

复合酶法提取酸枣仁黄酮研究

张明春, 解军波, 李 婷, 陈衍芬, 刁瑞丽, 马古纯, 马占新, 瞿敬波
(天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300314)

摘 要: 以水提工艺为对照, 研究了纤维素酶与果胶酶复合酶法提取酸枣仁黄酮新工艺。优化出最佳工艺条件: 酶解温度为 40℃, 酶解液初始 pH 值为 4.0, 纤维素酶与果胶酶比为 1:1, 30U/g 酸枣仁, 酶解时间为 5h, 提取。复合酶工艺的酸枣仁黄酮提取率比传统水提工艺提高了 54.67%。

关键词: 酸枣仁; 黄酮; 提取

Extraction of Flavonoids from Seed of Wild Jujube by Complex Enzyme Method

ZHANG Ming-chun, XIE Jun-bo, LI Ting, CHEN Yan-fen, DIAO Rui-li, MA Gu-chun,
MA Zhan-xin, QU Jing-bo

(School of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin Key Laboratory of Food
Biotechnology, Tianjin 300134, China)

Abstract: Objective: To increase extraction rate flavonoids from seed of wild jujube. Methods: The complex enzyme method and water extraction method of flavonoids were optimized respectively, and they were compares. Results: The optimal extraction conditions of flavonoids by complex enzyme method are hydrolysis temperture 40℃, pH of hydrolysis ratio of cellulase to pectinase to pectinase 1:1, enzyme amount 30 U/g seed of wild jujube and hydrolysis time 5 h. Conclusion: The extraction rate of flavonoids by complex enzyme technology is 54.67% higher than that by traditional water exaction.

Key words: seed of wild jujube; flavonoids; extraction

中图分类号: O623.54

文献标识码: A

文章编号 1002-6630(2008)09-0174-04

随着社会的发展, 竞争的激烈, 人们的工作压力越来越大, 随之产生的焦虑、失眠等症状也不断困扰着人们的正常生活, 但镇静催眠药品对神经系统有不同程度的毒副作用, 使得对具有改善睡眠的天然植物保健品的研究和开发突显其非常的意义。酸枣仁是鼠李科植物酸枣(*Zizyphus spinosa* Hu) 的成熟种子, 实验证明, 其中的黄酮类化合物有镇静催眠作用^[1-3]。

酸枣仁黄酮被包裹在细胞壁内, 细胞壁是提取黄酮的主要屏障。细胞壁由纤维素、半纤维素、果胶质、木质素等物质构成了致密的结构。在提取黄酮过程中, 必须克服细胞壁及细胞间质的阻力, 使黄酮成分向提取介质扩散, 溶于介质, 被提取出来。纤维素酶和果胶酶可以使细胞壁及细胞间质中的纤维素、半纤维素、果胶质等物质降解, 破坏细胞壁的致密构造, 减小细胞壁、细胞间质等传质屏障对黄酮成分从胞内向提取介质扩散的传质阻力, 从而有利于黄酮成分的溶出。酶法

提取黄酮过程的实质是通过酶解纤维素、半纤维素和果胶质, 强化黄酮的传质过程。本实验以水提为对照, 研究了纤维素酶^[4-5]和果胶酶复合酶法提取酸枣仁黄酮的工艺, 并优化出最佳提取工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酸枣仁黄酮 中国药品生物制品检定所; 酸枣仁 (*Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa* (Bunge)Hu ex. H. F.) 天津蓟县。

UV-7504 紫外-可见分光光度仪 上海欣茂有限公司; 旋转蒸发仪(RE-52AA) 上海亚容生化厂; SHB-B95A 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司。

1.2 方法

1.2.1 酸枣仁黄酮含量测定

采用紫外分光光度法, 以酸枣仁黄酮为标准品, 测

收稿日期: 2008-05-20

基金项目: 天津市科委科技支撑计划项目(07ZCKFNC00300)

作者简介: 张明春(1956-), 女, 副教授, 硕士, 主要从事天然生物活性物质的提取研究。E-mail: zhmchun@ticu.edu.cn

定总黄酮的含量。

1.2.2 标准品溶液的配制

精密称取酸枣仁黄酮对照品 10.44mg, 置于 100ml 容量瓶中, 加甲醇溶解, 并定容至刻度, 摇匀。即得浓度为 0.1044mg/ml 的对照品储备液。

1.2.3 最大吸收波长的选择

取 0.1044mg/ml 对照品储备液 2ml, 在紫外分光光度计上进行全波长扫描, 最大吸收波长: 257.6nm。

1.2.4 黄酮标准曲线的制备

精密吸取酸枣仁黄酮对照品溶液 1.25、2.5、3.75、5.0、6.25ml 分别置于 25ml 的容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用紫外-可见分光光度计($\lambda_{\max} = 257.6\text{nm}$)进行测定。以浓度 X 对吸光度 Y 进行直线回归, 得回归方程: $Y = 37.713X - 0.0095$, $R^2 = 0.9996$ 。如图 1 所示。

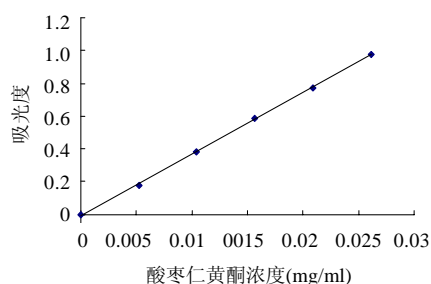


图 1 酸枣仁黄酮标准曲线

Fig.1 Standard curve of flavonoids

1.2.5 样品溶液的制备

精密称取样品 1.0g。置索氏提取器中, 用石油醚 (60~90℃) 水浴回流脱脂两次, 每次 2h。弃去石油醚提取液。待挥干石油醚后, 置干燥箱中 60℃ 干燥 4h, 移至干燥器中放至室温, 加蒸馏水 24ml, 加热回流两次, 每次 1h, 放冷至室温, 滤过, 并用 70% 乙醇洗涤样品粉末 (10ml × 2), 将洗液过滤, 将提取液和洗涤液并入 100ml 量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

1.2.6 样品测定

精密吸取样品溶液 5ml 于 25ml 容量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度, 摇匀, 放置 10min。用紫外-可见分光光度计($\lambda_{\max} = 257.6\text{nm}$)测定其吸光度。由回归方程计算出各样品的浓度及总黄酮的含量。结果酸枣仁中总黄酮的含量为 8.46mg/g, $RSD = 0.983\%$ ($n=3$)。

1.1.6 稳定性实验

按照样品测定方法操作, 分别在 0、10、20、40、60、90、120min 测定同一样品溶液的吸光度, 计算 RSD 分别为 0.58% 和 1.64%, 结果表明样品测定液中黄酮在 2h 内稳定。

1.2.8 重现性实验

取酸枣仁生品约 1.0g, 精密称定。按样品的测定方法测定。做 10 份, 其含量分别为 8.32、8.26、8.17、8.68、8.34、8.71、8.44、8.51、8.49、8.26mg, $X = 8.418\text{mg/g}$, $RSD = 1.83\%$ 。

2 结果与分析

2.1 酸枣仁黄酮水提工艺

2.1.1 正交设计

2.1.1.1 因素与水平

本实验以固液比、提取时间、提取次数、醇沉浓度为考察因素, 每个因素设三个水平, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计, 以酸枣仁中总黄酮苷得率为考察指标, 筛选酸枣仁中总黄酮苷的最佳提取工艺条件见表 1。

表 1 酸枣仁黄酮水提工艺正交因素水平表

Table 1 Orthogonal design for flavonoids extraction with water

水平	因素			
	A 固液比(g/ml)	B 提取时间(min)	C 提取次数	D 醇沉浓度(%)
1	1:08	30	1	70
2	1:10	60	2	80
3	1:12	90	3	90

2.1.1.2 正交试验

按照正交 $L_9(3^4)$ 表进行水提工艺正交实验, 结果见表 2。

表 2 酸枣仁黄酮水提工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Result of orthogonal design $L_9(3^4)$ for flavonoids extraction by water

试验号	A	B	C	D	黄酮含量 (mg/mg)	浸膏率(%)
1	1	1	1	1	7.005	8.835
2	1	2	2	2	9.513	9.0955
3	1	3	3	3	5.553	10.028
4	2	1	2	3	5.912	7.6735
5	2	2	3	1	7.256	10.6745
6	2	3	1	2	6.145	7.642
7	3	1	3	2	9.209	11.479
8	3	2	1	3	6.951	8.3955
9	3	3	2	1	8.976	10.989
K ₁	22.071	22.125	20.1	23.236		
K ₂	19.312	23.72	24.4	24.866		
K ₃	25.135	20.673	22.017	18.416		
I ₁	27.959	27.988	24.873	30.499		
I ₂	25.99	28.166	27.758	28.217		
I ₃	30.864	28.659	32.182	26.097		
R ₁	5.823	3.047	4.3	6.45		
R ₂	4.874	0.671	7.309	4.402		

根据正交试验结果, 选出最佳工艺 $A_3B_2C_2D_2$ 即: 固液比 1:12, 提取时间 60min, 提取次数两次, 醇沉浓度 80%。

2.1.2 大孔吸附树脂分离酸枣仁黄酮

对选取四种大孔吸附树脂进行筛选试验, 分别是: NKA-9、AB-8、X-5、D101。大孔树脂分别经过预处理, 上柱。经上样、吸附、水洗(洗脱多糖类物质)、乙醇梯度洗脱(30%、50%、70%、95%), 收集洗脱溶液, 紫外-可见分光光度计($\lambda_{\max} = 257.6\text{nm}$)测量, 结果见表 3。

表 3 大孔吸附树脂筛选结果

Table 3 Selection results of macroporous resin adsorbing flavonoids

树脂型号	30%乙醇洗脱黄酮量(mg)	50%乙醇洗脱黄酮量(mg)	70%乙醇洗脱黄酮量(mg)	95%乙醇洗脱黄酮量(mg)	总黄酮量(mg)
NKA-9	26.976	16.449	2.427	0.615	48.273
AB-8	29.751	17.799	1.806	0.603	49.959
X-5	32.685	12.819	1.287	0.282	47.073
D-101	33.666	14.403	1.494	0.567	50.13

结果表明, D-101 是分离酸枣仁中黄酮效果最好的, 故用 D-101 来分离正交试验 $n=3$ 的样品, 混合样品, 精密称取 10g, 加水溶于 10ml 容量瓶中, 加水至刻度, 上柱样浓度: 8.858mg/ml, 上柱 10ml, 重复三次上样, 分离结果见表 4。

表 4 D-101 大孔吸附树脂分离酸枣仁黄酮结果

Table 4 Results of separating flavonoids by D-101 macroporous adsorption resin

$n=3$	30%乙醇洗脱黄酮量(mg)	50%乙醇洗脱黄酮量(mg)	70%乙醇洗脱黄酮量(mg)	95%乙醇洗脱黄酮量(mg)	总黄酮量(mg)
1	32.933	26.76	2.784	0.893	63.37
2	33.951	25.742	2.345	0.982	63.02
3	35.478	25.805	2.358	0.969	64.61
平均	34.121	26.102	2.496	0.948	63.66

2.2 酸枣仁黄酮复合酶法提取工艺

2.2.1 酶液配制

称取约 0.4g 的纤维素酶(10000U/g)和 0.1g 的果胶酶(30000U/g)分别配制成浓度为 0.4% 和 0.1% 的酶液, 备用。

2.2.2 脱脂肪油

酸枣仁粉末 20g, 精密称定, 置索氏提取器中, 提取脱脂肪油。

2.2.3 正交设计

本试验以酶解温度($^{\circ}\text{C}$)、pH 值、复合比、酶解时

间(h)为考察因素, 每个因素设三个水平, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计, 以酸枣仁中总黄酮苷得率为考察指标, 筛选复合酶解法提取酸枣仁中总黄酮苷的最佳提取工艺条件见表 5。

表 5 酸枣仁黄酮复合酶法提取工艺因素水平表

Table 5 Factors and levels of orthogonal design for flavonoids extraction by complex enzyme method

水平	因素			
	A 酶解温度($^{\circ}\text{C}$)	B pH值	C 复合比	D 酶解时间(h)
1	40	3.5	01:00.3	1
2	45	4	01:00.6	3
3	50	4.5	1:01	5

按照正交 $L_9(3^4)$ 表, 进行酶解工艺正交试验, 结果见表 6。

表 6 酸枣仁黄酮复合酶法提取工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 6 Results of orthogonal design $L_9(3^4)$ for flavonoids extraction by complex enzyme method

试验号	A	B	C	D	黄酮含量(mg/g)	浸膏率(%)
1	1	1	1	1	10.461	15.007
2	1	2	2	2	16.375	20.649
3	1	3	3	3	18.919	19.593
4	2	1	2	3	15.694	19.207
5	2	2	3	1	17.091	16.409
6	2	3	1	2	15.765	18.477
7	3	1	3	2	15.192	17.395
8	3	2	1	3	21.965	19.81
9	3	3	2	1	14.045	15.911
K_1	45.755	41.347	48.197	41.597		
K_2	48.55	55.431	46.113	47.332		
K_3	51.202	48.729	51.202	56.578		
I_1	55.249	51.609	53.294	47.326		
I_2	54.092	56.867	55.766	56.52		
I_3	53.116	53.98	53.397	58.61		
R_1	5.447	14.084	5.089	14.981		
R_2	2.133	5.258	2.472	11.284		

根据正交试验结果, 选出最佳工艺 $A_3B_2C_3D_3$ 即: 酶解温度为 50°C , pH 值为 4.0, 纤维素酶与果胶酶复合比例为 1:1, 酶解时间为 5h。

2.2.4 重复最佳工艺

按照最佳工艺重复三次($n=3$), 测得实验结果见表 7。

2.2.5 大孔吸附树脂分离酸枣仁黄酮

精密称取酸枣仁粗品 10g, 加水溶于 10ml 容量瓶中, 加水至刻度, 上柱样浓度: 13.774mg/ml, 上柱

表7 酸枣仁黄酮复合酶法提取工艺重复最佳工艺 (n=3)

Table 7 Results of repeated experiments on optimized extration technology of flavonoids by complex enzyme method (n=3)

重复	浸膏得率(%)	黄酮含量(mg/g)
1	18.47	12.943
2	18.44	14.037
3	17.88	14.7
平均	18.26	13.893

表8 D-101 大孔吸附树脂分离酸枣仁黄酮最佳工艺

Table 8 Results of repeated experiments on optimized separation technology of flavonoids by D-101 macroporous adsorption resin

重复	30%乙醇洗脱 黄酮量(mg)	50%乙醇洗脱 黄酮量(mg)	70%乙醇洗脱 黄酮量(mg)	95%乙醇洗脱 黄酮量(mg)	总黄酮量 (mg)
1	59.245	32.36	3.787	0.993	96.385
2	59.323	31.842	3.445	0.992	95.602
3	58.878	31.85	3.398	0.989	95.115
平均	59.149	32.017	3.543	0.991	95.701

量: 10ml, 重复三次上样, 具体分离结果见表8。

2.3 酶法新工艺与水提工艺比较研究

酶法工艺与水提工艺提取酸枣仁黄酮比较结果见表9。

表9 酶法工艺与水提工艺酸枣仁黄酮的提取率

Table 9 Comparision of flavonoids extraction rates between complex enzyme method and water extraction

酶解 工艺	酸枣仁黄酮提 取量(mg/g)	黄酮提取 率(%)	传统 工艺	酸枣仁黄酮提 取量(mg/g)	黄酮提取 率(%)
1	12.943	43.14	1	9.637	32.12
2	14.037	46.79	2	9.074	30.25
3	14.7	49	3	8.245	27.48
平均	13.893	46.31		8.985	29.95

由表9可知, 酶法工艺酸枣仁黄酮提取率的平均值为13.893mg/g, 而水提工艺的结果则为8.985mg/g, 经t检验, 两者的对酸枣仁黄酮提取量的差异具有显著性($p < 0.001$)。

3 结 论

3.1 应用水提工艺提取酸枣仁黄酮, 酸枣仁黄酮的提取量为8.98mg/g; 应用复合酶工艺提取酸枣仁黄酮, 提取量为13.89mg/g。复合酶工艺的酸枣仁黄酮提取量是传统水提工艺酸枣仁黄酮提取量的1.55倍, 复合酶工艺的酸枣仁黄酮提取率比水提工艺提高了54.67%。

3.2 应用酶法新工艺提取酸枣仁黄酮, 最佳工艺条件为: 固液比1:12, 提取次数两次, 提取时间60min, 醇沉浓度80%, 纤维素酶(10000U/g)与果胶酶(30000U/g)比1:1, 酶解温度50℃, pH4.0, 酶解时间5h。

参考文献:

- [1] 李会军, 李萍, 余国莫. 酸枣的研究进展及开发前景[J]. 中国野生植物资源, 2002, 18(3): 15-19.
- [2] 任风芝, 栾新慧, 赵毅民. 酸枣仁药理作用及其化学成分的研究进展[J]. 基层中药杂志, 2001, 15(1): 46-47.
- [3] 彭智聪, 朱建军. 酸枣仁化学成分及药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(1): 86-87.
- [4] 余洪波, 张晓昱. 酶法在中药提取中的研究进展[J]. 中成药, 2005, 27(5): 591-593.
- [5] 张巾英, 张明春. 应用纤维素酶提取中草药有效成分的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(1): 79-81.