

文章编号:1671-6833(2009)04-0053-05

木槿花中原花青素的提取工艺研究

张 婕, 李瑞光, 陈卫航

(郑州大学 化工与能源学院, 河南 郑州, 450001)

摘 要:以木槿花原花青素含量为考察指标,研究提取剂浓度、提取温度、提取时间、料液比等因素对原花青素提取效果的影响,通过正交实验,确定木槿花原花青素的最佳提取条件为:提取剂90%乙醇溶液,提取温度70℃,提取时间30 min,料液配比1:9(g:mL)。

关键词:木槿花;原花青素;提取;正交实验

中图分类号:TQ 914.1 **文献标识码:**A

0 引言

木槿(*Hibiscus Syriacus* Linn)为锦葵科木槿属落叶灌木或小乔木,原产东亚,主要分布于我国长江流域、黄河流域、珠江流域及朝鲜、日本等国,全球温带和亚热带地区均有栽培,木槿花花期很长,为6~10月,木槿花亩产高达1 500 kg,具有很高的经济价值和开发利用潜力^[1]。

目前国内外已经对木槿属植物进行了一定的研究,蒋益花^[2]等初步研究了木槿花色素的提取和稳定性,但没有做详细的定量分析;张庭廷^[3]等对木槿花中锌铜等微量元素进行分析;张道敬^[4]等介绍了木槿属植物的化学成分和药理作用;Bong-Sik Yun^[5]等人从木槿根皮中提取出环状缩氨酸,具有抗菌、抗癌、抑制免疫、抑制酶活性等生物活性;Yun-Ching Chang^[6]等人发现了木槿属植物中的花青素可以诱导癌细胞凋亡;K. R. Christian^[7]等用正己烷、乙酸乙酯和甲醇对三种木槿属植物的花瓣进行提取,发现它们的提取物具有抗氧化活性和降低血液黏度的作用。但到目前为止关于木槿花提取原花青素方面的研究却未见报道。原花青素(Proanthocyanidins)是一大类多酚化合物的总称,由不同数目的黄烷-3-醇或黄烷-3,4-二醇聚合而成。原花青素在葡萄、山楂、松树皮、银杏、花生、野生刺葵、野草莓、可可豆、贯叶金丝桃、白桦树等植物中含量丰富。笔者对新鲜木槿花原花青素提取进行研究,并测出了木槿花

原花青素的含量,为开发利用木槿资源,扩大原花青素来源奠定基础。

1 实验仪器及试剂

1.1 仪器设备

RE-52A 旋转蒸发仪和 SHZ-II 循环水真空泵,上海亚荣生化仪器厂;HHS-2 数显恒温水浴,天津市华北实验仪器有限公司;TLJ-2 定时增力电动搅拌器,江苏姜堰市天力医疗器械有限公司;KQ-100VDE 数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;DZF-6020 真空干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;TU-1810S 型紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;BS 系列电子分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.2 实验试剂

儿茶素标准品(Sigma 公司),纯度99.9%;蒸馏水;无水乙醇、甲醇、硫酸和香草醛均为分析纯;木槿花7~9月采自郑州。

2 实验方法及测定

工艺流程:木槿花—分离花瓣—洗净晾干—水分一切丝—提取—分离—检测。

2.1 实验方法

2.1.1 提取方式和提取剂的选择

搅拌提取是最常用的提取方法。超声波由于其频率高,波长短,具有方向性好、功率大、穿透力强等

收稿日期:2009-03-30;修订日期:2009-07-14

作者简介:张 婕(1970-),女,河南商丘人,郑州大学副教授,博士,主要从事植物有效成份提取、沸石催化方面的研究,E-mail:zhanglianbi@yahoo.com.cn

特点被广泛地应用于植物提取中^[8-11]. 本实验将对两种提取方法进行对比,找出合适的提取方法.

在提取原花青素的文献中^[12],乙醇的提取效果优于甲醇、丙酮等常用提取剂,不易引入杂质.且这些溶剂均有一定毒性,对人体产生不利影响,因此选用乙醇做为提取剂.实验发现用蒸馏水或用乙醇含量较低的乙醇溶液提取时,因有大量黏性物质和水溶性杂质溶入提取剂,给过滤和分离带来麻烦,因此,本实验选择浓度较高的乙醇溶液作为提取溶剂.

定量分析新鲜木槿花和干燥木槿花的含量,确定最佳的原料处理方法,并比较超声和搅拌条件下的提取效率,得出较佳的提取方式.

2.1.2 单因素实验

准确称取 5.000 0 g 新鲜木槿花瓣,洗净切成 2~3 mm 的细丝,置于 250 mL 圆底烧瓶中,在一定料液比、溶剂浓度、温度条件下提取,抽滤后将滤渣再提取一次,合并两次滤液并定容检测.在原花青素主要吸收光谱区域(400~600 nm)扫描确定最大吸收在 530 nm 处,属于原花青素类物质^[10-12].

2.1.3 正交实验

在单因素实验的基础上,选出影响原花青素提取效果的主要因素:乙醇浓度、提取时间、提取温度、料液比.笔者利用正交实验分析了上述 4 种因素在 3 个水平上对木槿花中原花青素提取效果的影响.其中, *A* 为提取剂浓度(体积分数), *B* 为提取时间(min), *C* 为提取温度(℃), *D* 为料液比(g:mL).因素水平安排如表 1.

表 1 正交实验因素和水平

Tab.1 The factors and levels of orthogonal experiment

水平	<i>A</i> /%	<i>B</i> /min	<i>C</i> /℃	<i>D</i> (g:mL)
1	70	20	50	1:7
2	80	30	60	1:8
3	90	40	70	1:9

2.1.4 木槿花中原花青素含量的测定实验

将 50.000 0 g 新鲜木槿花放入 500 mL 圆底烧瓶中,按照最佳提取条件进行提取,粗提物的质量为 3.648 8 g,粗提物占新鲜木槿花的 7.3%.实验测定木槿花中原花青素含量为 2.63%,具有很高的开发利用价值.

2.2 原花青素含量的测定^[12]

2.2.1 标准曲线的绘制

(1)溶液配制. 儿茶素标准液:准确称取儿茶

素(干燥至恒重)用双蒸水溶解并定容,作为标准品溶液. 30 g/L 香草醛溶液:30 g 香草醛溶于 1 000 mL 甲醇中. 30% 硫酸溶液:30 mL 浓硫酸(体积分数为 95%~98%)+70 mL 甲醇混合均匀.

(2)标准曲线. 将标准品溶液稀释成不同浓度,分别取 2 mL 不同浓度的标准品溶液于 10 mL 具塞比色管中,加入 2.5 mL 体积分数为 30 g·L⁻¹ 香草醛溶液,然后加入 2.5 mL 30% 硫酸溶液,30℃ 条件下避光反应 20 min,以双蒸水为空白,在 500 nm 处测定吸光度值,所取标准液的浓度和吸光度数据经回归处理,回归方程 $y = 1.5449x + 0.0196$, $r = 0.9987$. 实验结果表明,儿茶素浓度在 0.05~0.5 mg·mL⁻¹ 的范围内具有良好的线性关系.

2.2.2 木槿花中原花青素含量测定

准确量取 2 mL 样品溶液,按照上述标准曲线方法进行测定,加入 2.5 mL 浓度为 30 g·L⁻¹ 香草醛溶液,然后加入 2.5 mL 30% 硫酸溶液,30℃ 条件下避光反应 20 min,以样品溶液为空白,在 500 nm 处测定吸光度值.

3 结果与讨论

3.1 不同原料处理和提取方式实验

3.1.1 原料处理方式对提取分离的影响

准确称取 5.000 0 g 新鲜木槿花瓣 3 份,一份直接提取,一份室温条件下阴干 48 h,另一份于 50℃ 下真空干燥 24 h,提取条件为:用体积分数为 80% 乙醇溶液作浸提剂,在 60℃ 的温度条件下恒温搅拌加热 30 min,料液配比为 1:7 (g:mL). 结果见图 1.

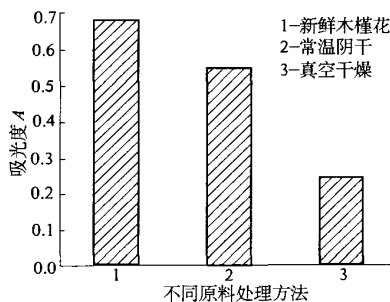


图 1 原料处理方式对提取分离的影响

Fig.1 Different pretreatment methods impacting on the extraction

由图 1 可以看出,3 种原料处理方法对提取结果有很大影响,新鲜木槿花中原花青素的提取率最

高,常温阴干的木槿花要比新鲜木槿花含量低,而真空干燥后的木槿花原花青素含量最低.由于原花青素对温度、氧和光具有敏感性,可能是由于长时间暴露在较高温度、氧和光下,部分原花青素降解的缘故^[13].这就说明原料处理对木槿花原花青素含量影响很大,实验中最好用新鲜木槿花直接提取原花青素并避免温度过高,最高不高于80℃^[13].

3.1.2 不同提取方式对提取效果的影响

准确称取5.0000g木槿花瓣2份,一份搅拌提取,一份超声提取,提取条件为:体积分数为80%乙醇溶液作浸提剂,60℃条件下提取30min,料液比为1:7(g:mL).结果如图2所示.

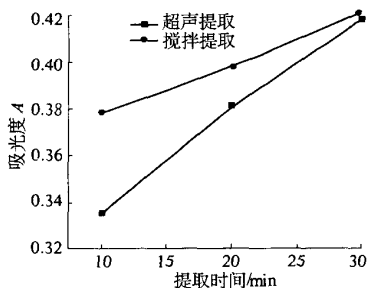


图2 不同提取方式对提取效果的影响

Fig.2 Different extracting methods impacting on the extraction

由图2可以看出,在小于20min时超声波辅助提取效果明显,但延长提取时间时并没有太大的优势.将木槿花花瓣置于香草醛硫酸溶液中进行处理,通过仔细观察发现,木槿花花瓣的上下表面显色明显,可能是原花青素聚集的地方,因此搅拌提取就已经能够把原花青素充分提取,不需用超声提取.

3.2 单因素实验

3.2.1 提取时间的选择

实验以体积分数为80%乙醇作为提取溶剂,提取温度为50℃,料液比为1:8(g:mL),提取次数为2次,实验结果如图所示.

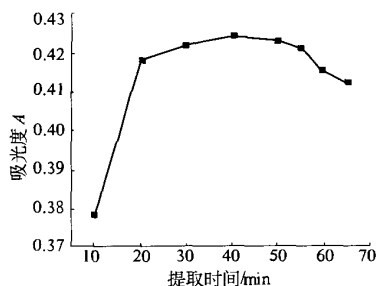


图3 提取时间对提取效果的影响

Fig.3 Extracting time impacting on the extraction

万方数据

由图3可知,提取时间小于30min时,溶剂中原花青素浓度较低,此时固液两相间传质推动力大,原花青素的浸出速率快,提取液中原花青素浓度随提取时间增加而大幅度增加.30min后,由于大量的原花青素已溶于提取剂中,固液相间传质推动力下降,使得原花青素浓度随时间变化的趋势变缓,继续延长提取时间原花青素浓度反而缓慢降低,可能是有部分原花青素分解的缘故.

3.2.2 提取温度的选择

以80%乙醇溶液做提取剂,料液比1:8,分别在30,40,50,60,70,80和90℃条件下提取,提取时间30min,提取两次,合并提取液并检测所得数据如图4.

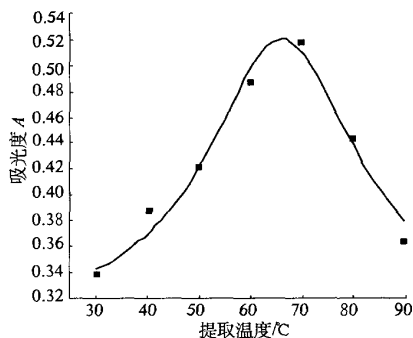


图4 温度对提取效果的影响

Fig.4 Temperature impacting on the extraction

从图4可以看出,当温度小于70℃时,原花青素提取率随温度的升高而提高.因为温度升高,分子的运动速度加快,渗透、扩散、溶解速度加快,原花青素更易从细胞组织中转移到溶剂中.当温度大于70℃时,原花青素的提取率随温度的升高而降低,这是由于随着温度的升高原花青素产生热解,结构被破坏导致提取率下降^[12-13].

3.2.3 料液比的选择

准确称取5.0000g木槿花瓣若干份,加入体积分数为80%乙醇溶液,提取温度为60℃,分别以1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9和1:10(g:mL)的料液比提取30min,所得结果如图5所示.

从图5可以看出,溶剂用量越大提取率越高,但过大的料液比会造成溶剂和能源的浪费,并给以后的操作带来困难.

3.2.4 乙醇浓度的影响

准确称取5.0000g木槿花瓣若干份,加入40mL乙醇溶液,体积分数分别为40%、50%、60%、70%、80%、90%和100%,提取温度为60℃,提取30min,所得结果如图6所示.

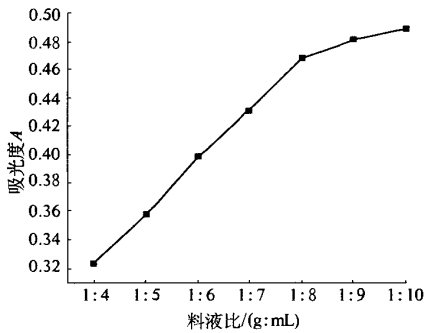


图5 料液比对提取效果的影响

Fig. 5 Solid-liquid ratio impacting on the extraction

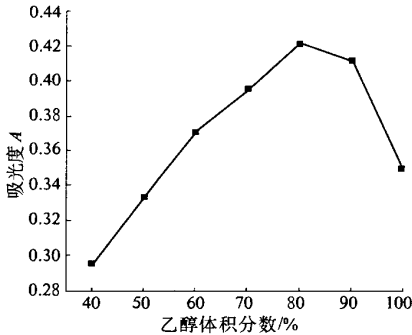


图6 乙醇浓度对提取效果的影响

Fig. 6 Ethanol concentration impacting on the extraction

由图6可以看出随着乙醇浓度的增加,吸光度逐渐增大,提取率增加.当乙醇浓度达到80%时,原花青素提取率最高,而后乙醇体积分数再增加,原花青素的溶解度减少.这可能是因为随着乙醇浓度的增大,一些醇溶性杂质和亲脂性强的成分溶出量增加,这些成分与原花青素竞争同乙醇-水分子结合,从而导致原花青素的提取率降低^[14].

3.2.5 提取次数的选择

准确称取5.000 0 g木槿花瓣若干份,加入体积分数为80%乙醇溶液,料液比1:8(g:mL),提取30 min,提取温度为60℃,所得结果如图7所示.

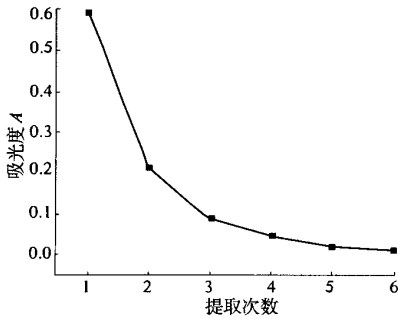


图7 提取次数对提取效果的影响

Fig. 7 Extracting times impacting on the extraction

从图7可以看出,经过2次提取后,木槿花中的大部分原花青素已被提取出来,以后几次的提取物中原花青素的量已经很少,曲线已趋向平缓,因此确定提取次数为2次.

3.3 正交实验

在单因素实验的基础上,选出影响原花青素提取效果的因素:乙醇浓度、提取时间、提取温度和料液比.笔者利用正交实验分析了上述4种因素在三个水平上对原花青素提取效果的影响.因素水平安排见表1,正交实验结果见表2.

通过正交实验得出:最优水平为A₃B₂C₃D₃,即提取剂为体积分数为90%乙醇,提取时间30 min,提取温度为70℃,料液比1:9(g:mL).各种因素对提取效果影响的主次顺序依次为:提取温度>提取时间>乙醇浓度>料液比.

经过多次重复试验发现,此优化条件的提取率最高,具有很好的重现性.

表2 花青素提取效果正交实验结果处理

Tab. 2 Handling on Result of orthogonal experiment					
实验号	A	B	C	D	原花青素 提取率/%
1	1	1	1	1	1.99
2	1	2	2	2	2.02
3	1	3	3	3	2.45
4	2	1	2	3	2.24
5	2	2	3	1	2.65
6	2	3	1	2	2.13
7	3	1	3	2	2.50
8	3	2	1	3	2.31
9	3	3	2	1	2.24
K1	6.46	6.73	6.43	6.88	
K2	7.02	6.98	6.50	6.65	
K3	7.05	6.82	7.60	7.00	
k1	2.15	2.24	2.14	2.29	
k2	2.34	2.33	2.17	2.22	
k3	2.35	2.27	2.53	2.33	
R	0.20	0.09	0.39	0.11	

4 结论

根据实验结果与分析可知,采用搅拌提取,乙醇为提取溶剂,能够把木槿花中原花青素充分提取出来.通过单因素和正交实验,考虑各因素对原花青素提取效果的影响,木槿花中原花青素提取的最佳工艺条件为:提取体积分数为90%乙醇溶剂,提取温度60℃,料液比1:9(g:mL),提取时间30 min,提取2次.粗提物占新鲜木槿花瓣的7.3% 原花青素得率2.63%.由于粗提物中仍含

有一些水溶性大分子的杂质如果胶、粘液质和糖类,还有鞣质、有机酸等,它们会影响到木槿花中原花青素的精制,故今后需要对木槿花中原花青素的分离纯化做进一步的研究。

参考文献:

- [1] 苏万楷,李 裕,黄家灿,等. 木槿植物资源的利用价值及开发潜力. 四川林业科技,2005,26(2):80-83.
- [2] 蒋益花,蒋新龙. 木槿花红色素的提取及理化性质研究[J]. 中国食品添加剂,2006,(4):86-90.
- [3] 张庭廷,郑 艳,李蜀萍. 木槿花微量元素分析[J]. 基层中药杂志,1999,13(1):22-23.
- [4] 张道敬,张 偲,吴 军,等. 药用木槿属植物化学成分和药理作用研究进展[J]. 中南药学,2005,3(3):158-160.
- [5] YUN B S, RYO I J, HIBISPEPTIN B. A novel cyclic peptide from hibiscus syriacus[J]. Tetrahedron,1998,54:15155-15160.
- [6] CHANG Y C, HUANG K X. Hibiscus anthocyanins - rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL - mediated macrophages apoptosis[J]. Food and Chemical Toxicology 2006,44:1015 - 1023.
- [7] CHRISTIAN K P, NAIR M G. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of sorrel[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19: 778-783.
- [8] 马迎杰,周宝利,程孙亮,等. 超声波提取番茄果实中类胡萝卜素条件的优化[J]. 植物生理学通讯,2005,41(5):659-661.
- [9] 李大婧,刘春泉,王振宇. 超声波法提取万寿菊花中叶黄素的工艺条件优化[J]. 江苏农业学报,2005,21(4):374-377.
- [10] 顾红梅,张新申,蒋小萍. 紫薯中花青素的超声波提取工艺[J]. 化学研究与应用,2004,16(3):404-408.
- [11] MARIA I S M, VALERAI F P, CLAUDIO D. Optimization of the sonication extraction method of hibiscus tiliaceus flowers[J]. Ultrasonics Sonochemistry,2006,13:242 - 250.
- [12] 张泽生,赵春艳,徐 英,等. 山楂果中原花青素提取工艺研究[J]. 天然产物研究与开发,2007,(19):127-130.
- [13] MENELAOS P, BENNO Z, ANNETT M, et al. Online coupling of pressurized liquid extraction, solid - phase extraction and high - performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt[J]. Journal of Chromatography A, 2002, (958):9-16.
- [14] 吕丽爽. 葡萄籽中低聚原花青素提取工艺初探[J]. 食品工业科技,2002,23(1):40-43.

Study on Extraction Procedure of Proanthocyanidins from Hibiscus Syriacus Linn

ZHANG Jie, LI Rui - guang, CHEN Wei - hang

(School of Chemical and Energy Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The content of proanthocyanidins from the flowers of Hibiscus syriacus Linn was regarded as the index of examination. This paper studied the concentration of ethanol, temperature, solid - liquid ratio and time of extraction as factors influencing the extraction. According to orthogonal test, the optimal extraction conditions of proanthocyanidins were showed as follows: the concentration of ethanol was 90%, the temperature of extraction was 70 ℃, the time of extraction was 30 minutes and the solid - liquid ratio was 1:9.

Key words: Hibiscus syriacus Linn; proanthocyanidins; extracting; orthogonal experiment