

文章编号:1671-6833(2005)04-0053-04

酶法提取芝麻叶中总黄酮的工艺研究

孟志芬, 董彩霞, 孟现超

(河南科技学院化工系, 河南 新乡 453003)

摘要: 采用纤维素酶酶解预处理与水浸提相结合的提取工艺从芝麻叶中提取总黄酮, 用分光光度法测定了芝麻叶中总黄酮的含量, 并对芝麻叶总黄酮的提取过程中各因素对收率的影响情况进行了研究, 得出最佳工艺条件为: 料液比 1:60; pH 5.0; 酶解温度 45 °C; 酶浓度 3 U/mL; 酶解时间 2.5 h; 浸提时间 2.5 h; 浸提温度 80 °C; 芝麻叶总黄酮提取收率达 12.31%。

关键词: 酶法; 提取; 芝麻叶; 黄酮类化合物

中图分类号: TQ 463.24

文献标识码: A

0 引言

黄酮类化合物(flavonoids)广泛分布于植物界, 在植物的叶子和果实中少量以游离的形式存在, 大部分与糖结合成苷类以糖配基的形式出现。黄酮类化合物的生理活性作用较为广泛, 具有抗癌、镇痛、提高免疫力等药用保健功能^[1], 临床上用来预防和治疗脑动脉硬化症及脑血管循环不畅等疾病^[2]。目前国内主要是从银杏叶、大豆、山楂叶、荷叶、芹菜叶、水芹、花生壳等材料里利用有机溶剂、超声波、酶解等方法提取黄酮类化合物^[3~10]。据报道, 芝麻叶中也含有黄酮类化合物^[1]。目前芝麻叶中黄酮的提取主要采用乙醇提取和微波处理与乙醇提取相结合的方法^[1], 而酶法提取芝麻叶(sesame leaves)总黄酮的研究尚鲜见报道。作者采用纤维素酶预处理与热水浸提相结合的方法, 对芝麻叶中总黄酮的提取工艺进行了研究, 为芝麻叶的开发利用提供了理论基础。

1 实验材料与方法

1.1 仪器与试剂

722 型光栅分光光度计(山东高密分析仪器厂); 不锈钢电热恒温水浴锅(GSY-Ⅱ型, 北京市医疗设备厂); PHS-3TC 型精密数显酸度计(上海天达仪器有限公司); 电子分析天平(TYPE L-160DTP); 亚硝酸钠; 氢氧化钠; 醋酸钠; 冰乙酸

(均为分析纯); 硝酸铝(化学纯); 纤维素酶(国药集团化学试剂有限公司, 酶活力: 10 000 U/g); 芦丁(上海试剂三厂); 芝麻叶(采自辉县太行山区)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制和标准曲线的制作

准确称取 30 mg 芦丁标准样品, 用水溶解后定容于 100 mL, 得浓度为 0.3 mg/mL 芦丁标准液。准确吸取芦丁标准液 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 于 10 mL 比色管中, 加入质量分数为 5% 的 NaNO₂ 溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min 后加入质量分数 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min 后加入质量分数 4% NaOH 溶液 4.0 mL, 再用蒸馏水定容, 摇匀, 以蒸馏水做空白参比, 10 min 后用 1 cm 比色皿于 500 nm 处测定吸光度 A, 得到芦丁含量 Y(mg/mL) 与吸光度 A 间的回归方程: $Y = 4.6133A + 0.016$ (相关系数 $R^2 = 0.998$)。

1.2.2 实验方案

整个工艺分为酶解和热水浸提两部分。酶解及浸提工艺的各单因素影响条件, 如酶浓度、酶解时间、酶解温度、酶解 pH、料液比、浸提时间、浸提温度等被逐一考察。工艺条件优劣用总黄酮收率来衡量。

2 实验结果与讨论

2.1 料液比的影响

分别用不同的料液比(1:20; 1:40; 1:50; 1:

收稿日期: 2005-05-20; 修订日期: 2005-09-15

项目来源: 河南省高校杰出科研人才创新基金(2004KYCH009); 河南科技学院科学基金资助项目(02131)

作者简介: 孟志芬(1970-), 女, 河南内黄人, 河南科技学院讲师, 硕士, 主要从事有机化学与高分子化学方面的研究。

60;1:70) 提取芝麻叶中总黄酮实验结果见图 1. 可以看出,随着料液比的增大,总黄酮收率逐步提高,可能是溶剂增多,更有利于黄酮类化合物溶解出来,在料液比为 1:60 之后,再增加提取剂的量不能显著提高提取率,考虑到生产成本,料液比以 1:60 为宜.

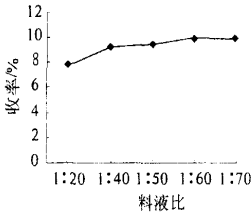


图 1 料液比对总黄酮收率的影响

Fig. 1 Effect of the ratio of material weight to solvent volume on the extraction yield of flavonoids

2.2 酶解pH 值的影响

由于纤维素酶的活性在微酸性环境下较好,故设计了pH 值分别为 3.5,4.0,4.5,5.0,5.5 五个 pH 值水平的试验,考察pH 值对总黄酮收率的影响,实验结果见图 2. 可以看出,在pH=5.0 以下总黄酮收率随pH 值升高而增大,pH=5.0 时,芝麻叶总黄酮收率随pH 值进一步增大而缓慢减少.这是因为纤维素酶的活性受pH 值影响较大,pH 值为 5.0 时,纤维素酶发挥最大活力,破坏芝麻叶细胞壁中纤维素的效率大大增强,使得芝麻叶黄酮类化合物的溶出效率也达到最大值.

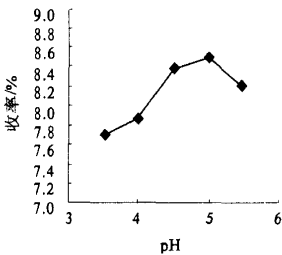


图 2 pH 值对总黄酮收率的影响

Fig. 2 Effect of pH on the extraction yield of flavonoids

2.3 酶解温度的影响

由于酶的活性多在 40~50℃ 较好,因此考察酶解温度为 30,35,45,50,55℃ 对芝麻叶总黄酮收率的影响. 由图 3 可知,在 45℃ 以下总黄酮收率随温度升高而增大,温度为 45℃ 时,芝麻叶总黄酮收率最大,随后温度进一步升高芝麻叶总黄酮收率逐渐减小.这是因为 45℃ 时纤维素酶发挥最大活性,有利于黄酮类化合物的溶出,提高芝麻叶总黄酮收率,温度进一步提高,则不利于酶活力的

发挥,因而提取效果变差.

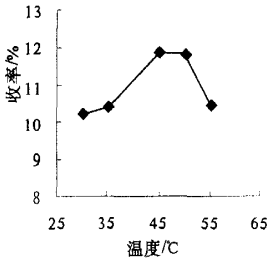


图 3 酶解温度对总黄酮收率的影响

Fig. 3 Effect of the temperature of enzymatic hydrolysis on the extraction yield of flavonoids

2.4 酶浓度的影响

提取介质中不同纤维素酶浓度(0,1,3,5,7,9 U/ml) 对芝麻叶总黄酮收率的影响如图 4 所示. 可以看出,在酶浓度为 3 U/mL 以下,总黄酮收率随酶浓度的增大而增加,当酶浓度为 3 U/mL 时,总黄酮收率达到最大值,继续增大酶浓度,收率逐渐下降.

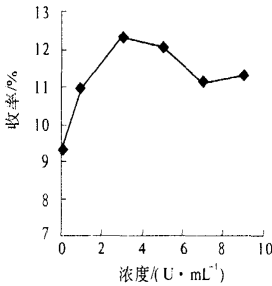


图 4 酶浓度对总黄酮收率的影响

Fig. 4 Effect of the concentration of enzyme on the extraction yield of flavonoids

2.5 酶解时间的影响

酶解时间对酶解效率的影响如图 5 所示. 由图 5 可知,酶解 2.5h 即可达到最佳效果,继续延长酶解时间,总黄酮收率反而下降,故酶解时间以 2.5h 为宜.

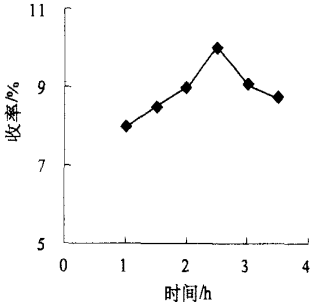


图 5 酶解时间对总黄酮收率的影响

Fig. 5 Effect of the time of enzymatic hydrolysis on the extraction yield of flavonoids

2.6 浸提时间的影响

采用不同的浸提时间(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0h) 提取芝麻叶中总黄酮, 实验结果见图 6. 可以看出, 随浸提时间的延长总黄酮收率增加, 浸提时间为 2.5h 时, 提取效果最好, 继续延长浸提时间, 收率反而下降.

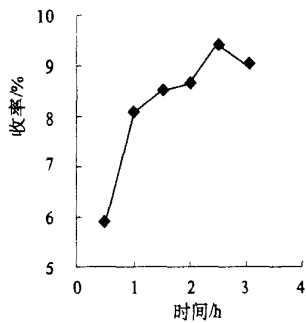


图 6 浸提时间对总黄酮收率的影响
Fig.6 Effect of the extraction time on the extraction yield of flavonoids

2.7 浸提温度的影响

图 7 考察了浸提温度为 70, 75, 80, 85, 90, 95 ℃对芝麻叶总黄酮收率的影响.

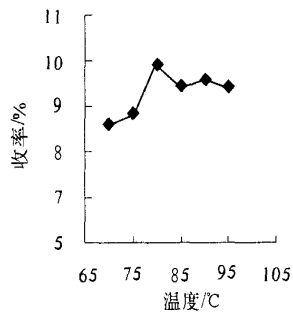


图 7 浸提温度对总黄酮收率的影响
Fig.7 Effect of the extraction temperature on the extraction yield of flavonoids

可以看出, 80 ℃以下随着浸提温度的升高, 芝麻叶总黄酮收率增大, 80 ℃时总黄酮收率最高, 继

总黄酮升高温度, 酮收率反而下降. 这是由于温度升高, 传质速率加快, 浸提效果增强, 但温度过高, 杂质含量增加, 因而浸提效果变差.

3 结论

通过用纤维素酶酶解法提取芝麻叶中总黄酮, 获得较好的效果, 芝麻叶总黄酮收率可达 12.31%, 为芝麻叶总黄酮的提取提供了一种新方法. 该方法的最佳工艺条件为: 料液比 1:60; pH=5.0; 酶解温度 45℃; 酶浓度 3 U/ml; 酶解时间 2.5h; 浸提时间 2.5h; 浸提温度 80℃.

参考文献:

[1] 黄泽元, 王海滨, 刘志伟. 芝麻叶中总黄酮的最佳提取工艺研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(6): 201~204.
[2] 王 晖, 刘佳佳. 银杏黄酮的酶法提取工艺研究[J]. 中药材, 2003, 26(12): 887~888.
[3] 黄阿根, 钱建业, 谭道经, 等. 荷叶黄酮提取工艺研究[J]. 食品与机械, 2000, 79(5): 14~16.
[4] 潘 见, 陈 强, 王国霞, 等. 葛根黄浸提工艺研究[J]. 农业工程学报, 1998, 14(4): 230~233.
[5] 何 改. 山楂叶总黄酮提取方法研究[J]. 食品研究与开发, 2002, 23(1): 15~17.
[6] 毕丽君, 李 慧. 水芹中总黄酮类化合物最佳提取工艺的研究[J]. 食品科学, 1999, (12): 35~37.
[7] 谢慧明, 骆祥峰, 张文成, 等. 银杏黄酮苷提纯工艺的研究[J]. 农业工程学报, 2001, 17(3): 103~106.
[8] 吴梅林, 周春山, 陈龙胜, 等. 酶法提取银杏黄酮类化合物研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 12(6): 557~560.
[9] 张秋荣, 单丽红, 杜 斌, 等. 超声波提取玉米黄色素的工艺研究[J]. 郑州大学学报(工学版), 2005, 26(2): 110~112.
[10] 毛陆原, 罗成果, 李玉娜, 等. 空气消毒剂过氧乙酸含量的酶催化光度法测定[J]. 郑州大学学报(工学版), 2005, 26(1): 73~78.

Study on the Extraction Process of Total Flavonoids from Sesame Leaves by Enzyme Hydrolysis

MENG Zhi -fen , DONG Cai -xia , MENG Xian -chao

(Chemical Engineering Department , Henan Institute of Science & Technology , Xinxiang 453003, China)

extracting is studied in this paper . The content of total flavonoids in sesame leaves is determined by spectrophotometric methods . The results show that the optimum conditions are obtained as follows :the ratio of material to solvent is 1:60; pH=5.0;the temperature of enzyme hydrolysis is at 45℃;the concentration of enzyme is 3 U/ml ; the time of enzyme hydrolysis is 2.5 hours ;the extraction time is 2.5 hours ;the extraction temperature is 80℃ . This process is new , simple and practical , and the yield of product is 12.31% .

Key words : enzyme hydrolysis ; extraction ; sesame leaves ; flavonoids

(上接第 52 页)

参考文献:

[1] WS-346(X-289)-94, 中华人民共和国卫生部药品标准(二部三册)[S] .

[2] 姜 华 . 薄层—比色法测定贞芪扶正口服液中齐墩果酸的含量[J] . 西北药学杂志, 1996, 11(3) : 103~104.

[3] 都述虎, 饶金华, 耿武松 . 薄层扫描法测定木瓜中齐墩果酸的含量[J] . 中草药, 2003, 34(1) : 35~37.

[4] 胡君萍, 杨建华, 都年生 . 双波长薄层扫描法测定维吾尔药琐琐葡萄中齐墩果酸的含量[J] . 华西药学杂志, 2003, 18(1) : 58~59.

[5] 肖巧清, 李玉兰 . 旋光法测定齐墩果酸片的含量[J] . 天津药学, 2002, 14(3) : 80~81.

Determination of Oleanolic Acid in Tablets by HPLC

HAN Zhi -hui , LIU Guo -ji , LUO Ting -liang

(School of Chemical Engineering , Zhengzhou University , Zhengzhou 450002, China)

Abstract : The acid base non aqueous titration is used extensively to control the quality of OLA .But this method is unstable and the resulting error is great .In view of this the isolation and determination of OLA in tablets by HPLC is reported .The chromatographic method is carried out on ZORBAX SB -C18column using 90% methanol + 10% water as mobile phase , detector being set at 215nm, the linear relation of calibration curve in the range of 0.0252~2.5200 mg •mL⁻¹ was excellent (r =0.9997) . The average recovery is 99.4% with RSD =1.9% .The method is rapid , accurate and reliable for quality control of oleanolic acid tablets .

Key words : oleanolic acid(OLA) ; content ; HPLC