

苦瓜总黄酮提取工艺*

华景清 蔡 健

(苏州农业职业技术学院食品系, 苏州 215008)

摘 要 以不同体积分数的乙醇、提取时间、固液比及提取温度等条件对苦瓜总黄酮的提取进行正交设计试验,并以芦丁为标准品,用分光光度法在 500 nm 处测定各提取液的总黄酮含量。结果显示:乙醇提取法最佳工艺组合为 $A_3B_1C_3D_2$,即乙醇体积分数 90%,提取时间 3h,固液比 1g:60 mL,提取温度 70℃。研究结果可为利用苦瓜工业化生产黄酮类药物成分提供科学依据。

关键词 苦瓜,分光光度法,总黄酮,提取工艺

苦瓜为葫芦科 1 年生草本植物苦瓜的果实,又称凉瓜、癞葡萄、锦荔枝。苦瓜是人们喜爱的一种保健蔬菜食品,全国各地都有栽培,资源十分丰富。苦瓜含有较丰富的苦瓜苷、谷氨酸、丙氨酸、脯氨酸、胱氨酸、果胶、多种维生素及微量元素。

在民间,苦瓜药食两用已有几千年的历史,世界各国均有苦瓜治病食疗的记载。我国传统医学记载,它味苦性寒,具有利尿、清热、降血脂、降血糖功效,对提高机体的免疫能力,防治湿疹等皮肤病有一定作用。现代研究表明,苦瓜中的有效成分可抑制正常细胞的癌变和促进突变细胞的回复过程,具有抗癌作用。黄酮类化合物广泛存在于植物中,它的生理活性较为广泛,具有生物抗氧化、抗菌作用及抗衰老、治疗脑血管病、降血脂等药用保健功能^[1]。由于从苦瓜中提取黄酮方法的研究鲜有报道,所以文中利用乙醇提取,探讨苦瓜中黄酮类化合物的最佳提取工艺,为更好地开发和利用苦瓜提供理论基础。

1 试验材料与仪器设备

1.1 试验材料

1.1.1 原料

苦瓜,市售。

1.1.2 试剂

芦丁,中国医药(集团)上海化学试剂公司

(生化试剂);无水乙醇(AR), NaNO_2 (AR), $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (AR), NaOH (AR),蒸馏水。

1.2 仪器设备

XA-1 型高速万能粉碎机,江苏姜堰市银河实验仪器厂;分析天平,上海天平仪器厂;电热恒温水浴锅,上海医疗器械五厂;80-1 离心沉淀器,上海手术器械厂;722-光栅分光光度计,上海第三分析仪器厂;101A-2 型数显电热鼓风干燥箱,上海浦东荣丰科学仪器有限公司。

2 试验方法^[2]

2.1 原料的预处理

市售的苦瓜在 70℃ 的温度下烘干,保存于干燥的环境中。使用时需进一步粉碎。

2.2 黄酮含量的测定方法

2.2.1 分光光度法^[3]

采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法,以芦丁为标准样在 500 nm 处测定苦瓜中总黄酮含量。

2.2.2 工作曲线回归方程建立^[4]

准确称取芦丁标准试剂 0.0788 g,用体积分数(下同)30%乙醇溶解,并完全移入 250 mL 容量瓶中,用 30%乙醇定容。分别取芦丁标准溶液 0、1、2、4、6、8、10 mL 于 7 只 25 mL 容量瓶中,用 30%乙醇补充至 12.5 mL,加入质量分数 5%的 NaNO_2 0.7 mL,摇匀,放置 5 min 后加入质量分数 10%的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.7 mL,6 min 后再

第一作者:硕士研究生,高级农艺师,蔡健为通讯作者,E-mail:szcjfood@163.com。

*苏州农业职业技术学院科学研究基金资助项目(No.2003030)

收稿时间 2004-03-17, 改回时间 2004-05-09

加入质量分数 4% 的 NaOH 5 mL,混匀,用 30% 乙醇稀释至刻度,10 min 后于波长 500 nm

处比色测定,试剂为空白参比。具体结果见表 1。

表 1 芦丁标准吸光度与浓度的关系

标准液(X) / mL	0	1	2	4	6	8	10
吸光度(A)	0	0.024	0.043	0.106	0.184	0.236	0.283
浓度(Y) / g·L ⁻¹	0	0.0063	0.0126	0.0252	0.0378	0.0504	0.0632

根据表 1 结果用最小二乘法作线性回归,得芦丁浓度 Y 与吸光度 A 的关系曲线的回归方程式: $Y = 0.2087A + 0.002110$ 。相关系数 $r = 0.9970$,所以本检测方法中芦丁浓度与吸光度有良好的相关性。

3 结果与讨论

3.1 乙醇体积分数的影响

分别用 40%、50%、60%、70%、80%、90% 乙醇溶液浸泡相同量的样品 24h。测定提取液的吸光度值 结果见表 2。

表 2 乙醇体积分数对样品中黄酮类物质提取效果的影响¹⁾

乙醇体积分数/%	40	50	60	70	80	90
吸光度	0.010	0.012	0.014	0.012	0.026	0.027

1) 以上固液比为 1:40 (g:mL)

试验结果表明 随着乙醇体积分数的提高,在 60% 和 90% 出现 2 个高峰,黄酮类物质浸出率也随着增大,但乙醇体积分数过高则叶绿素等脂溶性物质的溶出量也增多,不利于黄酮的提纯^[5,6],因此乙醇体积分数确定在 90% 以下。

表 4 不同固液比对样品中黄酮类物质提取效果的影响¹⁾

固液比(g:mL)	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60	1:70	1:80
提取量/%	0.8360	0.1044	0.5356	1.048	0.7362	1.196	2.126	2.178

1) 乙醇体积分数为 90%。

3.4 提取温度的影响

称取一定量的样品分别在 30、40、50、60、70、80℃ 下保温 3.5 h,结果见表 5。从表 5 可知 30℃ 到 40℃ 吸光度有较大的增长,但 40℃ 到 50℃ 变化不大,而 50、60、70℃ 时在 60℃ 出现高峰,而 80℃ 时吸光度有升高。这主要是由于黄酮在乙醇中的溶解度随着温度的升高而增大,同时由于温度的升高,提取液粘度减少,扩散系数增加,促进提取速度加快。

3.2 提取时间的影响

在固液比 1 g:40 mL、乙醇溶液 90% 的条件下,每隔 0.5 h 测定一次提取液的吸光度值,结果见表 3。试验结果表明,当提取时间为 3.5 h 时,提取效果最好。当时间继续延长时,吸光度反而降低。这可能是提取时间太长,有部分乙醇被挥发而导致沸点逐渐增大,从而破坏某些黄酮类化合物^[7,8]。

表 3 提取时间对样品中黄酮类物质提取效果的影响

浸提时间/h	2	2.5	3	3.5	4	4.5
吸光度	0.016	0.019	0.021	0.031	0.023	0.023

3.3 不同固液比的影响

用 80% 乙醇溶液对样品进行浸泡,对不同的固液比进行提取试验,固液比(g:mL)分别为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70 和 1:80,提取时间为 3.5 h,结果见表 4。从表 4 可知,随着固液比的增加,提取量出现了 2 个波峰 1.048% 和 2.178%,尽管固液比为 1:80 时出现的数值最大,但提纯较为困难,因此从提取工艺角度出发,选择固液比 1:60 以下作为考虑对象。

表 5 提取温度对样品中黄酮类物质提取效果的影响¹⁾

温度/℃	30	40	50	60	70	80
吸光度	0.012	0.020	0.018	0.028	0.022	0.027

1) 乙醇体积分数为 90%。

3.5 正交试验确定提取的最佳条件

在实际操作中,由于各因素之间相互交叉影响,因此为全面考察乙醇提取法的工艺参数,根据已有的资料介绍及实际情况^[9~12],确定以乙醇体积分数、提取时间、固液比、提取温度等 4 种因素进行正交试验设计,以测定苦瓜浸提样

品中的总黄酮含量(见表 6、表 7)

表 6 正交实验因素水平表 $L_9(3^4)$

水平	乙醇 (A) %	提取时间 (B) h	固液比 (C) (g:mL)	提取温度 (D) /°C
1	70	3	1:40	60
2	80	3.5	1:50	70
3	90	4	1:60	80

表 7 苦瓜正交实验结果

	因素水平				总黄酮 含量/%
	A	B	C	D	
	/%	/h	(g:mL)	/°C	
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	0.8394
2	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	2.093
3	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃	2.637
4	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃	2.406
5	A ₂	B ₂	C ₃	D ₁	1.948
6	A ₂	B ₃	C ₁	D ₂	1.632
7	A ₃	B ₁	C ₃	D ₂	7.395
8	A ₃	B ₂	C ₁	D ₃	2.843
9	A ₃	B ₃	C ₂	D ₁	1.884
K_1	5.569	10.64	5.315	4.671	
K_2	5.986	6.884	6.383	11.12	
K_3	12.12	6.153	11.98	7.886	
k_1	1.856	3.547	1.772	1.557	
k_2	1.995	2.295	2.128	3.707	
k_3	4.040	2.051	3.993	2.629	
R	2.184	1.496	2.221	2.150	

从表 7 中的可知,乙醇浓度、提取时间、固液比、提取温度 4 因素对黄酮提取量影响的主次顺序为:固液比>乙醇浓度>提取温度>提取时间,并且最好的提取条件为乙醇体积分数 90%,提取时间 3h,固液比 1g:60mL,提取温度 70°C,即 $A_3B_1C_3D_2$ 。

3.6 试验因素对黄酮类物质提取量影响的方差分析

试验因素对苦瓜黄酮类物质提取量影响的方差分析结果见表 8。

由表 8 可知, $F_A = 6.60 > F_C = 6.34 > F_{0.01} = 6.23$,故乙醇体积分数和固液比为极显著影响的因素; $F_D = 5.14 > F_{0.05} = 3.63$,故提取温度

表 8 方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F	临界值
A	8.88	2	4.44	6.60**	$F_{0.01}(2,16) = 6.23$
B	3.85	2	1.93	2.87	$F_{0.05}(2,16) = 3.63$
C	8.54	2	4.27	6.34**	
D	6.92	2	3.46	5.14*	
误差	10.77	16	0.673		

为显著因素; $F_B = 2.87 < F_{0.05} = 3.63$,故提取时间为不显著因素。但从方差分析的观点看,此组试验的最好水平搭配仍为 $A_3B_1C_3D_2$ 。

3.7 实际生产中的工艺条件的确定

从 3.5 及 3.6 分析结果可知:单纯从试验角度出发,并考虑提取黄酮的总含量最高,可选用 $A_3B_1C_3D_2$ 。但如果从实际生产出发,要考虑生产成本及提取效率。由于乙醇体积分数和固液比均为极显著性因素,而提取温度为显著因素,所以选用 90%、1g:60mL 和 90°C;提取时间为不显著因素,可以选择最短时间。综合考虑,在不影响提取量的情况下,因从提取时间最短、成本最低、产品易分离等角度加以考虑,以得最佳参数。

参 考 文 献

- 1 蔡 健. 苦瓜饮料的研制[J]. 四川食品与发酵, 1996(4):37~39
- 2 蔡 健, 华景清, 王 薇等. 黄酮提取工艺研究进展[J]. 淮阴工学院学报, 2003(12):82~85
- 3 黄晓冬, 刘剑秋, 陈炳华等. 赤楠茎叶果总黄酮提取与含量测定[J]. 泉州师范学院学报, 2003, 21(4):72~76
- 4 毛莉娟, 刘学文, 冉 旭. 苦丁茶中黄酮的提取工艺[J]. 食品科技, 2002(11):18~19, 24
- 5 杨 洋, 余 炼, 唐宇雯. 柚皮黄酮类成分的分离工艺研究[J]. 食品科学, 2001, 22(3):41~43
- 6 陈海光, 余以刚, 曾庆孝. 荷叶黄酮及生物碱的提取研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1):69~71
- 7 范志刚, 麦军利, 杨莉斌等. 微波技术对雪莲中黄酮浸出量影响的研究[J]. 中国民族医药杂志, 2000, 1:43~44
- 8 王 晓, 李林波, 马小朱等. 酶法提取山楂叶中总黄酮的研究[J]. 食品工业科技, 2002(3):37~39
- 9 王选东, 刘利林, 许宗运. 正交设计研究石榴皮总黄酮提取工艺[J]. 塔里木农垦大学学报, 2003, 15

- (2):11~15
- 10 赵伯涛,钱 骅,薛 辉等. 芦蒿花总黄酮类提取工艺的研究[J]. 中国野生植物资源, 2002, 20(6):55~56
- 11 郑瑞昌,黄阿根,钱建亚. 水芹黄酮提取工艺的研究[J]. 扬州大学学报, 2001, 4(4):50~51
- 12 王钦德,杨坚主编. 食品试验设计与统计分析[M]. 北京:中国农业大学出版社, 2003. 152~362

A Study on Extraction Technology of Total Flavonoids in Balsam Pear

Hua Jingqing Cai Jian

(Department of Food, Suzhou Polytechnical Institute of Agriculture, Suzhou 215008)

ABSTRACT The total flavonoids were extracted from balsam pear with different extracting conditions by conducting the orthogonal experiments. Rutin was used as a standard compound and the total flavonoids of balsam pear was quantitated by measuring the absorbance at 500 nm by spectrometric method. The results indicated the optimum extracting condition of the ethanol digestion method being A₃B₁C₃D₂, i. e., 90% ethanol as solvent, extracting time of 3h, ratio of solid to liquid as 1:60 and temperature of extraction at 70°C. The results provides pharmaceutical in formation of flavonoids from balsam pear.

Key words balsam pear, spectrometric method, total flavonoids, extracting technology

国外开发柑橘防腐保鲜剂

石蜡系保鲜剂用蜡等疏水性物质配制涂料,涂在水果表面形成一层蜡状薄膜,起隔离、杀菌和防止水分蒸发的作用。

(1)俄罗斯出品一种“普终帖克桑”的水果保鲜乳液,用25%高纯度石蜡、5%蜂蜡、0.2%山梨酸、69.8%水配制成,使用前按1:3比例加水稀释,水果在乳液中浸泡后表面呈一层光滑的薄膜脂肪层。

(2)日本专利:一种石蜡保鲜剂,采用100份疏水性物质石蜡等,加0.05~5份表面活性剂。如:蔗糖、脂肪酸脂、卵磷脂和酪氨酸等,加0.015~1.5份水溶性高分子化合物,如阿拉伯胶糊精、动物胶等,再加40~400份水,充分混匀成乳液,再加热灭菌处理即成,用于喷涂、浸涂效果较好。

美国专利:小烛树蜡40份、油酸12份、加上吗啉、乙二醇、石碳酸及水组成保鲜剂,保鲜柑橘效果著。

蔗糖脂肪酸保鲜剂,英国剑桥大学研究成一种由蔗糖、脂肪酸和合成糖制成的一种水果涂料。喷在柑橘上能减缓柑橘的成熟速度,充分保持水分与香气,延长存放期。

英国TAL化学药剂公司研究由蔗糖酯甘油及纤维素组成的保鲜剂,可在水果表面形成一层半透气的膜,让柑橘中CO₂扩散出来,限制氧往里渗透,从而降低水果的新陈代谢,起保鲜作用。

日本开发用0.5%~3%的蔗糖酯,0.02%~3.0%单甘油酯,0%~2%二甘油酯和0%~2%的三甘油酯组成的蔗糖保鲜剂,用于浸涂风干柑橘保鲜。

日本采用竹液酿制出质量上佳的竹酒

日本采用竹液,添加酵母(或自然发酵)酿制出质量好、香味浓、含酒精20%的美酒。具体制法是:在竹笋生长旺盛的春季(最好4月份),将竹笋上部数节砍掉,使留下的部分原封不动,在土壤中停留一些时间,则竹笋节与节空隙部会贮留许多无色、无臭、黏性竹液,取这些竹液,灭菌,将其自然发酵或接入酵母发酵20d而制成。

信息窗