

DOI:10.11937/bfyy.201504032

# 酶法提取刺玫果总黄酮工艺研究

王晓林, 钟方丽, 薛健飞, 刘方方

(吉林化工学院 化学与制药工程学院, 吉林 吉林 132022)

**摘 要:**以刺玫果为试材,采用酶法辅助提取刺玫果总黄酮,研究各因素对刺玫果总黄酮提取率的影响。结果表明:纤维素酶辅助提取刺玫果总黄酮的最佳工艺条件为提取溶剂为 50%乙醇、温度控制在 50℃、料液比 1:15 g/mL、纤维素酶加入量为 40 mg/g、控制提取液于 pH 5.5 条件下,酶解提取 2 次,每次 140 min,在最佳条件下进行 3 次验证试验,其总黄酮提取率平均为 95.94 mg/g。

**关键词:**刺玫果;总黄酮;酶解;提取

**中图分类号:**R 284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0136-04

刺玫果属蔷薇科蔷薇属植物山刺玫(*Rosa davurica* Pall.)的成熟果实,其果实酸甜可口、营养丰富,具有持久、浓郁的清新、香甜气息,广泛分布于我国的东北及内蒙、山西等地区,果实中富含黄酮类、皂苷类、维生素 C、氨基酸等<sup>[1-3]</sup>,具有健脑益智、抗衰老、抗疲劳、除血栓、降血压、抗辐射等作用<sup>[4-8]</sup>。该课题组对山刺玫进行了详细研究<sup>[9-17]</sup>。黄酮类化合物是一类广泛存在于自然界的

天然有机化合物,具有众多生理活性<sup>[18]</sup>。现对酶解法提取刺玫果总黄酮的工艺进行了初步研究,以期对刺玫果的进一步开发提供基本依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 采自吉林市龙潭区玉龙山并经吉林化工学院药学系薛健飞博士鉴定为蔷薇科蔷薇属植物山刺玫(*Rosa davurica* Pall.)的成熟果实。

1.1.2 试剂 芦丁,中国食品药品检定研究院(供含量测定用);纤维素酶,湖南红鹰祥生物股份有限公司;木瓜蛋白酶,江苏锐阳生物科技有限公司;果胶酶,上海金穗生物科技有限公司;硝酸铝、氢氧化钠、亚硝酸钠、无水乙醇均为分析纯,天津市大茂化学试剂厂;水为重蒸馏水。

**第一作者简介:**王晓林(1969-),男,山东五莲人,硕士,副教授,现主要从事天然产物有效成分的提取及纯化工艺等研究工作。E-mail:wangxiaolin69@eyou.com。

**责任作者:**钟方丽(1970-),女,山东安丘人,博士,教授,硕士生导师,现主要从事天然产物化学成分的分离与生物活性等研究工作。E-mail:fanglizhong@sina.com。

**基金项目:**吉林省科技厅计划资助项目(20110948)。

**收稿日期:**2014-11-11

## Study on Ultrasonic Extraction Process of Total Flavones from Lotus Plumule

HUANG Zhong-mei, HE Zi-qiang, ZHAO Wan, HUANG Xiao-qin

(Department of Chemical and Environmental Engineering, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415)

**Abstract:** Taking lotus plumule as test material and ethanol as extraction agent, using means of ultrasonic wave treatment. Effects of extracting temperature, ratio of the raw material and solvent, ultrasonic extracting time, and ethanol concentration on the rate of lotus plumule total flavonoids extraction were studied through the single factor control method and  $L_9(3^4)$  orthogonal design, with the extractive yield of total flavones as the index. The results showed that the order of factor affecting the extracting rate of total flavones was as followed: ethanol concentration, temperature, solid-to-liquid ratio and extraction time. Optimal extraction conditions were obtained as follows: concentration of ethanol was 60%, solid-to-liquid ratio was 1:24 g/mL, extraction temperature was 70℃ and extraction time was 30 min. The extracting rate of total flavones was 10.86 mg/g under these optimal conditions.

**Keywords:** total flavones; lotus plumule; ultrasonic extraction

1.1.3 仪器 微波辐射萃取仪, MAS-II型, 上海新仪微波化学科技有限公司; 旋转蒸发仪, RE-52AA 型, 上海亚荣生化仪器厂; 紫外可见分光光度计, TU-1810 型, 北京普析通用仪器有限责任公司; 电热鼓风干燥箱, DNZ-9076A 型, 上海精宏试验设备有限公司; 电子天平, FA2004N 型, 上海精密科学仪器有限公司; 循环水真空泵, SHB-III A 型, 郑州长城科工贸有限公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的制备 精密吸取干燥至恒重的芦丁对照品 10.0 mg 于 50 mL 容量瓶中, 加 60% 乙醇溶液稀释至刻度, 制成浓度为 0.2 mg/mL 的芦丁对照品溶液。精密吸取上述芦丁对照品溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 mL 分别置于 50 mL 容量瓶中, 各加 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液 2 mL, 摇匀, 放置 6 min, 各加 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液 2 mL, 摇匀, 放置 6 min, 各加 4%  $\text{NaOH}$  溶液 20 mL, 再加 60% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以相应对照品溶液为空白, 参照紫外可见分光光度法, 于 505 nm 波长处测吸光度<sup>[19]</sup>。以浓度  $C(\text{mg/mL})$  为横坐标, 吸光度值  $A$  为纵坐标, 进行直线回归, 绘制标准曲线, 其线性方程:  $A = 16.846C - 0.0151$ ,  $R = 0.9996$ , 表明芦丁在 0.004~0.048 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。

1.2.2 样品含量测定 精密吸取刺玫果提取液适量于 25 mL 容量瓶中, 按 1.2.1 方法进行测定, 以相应试剂为空白, 在 505 nm 波长处测吸光度, 通过线性方程计算出提取液中总黄酮浓度, 得出提取液中总黄酮的质量, 进而得出总黄酮提取率, 计算公式如下: 总黄酮提取率  $(\text{mg/g}) = \text{总黄酮的质量} / \text{刺玫果粉的质量}$ 。

1.2.3 酶法提取刺玫果总黄酮的单因素试验 纤维素酶: 称取刺玫果干粉 2.5 g, 酶解温度控制在 45℃, 料液比为 1:15 g/mL, 提取溶剂为 50% 乙醇, pH 5.0 条件下, 选择不同用量的纤维素酶(20、30、40、50、60 mg/g) 酶解 120 min, 90℃、30 s 灭酶, 过滤, 滤液定容至 50 mL 容量瓶中, 吸取 0.2 mL 提取液于 25 mL 容量瓶中, 60% 乙醇定容, 按 1.2.2 的方法测定提取液总黄酮含量, 计算总黄酮提取率, 确定最佳纤维素酶用量。果胶酶: 称取刺玫果干粉 2.5 g, 选择不同用量的果胶酶(20、30、40、50、60 mg/g) 酶解 120 min, 其它条件同上。复合酶(纤维素酶: 果胶酶=1:1): 称取刺玫果干粉 2.5 g, 选择不同用量的复合酶(纤维素酶: 果胶酶=1:1, 20、30、40、50、60 mg/g) 酶解 120 min, 其它条件同上。复合酶(纤维素酶: 果胶酶=2:1): 称取刺玫果干粉 2.5 g, 选择不同用量的复合酶(纤维素酶: 果胶酶=2:1, 20、30、40、50、60 mg/g) 酶解 120 min, 其它条件同上。复合酶(纤维素酶: 果胶酶=1:2): 称取刺玫果干粉 2.5 g, 选择不同用量的复合酶(纤维素酶: 果胶酶=1:2, 20、30、40、50、60 mg/g) 酶解 120 min, 其它条件同上。提取时间对总黄酮提取率的影响: 称取刺玫果干粉 2.5 g, 酶解温度控

制在 45℃, 料液比为 1:15 g/mL, 提取溶剂为 50% 乙醇, 纤维素酶用量 40 mg/g, pH 5.0 条件下, 分别酶解 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h, 其它操作同上。pH 值对总黄酮得率的影响: 称取刺玫果干粉 2.5 g, 酶解温度控制在 45℃, 料液比为 1:15 g/mL, 提取溶剂为 50% 乙醇, 纤维素酶用量 40 mg/g, 分别于 pH 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 条件下酶解提取 2.0 h, 其它操作同上。温度对总黄酮得率的影响: 称取刺玫果干粉 2.5 g, 料液比为 1:15 g/mL, 提取溶剂为 50% 乙醇, 纤维素酶用量 40 mg/g, pH 5.0 条件下分别于 30、35、40、45、50、55、60℃ 酶解提取 2.0 h, 其它操作同上。提取次数对总黄酮得率的影响: 称取刺玫果干粉 2.5 g, 料液比为 1:15 g/mL, 提取溶剂为 50% 乙醇, 纤维素酶用量 40 mg/g, pH 5.0 条件下在 50℃ 酶解提取 2.0 h, 然后将提取残渣按上述条件(不加酶)分别进行第 2、3、4、5 次提取, 其它操作同上。

1.2.4 酶法提取刺玫果总黄酮的正交实验 在单因素试验的基础上, 采用正交实验方法, 优化刺玫果总黄酮的酶解提取工艺。以刺玫果总黄酮提取率为考察指标, 选择纤维素酶用量、提取时间、pH 值和提取温度作为考察因素, 按 4 因素 3 水平进行正交实验设计  $L_9(3^4)$ , 见表 1。取刺玫果适量, 粉碎成粗粉, 称取 2.5 g, 放入到烧瓶中, 按正交实验表进行试验, 每组试验均提取 2 次, 测定提取液的吸光度, 计算总黄酮提取率。

1.2.5 酶法提取刺玫果总黄酮的工艺验证性试验 称取刺玫果干粉 2.5 g, 放入到烧瓶中, 加入 37.5 mL 50% 乙醇和 0.10 g 纤维素酶, 酶解温度控制在 45℃, 控制提取液于 pH 5.5 条件下酶解提取 2 次, 每次 140 min, 其它操作同上。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels in orthogonal array design

水平因素 Factors and levels	A 纤维素酶用量 Quantity of cellulase /(mg · g <sup>-1</sup> )	B pH 值 pH value	C 提取温度 Extraction temperature/℃	D 提取时间 Extraction time/min
1	32	4.5	45	100
2	40	5.0	50	120
3	48	5.5	55	140

## 2 结果与分析

### 2.1 酶法提取刺玫果总黄酮的单因素试验

2.1.1 酶种类及其用量对总黄酮得率的影响 由图 1 得知, 当纤维素酶用量由 20 mg/g 增加到 40 mg/g 时总黄酮提取率明显提高, 当纤维素酶用量大于 40 mg/g 时提取率下降, 当纤维素酶用量为 40 mg/g 时总黄酮提取率最高, 因此, 最佳纤维素酶用量为 40 mg/g。当果胶酶用量由 20 mg/g 增加到 40 mg/g 时总黄酮提取率略有提高, 当果胶酶用量大于 40 mg/g 时提取率略有下降, 当复合酶(纤: 果=1:1) 用量由 20 mg/g 增加到 40 mg/g 时总黄酮提取率略有提高, 当复合酶用量大于 40 mg/g 时提取率略有下降。当复合酶(纤: 果=2:1) 用

量由 20 mg/g 增加到 50 mg/g 时总黄酮提取率略有提高,当复合酶用量大于 50 mg/g 时提取率略有下降。当复合酶(纤:果=1:2)用量由 20 mg/g 增加到 30 mg/g 时总黄酮提取率有所提高,当复合酶用量大于 30 mg/g 时提取率逐渐下降。根据对酶种类及用量的单因素试验结果可知,复合酶用量对总黄酮提取率的影响比果胶酶大,但小于纤维素酶,使用复合酶辅助提取刺玫果总黄酮的效果高于单独使用果胶酶,但低于单独使用纤维素酶,使用各种比例的复合酶辅助提取刺玫果总黄酮的提取率不比单独使用纤维素酶时高,所以选择纤维素酶辅助提取刺玫果总黄酮,其最佳用量为 40 mg/g。

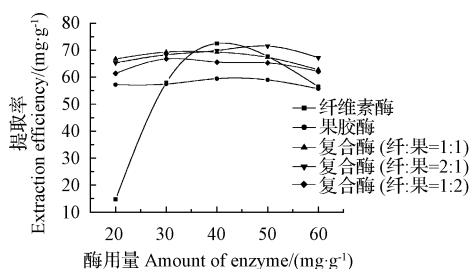


图 1 酶种类及用量的影响

Fig. 1 Effect of varieties and amount of the enzyme

2.1.2 提取时间对总黄酮提取率的影响 由图 2 可知,随着酶解时间的延长,总黄酮提取率逐渐提高,在酶解时间达到 2.0 h 时,再延长酶解时间,提取率提高不明显,因此选择最佳酶解时间为 2.0 h。

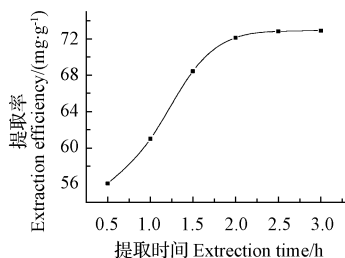


图 2 提取时间的影响

Fig. 2 Effect of extraction time

2.1.3 pH 值对总黄酮得率的影响 由图 3 可知,随着 pH 值的升高,提取率逐渐增大,当 pH 5.0 时,提取率最高,pH 值再提高时,提取率开始下降,因此确定酶解的最佳 pH 为 5.0。

2.1.4 温度对总黄酮得率的影响 由图 4 可知,随着酶解温度的升高,总黄酮提取率逐渐提高,到 50℃ 时提取率达到最高,温度再提高提取率开始下降,说明在此条件下,50℃ 是最佳酶解温度。

2.1.5 提取次数对总黄酮得率的影响 由图 5 可知,提取 5 次总黄酮提取率为 86.94 mg/g,而提取 2 次总黄酮提取率为 84.46 mg/g,提取 2 次后总黄酮提取率达到总提取率的 97.15%,所以固定提取次数为 2 次。

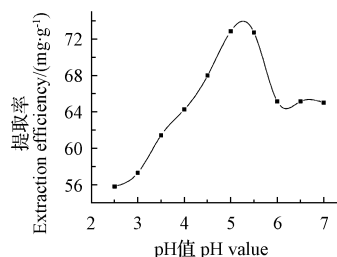


图 3 pH 值的影响

Fig. 3 Effect of pH value

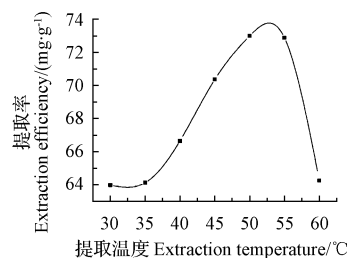


图 4 提取温度的影响

Fig. 4 Effect of extraction temperature

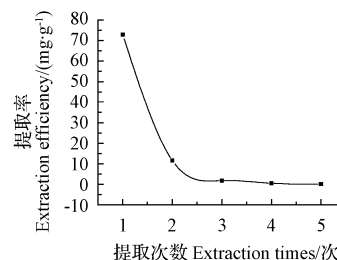


图 5 提取次数的影响

Fig. 5 Effect of extraction times

表 2 正交实验设计及试验结果

Table 2 Orthogonal array design arrangement and the experimental data

试验号 Number	A	B	C	D	总黄酮提取率 Extraction efficiency of total flavonoid/(mg·g <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	1	86.40
2	1	2	2	2	86.99
3	1	3	3	3	95.30
4	2	1	2	3	93.52
5	2	2	3	1	85.21
6	2	3	1	2	91.74
7	3	1	3	2	84.32
8	3	2	1	3	85.21
9	3	3	2	1	84.32
K <sub>1j</sub>	89.56	88.08	87.78	85.31	
K <sub>2j</sub>	90.16	85.80	88.28	87.68	
K <sub>3j</sub>	84.62	90.45	88.28	91.34	
R	5.54	4.65	0.50	6.03	
Max	90.16	90.45	88.28	91.34	
优水平	A <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	

## 2.2 酶法提取刺玫果总黄酮的正交实验

正交实验结果表明,纤维素酶存在条件下,各因素对刺玫果总黄酮提取率的影响大小为酶解时间>纤维素酶用量>pH值>酶解温度,刺玫果总黄酮的最佳酶解提取工艺条件为  $A_2B_3C_2D_3$ ,即料液比为 1:15 g/mL,提取溶剂为 50%乙醇,纤维素酶用量 40 mg/g,pH 值为 5.5,提取温度为 50℃,酶解提取时间为 140 min,提取次数 2 次。

## 2.3 酶法提取刺玫果总黄酮的工艺验证性试验

按上述工艺条件重复试验 3 次。结果刺玫果总黄酮提取率分别为 96.61、95.60、95.60 mg/g,平均为 95.94 mg/g,说明优选的酶解提取工艺比较稳定。

## 3 结论

该试验采用单因素和正交实验法对酶解提取刺玫果总黄酮的工艺进行了优化。其酶解最佳工艺条件为提取溶剂为 50%乙醇、温度控制在 50℃、料液比 1:15 g/mL、加入纤维素酶适量、控制提取液于 pH 5.5 条件下酶解提取 2 次,每次 140 min,在正交实验中,根据对各个因素和水平的极差计算结果可知,影响刺玫果总黄酮提取率的 4 个因素主次顺序为酶解时间>纤维素酶用量>pH 值>酶解温度。在最佳条件下进行 3 次验证试验,其总黄酮提取率平均为 95.94 mg/g,而单独使用 60%乙醇提取刺玫果总黄酮提取率<sup>[10]</sup>仅为 64.39 mg/g,酶法提取刺玫果黄酮类化合物效果比醇提法提取率高的原因,可能是刺玫果细胞壁含有大量的纤维素,通过纤维素酶的酶分解处理,使刺玫果细胞壁发生分解等改变,然后使细胞壁的通透性变化,使黄酮类化合物容易溶出,达到提高其提取率的目的<sup>[23]</sup>。由此可见采用酶解法提取刺玫果总黄酮的方法是可行而有效的。

### 参考文献

- [1] 杨晓辉,李国兴.刺玫果的种源选择[J].中国林副特产,2010(2):39-40.
- [2] 俞作仁,王文莉.刺玫果的化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2002,33(2):188-190.
- [3] 黄成钢,苑春升,魏峰,等.刺玫果化学成分研究[J].中草药,1991,22(6):285-286.

- [4] 于玲媛,史凤英,吴景时.山刺玫果对心脏及保护心肌缺血作用的研究[J].中国林副特产,2005(1):16.
- [5] 于玲媛,史凤英,吴景时.山刺玫果对血清胆固醇的作用研究[J].中国林副特产,2005(3):37.
- [6] 杜佳林,顾晓颖,包玉龙,等.刺玫果不同提取物对Ⅱ型糖尿病大鼠影响试验研究[J].中成药,2010,32(11):1967-1969.
- [7] 焦淑萍,陈彪,姜虹.山刺玫果实清除羟自由基及抗 DNA 损伤作用的试验研究[J].北华大学学报,2002,3(4):307-308.
- [8] 何晓燕,张馨木,常淑芳,等.刺玫果水煎液对动物胃肠运动的影响[J].时珍国医国药,2006,17(11):2147-2148.
- [9] 钟方丽,陈帅,关晓侠.微波法提取刺玫果总黄酮工艺研究[J].江苏农业科学,2010(6):449-451.
- [10] 庄志军,钟方丽,杨英杰,等.刺玫果中总黄酮的提取与分析[J].中成药,2007,29(9):1394-1395.
- [11] 钟方丽,王晓林,敬采月,等.高效液相色谱法测定刺玫果中总黄酮的含量[J].食品科学,2010,31(24):281-284.
- [12] 王晓林.高效液相色谱法测定刺玫果中槲皮素的含量[J].食品工业科技,2011,32(4):370-372.
- [13] 王晓林,王建刚,钟方丽,等.刺玫果挥发性成分的顶空固相微萃取-气质联用分析[J].食品科学,2013,34(6):223-226.
- [14] 钟方丽,王晓林,孙晓雨,等.刺玫叶中总黄酮含量的测定[J].食品科学,2013,34(2):231-235.
- [15] 钟方丽,王晓林,付丽娟,等.大孔树脂法纯化刺玫果总皂苷工艺研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2014,35(1):76-80.
- [16] 钟方丽,王晓林,张娜.刺玫果总皂苷的提取工艺研究[J].安徽农业科学,2011,39(3):1387-1389.
- [17] 钟方丽,王慧竹,王芳.刺玫果多糖的提取工艺研究[J].食品与机械,2011,27(1):43-45.
- [18] 李楠,刘元,侯滨滨.黄酮类化合物的功能特性[J].食品研究与开发,2005,26(6):139-141.
- [19] 古丽巴哈尔·阿巴拜克力.西伯利亚铁线莲地上部分有效成分分析及总黄酮的测定[J].食品科学,2009,30(24):221-226.
- [20] 高文秀,王亚红,祝波.酶解法协同超声波法提取山楂中总黄酮的工艺条件优化[J].江苏农业科学,2013,41(3):252-254.
- [21] 蒋华梅,王向前,石登红,等.回流提取插天泡叶总黄酮的条件优化[J].贵州农业科学,2013,41(5):144-145.
- [22] 李慧力,陶文亮,吴钰娟,等.酶法提取竹叶中总黄酮的工艺研究[J].贵州农业科学,2010,38(10):185-187.
- [23] 陈炳华,张清其,谢必峰.酶解法对山楂总黄酮提取及含量分析的影响[J].福建师范大学学报(自然科学版),1997,13(4):90-93.

## Study on the Extraction Technology of Total Flavonoids in Fruit of *Rosa davurica* Pall. with Enzymes Method

WANG Xiao-lin, ZHONG Fang-li, XUE Jian-fei, LIU Fang-fang

(School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin, Jilin 132022)

**Abstract:** Taking fruits of *Rosa davurica* Pall. as test materials, the effect of many factors on the extraction efficiency of total flavonoids (TF) in fruits of *Rosa davurica* Pall. with enzymes-aided extraction method were studied. The results showed the optimum extraction technology with cellulase as follow, the concentration of the ethanol extraction solvent, the temperature, the ratio between raw material and solvent, the quantity of cellulase, the pH value, the extraction times and time were 50%, 50℃, 1:15 g/mL, 40 mg/g, 5.5, 2 times, 140 min respectively. The average extraction efficiency of TF was 95.94 mg/g in three verification experiments under the optimized extraction condition.

**Keywords:** fruit of *Rosa davurica* Pall.; total flavonoids; enzymolysis; extract