

- Wochenschr, 2002, 114(19-20): 840-846.
- [5] Budinsky A, Wolfram R, Oguogho A, et al. Regular ingestion of *Opuntia robusta* lowers oxidation injury [J]. *Prostag Leukotr Essent Fat Acids*, 2001, 65(1): 45-50.
- [6] Tao M H. Hyperglycemic and immune activity of *Opuntia dillenii* Haw. crude polysaccharide in diabetic mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(Suppl): 144-147.
- [7] Gou L. The purification and preliminary analysis on polysaccharides of *Opuntia vulgaris* Mill. [J]. *J Sichuan Agric Univ* (四川农业大学学报), 1997, 15(2): 163-165.
- [8] Karsten, Kenneth Abraham S. Afr. S. Cactus extract for treatment of diabetes [P]. ZA: 9304, 523 (Cl. A61K), 1994-01-27.
- [9] Marshak D R. *Strategies for Protein Purification and Characterization; a Laboratory Course Manual* (蛋白纯化策略及特征: 实验室教程手册) [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [10] Ge W, Huang Y L. Study of the separating water-soluble polysaccharide from cactus [J]. *J Jiangxi Inst Edu* (江西教育学院学报), 2002, 23(3): 34-35.
- [11] Jin D H, Ji Y H, Cui Y H, et al. Extraction of crude polysaccharide from stem of *Opuntia dillenii* Haw. and determination of polysaccharide content [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(3): 199-200.
- [12] He H C, Zheng R Z. Extraction of polysaccharide from *Opuntia dillenii* Haw. [J]. *Chin J Tropical Agric* (热带农业科学), 2000, (4): 34-38.

苦荞茎叶粉中总黄酮酶法提取工艺研究

王敏¹, 高锦明², 王军¹, 王丽云¹

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学理学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:目的 研究苦荞茎叶粉中总黄酮酶法提取工艺。方法 苦荞茎叶粉经纤维素酶处理后用水提取总黄酮, 研究酶加酶量、解温度、酶解时间和pH值对总黄酮得率的影响。结果 酶法提取的最佳工艺条件为: 酶解温度 55℃, 加酶量 3.0 μL, pH值 6.5, 酶解 90 min, 再在 90℃下提取 3次, 每次 30 min, 总黄酮得率可达 1.47%。结论 纤维素酶适用于苦荞茎叶粉中总黄酮的辅助提取。

关键词: 苦荞茎叶粉; 总黄酮; 纤维素酶; 正交试验

中图分类号: R284.2, R284.06

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)11-1645-04

Extracting technology of total flavones in powder of *Fagopyrum tataricum* stem and leaf by enzymatic treatment

WANG Min¹, GAO Jin-ming², WANG Jun¹, WANG Li-yun¹

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China; 2. College of Science, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract; Objective To optimize the extracting technology of total flavones in powder of *Fagopyrum tataricum* stem and leaf by enzymatic treatment. **Methods** The powder was treated by cellulase before extracted using water, the effects of enzyme dosage, treatment temperature, treatment time, and pH value on the extract rate of total flavones were studied. **Results** The optimum extracting technology was as follows: enzymatic treatment temperature: 55℃, enzyme dosage: 3.0 μL, pH value: 6.5, treatment time: 90 min, extracting 3 times at: 90℃ for 30 min once. The extract rate of total flavones was 1.47% by this technology. **Conclusion** Cellulase could be applied in the assistant extraction of total flavones in powder of *F. tataricum* stem and leaf.

Key words: the powder of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaerth stem and leaf; total flavones; cellulase; orthogonal test

荞麦为蓼科双子叶药食兼用植物, 主要有两个栽培种: 一是鞑靼荞麦 *Fagopyrum tataricum* (L.)

Gaerth., 也称为苦荞 (tartary buckwheat), 一是普通荞麦 *F. esculentum* Moench, 也称为甜荞 (buck-

收稿日期: 2006-03-17

基金项目: 科技部攻关计划重大项目 (2003BA901A19); 西安市 2003 年农业科技攻关计划项目 (NG200317)

作者简介: 王敏 (1967-), 女, 河南堰城人, 副教授, 博士, 主要从事食品营养与功能食品研究。

Tel: (029)87092816 E-mail: wangmin 20050606@163.com

wheat)。我国荞麦的分布较广,但生产相对集中,华北、西北、东北地区以种植甜荞为主,西南地区的四川、云南、贵州等省以种植苦荞为主^[1]。荞麦含有大量的黄酮类化合物。具有抗氧化、降血糖、降血脂、抗肿瘤等多种药理活性,而发挥这些药理活性的物质主要是荞麦中所含有的黄酮类化合物^[2,3]。苦荞麦的花、叶、茎、籽粒、壳中均含有一定量的黄酮类化合物,其中茎中含总黄酮的量约为 1.0%,叶中约为 5.3%^[4]。目前总黄酮的提取方法主要有水提取、碱提酸沉、乙醇提取、微波辅助提取、超临界萃取等方法^[5],水提法在工业上由于成本低而应用广泛,但总黄酮得率较低,而其他方法在应用中有溶剂污染、需专用设备或增加成本等问题。近年来纤维素酶被应用于黄酮类化合物的提取^[6,7]。植物组织中的有效成分大多包裹在细胞壁中,对这些有效成分的提取,传统的热水、酸、碱、有机溶剂提取法,受细胞壁主要成分纤维素的阻碍,往往提取效率较低。恰当地利用纤维素酶处理这些植物材料,可改变细胞壁的通透性,提高有效成分的提取率^[8]。本实验先利用纤维素酶对苦荞茎叶粉进行处理,然后用水提取,并对提取工艺进行了研究,以期寻找改良水提工艺的处理方法,为荞麦资源的开发利用提供参考。

1 材料与仪器

苦荞茎叶粉为 2003 年陕西榆林农科所实验场苦荞种植 30 d 后的茎叶干燥磨粉制得,由西北农林科技大学农学院柴岩教授鉴定为川荞 1 号;芦丁(生化试剂,质量分数 $\geq 95.0\%$,国药集团化学试剂有限公司);试剂均为市售分析纯试剂;纤维素酶(食品级,活力 100 FEB/g,徐州一统食品添加剂公司);723 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);pHS-3C pH 计(上海精密科学仪器有限公司);恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);离心机(北京医用离心机厂)。

2 方法与结果

2.1 苦荞茎叶粉中总黄酮的 UV 法测定

2.1.1 标准曲线的制备:将芦丁于 120 °C 烘箱中烘至恒重,于干燥器中冷却后称取 50 mg 用 70% 乙醇溶解,定容至 250 mL,得 0.200 mg/mL 芦丁对照品溶液。准确吸取芦丁对照品溶液 0.3、0.6、0.9、0.12、0.15、0 mL 于 50 mL 量瓶中,加入 5% NaNO_2 溶液 1.5 mL,摇匀,放置 6 min 后加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1.5 mL,摇匀,放置 6 min 后加入 4% NaOH 溶液 20 mL,再用 70% 乙醇定容,摇匀,以 70% 乙醇为空白参比,10 min 后用 1 cm 比色皿

于 510 nm 测定吸光度,得芦丁质量分数(Y , mg/mL)与吸光度(A)的回归方程: $Y = 0.0749A + 0.0022$ ($R^2 = 0.9961$)。

2.1.2 总黄酮的测定:准确称取 2.50 g 苦荞茎叶粉,于 250 mL 三角瓶中,加入 50 mL 水,按试验设置的处理条件,在不同的加酶量、酶解温度和 pH 值条件下,酶解不同的时间,然后升温至 90 °C 提取,离心去沉淀,用 70% 乙醇定容至 200 mL,作为待测液。取 3 mL 待测液于 50 mL 量瓶中,按照标准曲线的制备项下方法测定吸光度,计算总黄酮的质量,并计算总黄酮得率(总黄酮得率 = 提取液中总黄酮质量/苦荞茎叶粉质量 $\times 100\%$)。

2.2 单因素试验

2.2.1 提取次数和提取时间对总黄酮得率的影响:选择不同的提取时间和提取次数进行试验,加酶量 2.0 μL ,酶解温度 55 °C, pH 值 6.5,酶解时间 2 h,计算总黄酮得率,结果见图 1。可以观察到 30 min 提取 3 次与 90 min 提取 2 次总黄酮得率相当且稍有提高,而 30 min 提取 4 次总黄酮得率增加不显著。从工作量和生产成本等因素考虑选 30 min 提取 3 次较为合理。

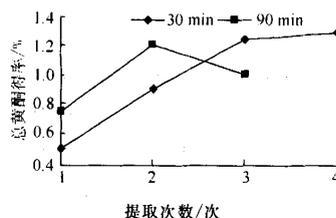


图 1 提取次数和提取时间对总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effect of number of times and time of extraction on extract rate of total flavones

2.2.2 加酶量对总黄酮得率的影响:选择不同的加酶量进行试验,其他条件同 2.2.1,计算总黄酮得率,结果见图 2。可以看出,随酶用量的增大,总黄酮得率逐步提高。增加酶用量可以提高酶促反应速度,同时酶浓度对反应速度的影响具有饱和现象,即当酶浓度较高时,反应速度并不随酶浓度的增加而成比例增大。综合考虑最佳酶用量应在 2.5 μL 左右。

2.2.3 酶解温度对总黄酮得率的影响:选择不同的酶解温度进行试验,其他条件同 2.2.1,计算总黄酮得率,结果见图 3。可知,随着温度的升高,酶的活性也升高,酶促反应加快,总黄酮得率也随之提高,但温度过高,得率有下降的趋势。当温度升高到一定程度时,酶蛋白开始受热变性,使酶的活性降低,从而降低了总黄酮得率。故最佳酶解温度应在 50~60 °C。

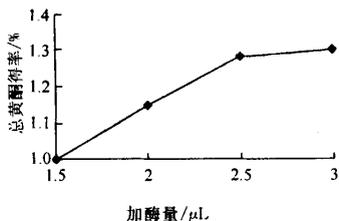


图 2 加酶量对总黄酮得率的影响

Fig. 2 Effect of enzyme dosage on extract rate of total flavones

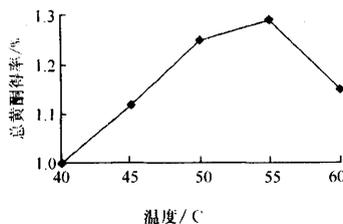


图 3 酶解温度对总黄酮得率的影响

Fig. 3 Effect of enzymatic treatment temperature on extract rate of total flavones

2.2.4 pH 值对总黄酮得率的影响:选择不同的 pH 值进行试验,其他条件同 2.2.1,计算总黄酮得率,结果见图 4 所示。可知,在酸性条件下,随着 pH 值的增大,总黄酮得率显著提高,在碱性条件下总黄酮得率随着 pH 值的增大而下降。酶活力受 pH 的影响,pH 不仅能够影响酶的构象,也影响底物的解离状态,结果说明纤维素酶在微酸性条件下,活性较好,实验发现 pH 值为 6.5 时得率最高,所以将酶解 pH 值定为 6.5。

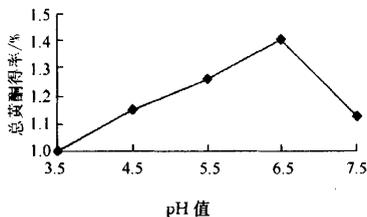


图 4 pH 值对总黄酮得率的影响

Fig. 4 Effect of pH value on extract rate of total flavones

2.2.5 酶解时间对总黄酮得率的影响:选择不同的酶解时间进行试验,其他条件同 2.2.1,计算总黄酮得率,结果见图 5。可知,随酶解时间的延长,总黄酮得率在增加,但在酶解 2 h 后,得率不再有明显增加,因此本着节约时间,降低成本的原则,时间选在 80~100 min 内比较适宜。

2.3 正交试验考察:单因素试验中提取次数、提取时间和 pH 值都有了明显的最佳点,因此正交试验

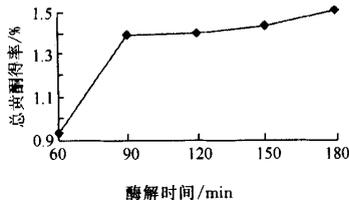


图 5 酶解时间对总黄酮得率的影响

Fig. 5 Effect of enzymatic treatment time on extract rate of total flavones

主要考察酶解温度、酶解时间和加酶量对总黄酮得率的影响,正交试验因素水平安排见表 1、试验结果分别见表 2、3。由分析结果可知,各因素的影响主次为 A>B>C,即酶解温度>酶解时间>加酶量,其中酶解温度和酶解时间达到极显著水平($P < 0.01$),加酶量达到显著水平($P < 0.05$)。最佳工艺组合为 $A_2B_2C_3$,即酶解温度 55℃,酶解时间 90 min,加酶量为 3.0 μL 。最佳提取工艺条件验证试验结果见表 4。

2.4 水提法和酶法提取效果的比较:采用两种方法进行提取,结果见表 5。在相同的 pH 值、提取温度、提取时间下,采用加酶量 3.0 μL ,酶解温度 55℃,酶解 90 min,条件用纤维素酶酶解后提取,总黄酮得率为水提法的 3.08 倍。由此可见,纤维素酶可充

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	四 素		
	A 酶解温度/℃	B 酶解时间/min	C 加酶量/ μL
1	50	80	2.0
2	55	90	2.5
3	60	100	3.0

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D(空列)	总黄酮得率/%
1	1	1	1	1	1.28
2	1	2	2	2	1.30
3	1	3	3	3	1.28
4	2	1	2	3	1.39
5	2	2	3	1	1.45
6	2	3	1	2	1.39
7	3	1	3	2	1.30
8	3	2	1	3	1.33
9	3	3	2	1	1.27
K_1	3.86	3.97	4.00		
K_2	4.23	4.08	3.96		
K_3	3.90	3.94	4.03		
k_1	1.29	1.32	1.33		
k_2	1.41	1.36	1.32		
k_3	1.30	1.31	1.34		
R	0.12	0.05	0.02		

表 3 正交设计方差分析

Table 3 Variance analysis for orthogonal test

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
A	0.027 49	2	0.013 74	1 237	0.000 81
B	0.003 62	2	0.001 81	163	0.006 1
C	0.000 82	2	0.000 41	37	0.026 32
D(误差)	0.000 02	2	0.000 01		

表 4 最佳工艺条件的验证

Table 4 Testification of optimum technological conditions

批号	总黄酮得率/%
1	1.46
2	1.48
3	1.47

表 5 直接水提和酶法水提效果比较(n=3)

Table 5 Comparison of two extracting methods (n=3)

提取方法	pH	提取温度/℃	提取时间/min	总黄酮得率/%
水提法	6.5	90	90	0.48
酶法	6.5	90	90	1.48

分破坏荞麦茎叶以纤维素为主的细胞壁结构,使提取传质阻力减小,内容物总黄酮易于溶出,从而提高得率。

3 讨论

王晖等^[7]在银杏黄酮的酶法提取工艺研究中发现,加入纤维素酶后总黄酮得率大大提高,但加入果胶酶反而使总黄酮得率降低。纤维素酶破坏了细胞壁,释放出胞内物质,而细胞中的果胶物质在果胶酶作用下的水解产物对黄酮类物质的吸附性较强,使得总黄酮得率低于无酶实验结果。加入复合酶的总黄酮得率都低于相同用量的纤维素酶,两种酶无明显协同作用。因此,单一纤维素酶是较优的选择。本文选用单一酶法也取得较好效果。田秀兰^[8]在杭白菊总黄酮提取中应用纤维素酶对原料进行处理,并进行了加酶与不加酶的对比试验,结果表明,在纤维

素酶的作用下,杭白菊总黄酮的收率提高了 12%,从薄层色谱结果可以看出加酶与不加酶提取的成分一致,说明酶解没有破坏杭白菊的成分。因此,纤维素酶可以用于植物有效成分的提取。

在苦荞壳的黄酮提取中,传统水提方法一般加 15~20 倍水,在 90℃ 以上进行提取,时间在 6 h 以上^[4]。而在本研究中,在相同温度、pH 值和处理时间中,经酶解工艺处理的苦荞茎叶样品总黄酮得率为未水解样的 3.08 倍,可大大缩短提取时间。由于实验条件限制,本实验样品取样量较小,故在实际应用中还需做放大试验。

References:

- [1] Lin R F. *China Buckwheat* (中国荞麦)[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1994.
- [2] Mukoda T, Sun B X, Ishiguro A. Antioxidant activities of buckwheat hull extract toward various oxidative stress *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(3): 209-213.
- [3] Wang M. Study on the compositions and mechanisms of hypolipidemic property of tartary buckwheat [A]. *Dissertation for Doctor Degree of Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry* (西北农林科技大学博士论文) [D]. Yanglin: Northwest Agriculture and Forestry University, 2005.
- [4] Guo Y Y. Study on extracting flavonoids from buckwheat hulls [A]. *Dissertation for Master Degree of Inner Mongolia Agricultural University* (内蒙古农业大学硕士论文) [D]. Huhhot: Inner Mongolia Agriculture University, 2004.
- [5] Zhang R, Xu Y Q. The extracting technology of flavonoids compounds [J]. *Food Mach* (食品与机械), 2003 (1): 21-23.
- [6] Wang X, Li L B. Study on extracting total flavone from *Crataegus* using enzyme [J]. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2002, 3(23): 37-38.
- [7] Wang H, Liu J J. Study on extraction process of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves by enzymic treatment [J]. *J Chem Ind Forest Prod* (林产化工通讯), 2004, 38(1): 14-16.
- [8] Yang J X, Cai J P, Zhu L. Utilization of cellulase in extraction of Chinese medicine components [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2005, 28(1): 64-67.
- [9] Tian X L. Utilization of cellulase in extraction of total flavone from *Chrysanthemum morifolium* Ramat [J]. *J Qiqihar Med Coll* (齐齐哈尔医学院学报), 2005, 26(5): 542.

《中国医院药学杂志》2007 年征订启事

《中国医院药学杂志》系中国科协主管、中国药学会主办的综合性医院药学专业性学术核心期刊。本刊为湖北省优秀期刊,2006 年中国科协精品科技期刊工程资助期刊,主要面向全国医院药学工作者、医务人员和广大药学工作者,主要介绍国内外医院药学创新性成果、药学先进技术、临床合理用药、中西药制剂、药剂科的科学与管理、药学基础知识及理论等。

本刊为月刊,大 16 开,每期 120 页,定价 12.50 元,全年 150 元。每月 18 日出版,国内邮发代号 38-50,国外代号:M65-38。欢迎广大读者订阅。

本刊现已开通网上在线投稿,欢迎广大作者踊跃投稿(网址: <http://www.zgyyyx.com>)。编辑部地址:武汉市胜利街 155 号(邮政编码:430014);电话:027-82836596;传真:027-82856411;E-mail:pharmacy@vip.163.com。