

文章编号:1001-6880(2014)Suppl-0133-07

竹叶总黄酮提取工艺的比较研究

叶清华,林晓燕,张舒婷,周相助,陈清西*

福建农林大学园艺学院,福州 350002

摘要:本试验采用水浴法、超声法提取箬竹叶总黄酮,通过单因素和正交试验,获得两种提取方法的最优参数。结果表明:水浴法提取竹叶总黄酮的最佳工艺参数为:乙醇浓度 90%、液固比 25:1 (mL/g)、提取时间 0.5 h、提取温度为 70 ℃,提取 3 次,提取得率为 1.79%。超声法提取竹叶总黄酮的最佳工艺参数为:乙醇浓度 90%、液固比 35:1 (mL/g)、提取时间 75 min、提取功率 360 W,提取 2 次,提取得率为 2.75%。超声法优于水浴法。

关键词:竹叶;总黄酮;提取;超声;水浴;优化

中图分类号:Q946;R284.2

文献标识码:A

Comparative Research on Extraction of Total Flavonoids from Bamboo Leaves

YE Qing-hua, LIN Xiao-yan, ZHANG Shu-ting, ZHOU Xiang-zhu, CHEN Qing-xi *

School of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: This experiment explored water bath extraction and supersonic to extract the content of total flavonoids from bamboo leaves. Via single factor experiment and orthogonal test, two methods optimal extract parameters were acquired. The results showed the optimal parameters for the extraction of total flavones from bamboo leaves by water bath method: Ethanol concentration 90%, liquid-solid ratio of 25:1 (mL/g), extraction time 0.5 h, extraction temperature (water bath) 70 ℃, for 3 times, the extracting rate was 1.79%. The optimal parameters for the extraction of total flavones from bamboo leaves by supersonic: Ethanol concentration 90%, liquid-solid ratio of 35:1 (mL/g), extraction time 75 min, extraction power 360 W, for twice, the extracting rate was 2.75%. The method of supersonic was better than water bath.

Key words: Bamboo leaves; Total flavonoids; Extraction; Water bath; Supersonic; Optimization

箬竹(*Indocalamus tessellatus (munro)* Keng f.),为禾本科竹亚科箬竹属,主要分布于南方各省。研究表明^[1-2],竹叶中含有丰富的黄酮类物质,主要为糖甙类黄酮化合物。竹叶黄酮具有抗氧化、抗衰老、降血脂、免疫调节等生物学功效,具有广阔的应用前景^[3]。但箬竹叶目前主要用于粽子等地方食品的加工,其有效功能成分未得到充分利用。因此,本试验旨在探索提取箬竹叶中总黄酮的最佳条件,为箬竹叶深加工利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 供试材料

试材箬竹叶于 2013 年 6、11 月采自福建农林大

学校园。选择新鲜、无病虫害的叶片,洗净,于烘干箱中鼓风干燥,干燥竹叶用多功能粉碎机磨成粉末,过 60 目筛,置于 -40 ℃ 中备用。

1.1.2 试剂

芦丁标准品(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。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的绘制

参照魏永生等的方法^[4],采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法测定黄酮含量。准确称取 20.00 mg 已烘至恒重的芦丁标样,用 70% 乙醇溶液定容至 50 mL,摇匀;分别吸取 0、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mL 上述溶液于 25 mL 容量瓶中,加入 1 mL 5% NaNO₂ 溶液,摇匀,静置 6 min;加入 1 mL 10% 的 Al(NO₃)₃ 溶液,摇匀,静置 6 min;加入 5 mL 4% 的 NaOH 溶液,摇匀,用 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀后静置 15 min。以第一个试剂做空白,在最大吸收波长 510 nm 处测量其吸光值。以芦丁质量 C (mg)

对吸光值(A值)进行回归,得回归方程为 $A = 0.4462C - 0.008, R^2 = 0.9992$ 。

1.2.2 水浴法提取竹叶总黄酮

提取工艺:准确称取竹叶粉末0.4 g,加40%乙醇,液固比30:1(mL/g),70℃水浴加热1 h,10000 rpm离心5 min,分离上清液,得总黄酮提取液。

单因素试验按上述工艺操作,分别探讨液固比、温度、时间、乙醇浓度及提取次数对总黄酮提取效果的影响,并比较夏、冬季节竹叶的黄酮含量差异。根据单因素试验结果,进行正交试验优化,获得最佳提取条件。

1.2.3 超声法提取竹叶总黄酮

提取工艺:准确称取竹叶粉末0.4 g,加40%乙醇,液固比30:1(mL/g),600W超声30 min,10000 rpm离心5 min,分离上清液,得总黄酮提取液。

单因素试验按上述工艺操作,分别探讨液固比、乙醇浓度、超声波功率、时间及提取次数对总黄酮提取效果的影响,并比较夏、冬季节竹叶的黄酮含量差异。根据单因素试验结果,再用正交试验进行优化,获得最佳提取条件。

1.2.4 总黄酮的测定

准确吸取竹叶总黄酮提取液1 mL于25 mL容量瓶中,按照1.2.1方法,测定A值。计算提取得率。

$$\text{总黄酮提取得率} = \frac{C \times V_T \times N}{m \times V_s} \times 100\% ;$$

其中,C:从标准曲线查出的总黄酮量/mg;V_T:提取液体积/mL;N:稀释倍数;V_s:测定时取用的样品提取液体积/mL;m:竹叶干重量/mg。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 不同单因素对水浴法提取竹叶总黄酮得率的影响

2.1.1.1 液固比

随液固比增大,总黄酮得率呈现先增后减的趋势(图1)。液固比为20:1时提取得率最高,液固比继续增大时,提取得率下降,因此,选择液固比为20:1提取箬竹总黄酮。

2.1.1.2 温度

随着温度升高,提取得率呈现先上升后下降的趋势(图2)。温度为70℃时总黄酮提取得率最高,超过70℃,提取得率开始下降,故选择70℃提取箬

竹总黄酮。

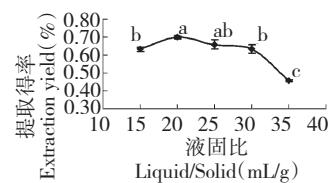


图1 液固比对总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effect of liquid-ratio ratio on flavonoid yield

注:字母不同表示0.05水平差异显著,下同。

Note: Different letters shows significantly different at P<0.05, the below is same.

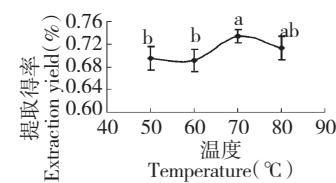


图2 温度对总黄酮得率的影响

Fig. 2 Effect of temperature on flavonoid yield

2.1.1.3 提取时间

随提取时间延长,提取得率总体呈现先上升后下降趋势(图3)。1.0 h时提取得率最高,而后略微下降,差异不显著,超过2.0 h,提取得率显著下降,可能是由于部分黄酮类物质被氧化^[5]。因此,选择提取箬竹总黄酮时间为1.0 h。

2.1.1.4 乙醇浓度

随着乙醇浓度升高,提取得率呈现先上升后下降的趋势(图4)。乙醇浓度为90%时提取得率最高,超过90%,提取得率开始下降,因此选择浓度为90%乙醇提取箬竹总黄酮。

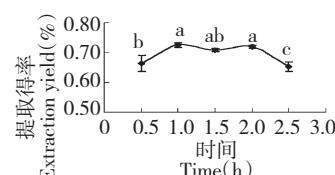


图3 提取时间对总黄酮得率的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on flavonoid yield

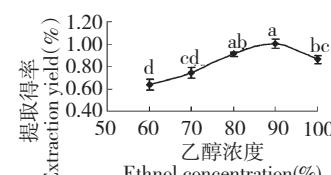


图4 乙醇浓度对总黄酮得率的影响

Fig. 4 Effect of ethanol concentration on flavonoid yield

2.1.1.5 采收季节

夏季与冬季的竹叶总黄酮得率分别为 1.22%、0.96%，夏季箬竹叶总黄酮含量显著高于冬季(图 5)。与李水芳等^[6]研究结果不同，可能因为在箬竹种植区域，夏季光照强烈而充分，影响了箬竹叶体内黄酮类化合物的合成^[7,8]。故实际应用中选用夏季的箬竹叶较好。

2.1.1.6 提取次数

随提取次数的增加，提取得率呈现先上升后下降的趋势(图 6)。提取 3 次时，总黄酮得率最高。超过 3 次，提取得率下降，可能是提取 3 次后，箬竹叶中的总黄酮已基本提取完全，但每次提取后，残渣未经洗涤和滤干即进行下次提取，残渣中仍留有一定量的提取液，使得提取时的液固比增大，且其中的黄酮类物质由于加热时间太长而分解^[9]，导致提取得率下降。故选择提取 3 次为佳。

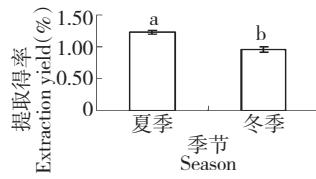


图 5 季节对总黄酮得率的影响

Fig. 5 Effect of seasons on flavonoid yield

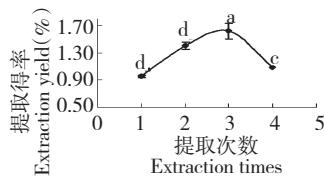


图 6 提取次数对总黄酮得率的影响

Fig. 6 Effect of extraction times on flavonoid yield

2.1.2 不同单因素对超声法提取竹叶总黄酮得率的影响

2.1.2.1 液固比

随液固比的增大，总黄酮提取得率呈现上升趋势(图 7)。当液固比 35:1 时，得率最高为 0.93%，而 25:1 和 30:1 时提取得率为 0.87%、0.92%，与 35:1 差异不显著。选择液固比 30:1，既能保证一定的提取得率，又能在一定程度上节省成本。因此，选择液固比 30:1 提取箬竹总黄酮。

2.1.2.2 乙醇浓度

随乙醇浓度增大，提取得率呈现先上升后下降的趋势(图 8)。乙醇浓度为 90% 时，提取得率最高为 1.34%，超过 90%，提取得率开始下降，因此选择

90% 乙醇提取箬竹总黄酮。

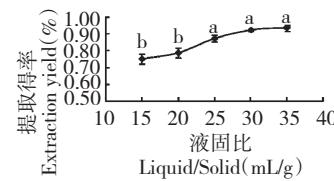


图 7 液固比对总黄酮得率的影响

Fig. 7 Effect of liquid-ratio ratio on flavonoid yield

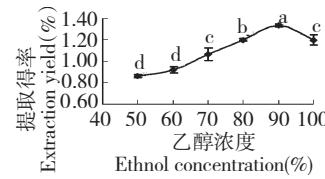


图 8 乙醇浓度对总黄酮得率的影响

Fig. 8 Effect of the ethanol concentration on flavonoid yield

2.1.2.3 超声波功率

随着超声波功率增大，提取得率呈先上升后下降趋势(图 9)。功率 420 W 时提取得率最高为 1.31%，超过 420 W，提取得率下降，最后趋于平衡，但与 420 W 时的提取得率差异不显著。为节约能源，选择超声波功率 420 W 提取箬叶总黄酮。

2.1.2.4 提取时间

随提取时间延长，提取得率呈现先上升后下降趋势(图 10)。提取 60 min 时，提取得率最高为 1.42%，超过 60 min，得率下降。可能因为超声 60 min 时，总黄酮大部分已提取完成，继续浸提则导致少部分的黄酮类物质分解，得率略有下降。故选择提取 60 min 提取箬竹总黄酮。

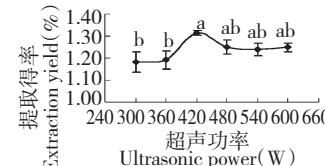


图 9 超声功率对总黄酮得率的影响

Fig. 9 Effect of extraction power on flavonoid yield

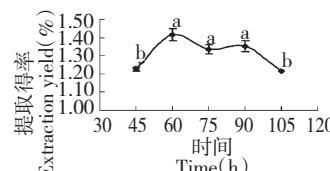


图 10 提取时间对总黄酮得率的影响

Fig. 10 Effect of extraction time on flavonoid yield

2.1.2.5 采收季节

夏季与冬季的竹叶总黄酮得率分别为 1.48%、1.19%，夏季箬竹叶黄酮含量显著高于冬季(图 11)。故在实际应用中应选用夏季的箬竹叶，与水浴法所得结果一致。

2.1.2.6 提取次数

随提取次数的增加，提取得率呈上升趋势(图 12)。次数越多，得率增加速率缓慢，为节约成本及时间，选择提取 2 次提取箬竹总黄酮。

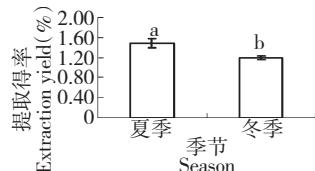


图 11 季节对总黄酮得率的影响

Fig. 11 Effect of seasons on flavonoid yield

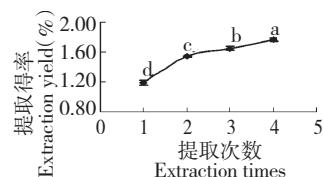


图 12 提取次数对总黄酮得率的影响

Fig. 12 Effect of extraction times on flavonoid yield

2.2 正交试验

由于影响箬竹叶总黄酮提取的 4 个因素之间能相互影响，因此在单因素试验结果基础上，选定提取竹叶黄酮类物质的最佳提取参数，进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。其中，提取次数采用单因素最佳条件，即水浴法提取 3 次，超声提取 2 次。最后采用 Excel2007 与 SPSS17.0 对试验结果进行分析。

2.2.1 水浴法优化

表 1 水浴法提取工艺参数

Table 1 Factors and levels of water bath method

水平 Levels	因素 Factors			
	A 乙醇浓度 The ethanol concentration(%)	B 液固比 Liquid-solid ratio (mL/g)	C 提取时间 Extraction time (h)	D 提取温度 Temperature (°C)
1	85	15:1	0.5	60
2	90	20:1	1.0	70
3	95	25:1	1.5	80

表 2 水浴法正交试验结果

Table 2 Result of water bath orthogonal test

处理号 No.	A	B	C	D	提取得率 the extracting rate (%)
1	1	1	1	1	1.31
2	1	2	2	2	1.47
3	1	3	3	3	1.62
4	2	1	2	3	1.45
5	2	2	3	1	1.38
6	2	3	1	2	1.79
7	3	1	3	2	1.41
8	3	2	1	3	1.56
9	3	3	2	1	1.41
k1	1.47	1.39	1.55	1.37	
k2	1.54	1.47	1.44	1.56	
k3	1.46	1.61	1.47	1.54	
R	0.08	0.22	0.11	0.19	

注: k 为不同水平提取得率均值; R 为极差。

水浴法正交试验结果见表 2。结果表明:1)由极差 R 知,4 个因素对总黄酮提取效果影响顺序为液固比 > 温度 > 时间 > 乙醇浓度,液固比对竹叶总黄酮提取影响最大,是影响总黄酮得率的关键因素。2)从正交试验结果分析,第 6 组 $A_2B_3C_1D_2$ 得率最高为 1.79%。3)以总黄酮提取得率为目标,从 4 个

因素的水平趋势图(图 13)知,水浴法提取箬竹总黄酮的最佳水平组合为 $A_2B_3C_1D_2$,与表 2 所得最佳水平组合相同。故选取 $A_2B_3C_3D_1$ 为超声法提取竹叶总黄酮的最优条件,即优化参数为 90% 乙醇、液固比 25:1、提取 0.5 h、温度 70 ℃。

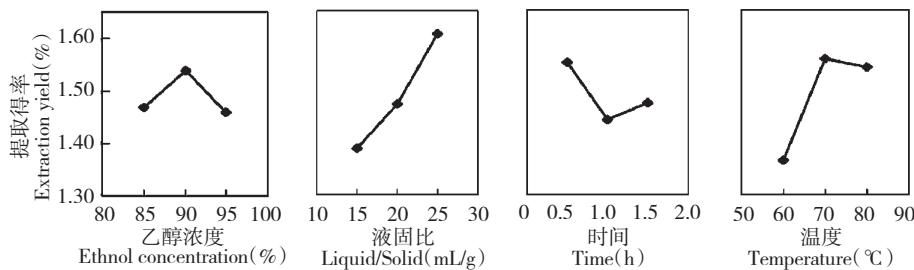


图 13 乙醇浓度、液固比、时间和温度对总黄酮得率的影响

Fig. 13 Effect of ethanol concentration, liquid-ratio ratio, extraction time and temperature on flavonoid yield

2.2.2 超声法优化

表 3 超声法提取工艺参数

Table 3 Factors and levels of supersonic

水平 Levels	因素 Factors			
	A 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	B 液固比 Liquid-solid ratio (mL/g)	C 提取时间 Extraction time (min)	D 提取功率 Extraction power (W)
1	85	25:1	45	360
2	90	30:1	60	420
3	95	35:1	75	480

表 4 超声法正交试验结果

Table 4 Result of supersonic orthogonal test

处理号 No.	A	B	C	D	提取得率 Extracting rate (%)
1	1	1	1	1	2.15
2	1	2	2	2	2.29
3	1	3	3	3	2.41
4	2	1	2	3	2.14
5	2	2	3	1	2.61
6	2	3	1	2	2.48
7	3	1	3	2	2.08
8	3	2	1	3	2.06
9	3	3	2	1	2.12
k_1	2.28	2.12	2.23	2.29	
k_2	2.41	2.32	2.18	2.28	
k_3	2.09	2.33	2.37	2.20	
R	0.32	0.21	0.18	0.09	

注: k 为不同水平提取得率均值; R 为极差。

超声法正交结果如表4。结果表明:1)由极差R知,4个因素对总黄酮提取得率的影响顺序为乙醇浓度>液固比>时间>功率,乙醇浓度是控制得率的重要因素。2)从正交试验结果分析,第5组 $A_2B_2C_3D_1$ 得率最高为2.61%。3)以总黄酮提取得率为目标,从4个因素的水平趋势图(图14)知,

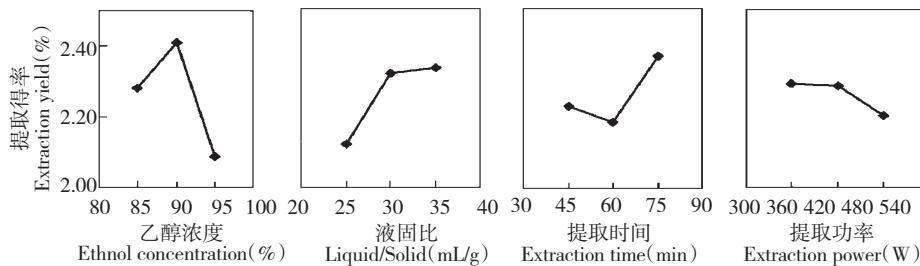


图14 乙醇浓度、液固比、提取时间和提取功率对总黄酮得率的影响

Fig. 14 Effect of ethanol concentration, liquid-ratio ratio, extraction time and extraction power on flavonoid yield

3 结果与讨论

本试验初步比较了水浴法、超声法提取箬竹叶总黄酮,为箬竹总黄酮的纯化及箬竹叶深加工提供了一定的理论依据。结果表明,水浴法提取竹叶总黄酮的最优参数为90%乙醇、液固比25:1、提取0.5 h、温度70 °C,提取3次,得率为1.79%。超声法提取的最优条件为90%乙醇、液固比35:1、提取75 min、功率360 W,提取2次,得率为2.75%。超声法提取得率比水浴法高出0.96个百分点,且提取次数少,差异显著。超声法具有产率高,设备简单,操作方便,无须加热,省时节能等优点,有利于保护不稳定成分^[10]。从节约成本和时间效率上考虑,超声法优于水浴法。

不同研究提取箬竹叶总黄酮的最佳提取工艺有一定差异,得率也不尽相同。崔健^[11]用超声波法在80 °C条件下,用40%乙醇,按料液比1:15,提取2 h,提取6月的阔叶箬竹总黄酮得率为1.93%,10月的为1.43%,虽乙醇浓度更低,但温度较高且提取时间较长。李水芳等^[6]用85%乙醇,在液固比20:1,85 °C水浴回流3 h条件下提取箬竹叶总黄酮,得总黄酮含量在1.24%~1.98%之间,得率低于本试验且操作复杂费时。王志坤等^[12]用微波法在70%乙醇,微波功率150 W,料液比1:20条件下提取箬竹总黄酮150 s,得箬竹总黄酮0.51%,虽然方法简单,用时短,但得率太低,无法将箬竹叶总黄酮充分提取。故采用本试验超声波提取法的最优参数提取箬竹叶总黄酮较好。

超声法提取箬竹总黄酮的最佳水平组合为 $A_2B_3C_3D_1$,在此条件下提取箬竹总黄酮,得率为2.75%,比组合 $A_2B_2C_3D_1$ 的得率2.61%高出5.36%。故选取 $A_2B_3C_3D_1$ 为超声法提取竹叶总黄酮的最优条件,即90%乙醇、液固比35:1、提取75 min、功率360 W。

参考文献

- Zou YH(邹耀洪). Analysis of flavonoids in bamboo leaf by high performance liquid chromatography. *Chin J Analytical Chem(分析化学)*, 1996, 24:216-219.
- Li HY, Sun JY, Dai SW. Studies on chemical constituents in leaf of phyllostachys pubescens. *U. S. Chin Health Hygiene J*, 2003, 6(4):7.
- Zhang Y(张英), Wu XQ(吴晓琴), Yu ZY(俞卓裕). Comparison study on total flavonoid content and anti-free radical activity of the leaves of bamboo, phyllostachys nigra, and Ginkgo biloba. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2002, 27(4):254-257.
- Wei YS(魏永生), Wang YN(王永宁), Shi YP(石玉平), et al. A study on experimental conditions in determining total flavonoids by spectrophotometry. *Journal of Qinghai University(青海大学学报)*, 2003, 3.
- Chen HG(陈海光), Yu LM(于立梅), Huang DY(黄东雨). Study on extracting technology and anti-microbial activity of flavones from bamboo leave. *J Zhongkai Univer Agric Eng(仲恺农业工程学院学报)*, 2010, 23(3):50-53.
- Li SF(李水芳), Li JJ(李娟). Comparison of chemical components in leaves of indocalamus. *Food Res Dev(食品研究与开发)*, 2008, 29(12):7-10.
- Graham LT. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiol*, 1991, 95:594-603.
- Cao JG(曹建国), Zhao ZH(赵则海), Wang WJ(王文杰), et al. Study on the content of syringin and total flavonoids of different parts of acanthopanax senticosus in three different habitats. *Bull Botanical Res(植物研究)*, 2005, 25:205-209.