

冯海燕,任 蕾,贾鹏飞,等. 超声波辅助提取柿蒂总黄酮的工艺[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):275-277.

# 超声波辅助提取柿蒂总黄酮的工艺

冯海燕,任 蕾,贾鹏飞,常永芳,刘翠芳

(石家庄学院化工学院,河北石家庄 050035)

**摘要:**为研究柿蒂总黄酮超声波辅助提取的最佳工艺,以芸香苷为对照品,用  $\text{AlCl}_3$ -醋酸缓冲溶液分光光度法测定柿蒂中总黄酮的含量。在单因素试验的基础上,用正交试验对乙醇浓度、提取温度、料液比和提取时间进行工艺参数的优化。结果表明,提取温度是主要的影响因素,最佳工艺条件为乙醇浓度 60%、料液比 1 g : 25 mL、提取时间 50 min、提取温度 70 ℃。此时,总黄酮提取量为 4.390 mg/g。

**关键词:**柿蒂;超声波提取;总黄酮;正交试验

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0275-02

柿蒂是柿树科植物柿(*Diospyros kaki* Thunb.)的干燥宿萼,主产于河北、河南、山东、福建等地,是一种传统中药。其味苦、性温,有降气、止呃之功能,常用于胃寒气滞的呃逆<sup>[1]</sup>。除此以外,柿蒂提取物还有镇静、抗心率失常和一定的抗生育作用<sup>[2]</sup>。现代研究表明,柿蒂含有多种活性成分和营养物质,其中三萜类、黄酮类为其 2 类主要化学成分<sup>[3-4]</sup>。目前对柿蒂的研究主要集中在三萜类化合物上<sup>[5-7]</sup>,而对黄酮类化合物的研究鲜见报道。本研究在单因素试验的基础上,通过正交试验对柿蒂中的总黄酮进行超声波提取工艺优化,旨在为柿蒂资源的进一步研究与开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

柿蒂(河北省安国市东方药城中药材有限公司);芸香苷标准品(中国药品生物制品检定所,批号 100080-200707);无水乙醇、三氯化铝、醋酸、醋酸钠、石油醚(60~90 ℃)等均为国产分析纯。

### 1.2 仪器

UV/VIS-916 紫外分光光度计(澳大利亚 GBC 科学器材有限公司);KQ-250DE 数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司);FW100 高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 总黄酮提取** 参照文献[8],用石油醚对柿蒂脱脂脱色。准确称取处理后的柿蒂 2.0 g,移入 100 mL 圆底烧瓶中,以不同浓度乙醇作为提取剂,在一定温度、一定料液比下超声提取一定时间。将提取液放冷,过滤,定容,即得供试品溶液。

**1.3.2 总黄酮测定方法**  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - $\text{NaNO}_2$ - $\text{NaOH}$  显色法是测定植物总黄酮含量的主要光谱方法,此法专属性较差,

所测总黄酮含量不能包含山柰酚等黄酮化合物在内<sup>[9]</sup>。柿蒂中含有山柰酚成分<sup>[4-5]</sup>,故试验采用  $\text{AlCl}_3$ -醋酸缓冲溶液比色法对柿蒂总黄酮进行测定。

**1.3.3 柿蒂中总黄酮含量的计算** 精确量取 2 mL 供试品溶液至 25 mL 容量瓶中,从各加 0.1 mol/L 三氯化铝溶液 3 mL 起同“2.2”操作,根据回归方程计算总黄酮含量,据下式计算柿蒂药材中总黄酮含量:

$$\text{含量}(\text{mg/g}) = \frac{\text{测量浓度}(\text{mg/mL}) \times \text{稀释倍数} \times \text{供试液体积}(\text{mL})}{\text{原料干重}(\text{g})}$$

## 2 结果与分析

### 2.1 测定波长的选择

精确称取 11.6 mg 芸香苷对照品,用无水乙醇溶解,定容至 50 mL 容量瓶中,得 0.232 mg/mL 芸香苷标准品溶液。分别移取芸香苷标准品溶液、3 份柿蒂提取液各 2 mL,按标准曲线制备方法显色,在 350~700 nm 波长范围内进行扫描。结果发现,标准品和柿蒂提取液均在 410 nm 处有明显吸收,故选择测定波长为 410 nm。

### 2.2 标准曲线的绘制

精确量取芸香苷标准品溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置于 25 mL 容量瓶中,各加 0.1 mol/L 三氯化铝溶液 3 mL、pH 值 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液 5 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,以试剂空白作参比,在 410 nm 处测定吸光度  $D$ 。以吸光度  $D$  为纵坐标,芸香苷浓度  $C(\text{mg/mL})$  为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程  $D = 0.0929 + 28.0369C$ ,  $r = 0.9995$ 。

### 2.3 单因素试验

**2.3.1 乙醇浓度对总黄酮提取的影响** 温度为 40 ℃,料液比为 1 g : 20 mL,在不同乙醇浓度的条件下超声提取 30 min,结果见图 1。随乙醇浓度的增大,总黄酮提取量先增加后减小,当乙醇浓度为 60% 时,黄酮的提取量最高,说明此时溶剂的极性与柿蒂黄酮的极性接近,黄酮溶出充分;继续增加或减小乙醇浓度,溶剂和柿蒂黄酮的极性差距增大,不利于溶出,提取量降低。因此,试验选取最佳乙醇浓度为 60%。

**2.3.2 提取时间对总黄酮提取的影响** 在温度为 40 ℃,乙醇浓度为 60%,料液比为 1 g : 20 mL 的条件下,超声提取不

收稿日期:2013-01-22

基金项目:河北省科技支撑计划(编号:10212144);石家庄学院科研启动基金(编号:12YB011)。

作者简介:冯海燕(1974—),女,河北保定人,博士,副教授,从事天然产物提取及成分分析研究。E-mail:05fenghaiyan@mails.gucas.ac.cn。

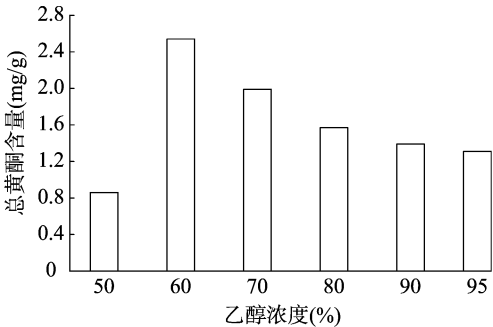


图1 乙醇浓度对总黄酮含量的影响

同时时间,结果见图 2。由图 2 可知,总黄酮提取量在 10 ~ 50 min 期间内随着时间的延长不断增加,50 min 达到最大值。提取时间太短不足以使柿蒂中的黄酮类物质完全提取出来,时间过长有可能引起提取温度升高,使提取出来的黄酮类物质发生分解。因此,提取时间以 50 min 为宜。

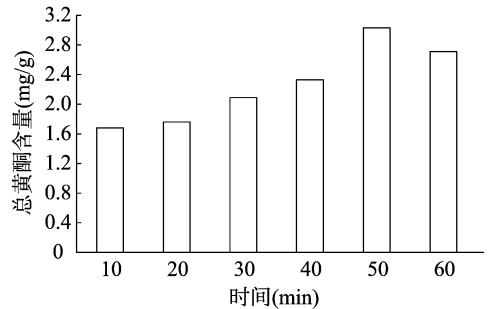


图2 提取时间对总黄酮含量的影响

2.3.3 料液比对总黄酮提取的影响 温度为 40 ℃,乙醇浓度为 60%,超声提取 50 min,在 1 g : 10 mL ~ 1 g : 35 mL 的范围内研究料液比对柿蒂总黄酮提取量的影响(图 3)。结果表明:随料液比的增加,总黄酮的提取量先升后降,料液比在 1 g : 25 mL 时出现峰值,1 g : 30 mL 时提取量迅速减小。溶剂用量越大,越有利于植物细胞中黄酮类物质的扩散,提取效果越好;但溶剂用量过大,会加大超声波破碎细胞时的阻力,不利于活性成分的溶出,提取效果变差,同时还会延长后续处理时间。本研究料液比 1 g : 25 mL 时的萃取效果最佳。

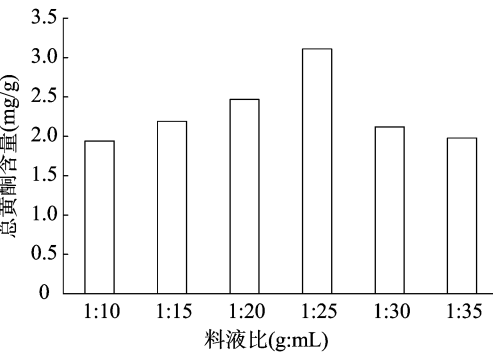


图3 料液比对总黄酮含量的影响

2.3.4 提取温度对总黄酮提取的影响 在乙醇浓度 60%,料液比 1 g : 25 mL,不同温度的条件下,超声提取 50 min,结果见图 4。由图 4 可以看出,温度对柿蒂总黄酮的提取有较大影响,随着超声温度的升高,柿蒂总黄酮的提取量相应增

大,70 ℃时,总黄酮提取量最高。温度升高,分子运动加剧,黄酮的渗透、溶解、扩散速度也加快,有利于黄酮类物质从原料中溶出;但温度太高,往往会破坏其中的有效成分,同时造成溶剂的损失。综合考虑,提取温度以 50 ~ 70 ℃为宜。

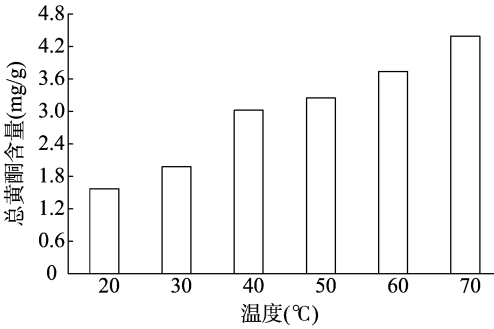


图4 提取温度对总黄酮含量的影响

2.4 正交试验

根据前面所做的单因素试验,确定每个因素的 3 个水平(因素水平见表 1),选用  $L_9(4^3)$  正交表进行试验,以柿蒂中总黄酮的提取量为考察指标,正交试验结果列于表 2 和表 3。

表 1 柿蒂总黄酮提取工艺正交试验因素水平

水平	因素			
	A:提取温度(℃)	B:提取时间(min)	C:料液比(g : mL)	D:乙醇浓度(%)
1	50	40	1 : 20	60
2	60	50	1 : 25	70
3	70	60	1 : 30	80

表 2 柿蒂总黄酮提取工艺  $L_9(4^3)$  正交试验结果

试验号	因素				总黄酮含量(mg/g)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.831
2	1	2	3	2	1.490
3	1	3	2	3	2.375
4	2	1	3	3	1.578
5	2	2	2	1	4.153
6	2	3	1	2	2.731
7	3	1	2	2	4.177
8	3	2	1	3	3.779
9	3	3	3	1	3.447
$k_1$	2.232	2.862	3.144	3.477	
$k_2$	2.821	3.141	3.568	2.799	
$k_3$	3.801	2.851	2.172	2.571	
R	1.569	0.290	1.396	0.900	

表 3 柿蒂总黄酮提取工艺方差分析

变异来源	离差平方和	自由度	均方	F
A	3.769	2	1.885	23.265 *
B	0.162	2	0.081	1.000
C	3.045	2	1.523	18.796
D	1.318	2	0.659	
误差	0.162	2	8.136	

注: \* 表示在 0.05 水平差异显著;  $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

孔涛,米平,赵雪淞,等. 碱法提取花生粕蛋白质工艺条件的优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):277-279.

# 碱法提取花生粕蛋白质工艺条件的优化

孔涛<sup>1,2</sup>,米平<sup>1</sup>,赵雪淞<sup>3</sup>,刘民<sup>1</sup>

(1. 辽宁工程技术大学理学院,辽宁阜新 123000; 2. 中国科学院沈阳应用生态研究所,辽宁沈阳 110016;

3. 辽宁工程技术大学矿业学院,辽宁阜新 123000)

**摘要:**采用碱提酸沉法从花生粕中提取花生分离蛋白,用蛋白质提取率作为衡量提取工艺的指标。在单因素试验基础上,以料液比、pH 值、提取温度和提取时间为考察因素,采用正交试验优化最佳提取工艺,确定碱提的最佳工艺条件为:料液比 1 g : 10 mL、pH 值 10.0、提取温度 60 ℃、提取时间 2 h。在此条件下,花生粕蛋白质最高提取率可达 75.88%。在试验影响因素中,影响程度从大到小依次为:提取温度 > pH 值 > 提取时间 > 料液比。

**关键词:**碱提酸沉;花生蛋白;正交设计;提取工艺

**中图分类号:** TS214.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0277-03

花生是世界上主要的油料资源之一,种植面积居油料作物第 2 位<sup>[1]</sup>。花生仁约含 50% 的脂肪和 30% 的蛋白质,是重要的食用油资源和植物蛋白资源<sup>[2]</sup>。我国每年可产 200 万 t 以上的花生饼粕<sup>[3]</sup>,花生饼粕含蛋白质 40% 以上,其中 10% 为清蛋白,90% 为碱性蛋白<sup>[4]</sup>。花生蛋白是一种营养价值较高的植物蛋白,含有人体所需的 8 种必需氨基酸,生物价为

59,蛋白质的净利用率为 51,纯消化率可达 90%,极易被人体消化吸收<sup>[5]</sup>,与大豆蛋白相比,令肠胃胀气因子和抗营养因子较少<sup>[6]</sup>,与菜籽、棉籽蛋白相比,所含毒性物质较少,经常食用可预防高血压、动脉硬化和心血管等方面的疾病<sup>[7]</sup>。我国对花生饼粕利用很有限,大部分都作为牲畜饲料,甚至丢弃造成环境污染,造成了很大的资源浪费。本试验采用碱提酸沉法研究花生粕中蛋白质的最佳提取工艺条件,为花生粕蛋白质的工业化生产与利用提供技术参考。

收稿日期:2012-12-17

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD36B06);辽宁工程技术大学国家自然科学基金青年基金前期资助项目(编号:11-149)。

作者简介:孔涛(1981—),男,陕西渭南人,博士研究生,讲师,从事食品加工及微生物方面研究。E-mail:kongtao2005@126.com。

由表 2 正交试验结果的极差分析可知,超声提取柿蒂总黄酮的影响因素主次顺序为 A > C > D > B,即提取温度 > 料液比 > 乙醇浓度 > 提取时间。表 3 显示,所选取的 4 个因素中,提取温度对提取效果影响显著,提取时间影响较小。综合直观分析和方差分析的结果,柿蒂总黄酮的最佳提取工艺条件为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>,即当提取温度为 70 ℃,料液比为 1 g : 25 mL,乙醇浓度为 60%,提取时间为 50 min 时总黄酮提取量最高。

## 2.5 验证试验

按上述最佳工艺进行验证试验,重复 3 次,提取的总黄酮含量分别为 4.357、4.391、4.422 mg/g,平均值为 4.390 mg/g (RSD=0.74%),高于正交设计表中任一提取工艺的试验结果,说明通过正交试验得出的优化条件稳定、可靠。

## 3 结论

采用 AlCl<sub>3</sub> 比色法测定柿蒂中总黄酮含量,确定最大吸收波长为 410 nm,试验结果表明此方法准确可靠。

通过单因素试验和正交试验,优化得出超声波提取柿蒂总黄酮最佳工艺条件:料液比为 1 g : 25 mL,70 ℃ 下,用 60% 乙醇超声波辅助提取 50 min,总黄酮含量可达 4.390 mg/g。正交试验结果表明,提取温度对柿蒂总黄酮提取有显著影响,而乙醇浓度、提取时间影响相对较小。

## 1 材料与方

### 1.1 材料与仪器

花生饼粕(广东瑞丰粮油商贸公司)的成分包括灰分

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:233.
- [2] 熊海涛,唐志华,郑行望. 火焰原子吸收光谱法测定柿蒂中微量元素[J]. 理化检验:化学分册,2010,46(10):1211-1212.
- [3] 潘旭,具敬娥,贾娟,等. 柿蒂化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(5):356-359.
- [4] 周本宏,沈恒,魏嫣,等. 柿蒂药材的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 广东药学院学报,2011,27(2):147-150.
- [5] 邹盛勤,陈武. 高效液相色谱-光电二极管阵列检测器法同时测定柿蒂中乌索酸和齐墩果酸含量[J]. 时珍国医国药,2007,18(11):2606-2607.
- [6] 宋娟娜,李楠,刘景明,等. 反相离子对高效液相色谱法测定柿叶和柿蒂中的熊果酸和齐墩果酸[J]. 中国药师,2012,15(3):341-343.
- [7] 朱智勇,郑丰,陈武. HPLC 法测定柿蒂中乌索酸与齐墩果酸的含量[J]. 安徽农业科学,2007,35(31):9840-9841.
- [8] 张瑞芬,范杰平,朱衷榜,等. 超声辅助提取柿叶中的总黄酮和总三萜[J]. 现代食品科技,2008,24(11):1133-1136.
- [9] 郭亚健,范莉,王晓强,等. 关于 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaOH 比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志,2002,22(2):97-99.