取山楂叶总黄酮,通过试验优化了超声波提取工艺的几个影响因子,即用70%乙醇、以料液比1:30、中等粉碎粒度下超声波提取30 min,提取效率最高。

参考文献

- [1] 时岩鹏, 丁杏苞. 山楂化学成分的研究[J]. 中草药, 2000, 31(3): 173-176.
- [2] 王月刚, 陈素云. 山楂对心血管系统的药理作用研究[J]. 医药信息, 2000, 17(6): 29-30.
- [3] 李贵海, 孙敬勇, 张希林, 等. 山楂降血脂有效成分的试验研究[J]. 中草药, 2002, 33(1): 50-52.
- [4] Shahat A A, Cos P, Bruyne T, et al. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinica*[J]. *Planta Medica*, 2002, 68(6): 539-541.
- [5] 张鞍灵, 高锦明, 王妹清. 黄酮类化合物的分布及开发利用[J]. 西北林学院学报, 2000, 15(1): 69-74.
- [6] 李清华, 林玲娜. 黄酮以及稻米黄酮的研究与开发现状[J]. 福建稻麦科技, 2004, 22(4): 45-47.
- [7] 王威, 王春利. 从山楂叶中提取黄酮类物质及其鉴定方法[J]. 食品科学, 1994(3): 53-55.
- [8] 国家药典委员会. 中国药典 2005 年版[M]. 1 部. 北京: 化学工业出版社, 2005. 23-24.
- [9] 李苑, 张敏. 中草药中黄酮类化合物提取工艺的研究概况[J]. 广东药学院学报, 1999(2): 194-196.
- [10] 王威, 周增辉, 崔妍, 等. 山楂叶黄酮物质提取方法的研究及结构分析[J]. 中国食品添加剂, 2000(4): 7-11.
- [11] 张妍, 李厚伟, 张永春, 等. 山楂中总黄酮几种提取分离方法的考察及含量测定[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2001, 35(3): 183-184.
- [12] 霍丹群, 张文, 李奇琳, 等. 超声波法与热提取法提取山楂总黄酮的比较研究[J]. 中成药, 2004, 26(13): 1063-1065.
- [13] 张世润, 王立娟, 刘守新, 等. 山楂叶中黄酮类化合物提取工艺条件的筛选[J]. 东北林业大学学报, 2001, 29(4): 71-72.
- [14] 张郁松, 罗仓学. 正交设计法优化沙棘果渣中总黄酮的提取工艺[J]. 沙棘, 2007, 20(1): 19-21.
- [15] 王冬梅, 李琰, 王敏茹, 等. 山楂叶总黄酮生长积累动态及提取工艺研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(10): 2083-2087.

The Study on the Main Factors Influencing the Total Flavonoids Extracting in *Crataegus pinnatifida* Leaves

LI Zhi-xia, LV De-guo, LU Wei-wei, QIN Si-jun

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang Hawthorn Repository National Fruit tree Germplasm Resources, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: The important influencing factors of the total flavonoids extracting in *Crataegus pinnatifida* leaves of 'Tian-shui' variety were studied using the supersonic method and UV spectrophotometry. The results showed that the extracting effects of flavonoids were related to the extracting impregnants, the alcohol concentration, the ratios of raw-materials to extracting solution, the granularity of comminution, the extracting methods and the extraction periods. Ethanol was the best impregnant among Methanol, ethanol and acetone, and the extraction effects of 70% alcohol was superior to 60%, 80% and 90% ethanol. The extraction rate was different under different ratios of raw-materials to extracting solution and granularity of comminution, 1:30 was the most suitable rate among 1:10, 1:20, 1:30 and 1:40, and extraction ratio of the medium comminution was higher than the fine comminution and the tough comminution. The supersonic method had more advantage and greater potential than quench method and heatcircumfluence method. The highest extracting rate of flavonoids could be obtained at 30 minutes-extraction periods.

Key words: *Crataegus pinnatifida* leaves; total flavonoids; supersonic method