

山核桃外果皮黄酮提取与纯化^{*}

陈向明¹ 徐涛¹ 查甫本²

(1. 合肥学院生物与环境工程系, 合肥 230022; 2. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009)

【摘要】 采用有机溶剂萃取法提取山核桃外果皮黄酮化合物,通过单因素和正交试验确定了最佳工艺参数。结果表明,提取溶剂为体积分数70%乙醇、提取时间4 h、提取温度60℃、液料比15 mL/g条件下得黄酮化合物最高提取率为1.14%。采用硅胶色谱柱层析法纯化黄酮化合物,在液固比3 mL/g的条件下,体积分数70%乙醇以2 mL/min的流速进行洗脱,黄酮纯度提高了34.6%,总黄酮回收率达89.46%。

关键词: 山核桃外果皮 黄酮 提取 纯化

中图分类号: TS201.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2011)12-0177-05

Extraction and Purification of Flavone in *C. cathayensis* Exocarp

Chen Xiangming¹ Xu Tao¹ Zha Fuben²

(1. Department of Biological and Environmental Engineering, Hefei University, Hefei 230022, China

2. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract

In order to study the extraction and purification of flavone in *C. cathayensis* exocarp, organic solvent extraction was used to extract flavone compound in *C. cathayensis* exocarp. Through single fraction experiments and orthogonal experiments, the optimal technological parameters were determined. The result showed the maximum extraction ration of flavone compound was 1.14% under the condition of 70% ethanol, time of 4 h, temperature of 60℃, liquid-solid ratio of 15 mL/g. Silica gel chromatography was used to purify flavone, liquid-solid ratio of 3 mL/g, gradient eluted by 70% ethanol at the speed of 2 mL/min, the purity of flavone was improved by 34.6%, and its recovery reached to 89.46%.

Key words *C. cathayensis* exocarp, Flavone, Extraction, Purification

引言

山核桃外果皮是浙、皖地区的主要农业废弃物。研究表明,山核桃外果皮富含K、Mn、Ca、Fe、Cu、Zn、Mg等多种无机元素和黄酮、单宁、醌类、多糖、维生素等生物活性成分^[1]。因此,开发利用山核桃外果皮有利于提高植物资源的利用率和保护山核桃产区的生态环境。已有资料报道,可以利用山核桃外果皮制备工业钾盐——碳酸钾和焦磷酸钾^[2];山核桃外果皮黄酮化合物具有重要的生物学功能,如抑制食用油脂的自动氧化过程、清除活性氧自由基、延长油脂的储藏时间^[3];对小鼠(*Mus musculus*)经⁶⁰Co辐射所致的氧化损伤有一定的防护作用,能显著降低

血清和肝组织中的丙二醛含量并提高细胞超氧化物歧化酶的活性^[4],对农作物小麦和绿豆的苗期生长具有一定的促进作用^[5]等。目前,山核桃外果皮黄酮化合物的研究主要集中在医学、农业和食品等领域,有关山核桃外果皮黄酮化合物的提取与纯化工艺尚未见有报道。本文对山核桃外果皮黄酮的提取与纯化工艺条件进行研究,以期能为农业废弃物的开发利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

1.1.1 试验材料

植物材料:山核桃外果皮为当年产,由安徽省

收稿日期:2011-01-10 修回日期:2011-07-08

^{*} 安徽省高校省级自然科学基金重点资助项目(KJ2010A293、2006KJ190B)

作者简介:陈向明,教授,博士,主要从事农业生物资源综合利用研究,E-mail:cxming@email.hfu.edu.cn

宁国市山里仁食品有限公司提供。将山核桃外果皮捡去石块和杂物,用水稍加清洗后自然晾干,机械粉碎过 40 目筛,避光冷藏备用。

层析材料:硅胶(200~300目)用浓盐酸清除微量金属离子,蒸馏水冲洗至 pH 值 7 左右^[6],在干燥箱 110℃ 下活化 24 h,冷却至室温备用。

1.1.2 试剂与设备

试剂:芦丁标准品(优级纯,购于中国药品生物制品鉴定所)、乙醇、盐酸、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠均为分析纯。

设备:FA-1004 型电子天平(上海方瑞仪器有限公司);757 型紫外-可见分光光度计(上海雷韵试验仪器制造有限公司);UV-1600 型紫外分光光度计(北京北分天普仪器技术有限公司);SBS100 型数控记滴自动部分收集器(上海新诺仪器设备有限公司);RE-52A 型旋转蒸发器(郑州亚荣仪器设备厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 黄酮提取试验

称取山核桃外果皮粉末 5 g,经溶剂回流提取、抽滤、离心、上清液减压浓缩、干燥得黄酮粗提样品冷藏备用。

(1) 单因素试验

通过单因素试验确定提取溶剂类型、提取溶剂体积分数、提取时间、提取温度、液料比各因素的较适宜范围。其中,提取溶剂为蒸馏水、体积分数为 50% 甲醇、体积分数为 50% 乙醇、丙酮、乙酸乙酯,适宜溶剂提取的体积分数为 50%、60%、70%、80%、90%,提取时间为 1、2、3、4、5 h,提取温度为 50、60、70、80、90℃,液料比为 8、10、15、20、25 mL/g。

(2) 正交试验

在单因素试验的基础上,以溶剂体积分数、提取时间、提取温度、液料比为研究对象,按 $L_9(3^4)$ 安排四因素三水平的正交试验,黄酮提取率为评价指标。正交试验因素与水平如表 1 所示。

1.2.2 黄酮纯化试验

(1) 黄酮粗提液预处理

用体积分数为 70% 乙醇溶解黄酮粗提样品成

表 1 正交试验因素与水平

Tab.1 Factors and levels

水平	因素			
	溶剂体积 分数 $a/\%$	提取时间 b/h	提取温度 $c/^\circ\text{C}$	液料比 $d/\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$
1	60	2	60	10
2	70	3	70	15
3	80	4	80	20

质量浓度为 1.5 mg/mL 的黄酮粗提液,经适量石油醚萃取 3 次,去除脂溶性成分弃去石油醚层,留作纯化样品时使用。

(2) 硅胶色谱柱制备

采用硅胶色谱柱层析法纯化黄酮^[6]。经预处理硅胶,湿法装入 5 cm × 60 cm 玻璃色谱柱中。

(3) 解吸附条件

在黄酮粗提液与硅胶液固比 3 mL/g 的条件下,设置体积分数 20%、40%、60%、80% 甲醇和体积分数 20%、40%、60%、80% 乙醇作洗脱剂,对硅胶吸附的黄酮进行静态解吸附性能比较,以确定最佳洗脱溶剂;设置洗脱流速为 1、2、3、4、5 mL/min,采用数控记滴自动部分收集器分段收集流出液,进行动态解吸附性能比较,以确定最佳洗脱流速。

1.3 测定方法

1.3.1 评价指标

(1) 黄酮提取率:黄酮质量与山核桃果皮质量的百分比。

(2) 黄酮洗脱率:洗脱黄酮质量与吸附黄酮质量的百分比,计算式为

$$D = \frac{D_3}{D_2(D_0 - D_1)} \times 100\% \quad (1)$$

式中 D_0 ——加入的起始黄酮质量,mg

D_1 ——滤液中残余黄酮质量,mg

D_2 ——硅胶吸附的黄酮质量,mg

D_3 ——洗脱的黄酮质量,mg

1.3.2 标准曲线绘制

(1) 芦丁标准溶液的配制

精确称取芦丁(黄酮标准物)对照品 10 mg,置 10 mL 容量瓶中,用体积分数 95% 乙醇溶解并稀释到刻度,摇匀。

(2) 最大吸收波长的测定

精确量取 1.0 mL 芦丁标准溶液,用体积分数 95% 乙醇补充至 10 mL;加入质量分数 5% 亚硝酸钠 0.3 mL 摇匀,放置 6 min;再加质量分数 10% 硝酸铝 0.3 mL,放置 6 min;加入质量分数 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,用体积分数 95% 乙醇稀释至刻度;15 min 后采用 UV-1600 型紫外分光光度计在波长 200~700 nm 范围内扫描并确定黄酮吸收波长。

(3) 回归方程建立

按照 $\text{NaNO}_2 - \text{AlCl}_3$ 络合-分光光度法^[6]于波长 510 nm 处测定吸光度,作出标准曲线。得到吸光度与质量浓度关系的回归方程为

$$E = 0.086F + 0.0025 \quad (r = 0.9998) \quad (2)$$

式中 E ——吸光度

F ——黄酮质量浓度,mg/mL

1.3.3 黄酮纯度测定

准确称取纯化前、后的样品粉末各 0.1 g, 分别溶于体积分数 95% 乙醇并定容到 100 mL, 在相同条件下测定样品的吸光度, 根据回归方程计算出样品中的黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 提取条件

2.1.1 提取溶剂

定量称取山核桃果皮粉末 5.0 g, 在提取时间 4 h, 提取温度 60℃, 液料比 15 mL/g, 提取溶剂为蒸馏水、体积分数 50% 甲醇、体积分数 50% 乙醇、丙酮、乙酸乙酯的条件下, 研究溶剂对黄酮提取率的影响, 试验结果如表 2 所示。由表 2 可以看出, 黄酮提取率因溶剂的极性不同有很大区别, 蒸馏水的提取率最低, 体积分数 50% 乙醇的提取率最高。说明此类黄酮可能是一类结构呈平面型的黄酮醇分子, 因为分子间排列紧密, 引力较大, 难溶于水, 易溶解于有机溶剂^[7]。丙酮的提取率也较高, 考虑到丙酮的毒性和产物得率, 以下试验均选用乙醇作为最适提取溶剂。

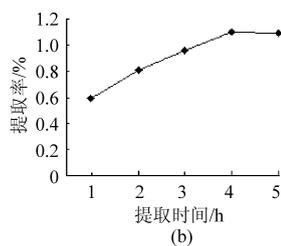
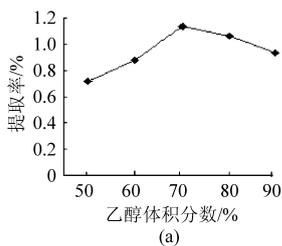
表 2 提取溶剂的选择

Tab. 2 Choice of extraction solvent

提取溶剂	蒸馏水	体积分数 50% 甲醇	体积分数 50% 乙醇	丙酮	乙酸乙酯
提取率/%	0.235	0.680	0.894	0.802	0.436

2.1.2 提取溶剂体积分数

在提取时间 4 h, 提取温度 60℃, 液料比 15 mL/g 的条件下, 研究体积分数为 50%、60%、70%、80%、90% 乙醇对黄酮提取率的影响。由图 1a 可以看出, 随着乙醇体积分数的增加, 黄酮提取率呈线性迅速增长, 当乙醇体积分数大于 70% 后, 黄酮提取率呈



下降的趋势。这是由于乙醇体积分数不同其极性不同, 黄酮类化合物具有较高的极性^[8]。因此选用 70% 乙醇浸提黄酮最为适宜。

2.1.3 提取时间

在提取溶剂体积分数 70% 乙醇, 提取温度 60℃, 液料比 15 mL/g, 提取时间为 1、2、3、4、5 h 条件下, 研究提取时间对黄酮提取率的影响。由图 1b 可以看出, 黄酮提取率与提取时间基本呈正相关, 说明适当延长提取时间, 可以提高黄酮的提取率。但时间超过 4 h 后, 黄酮提取率趋于稳定。因此, 确定提取时间为 4 h。

2.1.4 提取温度

在提取溶剂体积分数 70% 乙醇, 提取时间 4 h, 液料比 15 mL/g, 提取温度为 50、60、70、80、90℃ 的条件下, 研究温度对黄酮提取率的影响。由图 1c 可以看出, 在 50 ~ 60℃ 的范围内, 黄酮提取率随温度的增加迅速提高, 70℃ 以后黄酮提取率开始缓慢下降。究其原因, 可能是高温促进了黄酮的氧化分解, 或使部分热溶性物质释放, 干扰了测定的准确性^[9]。因此, 选用 60℃ 为最佳提取温度。

2.1.5 液料比

在提取溶剂体积分数 70% 乙醇, 提取时间 4 h, 提取温度 60℃, 液料比为 8、10、15、20、25 mL/g 的条件下, 研究液料比对黄酮提取率的影响。

从图 1d 可以看出, 液料比从 8 mL/g 开始, 随着溶剂体积的增加, 黄酮提取率迅速增长, 这是因为山核桃果皮粉末与提取溶剂的接触面增大, 黄酮类化合物容易渗透出来^[10]。液料比达到 15 mL/g 时, 黄酮提取率的增加速度开始减缓, 液料比达到 20 mL/g 时, 黄酮提取率仍有增加但增加的幅度有限。尽管继续增加溶剂体积还可以提高黄酮提取率, 但过多的溶剂不仅增加了后续操作的负荷也增加了提取成本。因此, 选用液料比 15 mL/g 为宜。

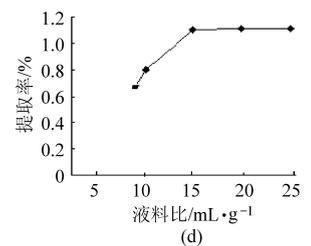
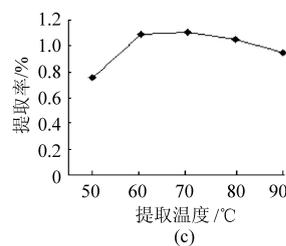


图 1 不同提取条件对黄酮提取率的影响

Fig. 1 Influence of different condition on extraction ration of flavone

2.1.6 正交试验结果

通过单因素试验, 选出适宜的提取溶剂体积分数、提取时间、提取温度和液料比进行正交试验, 试验结果如表 3 所示。

由正交试验结果得知, 影响黄酮化合物提取率的因素由大至小顺序为 A、D、C、B, 即: 提取溶剂体积分数、液料比、提取温度、提取时间。根据各因子 K 值可知, 最佳组合方案为 A₂B₃C₁D₂, 即提取溶剂

体积分数为70%乙醇,提取时间为4h,提取温度为60℃,液料比为15 mL/g时,所得黄酮提取率最高可达1.14%。将黄酮粗提液减压浓缩至最小体积,冷冻干燥得黄酮粗提样品,测得黄酮纯度为62.70%。

表3 正交试验结果分析

Tab.3 Results analysis of orthogonal experiments

试验序号	溶剂体积分数 A	提取时间 B	提取温度 C	液料比 D	提取率/%
1	1	1	1	1	0.65
2	1	2	2	2	0.89
3	1	3	3	3	0.78
4	2	1	2	3	1.06
5	2	2	3	1	0.86
6	2	3	1	2	1.14
7	3	1	3	2	0.84
8	3	2	1	3	0.80
9	3	3	2	1	0.72
K_1	0.773	0.850	0.890	0.743	
K_2	1.020	0.850	0.863	0.957	
K_3	0.787	0.880	0.827	0.880	
R	0.247	0.030	0.063	0.214	

2.2 纯化条件

2.2.1 洗脱溶剂对黄酮解吸的影响

(1) 黄酮静态解吸性能比较

在8只200 mL碘量瓶中按液固比3 mL/g分别加入质量浓度为1.5 mg/mL的黄酮粗提液和硅胶,静置吸附30 min后抽滤,测定滤液中黄酮残余量。用体积分数20%、40%、60%、80%甲醇和体积分数20%、40%、60%、80%乙醇各200 mL,每瓶分5次洗脱,收集洗脱液测定吸光度,计算黄酮洗脱量。重复3次取其平均值,结果如表4所示。

表4 不同溶剂解吸黄酮试验结果

Tab.4 Desorption results of different solvents

试验指标	甲醇体积分数/%				乙醇体积分数/%			
	20	40	60	80	20	40	60	80
吸附量/mg	3.075	3.108	3.126	3.114	3.135	3.087	3.133	3.092
洗脱量/mg	0.428	1.362	1.548	1.378	0.275	1.872	2.668	1.544
洗脱率/%	13.92	43.82	49.52	44.25	8.77	60.64	85.16	49.94

由表4可知,乙醇对黄酮的解吸效果总体上要比甲醇好,体积分数40%、60%、80%乙醇的洗脱率分别为60.64%、85.16%、49.94%,其中体积分数60%乙醇的洗脱率达到85%以上,体积分数20%乙醇的洗脱率只有8.77%。说明乙醇是黄酮的适宜洗脱剂,其体积分数为40%~80%。

(2) 黄酮动态解吸性能比较

在5 cm×60 cm玻璃色谱柱中,按液固比3 mL/g

硅胶装柱,缓慢均匀地加入质量浓度为1.5 mg/mL的黄酮粗提液于色谱柱,静置吸附30 min后抽滤,测定滤液中的黄酮残余量。用体积分数为0% (蒸馏水)、20%、40%、60%、70%、80%、90%乙醇各200 mL分5次进行梯度洗脱,以2 mL/min的流速分段收集测定,得出洗脱剂体积分数与黄酮洗脱量的动态解吸曲线,如图2所示。

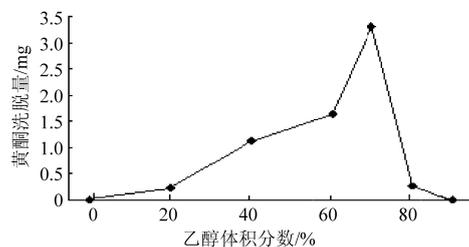


图2 黄酮动态解吸曲线

Fig.2 Desorption curve of dynamic state on flavone

从黄酮解吸的动态曲线可知,体积分数40%、60%、70%乙醇均能有效洗脱硅胶色谱柱吸附的黄酮,尤以体积分数70%乙醇洗脱率最高,体积分数20%和体积分数80%乙醇也能少量洗脱吸附黄酮,分别是1.21 mg和1.28 mg。虽然蒸馏水与体积分数90%乙醇未能洗脱下黄酮,却能将黄酮中混有的水溶性和醇溶性的杂质去除,起到纯化黄酮的作用。经测定,洗脱下的黄酮总量为33.00 mg,总黄酮的回收率达到89.46%。

2.2.2 洗脱流速对黄酮解吸的影响

按检测黄酮动态吸附性能方法装柱5支并上样。选用体积分数70%乙醇作洗脱剂,洗脱剂用量各100 mL,以1、2、3、4、5 mL/min的流速分别洗脱。每收集10 mL流出液测定黄酮洗脱量,评价5种洗脱流速与黄酮质量的解吸关系,结果如图3所示。

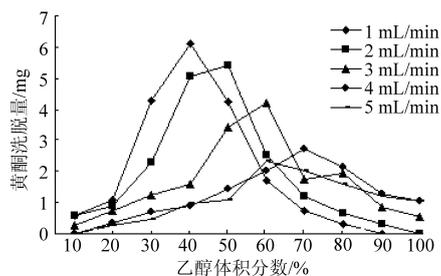


图3 不同洗脱流速下黄酮洗脱量与洗脱剂体积关系曲线

Fig.3 Relation curves of flavones desorption and eluent volume under different fluid speeds

试验表明,洗脱流速与黄酮洗脱量呈负相关关系。首先,洗脱流速为1 mL/min时黄酮洗脱量最多,流速为2~5 mL/min时黄酮洗脱量依次减少。其次,洗脱流速为1~2 mL/min时的黄酮解吸峰出现早,而3~5 mL/min的解吸峰出现迟。另外,流速慢的洗脱剂用量少,流速快的洗脱剂用量多。因为

流速慢使洗脱剂在硅胶柱上保留较长的时间,有利于充分解吸,流速快使洗脱剂尚未来得及解吸硅胶上的黄酮便流出。从图 3 可以看出,流速 1 ~ 2 mL/min 的洗脱效率高,洗脱剂用量分别在 80、90 mL 时就将吸附黄酮大部或全部洗净;流速 3 ~ 5 mL/min 的洗脱效率较低,100 mL 洗脱剂全部用完尚有黄酮未洗净。理论上洗脱剂用量越多吸附物洗脱越彻底,但洗脱剂用量过多不仅造成浪费也会影响后处理^[11]。本试验确定 2 mL/min 为最佳解吸流速,尽管 1 mL/min 流速黄酮解吸量最多,但相应也延长了黄酮的收集时间。将上述收集液合并后减压浓缩到最小体积,冷冻干燥得黄色固体粉末,测得黄

酮纯度为 84.40%。

3 结论

(1) 用体积分数 70% 乙醇浸提山核桃外果皮、液料比 15 mL/g、浸提温度 60℃、浸提时间 4 h 时,黄酮提取率达 1.14%,粗提样品中的黄酮纯度为 62.70%。

(2) 用硅胶色谱柱层析,在液固比 3 mL/g、吸附时间 30 min、70% 乙醇洗脱、流速 2 mL/min 的条件下,洗脱效果最好,黄酮回收率达 89.46%;纯化后的黄酮纯度为 84.40%,比纯化前黄酮纯度提高了 34.6%。

参 考 文 献

- Chen Xiangming, Yu Zhimin, Jin Jie. Development in the research on comprehensive utilization of *C. cathayensis* [C] // Proceedings of the 2nd International Conference on Asia - European Environmental Technology and Knowledge Transfer, 2008: 521 ~ 525.
- 陈向明,俞志敏,金杰. 山核桃外蒲壳制备碳酸钾工艺优化[J]. 农业机械学报,2008,39(9):68 ~ 72.
Chen Xiangming, Yu Zhimin, Jin Jie. Preparation technology optimization of potassium carbonate from hickory hull [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2008,39(9):68 ~ 72. (in Chinese)
- 陈向明,王华苓,马芹芬. 山核桃外蒲壳提取物对食用油脂的抗氧化性研究[J]. 中国粮油学报,2007,22(6):109 ~ 112.
Chen Xiangming, Wang Hualing, Ma Qinfen. Anti-oxidization of hickory hull extract for edible oil [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2007,22(6):109 ~ 112. (in Chinese)
- 杨琼霞,殷舒,申屠垠,等. 山核桃外果皮提取液对小鼠的辐射防护作用[J]. 浙江林学院学报,2006,23(6):604 ~ 607.
Yang Qiongxia, Yin Shu, Shen Tuyin, et al. Radioprotective effects of extract from *Carya cathayensis* nut exocarp on mice [J]. Journal of Zhejiang Forestry College, 2006,23(6):604 ~ 607. (in Chinese)
- 陈向明,马云飞. 山核桃外果皮黄酮提取液对小麦和绿豆幼苗的化感效应[J]. 西北植物学报,2010,30(4):827 ~ 831.
Chen Xiangming, Ma Yunfei. Allelopathy of flavone extract from *C. cathayensis* exocarp on wheat and mung bean seedlings [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2010,30(4):827 ~ 831. (in Chinese)
- 卢锦花. 中药有效成分提取分离技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- 卢锦花,胡晓玲,岳红,等. 大孔吸附树脂提取银杏黄酮[J]. 应用化学,2002,19(5):486 ~ 488.
Lu Jinhua, Hu Xiaoling, Yue Hong, et al. Extraction of flavonoids from ginkgo leaves by adsorptive resin [J]. Chinese Journal of Applied Chemistry,2002,19(5):486 ~ 488. (in Chinese)
- 贾韶千,吴彩娥,李艳霞. 枸杞中黄酮类化合物的超声波强化提取[J]. 农业机械学报,2009,40(5):130 ~ 134.
Jia Shaoqian, Wu Caie, Li Yanxia. Flavonoids ultrasonic extraction from *Lycium barbarum* L. [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009,40(5):130 ~ 134. (in Chinese)
- 查甫本,陈向明. 山核桃外果皮黄酮提取条件的研究[J]. 合肥学院学报,2009,19(3):68 ~ 72.
Zha Fuben, Chen Xiangming. Studies on extraction technique of total flavonoids from *C. cathayensis* exocarp [J]. Journal of Hefei University,2009,19(3):68 ~ 72. (in Chinese)
- 冯宗帅,吴彩娥,方升佐,等. 青钱柳叶总黄酮超声辅助提取工艺优化[J]. 农业机械学报,2009,40(2):130 ~ 134.
Feng Zongshuai, Wu Caie, Fang Shengzuo, et al. Technology optimization of total flavonoids extraction from cyclocarya paliurus leaves by ultrasonic assistance [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,2009,40(2):130 ~ 134. (in Chinese)
- 王育红,朱维军,潘治利,等. NKA-9 大孔树脂对苹果多酚的动态吸附工艺优化[J]. 农业机械学报,2009,40(8):119 ~ 123.
Wang Yuhong, Zhu Weijun, Pan Zhili, et al. Optimization of the adsorption property of apple polyphenols on NKA-9 macroporous resin [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,2009,40(8):119 ~ 123. (in Chinese)