

文章编号:1671-5497(2006)03-0438-05

超高压提取山楂叶中黄酮类化合物

李宏伟^{1,2}, 张守勤¹, 窦建鹏¹, 奚玉石¹

(1. 吉林大学生物与农业工程学院, 长春 130022; 2. 吉林省经济管理干部学院, 长春 130021)

摘要:为了研究超高压提取山楂叶中黄酮类化合物的最佳工艺,采用超高压技术常温提取,正交试验优化,分光光度法检测山楂叶中黄酮类化合物的含量。结果表明:超高压提取山楂叶中黄酮类化合物的最佳提取工艺参数为:提取溶剂为50%乙醇,提取压力为400 MPa,料液比为1:45,提取温度为60℃,提取时间为3 min。该超高压提取工艺具有提取效率高、时间短、杂质含量少等优点。

关键词:生物药理学;山楂叶;黄酮类化合物;超高压提取;正交实验

中图分类号:R284.2;TQ914.1 **文献标识码:**A

High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from Hawthorn leaves

Li Hong-wei^{1,2}, Zhang Shou-qin¹, Dou Jian-peng¹, Xi Yu-shi¹

(1. College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China; 2. Economic Management Staffer College of Jilin Province, Changchun 130021, China)

Abstract: High hydrostatic pressure extraction (HHPE) technique was used to extract flavonoids from Hawthorn leaves at normal temperature. The content of flavonoids was determined by UV-spectrophotometry. Parameters that may influence the extraction process were investigated. Orthogonal test was applied to obtain the optimum extraction condition, which was as follows: solid dissolved in 50% ethanol, ratio of raw Hawthorn leaves (g) to solvent (ml) of 1:45, temperature of 60℃, extraction pressure of 400 MPa and extraction time of 3 min. Results of this work show that HHPE possesses several advantages over other extraction methods, such as higher efficiency, shorter extraction time, and less impurity in the extracted flavonoids.

Key words: biological pharmacology; hawthorn leaves; flavonoids; high hydrostatic pressure extraction; orthogonal experiment

0 引言

山楂叶为蔷薇科植物山里红 *Crataegus Pinnatifida* Bge. Var. Major N. E. Br. 或山楂

Crataegus Pinnatifida Bge. 的干燥叶,含有丰富的黄酮类化合物,对心脑血管疾病有显著疗效。目前常用的提取方法主要分为热水提取法^[1]、乙醇回流法^[2-4]和酶法^[5,6]。这些方法存在提取时间长、提取液中杂质多(如无机盐、蛋白质、糖等)、

收稿日期:2005-12-23.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472135).

作者简介:李宏伟(1961-),男,博士研究生.研究方向:天然药物有效成分提取. E-mail:lhw610626@yahoo.com.cn

通讯联系人:张守勤(1946-),男,教授,博士生导师.研究方向:天然药物有效成分提取. E-mail:sqzhang@email.jlu.edu.cn

分离困难、能耗高、热敏性化合物易发生变性等不足。超高压提取技术^[7,8]是一种新兴的天然药物有效成分提取技术。先利用100 MPa以上的流体静压力作用于料液上,经过短时间提取后迅速卸压,然后再进行分离纯化。作者将超高压提取技术应用于山楂叶黄酮提取,建立了一种省时、高效的山楂叶黄酮提取的新工艺。

1 仪器与材料

DL700 超高压等静压机(上海大隆机器厂),UV757CRT 紫外可见分光光度计(上海分析仪器厂),MV110 电子天平(上海天平仪器厂),RE-52 旋转蒸发器(上海安亭电子仪器厂)。

山楂叶由长春三九药业提供(产地山东);芦丁对照品购于中国药品与生物制品签定所;其他试剂皆为分析纯。

2 方法与结果

2.1 材料的处理

将山楂叶置于70℃真空干燥箱中恒温干燥6h,取出后粉碎成40目粉末,混和均匀,置于黑色塑料袋内避光保存。

2.2 山楂叶黄酮类化合物的提取

精密称取山楂叶粉末1g,准确加入一定量的溶剂,塑封,混匀,按预先设计的高压参数处理,过滤,定容。用分光光度法测吸光度值。

2.3 山楂叶黄酮的测定

对照品溶液的制备:精密称取干燥至恒重的芦丁对照品25mg,置50mL量瓶中,加乙醇适量,于30℃水浴锅中加热,使之溶解,放冷,加乙醇至刻度,摇匀。精密量取20mL,置50mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,得对照品标准液。

标准曲线的制备:精密量取对照品溶液1、2、3、4、5、6mL,分别置于25mL量瓶中,各加水至6mL,加5%亚硝酸钠溶液1mL,摇匀,放置6min;加10%硝酸铝溶液1mL,摇匀,放置6min;加4%氢氧化钠溶液10mL,再加水至刻度,摇匀,放置15min。以相应试剂为空白,立即用分光光度法在500nm的波长处测吸光度(A)值。以吸光度为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线。回归方程为: $C=0.077A$, $r=0.9998$ 。

样品测定:精密量取上述待测液1mL并置于

25mL容量瓶中。加水至6mL,加5%亚硝酸钠溶液1mL,摇匀,放置6min;加10%硝酸铝溶液1mL,摇匀,放置6min;加4%氢氧化钠溶液10mL,再加水至刻度,摇匀,放置15min。以相应试剂为空白,立即按照紫外-可见分光光度法,在500nm的波长处测吸光度(A)值计算山楂叶黄酮提取率Y(%)。

$$Y = \{ [(0.077 \times A \times V) / V_1] / m \} \times 100\%$$

式中:A为吸光度值;V为过滤后定容总体积;V₁为检测时所取溶液体积;m为山楂叶样品质量。

2.4 单因素试验及结果

2.4.1 溶剂体积分数的选择

精密称取2g山楂叶干燥粉末(40目)6份,分别加入体积分数为0%、10%、30%、50%、70%、90%的乙醇,料液比为1:20(g:mL)。密封,加压300MPa,提取时间5min,温度为25℃。卸压后过滤,定容于100mL容量瓶,摇匀,在500nm处测定吸光度值,计算黄酮提取率(如图1所示)。

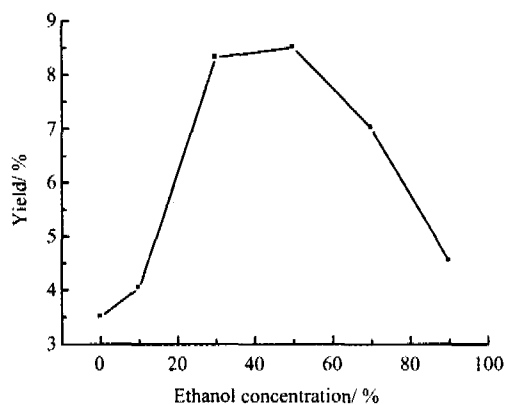


图1 乙醇体积分数对提取率的影响

Fig. 1 Effects of ethanol concentrations on yield

使用不同体积分数的乙醇,山楂叶黄酮提取率不同。从图1可以看出,乙醇对山楂叶黄酮提取率影响显著,当乙醇体积分数达到50%时,可以获得较高的提取率。

通过实验可以发现,在提取过程中乙醇的体积分数对总黄酮的提取有较大影响,乙醇的体积分数增高有利于总黄酮的提取,这与黄酮类物质的结构有关。乙醇体积分数增大,黄酮苷元类化合物的溶解性增大,脂溶性黄酮类化合物的溶解性也随之增大,因此,在乙醇体积分数为0~50%内,总黄酮的提取率随乙醇体积分数的增大而增加。但黄酮苷类化合物随乙醇体积分数的增大反而降低,当乙醇体积分数超过一定的范围,随乙醇

体积分数的增大,总黄酮的提取率反而降低。

2.4.2 压力的选择

精密称取 2 g 山楂叶干燥粉末 6 份,分别加入体积分数为 50% 的乙醇,料液比为 1:20 (g:mL)。密封,分别加压 100、200、300、400、500、600 MPa,提取时间 5 min,温度为 25 °C。卸压后过滤,定容于 100 mL 容量瓶,摇匀,在 500 nm 处测定吸光度值,计算提取率(如图 2 所示)。

从图 2 可以看出,压力对提取率有影响,压力从 100 MPa 变化到 600 MPa 的过程中,在 400 MPa 时提取率最高,压力大于 400 MPa 后,随压力增大,提取率有降低的趋势。

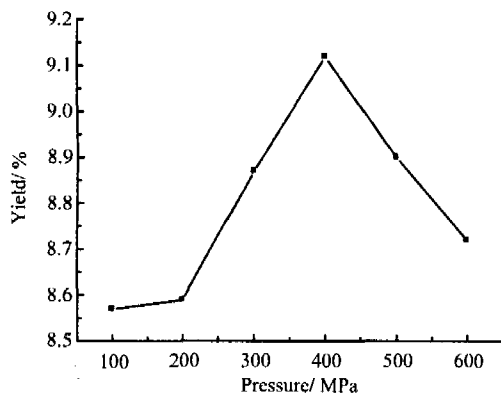


图 2 压力对提取率的影响

Fig. 2 Effects of different pressures on yield

提取压力对黄酮得率的影响是多方面的。一方面增大提取压力可以增加提取溶剂向固体组织的渗透速率,使固体组织内部快速充满溶剂,缩短提取时间;另一方面增大压力使组织细胞内外的压力差增大,卸压时提供的反向压力差大,在有效成分向组织外扩散过程中,提供了足够大的传质动力,有效成分快速扩散到固体组织外。此外,增大提取压力对固体组织的破坏程度增大,提取溶剂和固体组织接触面积增大,有效成分的溶解更加迅速、完全,提取收率增大。

2.4.3 料液比的选择

精密称取 2 g 山楂叶干燥粉末 6 份,分别加入体积分数为 50% 乙醇,固液比为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 (g:mL)。密封,加压 400 MPa,温度为 25 °C,提取时间 5 min。卸压后过滤,定容于 100 mL 容量瓶,摇匀,在 500 nm 处测定吸光度值,计算提取率(如图 3 所示)。

从图 3 可以看出,料液比对山楂叶黄酮提取率有影响,当料液比大于 1:40 以后,提取率不发

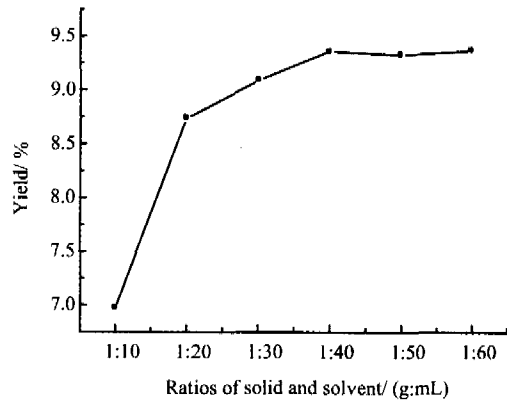


图 3 料液比对提取率的影响

Fig. 3 Effects of solid and solvent ratios on yield

生明显变化,所以 1:40 的料液比接近最佳值。

料液比对山楂叶黄酮提取率有影响主要表现在:料液比增大,有效成分在由固体组织向外扩散的过程中,浓度梯度增大,扩散速率提高,有利于提高提取率。但超高压提取过程能够提供一个超高压差,以提高有效成分的传质速率,因此料液比超过一定比例后,对提取率的影响并不大。

2.4.4 温度的选择

精密称取 2 g 山楂叶干燥粉末 6 份,分别加入浓度为 50% 乙醇。密封,加压 400 MPa,料液比 1:40 (g:mL),提取时间 5 min,温度分别为 30、40、50、60、70、80 °C。卸压后过滤,定容于 100 mL 容量瓶,摇匀,在 500 nm 处测定吸光度值,计算提取率(如图 4 所示)。

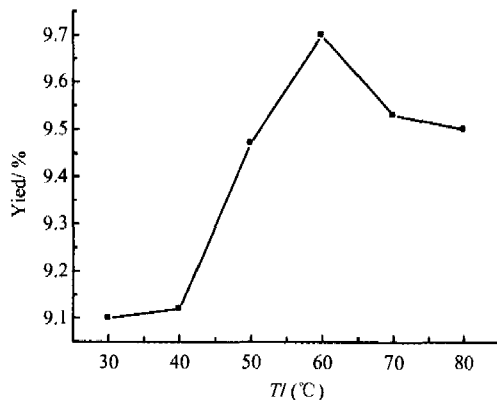


图 4 提取温度对提取率的影响

Fig. 4 Effect of different extracting temperature on yield

由图 4 可知,温度对山楂叶黄酮提取率有较大影响,提取温度在 40 °C 及以下时提取率偏低,高于 40 °C 时提取率显著提高,其中 60 °C 时提取率最高,温度再升高时提取率变化不大。这是因

为山楂叶黄酮主要存在于细胞内的液泡中,较高的温度能加快分子运动速率,利于溶剂分子有效地渗透进组织细胞,同时也能软化表面的细胞壁,降低黄酮类化合物由组织细胞内向外扩散的传质阻力,提高提取率。但许多黄酮化合物在高温下不够稳定,产生降解,因此温度过高提取率增加不大,甚至出现明显的下降。

2.4.5 提取时间的选择

精密称取 2 g 山楂叶干燥粉末 6 份,分别加入浓度为 50% 的乙醇,固液比为 1:40 (g:mL)。密封,加压 400 MPa,温度 60 °C,提取时间分别为 1、2、3、5、7、9 min。卸压后过滤,定容于 100 mL 容量瓶,摇匀,在 500 nm 处测定吸光度值,计算提取率(如图 5 所示)。

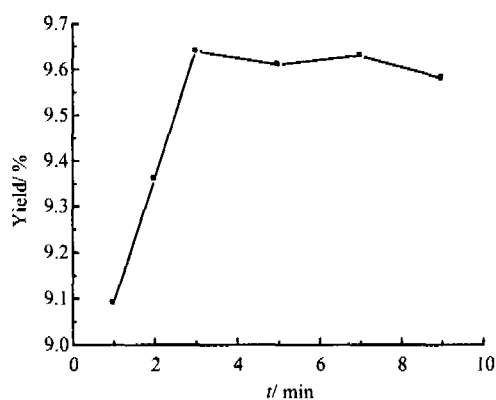


图 5 提取时间对提取率的影响

Fig. 5 Effects of different extracting time on yield

从图 5 可以看出,在 3 min 以内,随着提取时间的增加,山楂叶黄酮提取率逐渐增加;到 3 min 时山楂叶黄酮提取率达到最高;时间进一步延长则提取率不再提高。因此选择 3 min 作为提取时间最佳值,在正交试验中提取时间不作为考虑的因素。

2.4.6 正交试验结果与数据分析

在以上单因素试验基础上,对影响山楂叶黄酮类化合物超高压提取效果的因素乙醇浓度(A)、提取压力(B)、料液比(C)、温度(D)进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,并对试验结果分析(如表 1 所示)。

从表 1 可以看出:在正交试验所选条件范围内,4 个因素对提取效果影响的顺序为: A (乙醇浓度) > B (提取压力) > C (料液比) > D (温度)。最佳工艺条件为:溶剂为 50% 浓度乙醇,压力为 400 MPa,山楂叶粉末质量与溶剂体积比为 1:45,温度为 60 °C,提取时间为 3 min。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案及结果

Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal test and results

试验号	A/%	B/MPa	C/(g·mL ⁻¹)	D/°C	收率 Y/%
1	40	300	1:35	50	9.02
2	40	400	1:40	60	9.37
3	40	500	1:45	70	9.41
4	50	500	1:35	50	9.68
5	50	500	1:40	50	9.68
6	50	300	1:45	60	9.67
7	60	500	1:35	60	9.36
8	60	300	1:40	70	9.43
9	60	400	1:45	50	9.26
R_1	9.27	9.25	9.37	9.32	
R_2	9.57	9.49	9.33	9.47	
R_3	9.35	9.45	9.48	9.40	
R	0.303	0.246	0.153	0.147	
优水平	A ₂	B ₂	C ₃	D ₂	
主次因素	A, B, C, D				
最优组合	A ₂ B ₂ C ₃ D ₂				

3 讨论

(1) 使用不同浓度乙醇,过滤液有明显差异。使用体积分数为 90%、80%、70% 乙醇高压提取时,过滤液浑浊,静置 3 h 后,发现出现沉淀。使用体积分数为 30%、20%、10% 乙醇时,过滤液不浑浊,但过滤困难。使用体积分数为 60%、50%、40% 的乙醇时,提取液澄清度好,所含杂质少,而且在 400 MPa 的压力下还有灭菌的效果。这预示着超高压提取技术有可能在提高中药注射剂的稳定性方面有所作为。

(2) 在超高压的条件下,温度对山楂黄酮的提取率也具有重要影响。在一定的温度范围内,山楂黄酮的提取率随着温度的升高而增加,但超过 60 °C 以后,山楂黄酮的提取率出现逐渐降低的趋势。这可能是由于在较高的温度下,山楂黄酮发生分解造成的。

(3) 超高压提取过程中,由于压力较高,大大加快了溶剂的浸润过程和溶质扩散过程,从而提高了有效成分的传质速度。在非常短的时间内,有效成分就能被完全提取出来,山楂叶中的黄酮的提取时间仅为 3 min,与传统的热回流法相比,大大缩短了提取时间。

(4)虽然超高压提取技术在中药有效成分提取方面有许多优点,但其应用研究还处于起步阶段,还有许多问题有待于研究。例如超高压不会影响生物小分子的结构,但在山楂叶黄酮提取过程中,当提取压力大于400 MPa后,随着压力增大,提取率反而降低,其原因还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Chu Chia-yih, Lee Miao-jane, Liao Chuen-lan. Inhibitory effect of hot-water extract from dried fruit of *Crataegus pinnatifida* on low-density lipoprotein (LDL) oxidation in cell and cell-free systems [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 7583-7588.
- [2] Zhang Pei-cheng, Xu Sui-xu. Flavonoid ketohexose-furanosides from the leaves of *Crataegus pinnatifida* bge. var. major N. E. Br. [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(8): 1249-1253.
- [3] 王威,周增辉,崔妍,等. 山楂叶黄酮物质提取方法的研究及结构分析[J]. *中国食品添加剂*, 2000(4): 7-11.
Wang Wei, Zhou Zeng-hui, Cui Yan, et al. Studies on the method of flavones extraction from Chinese Hawthorn leaf and analysis of the basic structure [J]. *China Food Addictives*, 2000(4): 7-11.
- [4] 张世润,王丽娟,刘守新,等. 山楂叶中黄酮类化合物提取工艺条件的筛选[J]. *东北林业大学学报*, 2001, 29(4): 71-72.
Zhang Shi-run, Wang Li-juan, Liu Shou-xin, et al. The optimum extraction conditions of flavonoids in Hawthorn leaves [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2001, 29(4): 71-72.
- [5] 陈炳华,张清其,谢必峰,等. 酶解法对山楂总黄酮提取及含量分析的影响[J]. *福建师范大学学报:自然科学版*, 1997, 13(4): 90-93.
Chen Bing-hua, Zhang Qing-qi, Xie Bi-feng, et al. A study of the influence of enzymolysis over the extraction and content analysis of flavones in *Crataegus pinnatifida* [J]. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 1997, 13(4): 90-93.
- [6] 王晓,李林波,马小来,等. 酶法提取山楂叶中总黄酮的研究[J]. *食品工业科技*, 2002, 23(3): 37-39.
Wang Xiao, Li Lin-bo, Ma Xiao-lai, et al. Studies on total flavone from *Crataegus pinnatifida* Bge leaves by enzymatic extraction [J]. *Sci and Technol of Food Indus*, 2002, 23(3): 37-39.
- [7] Zhang Shou-qin, Zhu Jun-jie, Wang Chang-zheng. Novel high pressure extraction technology [J]. *Int J Pharm*, 2004, 278: 471-474.
- [8] Zhang Shou-qin, Xi Jun, Wang Chang-zheng. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2005, 80: 50-54.

(责任编辑 曹敏)