

Study on Extraction Technology of Total Flavonoids from Leaves of Huanghua Pear

Min He, Daping Wang*

Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing
Email: 770815352@qq.com, wdp600@126.com

Received: Nov. 1st, 2018; accepted: Nov. 15th, 2018; published: Nov. 22nd, 2018

Abstract

Taking the leaves of Huanghua pear as material, the extraction process of total flavonoids from leaves of Huanghua pear was studied by single factor experiment and orthogonal experiment with ethanol extraction method. The results showed that the optimum extraction conditions were ethanol concentration 70%, liquid-solid ratio 50:1 ml/g, extraction temperature 40°C, extraction time 2 h. Under these conditions, the extraction rate of total flavonoids was 9.72%.

Keywords

Huanghua Pear, Leaves, Total Flavonoids, Extraction

黄花梨叶片总黄酮提取工艺研究

何 敏, 王大平*

重庆文理学院, 重庆
Email: 770815352@qq.com, wdp600@126.com

收稿日期: 2018年11月1日; 录用日期: 2018年11月15日; 发布日期: 2018年11月22日

摘 要

以黄花梨叶片为材料, 采用乙醇提取法, 通过单因素试验和正交试验, 对叶片中总黄酮提取工艺进行研究。结果表明, 最佳提取工艺为: 乙醇浓度70%, 液料比50:1 ml/g, 提取温度40°C, 提取时间2 h。在此条件下, 总黄酮的提取率为9.72%。

*通讯作者。

关键词

黄花梨, 叶片, 总黄酮, 提取

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

黄花梨(*Pyrus pyrifolia* Nakai Huanghua)是1962年用亲本为不同生态型的品种“黄蜜(母本)”与“三花(父本)”杂交所得[1]。黄花梨果实深受消费者的青睐,具有很高的食用价值,是我国南方地区大量种植的优良梨品种,也是重庆市永川区主要的梨栽培品种,栽培面积达6000 hm²,年产量达60,000 t,是农民的重要经济来源[2]。

黄酮类化合物是一类植物次生代谢产物,存在于多种植物中,不仅数量种类繁多,而且结构类型复杂多样[3]。据报道,黄酮类化合物具有许多重要的生理、生化作用,适量摄入能减少癌症、肿瘤、心血管疾病、脂质过氧化以及骨质疏松等疾病的发病率[4],在医药领域应用广泛。果农每年都要进行整形修剪,废弃了大量的残枝叶片,为了充分利用资源,发挥其应有的价值,本实验以黄花梨叶片为材料,对叶片中总黄酮提取工艺进行了研究,为黄花梨叶片的再利用提供技术保障。

2. 材料和方法

2.1. 材料与设备

2.1.1. 材料与试剂

黄花梨叶片: 采自重庆市永川区黄瓜山梨园。

芦丁: 合肥博美生物科技有限责任公司生产; 无水乙醇、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝等均为分析纯。

2.1.2. 仪器与设备

电热恒温鼓风干燥箱: DGG-9246A型, 上海齐欣科学仪器有限公司; 电热恒温水浴锅: HH.S11-4-S型, 上海龙跃仪器设备有限公司; 高效多功能粉碎机: DS-T300型, 上海顶帅电器有限公司; 电热恒温水温箱: HH.W21.600型, 上海跃进医疗器械厂; 电子天平: EI204型, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 隔膜真空泵: GM-0.5A, 浙江台州求精真空泵有限公司; 可见分光光度计: 722型, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; 旋转蒸发器: RE-52AA型, 上海亚荣生化仪器厂。

2.2. 方法

2.2.1. 标准曲线的制作

称取芦丁标准品20.00 mg, 加入70%的乙醇溶液, 定容至100 ml, 得质量浓度为0.20 mg/ml的芦丁标准液。分别吸取0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 ml标准液置于1、2、3、4、5、6、7号共7个25 ml容量瓶中, 各加70%乙醇溶液补充至5 ml, 再分别加入5%亚硝酸钠溶液0.3 ml, 摇匀后静置6分钟后加入10%硝酸铝溶液0.3 ml, 摇匀, 静置5分钟, 最后加入1 mol/L氢氧化钠溶液4 ml, 定容至25 ml, 放置10分钟后, 以1号试管为对照, 测定在510 nm波长处不同芦丁标准液的吸光度, 以吸光度为纵坐标, 芦丁标准液浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

2.2.2. 总黄酮含量的测定

测定黄花梨叶片总黄酮含量时, 按制作标准曲线的方法测定不同系列样品的含量, 参照总黄酮提取率计算公式进行计算[5]。

$$\text{总黄酮提取率(\%)} = \frac{C \times V \times n}{m \times 10^3} \times 100$$

式中: C 为根据标准曲线计算出的总黄酮质量浓度(mg/ml); V 为提取液体积(ml); n 为提取溶液稀释倍数; m 为提取叶片的质量(g)。

2.2.3. 单因素试验

在其它条件相同的情况下, 分别开展乙醇浓度(40%、50%、60%、70%、80%、90%)、液料比(10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1 ml/g)、提取温度(20°C、30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°C)、提取时间(0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h)对黄花梨叶片总黄酮提取率的影响。

2.2.4. 正交试验

根据单因素试验结果, 考虑乙醇浓度(A)、液料比(B)、提取温度(C)、提取时间(D)对黄花梨叶片总黄酮提取的影响, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验方案的设计(表 1), 进一步优化黄花梨叶片中总黄酮的提取工艺。

Table 1. Factors and levels of orthogonal experiment

表 1. 正交实验因素与水平

水平 Level	因素 Factors			
	A (乙醇浓度/%) Ethanol concentration	B (液料比/ml·g ⁻¹) Liquid-solid ratio	C (提取温度/°C) Extraction temperature	D (提取时间/h) Extraction time
1	50	40:1	40	1
2	60	50:1	50	1.5
3	70	60:1	60	2

2.2.5. 数据分析

数据采用 SPSS18.0 进行统计分析。

3. 结果与分析

3.1. 标准曲线的绘制

根据实验结果得出芦丁标准曲线(图 1), 其回归方程为 $y = 5.8393x + 0.0043$, 相关系数 $R^2 = 0.9991$, 表明芦丁标准液浓度与吸光度值有较强的线性相关关系。

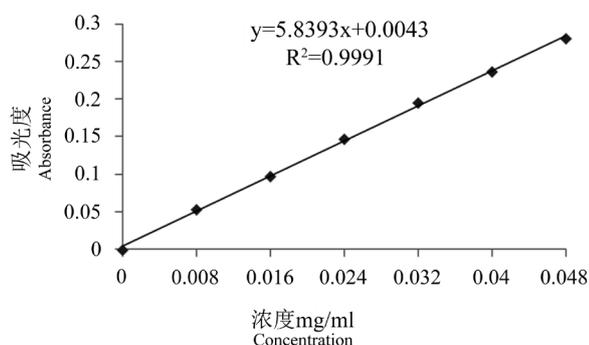


Figure 1. Standard curve of rutin solution

图 1. 芦丁溶液的标准曲线

3.2. 乙醇浓度对黄花梨叶片总黄酮提取率的影响

选取液料比 20:1, 温度 40℃, 提取时间 1 h, 采用 2.2.3 设置的不同水平的乙醇浓度 10 ml 进行实验。由图 2 看出, 在乙醇浓度为 40%~60%时, 随着乙醇浓度的增加, 黄花梨叶片的总黄酮提取率呈现上升趋势, 在乙醇浓度为 60%时达到最大值, 之后, 随着乙醇浓度的增加, 黄花梨叶片的总黄酮提取率下降较为明显, 这可能是由于杂质与脂溶性黄酮竞争溶剂, 从而导致总黄酮的提取率降低[6]。

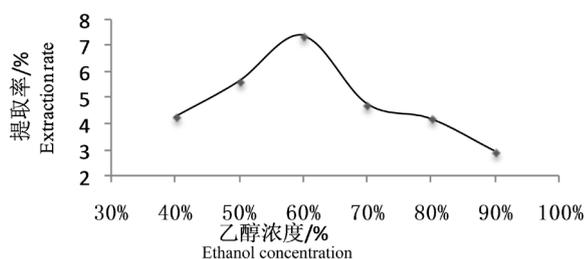


Figure 2. The effect of extraction ethanol concentration on extraction rate
图 2. 乙醇浓度对提取率的影响

3.3. 液料比对黄花梨片总黄酮提取率的影响

选取乙醇浓度 70%, 温度 40℃, 提取时间 1 h, 采用 2.2.3 设置的不同水平的液料比进行实验。由图 3 可知, 黄花梨叶片总黄酮的提取率随着液料比的增加呈现上升趋势, 最终在液料比为 50:1 时趋于稳定, 呈小幅度的上升。因此, 从提取效果和减少溶剂用量考虑, 选择液料比为 50:1 较为适宜。

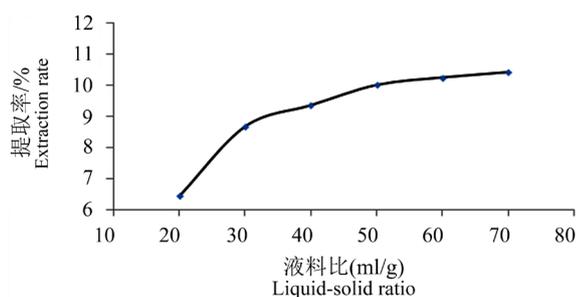


Figure 3. The effect of extraction liquid-solid ratio on extraction rate
图 3. 液料比对提取率的影响

3.4. 提取温度对黄花梨叶片总黄酮提取率的影响

选取乙醇浓度 70%, 液料比 20:1, 提取时间 1 h, 采用 2.2.3 设置的不同水平的温度进行实验。由图 4 可知, 当提取温度升高时, 黄花梨叶片的总黄酮提取率先上升后下降, 在提取温度为 50℃时, 提取率最大。从热力学角度分析, 温度越高, 越有利于总黄酮的溶出, 但温度过高, 杂质的溶出增加, 同时乙醇的挥发也增加, 不利于黄酮类化合物的溶出[7]。

3.5. 提取时间对黄花梨叶片总黄酮提取率的影响

以乙醇浓度 70%, 液料比 20:1, 温度 40℃, 采用 2.2.3 设置的不同水平的提取时间进行实验。从图 5 可看出, 从整体来看, 随着提取时间的增加, 黄花梨叶片总黄酮提取率先上升后下降, 在 0.5 h~1.5 h 内, 提取时间增加, 提取率增加; 在 1.5 h~3 h 内, 提取时间增加, 提取率减小, 可能是由于提取时间过长, 一些热敏性组分被破坏, 导致提取率下降。

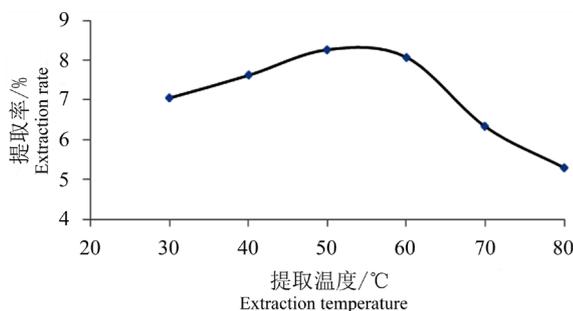


Figure 4. The effect of extraction temperature on extraction rate
图 4. 提取温度对提取率的影响

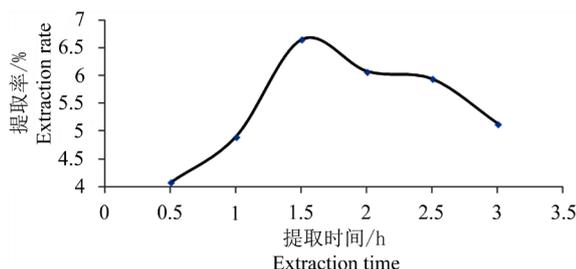


Figure 5. The effect of extraction time on extraction rate
图 5. 提取时间对提取率的影响

3.6. 正交试验

根据单因素试验结果进行正交试验, 从表 2 可见, 乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间对黄花梨叶片中总黄酮的提取率均有影响, 影响力大小依次为: C > B > A > D, 即提取温度 > 液料比 > 乙醇浓度 > 提取时间。由表 3 看出, 经方差分析, 乙醇浓度、料液比、提取温度对黄花梨叶片总黄酮提取率有显著差异, 提取时间无显著差异。提取工艺的最佳条件是 A₃B₂C₁D₃, 即乙醇浓度 70%, 液料比 50:1 ml/g, 提取温度 40°C, 提取时间 2 h, 在此提取条件下, 黄花梨叶片中总黄酮的提取率达到 9.72%。

Table 2. Results and analysis of orthogonal experiment

表 2. 正交实验结果与分析

编号 Number	因素 Factors				提取率/% Extraction rate
	A (乙醇浓度/%) Ethanol concentration	B (液料比/ml·g ⁻¹) Liquid-solid ratio	C (提取温度/°C) Extraction temperature	D (提取时间/h) Extraction time	
1	1	1	1	1	8.74
2	1	2	2	2	9.60
3	1	3	3	3	7.13
4	2	1	2	3	8.60
5	2	2	3	1	7.50
6	2	3	1	2	8.09
7	3	1	3	2	7.77
8	3	2	1	3	9.72
9	3	3	2	1	9.11
K ₁	8.489	8.370	8.848	8.450	
K ₂	8.063	8.941	9.107	8.487	
K ₃	8.868	8.109	7.466	8.483	
sR	0.805	0.832	1.641	0.037	

Table 3. Variance analysis of orthogonal experiment**表 3.** 正交实验方差分析

因素 Factors	偏差平方和 Deviation squared sum	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F-value	显著性 Significance
A	2.915	2	1.458	4.026	0.036
B	3.261	2	1.630	4.503	0.026
C	14.012	2	7.006	19.349	0.000
D	0.007	2	0.004	0.010	0.990

4. 结论

通过单因素试验和正交试验, 综合分析得出:

1) 液料比、提取温度、乙醇浓度、提取时间四因素对黄花梨叶片总黄酮的提取均有影响, 其中乙醇浓度、液料比、提取温度的影响达到显著水平($P < 0.05$), 各因素对黄花梨叶片总黄酮提取率的影响程度依次为提取温度 > 液料比 > 乙醇浓度 > 提取时间。

2) 黄花梨叶片总黄酮的最佳提取工艺条件为: 乙醇浓度 70%, 液料比 50:1 ml/g, 提取温度 40°C, 提取时间 2 h, 提取率达到 9.72%。

基金项目

重庆市大学生创新创业训练计划项目“黄花梨叶片总黄酮提取工艺的研究”(201810642044)。

参考文献

- [1] 黄代青, 吕柳新, 周奕华. 柚第一染色体的显微分离[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(1): 53-55.
- [2] 刁英, 王大平, 杨光绪, 等. 黄花梨 1 号染色体的显微分离[J]. 西南农业大学学报, 2006, 28(5): 791-793.
- [3] 韦国兵, 胡奇军. 黄酮化合物合成的研究进展[J]. 江西中医学院学报, 2007(3): 97-98.
- [4] 农朝赞, 黄华艺. 黄酮类化合物抗肿瘤作用的研究应用[J]. 民族医药, 2004, 1(2): 109-111.
- [5] 邹维娜, 王微, 徐启江, 杜伟伟, 李灵玉. 香茶子叶片总酚、总黄酮提取及抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(2): 266-272.
- [6] 张岩, 曹国杰, 张燕, 方国臻, 王硕. 黄酮类化合物的提取以及检测方法的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008(1): 154-158.
- [7] 韩秋菊, 李薇. 黑木耳黄酮类化合物提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(28): 17266-17268.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-5507, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjas@hanspub.org