

毛竹笋总黄酮的提取工艺研究

王文文, 袁艺*, 袁彩红, 武静文
(安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

摘要: 以毛竹笋为原料, 采用水提取、乙醇热回流提取和超声波提取 3 种提取方法, 通过单因素和正交设计试验确定了毛竹笋总黄酮提取的最佳条件。结果表明, 水提取工艺最佳条件为固液比 1:30(g:mL, 下同), 温度 60℃, 提取时间 1.5 h, pH9; 总黄酮得率为 0.706%, 影响得率的因素为固液比>提取温度>提取时间>溶液 pH 值。乙醇热回流提取最佳条件为固液比 1:40, 温度 60℃, 乙醇体积分数 70%, 提取时间 2.0 h, 总黄酮得率为 1.063%; 影响得率的因素为固液比>提取温度>提取时间>乙醇体积分数。超声波提取工艺最佳条件为提取时间 30 min, 固液比 1:40, 乙醇体积分数 70%, 提取温度 50℃; 总黄酮得率为 0.797%; 影响得率的因素为固液比>提取温度>提取时间>乙醇体积分数。

关键词: 毛竹笋; 总黄酮; 正交试验

中图分类号: S795.708

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2011)02-0197-05

Extraction of flavonoids from *Phyllostachys pubescens* shoot

WANG Wen-wen, YUAN Yi, YUAN Cai-hong, WU Jing-wen
(School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Flavonoids from *Phyllostachys pubescens* shoot were extracted by methods of water, ethanol backflow and ultrasonic wave extractions. The optimum extraction condition was obtained by single factor analysis and orthogonal test. The results showed that the yield of flavonoids was 0.706% by water extraction under the conditions of 60℃, 1:30 solid-liquid ratio, pH 9.0 and 1.5 h. The order of the factors which affected water extraction was solid-liquid ratio > extraction temperature > extraction time > pH. The yield of flavonoids was 1.063% by the method of ethanol backflow under the conditions of 1:40 solid-liquid ratio, 60℃, 70% ethanol and 2.0 h. The order of the factors which affected the ethanol backflow extraction was solid-liquid ratio > extraction temperature > extraction time > volume fraction of ethanol solution. The yield of flavonoids was 0.797% by methods of ultrasonic wave under the conditions of 1:40 solid-liquid ratio, 50℃, 70% ethanol and 30 min. The order of the factors which affected the ultrasonic wave extraction was solid-liquid ratio > extraction temperature > extraction time > volume fraction of ethanol solution.

Key words: *Phyllostachys pubescens* shoot; flavonoids; orthogonal test

毛竹 (*Phyllostachys pubescens*) 为禾本科 (*Gramineae*) 竹亚科 (*Bambusoideae*) 刚竹属 (*Phyllostachys*) 多年生常绿植物。毛竹笋营养丰富, 肉质脆嫩, 有“素食第一品”之称^[1]。黄酮类化合物具有抗衰老、抗癌、抗肿瘤、防治心脑血管和高血压疾病、抗炎抑菌、抗氧化、抗突变增强免疫功能等生理功能^[2-4], 是一类存在于自然界的、具有

2-苯基色原酮结构的化合物; 在植物体内大部分与糖结合成苷类或碳糖基的形式存在, 也有以游离形式存在的^[5-6]。据有关参考文献报道, 竹叶、竹皮等部位均含有丰富的黄酮类化合物, 且不同季节、不同品种、不同部位竹笋提取物中总黄酮含量变化较大^[7-8]。目前对天然黄酮类化合物的提取方法较多, 如溶剂提取法、微波提取法、超声波提取法等, 每种

收稿日期: 2010-07-21

基金项目: “十一五”国家科技支撑项目(2007DAQ01049, 2008BADA9B04)资助。

作者简介: 王文文, 女, 硕士研究生。E-mail: wenwen10@126.com

* 通讯作者: 袁艺, 女, 教授。

方法都有它各自的优点和缺点^[9]。黄酮类化合物易溶于乙醇中,通常采用乙醇为溶剂提取,并使用紫外可见分光光度法测定总黄酮的含量^[10];而影响总黄酮提取率的因素有浸提温度、时间、料液比和乙醇浓度等,通常以上述因素为研究对象并结合正交试验以确定最佳的提取条件。

本试验系统研究了水提取、乙醇热回流提取和超声波提取毛竹笋中总黄酮的工艺条件,在单因素试验的基础上,采用正交试验方案,总黄酮含量以芦丁标准品为标示,以总黄酮提取量为主要评价指标,对毛竹笋中总黄酮的提取工艺进行了优选。旨在为竹笋中提取黄酮类化合物的工业化生产提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器

ZN-200A 高速中药粉碎机、101AS-1 不锈钢数显电热鼓风干燥箱、HH-4 数显恒温水浴锅、RE-52 旋转蒸发器、UV715GD 紫外/可见分光光度计、FA2004 型电子天平、Hema TGL-16H 小型高速离心机。

1.2 试剂与材料

芦丁标准品(购于北京北化恒信生物技术有限公司)、毛竹笋(市购)、其它化学试剂皆为分析纯。

1.3 标准曲线制作

精密称取干燥芦丁标准品 5.0 mg,用 60%乙醇溶解后移至 50 mL 容量瓶中,并用 60%乙醇定容至刻度,得质量浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准液。分别吸取上述芦丁标准液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置于 6 只具塞的试管中,各加 60%乙醇至 5 mL,加入质量浓度 $0.05 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 NaNO_2 溶液 0.3 mL,摇匀,静置 6 min;加入质量浓度 $0.10 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.3 mL,摇匀,静置 6 min;加入 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 4.0 mL;加入蒸馏水 0.4 mL,摇匀,静置 20 min。于波长 510 nm 处用比色法测定各管溶液吸光度;以吸光度(Y)为纵坐标,芦丁标准溶液质量浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线,得标准回归方程为: $y=15.003x-0.003$, $R^2=0.9997$ 。

1.4 样品提取与测定

新鲜毛竹笋切碎成丁状、60℃烘干、粉碎后过 60 目筛制得干燥样品以备用。精密称取一定量干燥样品置于锥形瓶中,按选择的因素和水平进行水提取、乙醇热回流提取和超声波提取,真空抽滤,合并滤液,提取液离心(4 000 r, 15 min),合并上清液,旋转浓缩,水定容至 100 mL 作为待测液。

按照 1.3 节方法测定吸光值。根据回归方程计算各样品中毛竹笋总黄酮含量。

$$\text{总黄酮含量}(\%) = (\text{提取液总黄酮量}/\text{干药材量}) \times 100\%$$

1.5 提取试验

1.5.1 水提取单因素试验 精密称取毛竹笋干燥样品 1.0 g,以水为溶剂,温度设定为 55、65、75、85℃;提取时间采用 0.5、1.0、1.5、2.0 h;固液比(g:mL,下同)用 1:20、1:30、1:40、1:50; pH 值采用 6.5、7.5、8.5、9.5;提取 2 次,第 2 次加溶剂量为第 1 次的一半。

1.5.2 水提取正交试验 根据单因素试验结果,精密称取毛竹笋干燥样品 1.0 g,选用提取温度、提取时间、pH 值、固液比 4 个试验因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,并进行方差分析得出水提取毛竹笋总黄酮的最佳工艺参数,具体试验设计见表 1。

表 1 水提取因素水平设计

水平 Level	因素 Factor			
	A/h	B/g:mL	C/℃	D/pH
1	0.5	1:20	60	7.0
2	1.0	1:30	70	8.0
3	1.5	1:40	80	9.0

1.5.3 乙醇热回流提取单因素试验 精密称取毛竹笋干燥样品 1.0 g,以乙醇为溶剂,乙醇体积分数采用 55、65、75、85%;提取温度采用 60、70、80、90℃;提取时间为 0.5、1.0、1.5、2.0 h;固液比用 1:20、1:30、1:40、1:50;提取 2 次,第 2 次加溶剂量为第 1 次的一半。

1.5.4 乙醇热回流提取正交试验 根据单因素试验结果,精密称取毛竹笋干燥样品 1.0 g,选用提取时间、乙醇体积分数、提取温度、固液比 4 个试验因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,并进行方差分析得出乙醇热回流提取毛竹笋总黄酮的最佳工艺参数,具体试验设计见表 2。

表 2 乙醇热回流水平设计

水平 Level	因素 Factor			
	A/h	B/g:mL	C/%	D/℃
1	1.0	1:20	60	60
2	1.5	1:30	70	70
3	2.0	1:40	80	80

1.5.5 超声波提取单因素试验 精密称取毛竹笋干燥样品 1.0 g, 以乙醇为溶剂, 乙醇体积分数采用 55、65、75、85%; 提取温度采用 50、60、70、80℃; 提取时间为 10、20、30、40 min; 固液比用 1:20、1:30、1:40、1:50; 提取 2 次, 第 2 次加溶剂量为第 1 次的一半。

表 3 超声波提取水平设计

水平 Level	因素			
	A/min	B/%	C/℃	D/g:mL
1	10	60	50	1:20
2	20	70	60	1:30
3	30	80	70	1:40

1.5.6 超声波提取正交试验 根据单因素试验结果, 精密称取毛竹笋干燥样品 1.0 g, 选用提取时间、乙醇体积分数、提取温度、固液比 4 个试验因素, 采

用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 并进行方差分析得出超声波提取毛竹肉总黄酮的最佳工艺参数, 具体试验设计见表 3。

2 结果与分析

2.1 水提取单因素试验

水提取单因素考察结果表明: 在温度为 55 到 75℃ 时得率逐渐增高, 75℃ 时得率最高; 随温度的升高, 得率反而下降; 提取时间为 2.0 h 时得率最高, 提取时间对总黄酮得率影响不是很大; 在固液比为 1:30 时总黄酮得率最高; 提取 pH 值为 8.5 时总黄酮得率最高。

2.2 水提取正交试验结果

根据单因素试验结果, 选择影响毛竹笋总黄酮提取效果各因素中有意义的水平作正交试验 (表 1), 并对结果进行极差 (R) 分析, 以确定最佳的提取条件表 4。

表 4 水提取正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal test for extraction with water bath

试验号 Test No.	因素 Factor				总黄酮提取率% Extraction rate of total flavonoids
	A	B	C	D	
1	0.5	1:20	60	7.0	0.517
2	0.5	1:30	70	8.0	0.590
3	0.5	1:40	80	9.0	0.638
4	1.0	1:20	70	9.0	0.415
5	1.0	1:30	80	7.0	0.544
6	1.0	1:40	60	8.0	0.660
7	1.5	1:20	80	8.0	0.447
8	1.5	1:30	60	9.0	0.706
9	1.5	1:40	70	7.0	0.685
K1	1.745	1.379	1.883	1.746	
K2	1.619	1.840	1.690	1.697	
K3	1.838	1.983	1.629	1.759	
R	0.219	0.604	0.254	0.062	

由表 4 水提取正交试验直观分析结果, 确定的较佳提取工艺条件为 $A_3B_2C_1D_3$, 即: 提取时间 1.5 h, 固液比 1:30, 提取温度 60℃, 溶剂 pH 值 9.0; 总黄酮得率为 0.706%。这与单因素试验结果基本相吻合。由极差 (R) 分析可知, 各因素对总黄酮得率的影响程度依次为固液比 > 温度 > 时间 > 溶剂 pH 值。

2.3 乙醇热回流提取单因素试验

乙醇热回流提取单因素试验结果表明, 乙醇体积分数为 75% 时总黄酮得率较高; 固液比为 1:30 时总黄酮得率最高; 提取时间为 2.0 h 时总黄酮得率最高; 提取温度为 80℃ 时总黄酮得率最高。

2.4 乙醇热回流提取正交试验结果

根据单因素试验结果, 选择影响毛竹笋总黄酮提取效果各因素中有意义的水平作正交试验 (表 2), 并对结果进行极差 (R) 分析, 以确定最佳的提取条件见表 5。

由表 5 乙醇热回流提取正交试验直观分析结果, 确定的较佳提取工艺条件为 $A_3B_3C_2D_1$, 即: 提取时间 2.0 h, 固液比 1:40, 乙醇体积分数 70%, 提取温度 60℃; 总黄酮得率为 1.063%。由极差 (R) 分析可知, 各因素对总黄酮得率的影响程度依次为固液比 > 温度 > 时间 > 乙醇体积分数。

2.5 超声波提取单因素试验

超声波提取单因素试验结果表明：乙醇体积分数为 75% 时总黄酮得率较高；固液比为 1:30 时总黄酮得率最高；提取时间为 30 min 时总黄酮得率最高；提取温度为 60℃ 时总黄酮得率最高。

2.6 超声波提取正交试验结果

根据单因素试验结果，选择影响毛竹笋总黄酮提取效果各因素中有意义的水平作正交试验（表 3），并对结果进行极差（R）分析，以确定最佳的提取条件见表 6。

表 5 乙醇热回流提取正交试验结果
Table 5 Results of orthogonal test for extraction with ethanol solvent backflow

试验号	因素				总黄酮提取率% Extraction rate of total flavonoids
	A	B	C	D	
1	1.0	1:20	60	60	0.624
2	1.0	1:30	70	70	0.675
3	1.0	1:40	80	80	0.849
4	1.5	1:20	70	80	0.698
5	1.5	1:30	80	60	0.908
6	1.5	1:40	60	70	0.693
7	2.0	1:20	80	70	0.717
8	2.0	1:30	60	80	0.831
9	2.0	1:40	70	60	1.063
K1	2.148	2.039	2.148	2.595	
K2	2.299	2.414	2.436	2.085	
K3	2.611	2.605	2.474	2.378	
R	0.463	0.566	0.326	0.510	

表 6 超声波提取提取正交试验结果
Table 6 Results of orthogonal test for extraction with ultrasonic

试验号	因素				总黄酮提取率% Extraction rate of total flavonoids
	A	B	C	D	
1	10	60	50	1:20	0.570
2	10	70	60	1:30	0.704
3	10	80	70	1:40	0.755
4	20	60	60	1:40	0.715
5	20	70	70	1:20	0.513
6	20	80	50	1:30	0.750
7	30	60	70	1:30	0.554
8	30	70	50	1:40	0.797
9	30	80	60	1:20	0.490
K1	2.029	1.839	2.117	1.573	
K2	1.978	2.014	1.909	2.008	
K3	1.841	1.995	1.822	2.267	
R	0.188	0.175	0.295	0.694	

由表 6 超声波提取正交试验直观分析结果，确定的较佳提取工艺条件为 $A_3B_2C_1D_3$ ，即：提取时间 30 min，固液比 1:40，乙醇体积分数 70%，提取温度 50℃；总黄酮得率为 0.797%。由极差（R）分析可知，各因素对总黄酮得率影响程度依次为固液比>温度>时间>乙醇体积分数。

由表 4、表 5 和表 6 正交试验直观分析结果可以看出：水提取、超声波提取的总黄酮得率均低于乙醇热回流提取。影响总黄酮得率的最主要因素为固液比，其次为温度，通过单因素试验，提取时间对总黄酮得率影响不大。影响总黄酮提取率的因素很多，这些因素还有待于进一步的研究。

3 结论

采用单因素实验考察不同条件下毛竹笋总黄酮的提取率, 然后结合正交设计试验提取工艺确定最佳工艺路线, 具有直观和准确的优点。初步得到了毛竹笋总黄酮的最佳提取工艺。

分析比较水提取、乙醇热回流提取和超声波提取可知: 毛竹笋总黄酮最佳提取工艺为乙醇热回流提取, 该方法操作简单, 总黄酮提取率相对较高。最佳提取条件为: 提取时间 2.0 h, 固液比 1 : 40, 乙醇体积分数 70%, 提取温度 60℃; 总黄酮得率为 1.063%。各因素对总黄酮得率的影响程度依次为固液比 > 温度 > 时间 > 乙醇体积分数。比较 3 种提取方法, 从提取总黄酮含量来看, 水提取得率最低, 乙醇热回流提取法优于超声波提取法。然而, 超声波法仅 30 min 就可达到乙醇热回流法 2.0 h 总黄酮含量的 74.98%, 且在一定程度上节约了水资源。故在实际操作时, 可综合考虑所期望的目标及实验条件, 选择适合的最佳提取工艺。

该试验初步确定了毛竹笋总黄酮的最佳提取工艺, 研究了影响总黄酮提取率的几个主要因素, 为总黄酮进一步分离、纯化及其打下了基础^[11-12]。但其余因素对总黄酮提取率是否具有影响还有待于进一步研究。毛竹笋总黄酮在食品、医疗保健中的应

用也有待于更深入的研究。

参考文献:

- [1] 李安平, 谢碧霞, 钟秋平, 等. 毛竹春笋提取物抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 97-100.
- [2] 张英. 竹叶黄酮的生理与药理活性[J]. 世界竹藤通讯, 2004, 2(2): 1-11.
- [3] 许宝泉, 吴水英, 宋秋华. 竹叶黄酮的生理功能研究进展[J]. 江西林业科技, 2006(1): 37-39.
- [4] 黄河胜, 马传庚. 黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 31-33.
- [5] 岳永德, 操海群, 汤锋. 竹提取物的化学成分及其利用研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(3): 328-333.
- [6] 李凤林, 李青旺, 高大威, 等. 天然黄酮类化合物分离纯化研究进展[J]. 江苏调味副食品, 2008, 25(5): 20-24.
- [7] 孙长花, 张素华, 张凌云, 等. 竹叶黄酮的生理活性与应用研究[J]. 四川食品与发酵, 2006, 42(1): 13-16.
- [8] 郝培应, 徐有明, 皮忠来, 等. 竹类植物衍生物的生理活性及其疗效的研究进展[J]. 世界林业研究, 2004, 17(3): 21-24.
- [9] 陈伟, 陈惠, 刘晓燕, 等. 竹叶黄酮的提取和测定研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2007(4): 73-76.
- [10] 盛幼珍, 王丽梅, 余龙江, 等. 几种天然植物黄酮的抗氧化对比研究[J]. 食品科技, 2007: 176-178.
- [11] 李飞跃, 喻国光, 陈金珠, 等. 竹叶主要化学成分分析及其生物活性研究现状[J]. 江西林业科技, 2006(4): 34-36.