

竹叶总黄酮的提取和纯化工艺的研究

朱宏莉¹, 韦海洪¹, 宋纪蓉^{*}, 陈 邦², 任 静¹

(1.西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069 2.西北大学化学系, 陕西 西安 710069)

摘 要: 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 以溶剂种类、溶剂浓度、料液比、浸提时间, 作为主要考虑因素, 确定了竹叶黄酮的最佳提取工艺为: 60% 丙酮, 料液比为 1:40 的条件下回流浸提 3h。其中, 溶剂浓度和料液比是两个主要影响因素, 其 $p < 0.01$, 达到了显著性水平。在此基础上, 采用 x-5 大孔吸附树脂与聚酰胺树脂联用的方法纯化竹叶提取物, 最终竹叶总黄酮含量可达 78.97%。

关键词: 竹叶; 总黄酮; 提取; 纯化

Study on Extraction and Purification of Total Flavones from Bamboo Leaves

ZHU Hong-li¹, WEI Hai-hong¹, SONG Ji-rong^{*}, CHEN Bang², REN Jing¹

(1. Institute of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

2. Chemistry Department, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: The optimum extracting process of total flavones from bamboo leaves was obtained after using $L_9(3^4)$ orthogonal

收稿日期: 2005-05-28

*通讯作者

基金项目: 陕西省教育厅专项研究基金项目(HH02240)

作者简介: 朱宏莉(1971-), 女, 讲师, 博士, 主要从事应用微生物方面的研究。

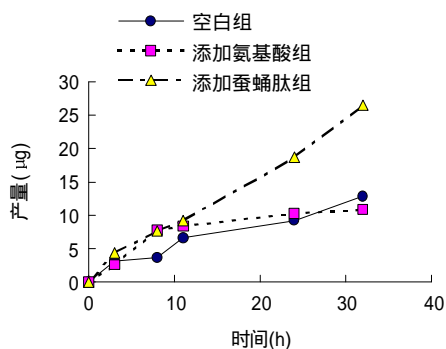


图1 空白组、添加氨基酸组和蚕蛹肽组酵母发酵液中不同发酵时间丙酮酸产量

Fig.1 Yield of pyruvic acid in yeast zymometer at different time in samples

分析以上实验数据, 不添加任何因子的空白对照组和添加氨基酸组的酵母发酵液中, 丙酮酸产量增长趋势相似, 随着发酵时间的增加, 丙酮酸产量逐渐增加, 但发酵到 11h 后, 丙酮酸生成量趋于平稳, 增加微小。不添加任何因子的空白对照组酵母发酵液中, 丙酮酸产量最多达到 12.83 μg , 添加氨基酸组酵母发酵液中, 丙酮酸产量最多达到 10.82 μg 。而添加蚕蛹肽组的酵母发

酵液中丙酮酸产量增加趋势明显, 发酵到 11h 后丙酮酸产量还逐渐增加, 而且发酵到 32h, 丙酮酸产量最多达到 26.47 μg 。以上实验结果表明, 酶解与膜法连用分离制备的蚕蛹肽有促进生物体丙酮酸生成作用, 本项目所作实验为《本草纲目》中有“蚕蛹煎汁饮, 止消渴”的记载和近代食用蚕蛹可治糖尿病提供了实验根据, 蚕蛹蛋白在人的胃、肠经酶分解成肽, 对糖的正常代谢有益。进一步探讨蚕蛹肽调控糖代谢作用机理有理论意义和实际意义。

参考文献:

- [1] 周爱梅, 彭凯文. 酶解蚕蛹蛋白及其应用研究[J]. 广州食品工业科技, 1995, 11(2): 11-14.
- [2] 周建军, 赵桦. 一种简便的提取蚕蛹蛋白新方法[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(4): 44-46.
- [3] 白虹, 刘德富, 等. 蛋白酶水解法在蚕蛹蛋白食品加工中的应用[J]. 食品科学, 1994, (5): 25-27.
- [4] 熊燕飞, 等. 酶法水解蚕蛹蛋白制备多肽的工艺研究[J]. 湖北大学学报, 1999, 21(3): 287-290.
- [5] 王大科. 家蚕的医学用途[J]. 生物学通报, 1998, 33(1): 45-46.

test plan. We selected four elements—solvent type; solvent concentration; material-solution ratio and extracting time to observe their effects on the extraction of bamboo flavones. The orthogonal test results showed that the optimum conditions were: 60%, acetone, 3h, material-solution ratio 1: 40. The major factors affecting the content of total flavones were the solvent concentration and the material-solution ratio. Both of them had a significant effect on the yield ($F > F_{0.01}$).

On the basis of these experiments, we used x-5 macroreticular resin together with polyamide to purify the extraction, and the final content of total flavones was up to 78.97%.

Key words: bamboo leaves; total flavones; extraction; purification

中图分类号: Q946

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2005)08-0158-04

竹子属禾本科竹亚科多年生常绿植物, 是当今世界最具有使用价值的植物之一^[1], 我国竹林面积为 350 万公顷, 主要分布于南方大部分地区, 陕南地区也有分布。竹叶在我国具有悠久的药用和食用历史, 新近又被国家卫生部批准列入药食两用的天然植物名单。竹叶中含有大量的黄酮类化合物和其它生物活性成分, 如酚类、蒽醌类^[2]、香豆素类内酯^[3]、活性多糖^[4]、特种氨基酸^[5]等, 其中黄酮是主要功能因子并具有显著的生理功能, 如抗活性氧自由基^[6]、抗脂质过氧化^[7]、抗衰老、降低血脂、抗菌抑菌^[8]、增强免疫力等, 而且竹叶黄酮安全无毒, 其安全性大大高于银杏提取物^[9], 因此, 目前对竹叶黄酮类物质的提取纯化及功能作用的研究已成为一个热点。

本文通过正交试验^[10]考察了多种因素对于竹叶黄酮提取效果的影响, 探索出了一条切实可行的提取工艺, 同时考虑到竹叶黄酮多为黄酮糖甙, 具有一定的极性和水溶性, 所以采用多种类型大孔吸附树脂进行吸附、分离, 并结合传统的萃取、脱色等方法对竹叶提取物进行纯化, 获得了有价值的实验数据, 为大规模工业生产提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜竹叶采自陕南。

1.2 标样与试剂

芦丁标准样(中国药品生物制品检定所), 甲醇、无水乙醇、95%乙醇、丙酮、石油醚、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇等试剂均为分析纯。x-5 大孔吸附树脂(西安蓝深科技有限公司), 聚酰胺树脂(南京大学化学系)。

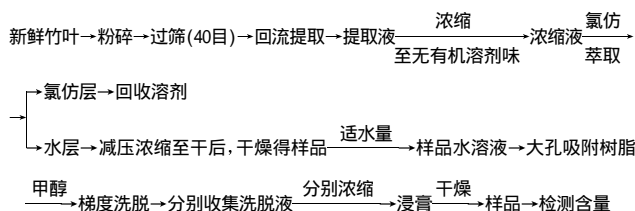
1.3 仪器

BL610型高速万能粉碎机 北京中兴仪器有限公司
JA2003N电子天平 上海精密科学仪器有限公司; R-201 旋转蒸发器 上海申顺生物科技有限公司; 78HW-1 恒温数显磁力搅拌器 杭州仪表电机有限公司; SHB-III 循环水多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; 757CRT 紫外分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; 101A-

3E 电热恒温干燥箱 上海跃进医疗器械厂; W201D 电热恒温水浴锅 上海申顺生物科技有限公司; ZF-2型三用紫外仪 上海市安亭电子仪器厂。

1.4 方法

1.4.1 工艺流程



1.4.2 实验步骤

1.4.2.1 预处理

将新鲜竹叶清洗, 沥干水分, 凉干, 粉碎后过 40 目筛, 备用。

1.4.2.2 萃取溶剂的选择

将用中等浓度甲醇提取的竹叶提取液减压回收溶剂并浓缩至无醇味, 取一部分干燥留样检测, 其余静置 24 h, 冷却过滤, 分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯萃取至有机相色淡, 收集水相, 减压浓缩干燥, 检测含量, 从中选出最佳萃取溶剂。

1.4.2.3 提取

准确称取烘干至恒重的竹叶粉 50g, 按正交试验回流提取, 提取液浓缩后用氯仿萃取, 收集水相, 减压浓缩干燥, 测含量。

1.4.2.4 树脂纯化

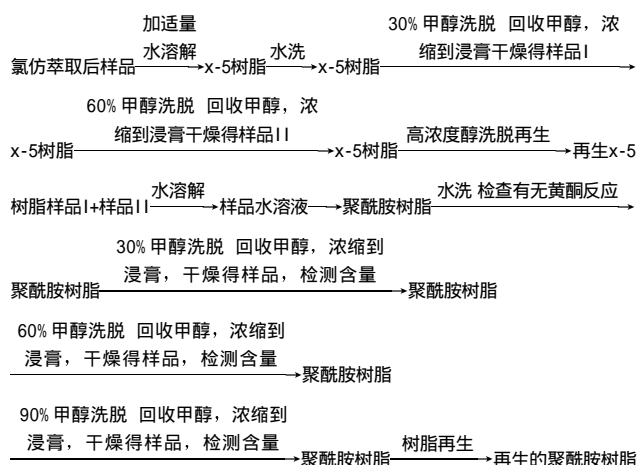
将氯仿萃取后的提取物用 x-5 树脂与聚酰胺树脂联用进行纯化。

1.4.2.5 正丁醇萃取

将 60% 甲醇洗脱液浓缩至干, 加蒸馏水溶解并用 NaCl 饱和, 用水饱和和正丁醇萃取 5 次, 收集正丁醇相浓缩, 干燥后检测含量。

1.4.2.6 芦丁标准曲线的绘制

精密量取烘至恒重的芦丁标准品 75mg, 以 95% 乙



注：树脂活化 树脂用4%NaOH浸泡24h，水洗至中性，再用95%乙醇充分浸泡24h，然后用乙醇洗至洗出液加适量水无白色混浊现象，最后用去离子水洗尽乙醇即可。
树脂再生 树脂用水洗后，再用95%乙醇浸泡，最后水洗至无醇味即可。

醇溶液定容至25ml，即得芦丁标准储备液，精密量取此溶液5.0ml置50ml容量瓶中，用40%乙醇定容即得标准芦丁对照液，分别吸取芦丁对照液0、0.5、1.0、1.4、1.7、2.0、3.0ml于10ml容量瓶中，各加入5%NaNO₂溶液0.3ml，摇匀，室温静置6min，再加入10%Al(NO₃)₃溶液0.3ml，摇匀，室温静置6min后，加入4%NaOH 4ml，摇匀，用40%乙醇定容至刻度，放置15min后于波长510nm处比色测定吸光度，试剂空白为参比液，绘制标准曲线。

1.4.2.7 样品吸光度的测定

将干燥样品精确称量100mg，置于25ml容量瓶中，按上述芦丁标准曲线绘制方法配制溶液，并以试剂空白为参比液，测定吸光度。

2 结果与分析

2.1 芦丁标准曲线及线性回归方程

按1.4.2.4所述方法，测定芦丁标准溶液在510nm处的吸光度，以吸光度A为纵坐标，以芦丁标准液浓度C为横坐标，绘制标准曲线，用最小二乘法进行线性回归分析得标准回归方程为：

$$Y = 11.115x - 0.0023 \quad R^2 = 0.9991$$

由图1可看出，测定吸光度与芦丁浓度有很好的线性关系。

2.2 不同有机溶剂萃取结果

从表1可看出，用氯仿萃取效果较好，经氯仿萃取后，总黄酮含量提高了近两倍，达到16.75%。而用石油醚和乙酸乙酯萃取，总黄酮含量变化不大，这可能因为石油醚无法有效地除去杂质，而乙酸乙酯和水不

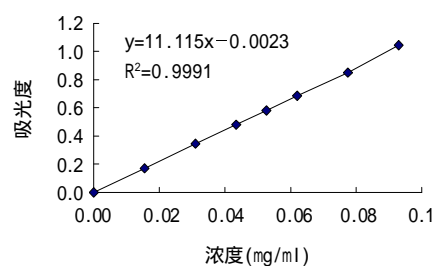


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 Rutin standard curve

表1 不同有机溶剂萃取结果

Table 1 The extraction results of different solvents

有机溶剂 Solvent	萃取后总黄酮含量(%) Content of total flavones after extraction	粗提物总黄酮含量(%) Content of total flavones before extraction
石油醚	8.13	
氯仿	16.75	6.72
乙酸乙酯	9.46	

能很好分层。因此氯仿是有效的萃取溶剂。

2.3 正交试验结果分析

L₉(3⁴)正交试验设计因素水平见表2，正交试验的安排与结果见表3，竹叶中总黄酮提取量的方差分析见表4。

表2 L₉(3⁴)正交试验设计的因素水平

Table 2 The factor-level table of L₉(3⁴)

水平 Level	因素Factor			
	A 溶剂种类 Solvent	B 溶剂浓度(%) Solvent concentration	C 料液比 Material-solution ratio	D 提取时间(h)/次 Extracting time
1	乙醇	30	1:30	1.5
2	丙酮	60	1:40	2
3	甲醇	90	1:50	3

表3 正交试验安排与结果

Table 3 Result analysis of orthogonal test L₉(3⁴)

No	A	B	C	D	总黄酮提取量(mg/g) Content of total flavones
1	1	1	1	1	17.18
2	1	2	2	2	20.59
3	1	3	3	3	11.16
4	2	1	2	3	21.49
5	2	2	3	1	15.80
6	2	3	1	2	12.64
7	3	1	3	2	14.96
8	3	2	1	3	18.15
9	3	3	2	1	15.37
I _j	48.93	53.63	47.97	48.35	
II _j	49.93	54.54	57.45	48.19	
III _j	48.48	39.17	41.92	50.8	
R ² = I _j ² + II _j ² + III _j ²	7237.46	7385.08	7359.91	7240.64	
R _j ²	2412.49	2461.69	2453.00	2413.55	
3					
S _j	0.37	49.57	40.88	1.43	

由表3可看出,四种因素及其因素水平对总黄酮提取量的影响是不同的:A因素中,二水平效果较好,但三者相差不大;从B因素(溶剂浓度)看,数据曲线出现明显的拐点,表明60%的浓度最合适,浓度降低或浓度继续升高,提取量都会下降,这可能因为溶剂浓度太低会使得多糖、蛋白质等大分子物质过多溶出,占据了竹叶黄酮的溶解空间,同时不利于进一步纯化;而溶剂浓度太高脂溶性成分溶解过多,黄酮类物质溶解量减少。因此,中等浓度溶剂最为适宜;从C因素(料液比)看,也出现了较好的拐点,表明料液比为1:40时,提取量最好,原因可能是竹叶中黄酮类物质为亲水性物质,易溶于极性大的有机溶剂水溶液,适当的料液比可以增加黄酮类物质的溶解空间,促进黄酮物质的溶出;分析D因素(提取时间)可看出,从一水平到三水平呈上升趋势,说明提取时间适当延长,会提高提取量。

表4 竹叶中总黄酮含量的方差分析表
Table 4 ANOVA of contents of TF from bamboo leaves

变异来源 Origin of variance	偏差平方和 Sum of square	自由度 Freedom	均方 Mean square	F比 F. value	显著性 Prominence level
A *	0.37	2	0.185	1	
B	49.57	2	24.785	133.97	$p < 0.01^{**}$
C	40.88	2	20.44	110.49	$p < 0.01^{**}$
D	1.43	2	0.715	3.86	
e	0.37	2	0.185		

$F_{0.01}(2,2)=99$, $F_{0.05}(2,2)=19$ 。

由表4可看出,四种因素中,最主要的二个影响因素分别是溶剂浓度和料液比,其 $p < 0.01$,达到了显著性水平,(以“*”表示),而溶剂种类与提取时间对总黄酮提取量的影响相对较小,其 $p > 0.05$ 。

综合表3、表4的结果,可以得出竹叶总黄酮的最佳提取方案为: $A_2B_2C_2D_3$,即以60%丙酮作为提取溶剂,料液比为1:40的条件下,回流提取3h。按最优组合 $A_2B_2C_2D_3$ 作平行实验,测得总黄酮提取量为22.39mg/g。由于A、D两个因素即溶剂种类和提取时间对于总黄酮提取量影响相对较小,所以在实际生产中可根据具体情况选择合适的溶剂和提取时间。

2.4 树脂纯化结果

利用x-5大孔吸附树脂与聚酰胺树脂联用的方法对竹叶黄酮进行纯化,分别收集x-5树脂不同浓度的甲醇洗脱液,浓缩、干燥、合并,所得样品加适量蒸馏水充分溶解,上聚酰胺树脂,用甲醇梯度洗脱,分别收集洗脱液,浓缩干燥计算得率,检测含量,结果见表5。

表5 树脂纯化实验结果
Table 5 The resin purification results

溶剂 Solvent	得率(%) Yield (%)	总黄酮含量(%) Content of total flavones
30% 甲醇	14.31	12.47
60% 甲醇	66.42	58.91
90% 甲醇	13.21	7.74

由表5可看出,用中等浓度(60%)甲醇洗脱效果较好,总黄酮含量可达到58.91%。

按1.4.2.5所述方法,将60%甲醇洗脱液进一步处理,用水饱和正丁醇萃取5次,最终可使总黄酮含量达到78.97%。

3 结 论

在竹叶总黄酮的提取中,溶剂浓度和料液比是影响提取效率的两个主要因素,而溶剂种类及提取时间对提取效果影响相对较小。通过正交试验,获得了竹叶总黄酮的最佳提取条件为:60%丙酮、料液比1:40的条件下,回流浸提3h,所得黄酮粗提液经过x-5大孔吸附树脂与聚酰胺树脂联用而得到纯化,使得最终竹叶黄酮含量可达78.97%。

参考文献:

- [1] 张英.天然功能性竹叶提取物——竹叶黄酮[J].中国食品添加剂,2002,(3):54-58.
- [2] 张英,丁霄霖.竹叶有效成份和抗活性氧自由基效能的研究[J].竹子研究汇刊,1996,15(3):17-24.
- [3] Failsal HA. Primary studies on lactone in bamboo leaf [D]. Thesis for MS degree of Zhejiang University, 2000.
- [4] 唐莉莉,徐榕榕,丁霄霖.竹叶多糖对小鼠移植瘤的抑制作用[J].无锡轻工大学学报,1998,17(3):62-65.
- [5] 张英,丁霄霖,王树英.竹叶特种氨基酸的存在及其生物学意义[J].无锡轻工大学学报,1997,16(1):29-32.
- [6] 张英.竹叶提取物类SOD活性的综合考察[J].中国食品学报,1998,2(2):62-66.
- [7] Hu Chun, Zhang Ying. Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo phyllostachys nigra Var. Henonis leaf extract invitro[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 3170-3176
- [8] 张伟,檀建新,马雯,等.竹叶对食品致病菌的抑菌作用[J].食品科学,1998,19(4):37-39.
- [9] 刘翠,王文文.竹叶资源研究进展及开发利用:兼谈云南竹叶资源开发对策[J].林业建设,1996,(6):10-11.
- [10] 杜荣骞.生物统计学[M].北京:高等教育出版社,1985. 419-430.