

地石榴中总黄酮提取工艺研究

杨申明¹, 王振吉^{1,2}, 杨红卫¹, 杜凌海¹

(1. 楚雄师范学院 化学与生命科学学院, 云南 楚雄 675000; 2. 云南省高校应用生物学重点实验室, 云南 楚雄 675000)

摘要:以地石榴为试材, 采用乙醇回流法从地石榴雌雄植株中提取总黄酮, 通过单因素试验和正交实验, 以地石榴总黄酮提取率为指示, 考察了乙醇体积分数、料液比、提取温度、提取时间对提取率的影响, 优化了地石榴总黄酮的提取工艺。结果表明: 最佳提取工艺参数为乙醇体积分数 65%, 料液比 1:25(g/mL), 提取温度 80℃, 提取时间 120 min。在此条件下, 地石榴雄、雌植株中总黄酮的提取率分别为 1.167% 和 1.147%, 加标平均回收率为 98.56%, RSD 值为 0.84%。该方法操作简单, 准确度较高, 精密度好, 可作为地石榴中总黄酮的提取和含量测定。

关键词:地石榴; 正交实验; 总黄酮

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)24-0126-05

地石榴(*Ficus tikoua* Bur.) 属桑科(Moraceae)榕属(*Ficus*)植物, 别名地板藤、石头藤、地枇杷、地瓜等, 主要分布于陕西南部、湖北、湖南、广西西部、四川、贵州、云南等地, 生于海拔 500~2 650 m 的山坡、草坡或岩石缝中^[1]。全株可作药用, 在《全国中草药汇编》、《中药大辞典》、《中华本草》、《滇南本草》和《云南天然药物图鉴》中均已收录。具有清热解毒、祛风化湿、舒筋活络、通利乳汁等功效^[2], 云南楚雄民间常用来治疗黄疸、瘰癧、无名肿痛、风湿疼痛、腹泻、痢疾、痔疮出血等疾病, 历史悠久, 疗效显著, 深受彝族人民的喜爱。

黄酮类化合物(flavonoids)是一类存在于自然界的、具有 2-苯基色原酮(flavone)结构的化合物, 是药用植物中的主要活性成分之一^[3]。它具有保护心血管系统、抗菌及抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、清除自由基、抗炎、镇痛活性和保肝护肝等多种功效^[4], 特别是具有清除自由基及抗癌、防癌重要作用, 因此使生物类黄酮在医药、食品等领域的应用具有广阔的应用前景^[5]。因此, 从药用植物中提取黄酮的技术具有重要的经济和实用价值。目前, 有关地石榴中总黄酮含量测定及提取工艺研究鲜见

报道。试验采用乙醇回流法从地石榴中提取总黄酮, 通过显色反应对地石榴提取物进行定性鉴定, 用 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaNO_2 比色法测定了总黄酮含量, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验优化了提取工艺, 以期地为地石榴的药学价值提供参考并为其进一步开发利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料: 地石榴植株采自云南省楚雄市西山公园, 经鉴定为桑科榕属植物, 样品依次用自来水、蒸馏水洗净后放入远红外快速恒温(80℃)干燥箱烘干, 用粉碎机粉碎后过 60 目, 得干粉, 密封保存、备用; 芦丁标准品(HPLC>98%)、95%乙醇、浓硫酸、浓盐酸、镁粉、三氯化铝、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等均为分析纯。

仪器: 722 型光栅分光光度计(山东高密彩虹分析仪器有限公司)、HH-S2S 恒温水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂)、CP214C 电子天平(奥豪斯仪器有限责任公司)、SHZ-III A 型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司)、摇摆式植物粉碎机、远红外快速恒温干燥箱(鄞城威瑞科教仪器有限公司)等。

1.2 试验方法

1.2.1 总黄酮的提取 准确称取 2.00 g 地石榴植株干粉, 用 50 mL 65%(体积分数, 下同)乙醇, 在 80℃水浴中加热回流 120 min, 提取完毕后, 减压抽滤, 滤液用 65%乙醇定容至 50 mL 容量瓶中, 摇匀, 得地石榴黄酮提取液(供试品溶液), 备用。

1.2.2 总黄酮的定性检验 取 2 mL 供试品溶液 4 份于试管中, 分别加 5%(质量分数, 下同)NaOH, 2% AlCl_3 乙醇溶液, 盐酸-镁粉, 浓硫酸进行显色反应, 观察试验现象, 检识总黄酮有无^[6-8]。

第一作者简介:杨申明(1976-), 男, 本科, 实验师, 现主要从事天然有机产物化学等研究工作。E-mail: ysm@cxtc.edu.cn.

责任作者:王振吉(1983-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事天然有机产物化学等研究工作。E-mail: wangzj@cxtc.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31300370); 云南省应用基础计划项目(2011FZ186); 云南省应用基础计划项目青年资助项目(2012FD049); 云南省重点建设学科, 楚雄师范学院重点建设学科基金资助项目(05YJJSXK03); 云南省高校科技创新团队支持计划资助项目(IRTSTYN); 楚雄师范学院基金资助项目(10YJYB02)。

收稿日期:2014-09-02

1.2.3 总黄酮的含量测定 以芦丁为标准品,采用 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2$ 比色法测定总黄酮的含量^[9-10]。芦丁标准溶液的制备:准确称取 105℃ 条件下恒重的芦丁 0.010 g,用 65%乙醇溶解并定容至 50 mL 容量瓶中,摇匀得浓度为 0.200 mg/mL 的芦丁标准溶液。标准曲线的绘制:准确吸取芦丁标准溶液 0.00、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00 mL 于 25 mL 比色管中,分别加入 5% NaNO_2 溶液 0.30 mL,摇匀,放置 6 min;加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.30 mL,摇匀,放置 6 min;再加入 5% NaOH 溶液 4.00 mL,摇匀,放置 6 min;加入 65%乙醇定容至 10 mL 刻度线,摇匀,放置 10 min 后,在 510 nm 处测定络合物的吸光度(以试剂作参比空白)。以芦丁浓度 $C(\text{mg/mL})$ 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,绘制标准曲线,建立回归方程。提取率(%) = $C \times N \times V / M \times 100\%$ 。式中: C 为所测溶液的吸光度值带入回归方程计算出的黄酮类化合物浓度(mg/mL); N 为稀释倍数; V 为提取液的体积(mL); M 为样品质量(g)。

1.2.4 提取工艺单因素试验 分别考察各单因素影响:①选择乙醇体积分数分别为 45%、55%、65%、75%、85% 作为提取溶剂进行比较,回流温度为 80℃,回流时间为 120 min,料液比为 1:25;②确定 65%乙醇提取效果较好,以 65%乙醇作为提取溶剂,分别在料液比为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30(g/mL)的条件下进行回流提取,回流温度为 80℃,回流时间为 120 min;③确定料液比为 1:25(g/mL)提取效果较好,用料液比为 1:25(g/mL),65%乙醇作为提取溶剂,分别在 65、70、75、80、85℃ 温度条件下进行回流提取,回流时间为 120 min;④确定回流温度为 80℃ 提取效果较好,以 65%乙醇作为提取溶剂,料液比为 1:25(g/mL),回流时间分别为 60、90、120、150、180 min 的条件下进行回流提取,从而确定各因素的影响作用^[11-12]。

1.2.5 最佳提取工艺参数优化 在单因素试验基础上,结合药材性质以及实际生产要求,以乙醇体积分数、料液比、提取温度、提取时间为试验因素,以地石榴中总黄酮提取率为评价指标,设计 $L_9(3^4)$ 正交实验探索最佳提取工艺条件(表 1)。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Factor and level of orthogonal design

水平 Level	A 乙醇体积分数 Volume fraction of ethanol/%	B 料液比 Solid-liquid ratio	C 回流温度 Temperature/℃	D 回流时间 Time/min
1	55	1:15	70	90
2	65	1:20	75	120
3	75	1:25	80	150

1.2.6 样品中总黄酮含量测定 准确称取 3 份地石榴雄、雌植株干粉各 2.00 g,分别在优化后的最佳提取工艺下进行提取,按标准曲线绘制方法测吸光度,计算总黄

酮的提取率。

1.2.7 回收率的测定 取已知黄酮类化合物提取率的地石榴样品溶液 1.00 mL,分别加入浓度为 0.200 mg/mL 的芦丁标准溶液 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL,按试验方法测定,计算回收率。

1.2.8 精密密度试验 取 5 份同一样品溶液各 1.00 mL,置于 25 mL 比色管中,按试验方法测定吸光度,计算 RSD。

2 结果与分析

2.1 黄酮类化合物的鉴定

加 5% NaOH 的溶液显橙红色,可能有二氢黄酮、黄酮醇、橙酮或查耳酮存在;加 2% AlCl_3 乙醇溶液显橙黄色,可能有查耳酮、橙酮存在;加盐酸-镁粉溶液由黄色变成红色,可能有黄酮或黄酮醇存在;加浓硫酸溶液由黄色变成橙色,提取液中可能有黄酮、黄酮醇存在。通过显色反应,说明地石榴的提取液中含有黄酮类化合物。

2.2 芦丁标准曲线

按 1.2.3 方法绘制标准曲线,得回归方程为 $A = 9.9398C - 0.003142$,相关系数 $R = 0.9998$,线性范围为 0.00~0.06 mg/mL 内,芦丁浓度与吸光度有良好的线性关系,所得标准曲线见图 1。

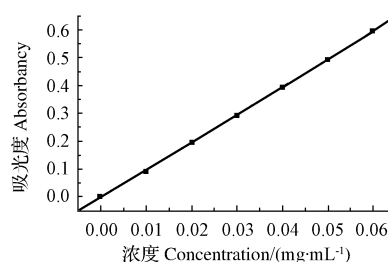


图 1 芦丁标准曲线

Fig. 1 Rutin standard curve

2.3 单因素试验结果

2.3.1 乙醇体积分数对提取效果的影响 由图 2 可知,随着乙醇体积分数的增大,总黄酮提取率提高,当乙醇体积分数增大到 65% 时,提取率最大,之后随着乙醇体积分数的增大而提取率呈下降趋势,可能是高浓度乙醇使细胞内蛋白质凝固,影响总黄酮的溶出。同时因为黄酮糖苷是由两部分组成,苷元成分不易溶于水,而糖又易溶于水,因此在提取黄酮类化合物时,只有乙醇与水达到最佳比例时,提取率最高。故选择乙醇体积分数为 55%~75%,用于进一步优化试验。

2.3.2 料液比对提取效果的影响 由图 3 可知,随着料液比的增大,总黄酮提取率提高,当料液比增大到 1:25 (g/mL) 时提取率最大。之后随着料液比的增大提取率呈下降趋势。结合实际情况,选择料液比为 1:15~1:25 (g/mL) 用于进一步优化试验。

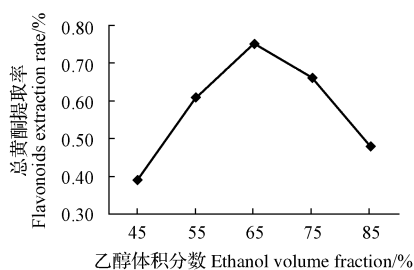


图2 乙醇体积分数对提取率的影响

Fig. 2 Effect of ethanol volume fraction on flavonoids extraction rate

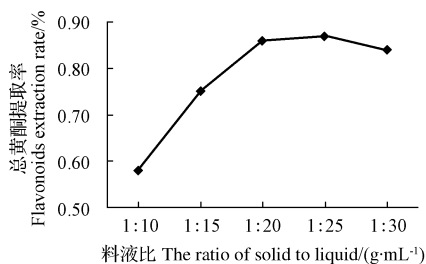


图3 料液比对提取率的影响

Fig. 3 Effect of ratio of solid to liquid on flavonoids extraction rate

2.3.3 提取温度对提取效果的影响 由图4可知,随着温度的升高,总黄酮提取率提高,当温度升高到80℃时提取率最大,之后随着温度的升高提取率呈下降趋势。这可能是随温度升高分子运动速度加快,溶解速度随之加快,同时温度可引起细胞膜结构的变化,使黄酮类化合物由外层细胞转移到溶质中,使提取率增大;但温度过高使蛋白质凝固,黄酮不易溶出,同时地石榴中有效成分也会受到破坏。故选择提取温度为70~80℃用于进一步优化试验。

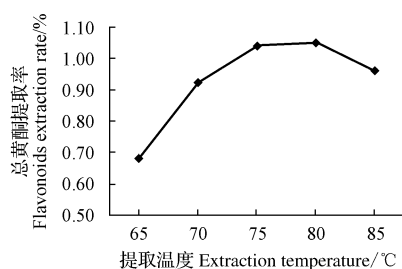


图4 温度对提取率的影响

Fig. 4 Effect of extraction temperature on flavonoids extraction rate

2.3.4 提取时间对提取效果的影响 由图5可知,随着提取时间的延长,总黄酮提取率提高,当提取时间增加到120 min时提取率最大,之后随着提取时间的延长提取率呈下降趋势,可能是随着提取时间的延长,高温使蛋白质凝固,造成黄酮不易溶出。故选择提取时间为

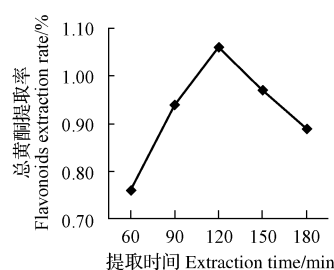


图5 时间对提取率的影响

Fig. 5 Effect of extraction time on flavonoids extraction rate

90~150 min 用于进一步优化试验。

2.4 正交实验结果

由表2可知,各因素对地石榴总黄酮提取率的影响程度不同,其影响的主次顺序为 B>D>C>A,即料液比>提取时间>提取温度>乙醇体积分数。由试验数据可以得出料液比为显著因素,极差分析最佳组合是 A₂B₃C₃D₂,即最佳提取工艺条件为:乙醇体积分数 65%,料液比 1:25(g/mL),提取温度 80℃,提取时间120 min。在此条件下进行重复性性好(平行提取测定3次),测得地石榴雄、雌植株中总黄酮平均提取率为 1.167%和 1.147%。

表3 正交实验结果

Table 3 Result of the orthogonal experiment

试验号 Test No.	A	B	C	D	总黄酮提取率 Flavonoids extraction rate/%
1	1	1	1	1	0.825
2	1	2	2	2	1.050
3	1	3	3	3	1.074
4	2	1	2	3	0.830
5	2	2	3	1	1.028
6	2	3	1	2	1.152
7	3	1	3	2	0.910
8	3	2	1	3	0.875
9	3	3	2	1	1.120
K1	2.949	2.565	2.852	2.973	
K2	3.010	2.953	3.000	3.112	
K3	2.905	3.346	3.012	2.779	
R	0.105	0.781	0.160	0.333	

2.5 样品中总黄酮含量的测定

由表4.5可知,地石榴雄植株、雌植株总黄酮平均提取率分别为 1.167%和 1.147%。

表4 地石榴雄植株总黄酮提取率

Table 4 Extraction rate of total flavonoids from

Ficus tikoua Bur. male plant

序号 No.	吸光度 Absorbancy	提取率 Extraction rate/%	平均提取率 Average extraction rate/%
1	0.525	1.175	
2	0.524	1.150	1.167
3	0.525	1.175	

表 5 地石榴雌植株总黄酮提取率

Table 5 Extraction rate of total flavonoids from *Ficus tikoua* Bur. female plant

序号 No.	吸光度 Absorbancy	提取率 Extraction rate/%	平均提取率 Average extraction rate/%
1	0.521	1.143	1.147
2	0.523	1.148	
3	0.524	1.150	

2.6 回收率试验

由表 6 可知,加样平均回收率为 98.56%,RSD 值为 0.84%,表明该方法对地石榴总黄酮提取率测量的准确度较高。

表 6 回收率试验结果

Table 6 Result of recovery test

样品量 The amount of sample/mg	加入量 The amount of addition/mg	测得量 The amount of measurement/mg	回收率 Rate of recovery/%	平均回收率 Average rate of recovery/%	RSD /%
0.0531	0.20	0.2490	97.95	98.56	0.84
0.0531	0.40	0.4502	99.28		
0.0531	0.60	0.6496	99.42		
0.0531	0.80	0.8425	98.68		
0.0531	1.00	1.0278	97.47		

2.7 精密度试验

由表 7 可知,平均吸光度为 0.522,RSD 值为 0.11%,表明测定结果的相对标准偏差较小,说明试验精密度较好,试验数据可靠。

表 7 精密度试验结果

Table 7 Result of precision experiment

样品 Sample	吸光度 Absorbancy	平均吸光度 Average absorbancy	RSD/%
1	0.521	0.522	0.11
2	0.523		
3	0.522		
4	0.524		
5	0.522		

3 讨论

黄酮类化合物易溶于甲醇、乙醇、水等溶剂中,乙醇溶解性能较好,对植物细胞的穿透能力较强,与一般有机溶剂相比,具有低毒、廉价、便于回收利用等特点,故试验选择乙醇作为提取溶剂。正交实验结果表明,各因素对地石榴总黄酮提取率的影响程度不同,在趋于提取平衡的条件下,其影响的主次顺序为料液比>提取时间>提取温度>乙醇体积分数。通过正交实验结果以及最

优参数的验证试验,最佳提取工艺条件为 $A_2B_3C_3D_2$,即乙醇体积分数 65%,料液比 1:25(g/mL),提取温度 80℃,提取时间 120 min。在此条件下进行提取试验,地石榴雄、雌植株中总黄酮平均提取率分别为 1.167%和 1.147%,加标平均回收率为 98.56%,RSD 值为 0.84%。该方法准确度较高,回收率较好,可作为地石榴总黄酮的提取和含量测定。

该研究结果表明,地石榴中含有黄酮类化合物,同一产地的地石榴雄、雌植株中总黄酮含量有一定的差异,但二者差异不大。

目前,有关地石榴总黄酮的提取及含量测定的相关研究尚鲜见报道,该试验用 $Al(NO_3)_3-NaNO_2$ 比色法测定了地石榴雄、雌植株中总黄酮含量,并对提取工艺进行优化,以期探索出一条高效的、适应工业化生产的地石榴总黄酮提取工艺路线,为其进一步开发利用提供技术保证。但地石榴总黄酮提取的影响因素很多,包括提取剂浓度、料液比、提取温度、提取时间、提取剂种类、提取次数、提取方法和粉碎粒度等。该试验仅对前 4 个常规影响因素进行了研究,其它因素的影响效果还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 张秀实,吴征镒.中国植物志:被子植物门.双子叶植物纲.桑科[M].23卷,第1分册.北京:科学出版社,1997:156-157.
- [2] 云南省药物研究所.云南天然药物图鉴[M].第3卷.昆明:云南科技出版社,2007:165.
- [3] 陈业高.植物化学成分[M].北京:化学工业出版社,2004:229.
- [4] 徐向容,王文华,李华斌.荧光法测定 Fenton 反应产生的羟自由基[J].分析化学,1998,26(12):1460-1463.
- [5] 陈丛瑾,黄克瀛,王贵武,等.香椿叶总黄酮不同提取方法的比较[J].食品研究与开发,2008,29(3):57-60.
- [6] 罗伯特 D.布朗.最新仪器分析技术全书[M].北京:化学工业出版社,1987:181.
- [7] 何兰,姜志宏.天然产物资源化学[M].北京:科学出版社,2008:356.
- [8] 彭俊文,朱晓伟,陈建平,等.黄花蒿中黄酮类成分的分离鉴定[J].内蒙古医学院学报,2011,33(2):152-154.
- [9] 夏道宗,于新芬,马志杰.二次回归通用旋转设计优化土茯苓总黄酮的提取工艺[J].中华中医药学刊,2009,27(7):1460-1463.
- [10] 张春兰,张锐利,张建花,等.枣核中黄酮类化合物的提取工艺[J].食品研究与开发,2011,32(9):33-35.
- [11] 贺波,李小定,彭定祥,等.苎麻叶中黄酮类化合物的提取工艺研究[J].食品工业科技,2010,31(10):259-262.
- [12] 古丽娜尔·夏衣马尔旦.黄连中总黄酮含量测定及提取工艺研究[J].新疆师范大学学报,2010,29(1):75-78.

Study on Extraction Process of Total Flavonoid in *Ficus tikoua*YANG Shen-ming¹, WANG Zhen-ji^{1,2}, YANG Hong-wei¹, DU Ling-hai¹

(1. College of Chemistry and Life Science, Chuxiong Normal University, Chuxiong, Yunnan 675000; 2. Yunnan Province Universities Key Laboratory of Applied Biology, Chuxiong, Yunnan 675000)

三个南高丛蓝莓果实质量动态变化及储藏性研究

王连润¹, 刘芝刚², 孙 顺², 刘家迅¹, 高正清¹, 梁明泰¹

(1. 云南省农业科学院 园艺作物研究所, 云南 昆明 650205; 2. 云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201)

摘 要:对引种于云南澄江的 3 个南高丛蓝莓品种果实采后质量变化动态及储藏期进行了研究。结果表明:在常温及 4℃ 条件下, 3 个蓝莓品种中,“奥尼尔”的质量变化总量最大,储藏期最短;“密斯黛”的质量变化总量最小,是最耐储藏的品种;“夏普蓝”的质量变化总量及储藏期居中。

关键词:蓝莓;品种;质量变化;储藏期

中图分类号:S 663.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)24-0130-03

蓝莓(*Vaccinium* spp.)属杜鹃花科(Ericaceae)越桔属(*Vaccinium* L.)为多年生落叶或常绿灌木,又称越桔、蓝浆果。蓝莓因其独特的营养价值和保健功能成为联合国粮农组织推荐的人类五大健康食品之一^[1-3],果实中除含有常规的氨基酸、食物纤维和维生素 C 等成分外,还富含超氧化物歧化酶(SOD)、熊果甙、花青甙等其它果品中少有的特殊成分以及丰富的钾、铁、锌等矿物质元素,其营养价值远远高于其它水果,常被誉为“世界浆果之王”^[4]。近年来,全国各地都在积极引种栽培,发展速度较快。随着蓝莓产业的发展,果实采后处理技术越来越受到广泛地关注。该研究旨在考察云南蓝莓发展中主栽的几个南高丛蓝莓品种果实采后的质量动态变化及储藏期情况,以期对蓝莓发展中果实采后及时采取

相应的保鲜等措施提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试 3 个蓝莓品种分别为南高丛蓝莓“奥尼尔”、“夏普蓝”和“密斯黛”,果实采自云南澄江蓝莓种植示范基地。

1.2 试验方法

从田间选取无虫害的成熟蓝莓果实,采回后分别将其分为 2 份,从每份中随机抽取 30 粒作为考察样本,称重后一份置于常温条件下,另一份 4℃ 保存,除特殊情况外,常温条件下的试验材料每天称重记录,连续考察 14 d 内的质量动态变化情况。材料 4℃ 条件下储存 7 d 后每隔 1 d 称重记录,连续考察果实 30 d 内的质量动态变化情况。考察过程中观察记录每个品种出现烂果的时间及烂果数,烂果标准为果实失水严重,外观上不具备可食性。烂果率(%)=烂果数/果实总数×100%。

2 结果与分析

2.1 常温条件下蓝莓果实质量动态变化情况

从表 1 可知,常温条件下,5 月 1—3 日期间,3 个蓝莓品种果实失水量较大,质量变化均达到最大值;5 月

第一作者简介:王连润(1978-),女,云南鹤庆人,硕士,助理研究员,现主要从事蓝莓栽培及育种等研究工作。E-mail: lianruiwang@163.com.

责任作者:刘家迅(1967-),男,本科,副研究员,现主要从事小浆果栽培及育种等研究工作。

基金项目:云南省重点新产品开发计划资助项目(2013BB011)。

收稿日期:2014-09-15

Abstract: Taking *Ficus tikoua* Bur. as material, the total flavonoids in *Ficus tikoua* was extracted by means of ethanol refluxing method. The extraction technology of total flavonoids from *Ficus tikoua* was optimized through single factor experiment and orthogonal experiment. With the extraction rate of total flavonoids in *Ficus tikoua* as the indicator, effect of the volume fraction of ethanol, solid-liquid ratio, extraction temperature, extraction time on the extraction rate were studied. The results showed that the optimum extraction process parameters were followed, the volume fraction of ethanol 65%, ratio of solid to liquid 1:25(g:mL), extraction time 120 minutes, and extraction temperature 80℃. The average extraction rate of total flavonoids in male and female trees were 1.167% and 1.147% respectively, the average recovery rate was 98.56% under such condition. RSD value was 0.84%. The method has the advantages of simple operation, high accuracy, good precision, could be used as the extraction and content of total flavonoids in *Ficus tikoua* determination.

Keywords: *Ficus tikoua* Bur.; orthogonal test; total flavonoids