

# 红香椿理化性质测定及其活性物质的提取工艺

陈春刚<sup>1</sup>, 韩芬霞<sup>2</sup>, 刘本国<sup>1</sup>, 路建峰<sup>1</sup>, 牛生洋<sup>1</sup>, 李 波<sup>1</sup>

(1.河南科技学院食品学院, 河南 新乡 453003; 2.河南科技学院动物科学学院, 河南 新乡 453003)

**摘 要:** 对红香椿的理化指标进行了测定, 结果表明其水分含量为 83.7%, 粗蛋白、粗脂肪的含量分别为 23.2% 和 10.4% (干基), 富含人体必需氨基酸, 苏氨酸、赖氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸以及不饱和脂肪酸亚油酸和亚麻酸。采用响应面法研究了红香椿中总类黄酮的提取工艺, 最佳提取工艺条件为: 乙醇浓度 82%、浸提温度 60 °C、料液比 1:19、浸提 15min, 在此条件下提取率高达 98.27% ± 0.31%, 其总类黄酮的含量为 3.1% (干基)。

**关键词:** 香椿; 响应面; 类黄酮

## Analysis of Chemical Components in Red *Toona sinensis* Burgeon and Extraction of Total Flavonoids from It

CHEN Chun-gang<sup>1</sup>, HAN Fen-xia<sup>2</sup>, LIU Ben-guo<sup>1</sup>, LU Jian-feng<sup>1</sup>, NIU Sheng-yang<sup>1</sup>, LI Bo<sup>1</sup>

(1. School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology 453003, China;

2. School of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology 453003, China)

**Abstract:** In this study, the contents of the main ingredients in red *Toona sinensis* burgeon were measured, and the results showed that the contents of total water, protein and fat are 83.7%, 23.2% (dry weight) and 10.4% (dry weight), respectively. Red *Toona sinensis* burgeon is rich in the necessary amino acids (threonine, lysine, leucine, and phenylalanine) and unsaturated fat acids (linoleic acid and linolenic acid). By using the response surface methodology, the optimal extraction condition of flavonoids from red *Toona sinensis* burgeon was determined as follows: taking 82% ethanol as extractant, ratio of extractant to material 19:1, temperature 60 °C, and extraction time 15 min. Under these conditions, the yield of total flavonoids is 98.27% ± 0.31% and the total flavonoid content is 3.1% (dry weight).

**Key words:** red *Toona sinensis*; response surface methodology; flavonoids

中图分类号: O625.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)08-0115-05

香椿(*Toona sinensis*), 别名椿甜树、椿阳树, 为楝科香椿属乔木, 药食两用。原产我国, 分布于我国华北至华南和西南各省, 其中山东、河南、河北等省较多<sup>[1]</sup>。香椿是我国传统的木本蔬菜, 风味独特, 富含多种营养素以及类黄酮、生物碱等活性成分, 具有很高的药用价值。安徽太和的黑香椿、红曲椿和河南焦作的红香椿最为出名, 绿香椿叶香味稍淡, 含油脂较少, 品质稍差<sup>[2]</sup>。

类黄酮(flavonoids)是自然界存在的一大类酚类物质, 它们是植物次级代谢的产物, 是一组存在于植物叶、花、果中的天然色素, 在自然界中广泛存在, 因多呈黄色而被称为类黄酮, 至今科学家已发现 4000 多种类黄酮物质<sup>[3]</sup>。天然来源的生物黄酮分子量小, 能被人体迅速吸收, 能通过血脑屏障, 能进入脂肪组织, 主要体现在如下功能: 消除疲劳、保护血管、防动脉硬化、扩张毛细血管、疏通微循环脂肪氧化、抗衰老、

活化大脑及其他脏器细胞<sup>[4-5]</sup>。

近年来对香椿中总类黄酮的研究日益受到重视。但目前系统的对其理化指标(尤其是各种氨基酸和脂肪酸)的测定报道较少。本实验拟在红香椿理化特性的基础上利用响应面法对红香椿中活性物质的提取工艺进行优化, 旨在为红香椿中类黄酮类物质的工业化提取提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

红香椿(3w 嫩芽) 郑州香王经贸有限公司。

无水乙醇、无水乙醚、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、石油醚、芦丁标准品、邻二氮菲、EDTA 钠盐、硫酸亚铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、甲醇、浓硫酸、硫酸铜、无水硫酸钾、甲基红、溴甲酚绿、硼酸、浓盐酸、氯化铁、三氯乙酸、铁氰化钾(以上试剂均为分析纯) 天津科密欧公司; 实验用水均为蒸馏

收稿日期: 2008-06-28

基金项目: 河南科技学院资助项目(4014)

作者简介: 陈春刚(1978-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为食品工艺。E-mail: ccg28@126.com

水 河南科技学院化工系。

## 1.2 仪器与设备

LGJ-18 冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂; Fw-400A 倾斜式高速万能粉碎机 北京中兴伟业仪器有限公司; MD100-2 电子天平 广州红星仪器有限公司; 7200 型可见光分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; SHA-C 水浴恒温振荡器 金坛市杰瑞尔电器有限公司; Anke TDL-50B 离心机 上海安亭科学仪器厂; 100-2 型恒温干燥箱 上海市实验仪器总厂; SHZ-D( ) 循环水真空泵 河南智诚科技发展有限公司; M510(2010) 氨基酸分析柱 美国密理博公司; HP5890 气相色谱仪、HP-Innowax 色谱柱(30m × 0.25mm) 美国惠普公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 样品处理

将香椿芽进行冷冻干燥, 然后粉碎, 原料粒径最好在 0.2~0.5mm, 最大不超过 1mm。原料粒径过大, 给提取造成困难, 粒径过小, 给后续分离操作带来困难。

### 1.3.2 香椿理化指标测定

水分测定: 采用 GB5497—85 105 恒重法; 灰分测定: 采用 GB5505—85 550 灼烧法; 粗脂肪测定: GB5512—85 索氏抽提法; 粗蛋白测定: 采用 GB5511—85 半微量凯氏定氮法。

### 1.3.3 氨基酸组成及含量测定

称取一定量粉碎的样品, 加入 1% 苯酚, 6mol/L 盐酸溶液, 105℃ 水解 24h。水解液经过定容后, 吸取一定量样品, 真空干燥后, 用异硫氰酸衍生剂衍生后再干燥, 然后用上样缓冲液稀释至一定体积, 经过高速离心处理后, 采用氨基酸分析仪进行检测, 检测波长 254nm, 流速 1ml/min, 温度 38℃。

### 1.3.4 脂肪酸组成及含量测定

取 1.0g 左右样品, 加 20ml 石油醚, 浸提 1h, 浓缩, 然后旋转蒸发去除石油醚, 残留物甲酯衍生, 用气相色谱测定其脂肪酸组成。气相色谱条件为: 色谱柱 HP-Innowax(30m × 0.25mm), FID 检测器, 程序升温法, 柱温 150~190℃, 升温速率 3℃/min, 进样口温度 230℃, 检测器温度 230℃, 高纯度氮气压力 25kPa, 氢气压力 60kPa, 空气压力 50kPa, 分流比 50:1, 进样量为 1μl。

### 1.3.5 总类黄酮的鉴定和含量测定

先采用镁粉盐酸反应实验<sup>[6]</sup>(取乙醇提取液 1ml 于试管中加镁粉, 再加入浓盐酸数滴, 观察其颜色的变化) 对提取物进行鉴定, 参照参考文献<sup>[7]</sup>绘制芦丁浓度-吸光度标准曲线, 参照文献<sup>[8]</sup>测定样品中总类黄酮的含量。

### 1.3.6 样品中类黄酮的提取

称取 Mg(2g 左右) 经过脱脂处理的样品, 放入 150ml

锥形瓶中, 加入一定体积、一定浓度的乙醇溶液, 在确定的温度下, 振荡提取一定时间。提取完毕后, 立刻抽滤, 用乙醇溶液洗涤锥形瓶和抽滤瓶, 滤液和洗液转入 100ml 容量瓶, 定容后, 充分混合。准确称取 1ml 定容液于 25ml 容量瓶中, 用 30% 乙醇补充至 12.5ml, 加入 0.7ml 5% 亚硝酸钠, 摇匀放置 5min 后加入 0.7ml 10% 硝酸铝, 6min 后再加入 5ml 1mol/L 氢氧化钠溶液混合均匀, 用 30% 乙醇稀释至刻度, 10min 后于波长 500nm 处测定吸光度, 同时做空白实验。然后在芦丁浓度吸光度的标准曲线上查出相应的类黄酮含量。红香椿黄酮提取率按以下公式计算:

$$\text{样品中总类黄酮的提取率(\%)} = \frac{y \times 25 \times 100}{1000 \times M \times A} \times 100$$

式中: y 为工作曲线上相应的芦丁浓度(g/L); M 为样品质量(g); A 为样品中总类黄酮含量(% )。

### 1.3.6.1 样品中总类黄酮提取的单因素试验

选取水浴温度、乙醇浓度、提取时间、固液比四个可能影响提取效果的因素按照 1.3.6 的方法做单因素试验, 以香椿黄酮的提取率为指标, 确定相关因素的取值范围。

### 1.3.6.2 样品中总类黄酮提取的响应面试验

根据单因素试验所确定的取值范围, 采用 Design-Expert Software 7.0 中 RSM 设计方法, 进行水浴温度、乙醇浓度、提取时间、液固比的四因素三水平共 21 个响应面分析试验(包括 4 个中心点)。

## 2 结果与分析

### 2.1 常见理化指标的含量

表 1 常见理化指标含量

Table 1 Contents of chemical components in red *Toona sinensis* burgeon

指标	水分	灰分	粗脂肪	粗蛋白
含量(%)	83.7	9.2	10.4	23.2

注: 水分以湿重计, 其余以干重计。

### 2.2 氨基酸构成及含量

由红香椿氨基酸分析表(表 2)可以看出香椿中含有 17 种氨基酸, 谷氨酸的含量最多, 约占氨基酸总量的 5.5%, 其次是苏氨酸和天冬氨酸, 分别约为 2.1% 和 1.65%。另外亮氨酸、丝氨酸、丙氨酸、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、缬氨酸含量也较多, 半胱氨酸、蛋氨酸含量较少, 不含谷氨酰胺、天冬酰胺和色氨酸。

表2 氨基酸分析表

Table 2 Analysis results of amino acid composition in red *Toona sinensis* burgeon

氨基酸	峰面积(μV)	峰高	保留时间(min)	含量(mg/100g)
组氨酸	631809	120652	4.017	399.98
精氨酸	1364060	318399	4.300	931.78
甘氨酸	2777790	517600	3.883	884.76
谷氨酸	7692317	1315362	2.067	5504.94
丝氨酸	2668429	499211	3.700	1151.76
天门冬氨酸	2447413	491045	1.867	1655.41
赖氨酸	2764784	385941	10.050	858.84
苯丙氨酸	1156087	196840	8.933	662.00
亮氨酸	2490210	441843	8.017	1163.86
异亮氨酸	1422896	249626	7.850	652.41
半胱氨酸	189817	18402	7.450	57.12
蛋氨酸	520640	72807	6.833	277.21
酪氨酸	1158747	202438	5.917	712.19
缬氨酸	1991760	375199	6.450	831.36
丙氨酸	2498719	592612	4.583	949.73
脯氨酸	2845189	468155	4.683	882.00
苏氨酸	4161330	622241	4.433	2089.94

### 2.3 脂肪酸构成及含量

由脂肪酸分析表(表3)可以看出香椿中含有多种脂肪酸,其中以不饱和脂肪酸亚油酸和亚麻酸的含量较多,分别为亚油酸(31%)和亚麻酸(31%)。

表3 脂肪酸分析表

Table 3 Analysis results of fatty acid composition in red *Toona sinensis* burgeon

序号	保留时间(min)	峰面积(PA · s)	面积比(%)	脂肪酸
1	8.442	1114	0.793	C <sub>14:0</sub>
2	11.926	29677	21.122	C <sub>16:0</sub>
3	15.183	1363	0.970	C <sub>16:1</sub>
4	20.275	2190	1.559	C <sub>18:0</sub>
5	21.439	2386	1.698	C <sub>18:1</sub>
6	24.503	43732	31.126	C <sub>18:2</sub>
7	28.866	43591	31.025	C <sub>18:3</sub>
8	32.765	4728	3.365	C <sub>20:1</sub>
9	36.230	744	0.529	C <sub>21:0</sub>
10	37.956	3920	2.790	C <sub>22:1</sub>
11	38.446	5432	3.866	未知
12	43.465	1623	1.156	C <sub>24:0</sub>

### 2.4 类黄酮类物质的定性实验结果

按照1.3.5的方法发现形成了紫红色的物质,发生了类黄酮类物质的特有反应,可以认为提取物中含有类黄酮类物质。

### 2.5 类黄酮总量及提取率

#### 2.5.1 芦丁标准曲线

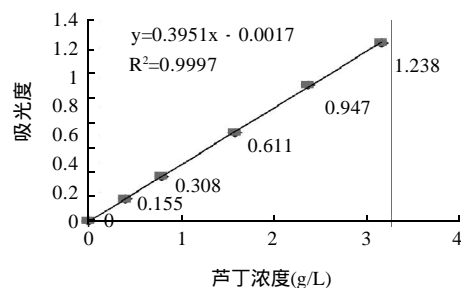


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 Standard curve of rutin

#### 2.5.2 提取率

##### 2.5.2.1 单因素试验设计

选取提取时间、液料比、温度和乙醇浓度作为主要影响因素,其单因素试验结果分别如图2~5。

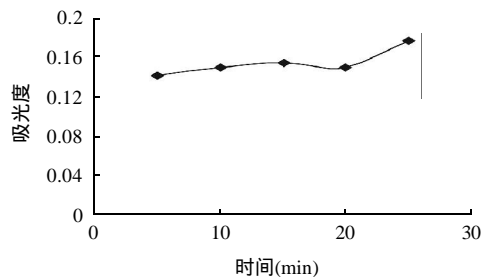


图2 时间对提取率的影响

Fig.2 Effects of extraction time on extraction yield of total flavonoids

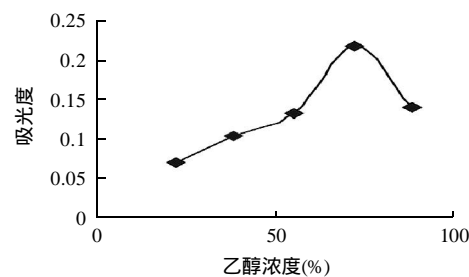


图3 乙醇浓度对提取率的影响

Fig.3 Effects of ethanol concentration on extraction yield of total flavonoids

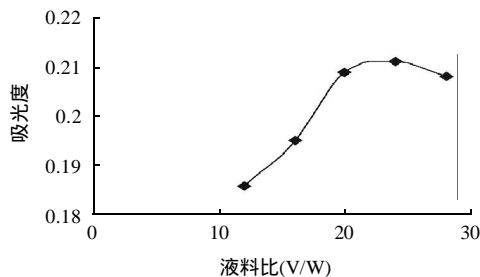


图4 液料比对提取率的影响

Fig.4 Effects of extractant to material ratio on extraction yield of total flavonoids

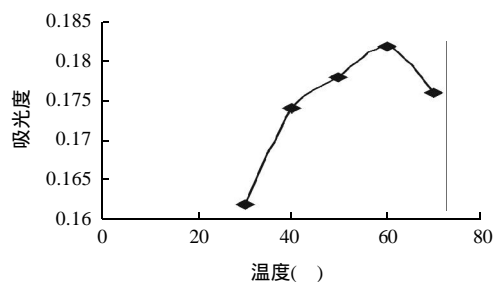


图5 温度对提取率的影响

Fig.5 Effects of temperature on extraction yield of total flavonoids

由单因素分析可知,各个单因素对类黄酮提取率的影响程度,可以得到响应面试验的因素水平范围,见表4。

表4 响应面试验因素水平表  
Table 4 Factors and levels of response surface test

因素	水平		
	-1	0	1
A 提取时间(min)	5	10	15
B 乙醇浓度(%)	60	80	100
C 液料比(V/W)	10	15	20
D 温度(°C)	50	60	70

### 2.5.2.2 响应面分析

使用 Design-Expert Software7.0 中的响应面设计法(RSM),进行水浴温度、乙醇浓度、提取时间、液固比的四因素三水平共21个实验(包括4个中心点)的响应面分析试验,结果如表5所示。

表5 响应面试验设计表  
Table 5 Response surface test design and results

试验号	A 时间(min)	B 乙醇浓度(%)	C 液料比(V/W)	D 温度(°C)	提取率(%)
1	10	80	15	60	97.2
2	10	80	20	60	94.8
3	10	80	15	60	97.6
4	15	80	15	60	94.4
5	15	80	10	70	76.4
6	10	80	15	60	90.4
7	10	80	10	60	82.4
8	10	80	15	50	86.4
9	15	100	10	50	72.8
10	10	80	15	50	88.8
11	10	80	15	60	90.8
12	5	100	10	70	89.6
13	5	60	20	50	69.2
14	5	100	15	70	79.6
15	10	80	15	60	97.6
16	10	100	20	60	90.4
17	10	60	15	60	76.8
18	5	80	15	60	95.2
19	15	60	20	70	92.0
20	15	100	20	50	84.4
21	5	60	20	50	81.2

Design-Expert Software7.0 对表3中的实验数据进行分析后,推荐使用二次方程式的数学模型。红香椿中总类黄酮提取率的数学模型如下:

$$\begin{aligned} \text{提取率} = & -299.12968 - 7.38312A + 4.9794B + 8.78232C + \\ & 4.95532D - 0.0495AB + 0.126AC + 0.117AD - 0.0325BC - 5.75 \\ & \times 10^{-3}BD - 0.045CD + 0.11766A^2 - 0.020646B^2 - 0.13034C^2 - \\ & 0.042586D^2 \end{aligned}$$

表6 响应面分析表

Table 6 Variance analysis of regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	1341.91	14	95.85	6.14	0.0173	显著
A	0.32	1	0.32	0.020	0.8909	
B	92.48	1	92.48	5.92	0.0509	
C	173.06	1	173.06	11.08	0.0158	
D	2.88	1	2.88	0.18	0.6826	
AB	39.20	1	39.20	2.51	0.1642	
AC	79.38	1	79.38	5.08	0.0651	
AD	54.76	1	54.76	3.51	0.1103	
BC	84.50	1	84.50	5.41	0.0590	
BD	2.12	1	2.12	0.14	0.7255	
CD	40.50	1	40.50	2.59	0.1585	
A <sup>2</sup>	22.09	1	22.09	1.41	0.2793	
B <sup>2</sup>	174.12	1	174.12	11.15	0.0156	
C <sup>2</sup>	27.11	1	27.11	1.74	0.2358	
D <sup>2</sup>	46.30	1	46.30	2.96	0.1359	
残差	93.736		15.62			
失拟	36.962		18.48	1.30	0.3668	不显著
纯误差	56.774		14.19			
总平方和	1435.67		20			

由表6可以看出,  $p=0.0173$  说明应变量与全体自变量之间的线性关系显著,即这种试验方法可靠。在本试验设定的区域范围内,只有液料比对红香椿中总类黄酮的提取率影响显著( $p=0.0156$ ),而时间、浓度、温度以及它们之间的交互作用均对提取率的影响不显著( $p>0.05$ )。

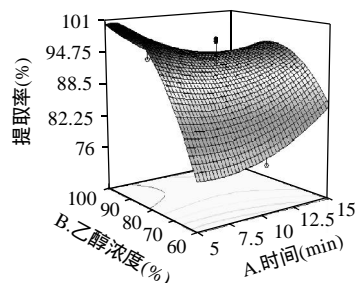


图6 时间与浓度的交互作用对提取率的影响

Fig.6 Response surface plot for effects of extraction time and ethanol concentration on extraction yield of total flavonoids

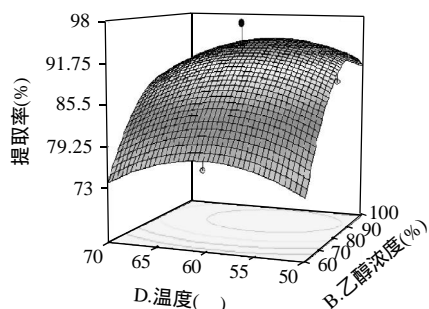


图7 浓度与温度的交互作用对提取率的影响

Fig.7 Response surface plot for effects of ethanol concentration and temperature on extraction yield of total flavonoids

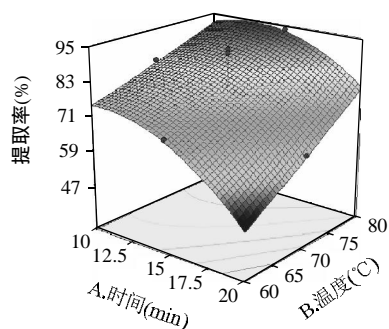


图8 时间、温度的交互作用对提取率的影响

Fig.8 Response surface plot for effects of extraction time and temperature on extraction yield of total flavonoids

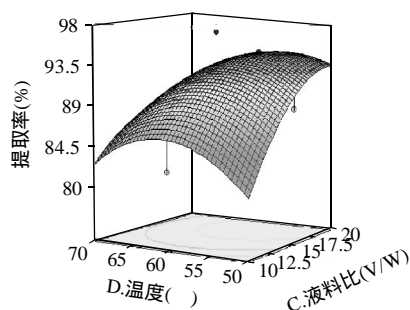


图9 液料比、温度的交互作用对提取率的影响

Fig.9 Response surface plot for effects of extractant to material ratio and temperature on extraction yield of total flavonoids

RSA 方法的图形如图 6~9 所示。图 6~9 中图形是特定响应值 Y 分别与对应的因素 A、B、C、D 构成的一个三维空间图,可以直观地反映各因素以及它们之间

的交互作用对响应值的影响。从试验所得响应值分析图可看出它们在反应过程中的相互关系,确定合适的工艺条件。

由响应面试验可以得到软件推荐的最佳工艺如下:提取时间 14.90min,乙醇浓度 82.13%,液料比为 18.87,提取温度 60.42,总类黄酮提取率为 99.1984%。

### 2.5.2.3 验证实验

根据响应面试验所推荐的最适条件,提取温度为 60.40 (取 60)、提取时间为 14.90 min(取 15min)、液料比 18.87(取 19)、乙醇浓度为 82.13%(取 82%),经三次平行试验测得总类黄酮得率为  $98.27\% \pm 0.31\%$ ,与理论值 99.2% 差异不显著,说明该预测值是可靠的。

## 3 结 论

通过对红香椿的理化指标的测定表明:红香椿中水分含量为 83.7%;粗蛋白含量丰富,约为 23.2%(干基);含有 17 种氨基酸,其中以谷氨酸的含量最多,约占氨基酸总量的 5.5%,其次是苏氨酸和天冬氨酸,分别约为 2.1% 和 1.65%,不含谷氨酰胺、天冬酰胺和色氨酸;脂肪的含量也较高约为 10.4%(干基),其中以不饱和脂肪酸亚油酸和亚麻酸的含量较多。

通过响应面试验得到了红香椿中总黄酮的含量为 3.1%,最佳提取条件为:乙醇浓度 82%、浸提温度 60、浸提时间 15min、料液比 1:19。在此条件下红香椿中总类黄酮的提取率可达  $98.27\% \pm 0.31\%$ 。

### 参考文献:

- [1] 李世俊,胡永金.香椿叶提取物抗氧化活性研究[J].安徽农业科学,2007,35(22):6807-6810.
- [2] 彭芳仁,梁有旺.香椿的生物学特性及开发利用前景[J].林业科技开发,2005,19(3):3-6.
- [3] 兰丹,文略,王小萍,等.红薯叶中总黄酮提取工艺的研究[J].微量元素与健康研究,2007(1):47-48.
- [4] 胡春.黄酮类化合物的抗氧化性质[J].中国油脂,1996,21(4):18-21.
- [5] 张庆建,赵毅民,杨明,等.黄酮类化合物对中枢神经系统的作用[J].中药材杂志,2001,26(8):511-514.
- [6] 黄晓冬,朱加元,黄晓昆,等.南方碱蓬叶总黄酮提取工艺研究[J].海峡药学,2007(9):30-31.
- [7] 李志洲,刘军海.草莓中黄酮的提取及其抗氧化性研究[J].食品研究与开发,2007(7):31-32.
- [8] 刘本国,朱永义.苦荞中生物类黄酮提取工艺的研究[J].粮食与饲料工业,2004(4):23-25.