

费约果叶片槲皮素的提取工艺研究

马泽刚¹, 袁小红^{1*}, 徐春霞¹, 刘卓¹, 王丹¹, 徐文学², 张新尧³ (1. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621000; 2. 乐山同泰生物科技有限公司, 四川乐山 614000; 3. 乐山市农业局, 四川乐山 614000)

摘要 [目的]研究费约果叶片槲皮素提取工艺, 优选最佳提取条件。[方法]以提取率、槲皮素收率和槲皮素纯度为指标, 采用单因素试验法, 考察提取溶剂、提取温度、提取时间、料液比和提取次数对费约果叶片槲皮素收率的影响, 优选出最佳提取工艺条件。[结果]最佳槲皮素提取工艺是在 50 ℃ 条件下, 将费约果叶片粉末置于 10 倍 90% 乙醇中回流提取 4 次, 每次 2 h, 提取率、槲皮素收率、槲皮素纯度分别为 3.486%、0.0334%、0.958%。[结论]此法高效、成本低、操作方便、工艺简单, 为费约果叶片槲皮素提取工艺的进一步研究提供了依据。

关键词 费约果叶片; 槲皮素; 提取工艺

中图分类号 S667.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)36-12881-02

Extraction Technology of Quercetin from Leaves of *Feijoa sellowiana* Berg

MA Ze-gang, YUAN Xiao-hong*, XU Chun-xia et al (School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621000)

Abstract [Objective] To determine the optimal extraction technology of quercetin from the leaves of *Feijoa sellowiana* Berg. [Method] Taking extraction rate, purity and yield of quercetin as the indices, effects of extraction solvent, extraction temperature, extraction time, solid to liquid ratio and extraction times on the extraction rate of quercetin were studied. And the optimal extraction technology was selected. [Result] The optimal extraction technology was as follow: leaves of *Feijoa sellowiana* Berg powder was added into 90% alcohol with the ratio of 1: 10 (g/ml) under 50 ℃, the leaves was by reflux extraction for 4 times with each time for 2 h. The extraction rate, extraction rate of quercetin, and purity of quercetin were 3.486%, 0.0334% and 0.958%, respectively. [Conclusion] The extraction technology was efficient, economical, convenient and this study provided a scientific basis for optimizing the extraction technology of quercetin.

Key words Leaves of *Feijoa sellowiana* Berg; Quercetin; Extraction technique

费约果 (*Feijoa sellowiana* Berg) 又名凤梨番石榴、巴西番石榴、无花果番石榴, 系桃金娘科费约果属常绿灌木或小乔木。费约果叶片主要化学成分包括维生素 E、黄酮、甾萜醇、β-胡萝卜素、对羟基苯乙醇和多酚类成分^[1], 具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤、增强免疫和抗炎等药理作用^[2]。费约果叶片中含有丰富的黄酮物质, 研究表明, 黄酮类化合物能防治心脑血管系统和呼吸系统疾病, 具有抗炎抑菌、降低血糖以及增强免疫功能等药理作用^[3-4]。槲皮素是黄酮类化合物中最具代表性的生理活性物质之一, 其在天然产物中以单体和苷的形式大量存在。近年来研究表明槲皮素具有多种生物活性, 如抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗自由基以及保护血管等^[5-6]。目前对费约果叶片槲皮素提取工艺研究的文献尚未见报道。笔者采用 HPLC 分析法, 以提取率、槲皮素收率、槲皮素纯度为指标, 采用单因素试验比较了不同提取因素对费约果叶片槲皮素提取的影响, 以期对费约果叶片的开发利用提供了理论参考和试验指导。

1 材料与方 法

1.1 材料 费约果叶片于 2013 年 9 月中旬由四川乐山同泰生物科技有限公司提供。

1.2 仪器与试剂 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。槲皮素标准品(批号 111566-200402, 中国药品生物制品检定所), 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 槲皮素含量的测定。

1.3.1.1 色谱条件。 色谱柱为 XDB C18 (4.5 × 150 mm, 5 μm); 流动相为甲醇: 0.1% 磷酸溶液 (60: 40), 柱温 25 ℃, 检测波长 360 nm, 流速 0.6 ml/min。

1.3.1.2 标准曲线绘制。 称取槲皮素标准品 4.8 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 加甲醇溶液并定容至刻度, 然后精密吸取 5 ml, 置于 10 ml 容量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度。如此反复再稀释 2 次。分别吸取 25 μl 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以峰面积的积分值(y)为纵坐标、槲皮素浓度(x)为横坐标进行线性回归, 得回归方程为 $y = 56\,296x - 202.77$ ($r^2 = 0.9998$)。

1.3.2 单因素试验。

1.3.2.1 提取溶剂的选择。 取费约果叶片粉末(60 目) 5 g, 提取溶剂分别用 10 倍粉末量的水、20% 乙醇、40% 乙醇、60% 乙醇、80% 乙醇、90% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇, pH = 8、10、13 的 NaOH 溶液, 50 ℃ 下回流提取 2 h。抽滤, 滤渣用相应溶剂洗涤, 合并并浓缩滤液, 置于 10 ml 容量瓶中, 定容, 摇匀, 得供试品溶液。平行提取 3 次。然后分别吸取 25 μl 注入液相色谱仪, 测槲皮素含量, 计算收率和纯度。

1.3.2.2 提取温度的选择。 取费约果叶片粉末(60 目) 5 g, 提取溶剂为 10 倍粉末量的 90% 乙醇, 分别在 40、50、60、70、80、90 ℃ 下回流提取 2 h。抽滤, 滤渣用相应溶剂洗涤, 合并并浓缩滤液, 置于 10 ml 容量瓶中, 定容, 摇匀, 得供试品溶液。平行提取 3 次。然后分别吸取 25 μl 注入液相色谱仪, 测槲皮素含量, 计算收率和纯度。

1.3.2.3 提取时间的选择。 取费约果叶片粉末(60 目) 5 g, 提取溶剂为 10 倍粉末量的 90% 乙醇, 50 ℃ 下分别回流提取

作者简介 马泽刚(1989-), 男, 回族, 安徽马鞍山人, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物化学。* 通讯作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事天然药物化学研究工作。

收稿日期 2014-11-07

1、2、3、4、5 h。抽滤,滤渣用相应溶剂洗涤,合并并浓缩滤液,置于10 ml容量瓶中,定容,摇匀,得供试品溶液。平行提取3次。然后分别吸取25 μl 注入液相色谱仪,测槲皮素含量,计算收率和纯度。

表1 提取溶剂对提取槲皮素的影响

溶剂	提取率//%	槲皮素收率//%	槲皮素纯度//%
水	9.728	0.005 85	0.060
20%乙醇	9.040	0.004 80	0.053
40%乙醇	7.440	0.007 80	0.105
60%乙醇	6.664	0.015 10	0.226
80%乙醇	3.552	0.011 90	0.335
90%乙醇	2.160	0.011 20	0.518
95%乙醇	2.140	0.010 60	0.495
无水乙醇	2.016	0	0
pH=8 NaOH溶液	7.140	0.005 75	0.081
pH=10 NaOH溶液	7.552	0.005 36	0.071
pH=13 NaOH溶液	5.712	0	0

表2 提取温度对提取槲皮素的影响

提取温度// $^{\circ}\text{C}$	提取率//%	槲皮素收率//%	槲皮素纯度//%
40	2.09	0.010 1	0.483
50	2.16	0.011 2	0.518
60	4.92	0.014 2	0.289
70	5.76	0.016 0	0.278
80	10.01	0.019 3	0.193
90	10.22	0.021 0	0.205

表3 提取时间对提取槲皮素的影响

提取时间//h	提取率//%	槲皮素收率//%	槲皮素纯度//%
1	2.03	0.010 5	0.517
2	2.16	0.011 2	0.518
3	4.32	0.012 7	0.294
4	4.92	0.014 4	0.293
5	5.17	0.014 8	0.286

1.3.2.4 提取料液比的选择。取费约果叶片粉末(60目)5 g,50 $^{\circ}\text{C}$ 下,分别以3、5、10、15倍于粉末量的90%乙醇,回流提取2 h。抽滤,滤渣用相应溶剂洗涤,合并并浓缩滤液,置于10 ml容量瓶中,定容,摇匀,得供试品溶液。平行提取3次。然后分别吸取25 μl 注入液相色谱仪,测槲皮素含量,计算收率和纯度。

表4 提取料液比对提取槲皮素的影响

料液比	提取率//%	槲皮素收率//%	槲皮素纯度//%
1:3	1.33	0.002 1	0.158
1:5	1.92	0.004 3	0.224
1:10	2.16	0.011 2	0.518
1:15	5.83	0.016 2	0.278

1.3.2.5 提取次数的选择。取费约果叶片粉末(60目)5 g,提取溶剂为10倍粉末量的90%乙醇,在50 $^{\circ}\text{C}$ 下依次回流提取1、2、3、4、5次,每次2 h。抽滤,滤渣用相应溶剂洗涤,合并并浓缩滤液,置于10 ml容量瓶中,定容,摇匀,得供试品溶液。平行提取3次。然后分别吸取25 μl 注入液相色谱仪,

测槲皮素含量,计算收率和纯度。

表5 提取次数对提取槲皮素的影响

提取次数	提取率//%	槲皮素收率//%	槲皮素纯度//%
1	2.160	0.011 2	0.518
2	2.930	0.019 5	0.665
3	3.302	0.026 6	0.805
4	3.486	0.033 4	0.958
5	3.513	0.034 1	0.971

2 结果与分析

2.1 提取溶剂对费约果叶片槲皮素提取的影响 由表1可见,使用乙醇作为溶剂时的提取效果比水和碱水作为溶剂的提取效果好。当乙醇浓度在20%~60%时,随着乙醇浓度的不断增大,槲皮素的收率也增大;当乙醇浓度在60%~100%时,随着乙醇浓度的不断增大,槲皮素的收率不断减小,当乙醇浓度达100%时,高效液相色谱仪未检测出槲皮素。当乙醇浓度达60%时,槲皮素的收率最大,但水溶性杂质也容易被提取出来,导致其纯度较低。因此,综合槲皮素的收率和纯度来考虑,确定提取溶剂为90%乙醇。

2.2 提取温度对费约果叶片槲皮素提取的影响 从表2可以看出,随着提取温度的升高,槲皮素收率呈上升趋势,当温度达90 $^{\circ}\text{C}$ 时,槲皮素收率最大,但其纯度较低,其他水溶性杂质含量高。因此,综合槲皮素的收率和纯度来考虑,确定提取温度为50 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 提取时间对费约果叶片槲皮素提取的影响 由表3可见,随着提取时间的增长,槲皮素收率呈上升趋势,但其变化不大,可能是此因素不是提取槲皮素的主要因素。因此,综合槲皮素的收率和纯度来考虑,确定提取时间为2 h。

2.4 料液比对费约果叶片槲皮素提取的影响 试验结果表明(表4),随着固液比增加,槲皮素的收率增加较为明显,当提取料液比达1:10以后,收率增加较小。综合槲皮素的收率和纯度来考虑,因此确定最佳料液比为1:10。

2.5 提取次数对费约果叶片槲皮素提取的影响 从表5可以看出,随着提取次数增加,提取率、槲皮素的收率增加,纯度也在增加。但提取次数分别为4次、5次时,提取率、槲皮素的收率及纯度变化不大。考虑试验实际情况,因此最佳提取次数为4次。

3 讨论

综上所述,最佳槲皮素的提取工艺为在50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,将费约果叶片粉末置于10倍90%乙醇中回流提取4次,每次2 h,提取率、槲皮素收率、槲皮素纯度分别为3.486%、0.033 4%、0.958%。通过验证试验发现,其结果与预测结果接近,表明该提取工艺稳定、可行。现有技术中,尚未见有费约果叶片槲皮素提取技术的报道。同时该试验也为今后费约果叶片的开发利用提供了理论参考和实验指导。

参考文献

- [1] DAVID B D. Feijoas-Origins, Cultivation and uses[M]. New Zealand: The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd., 2002: 7-79.

抑菌浓度范围为 0.080 ~ 0.100 g/ml。

表 3 蜀本草多糖提取液的抑菌作用

多糖浓度 g/ml	抑菌圈直径//mm			
	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	酵母菌
0.125	13.1	12.1	14.7	10.0
0.250	15.3	14.9	15.6	10.0
0.500	16.6	15.8	17.1	10.0

注:抑菌环直径在 15 mm 以上为抑菌能力强;在 10 ~ 15 mm 为抑菌能力较强;在 10 mm 及其以下为抑菌能力弱。

表 4 多糖对几种菌的最低抑菌浓度

多糖浓度//g/ml	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	黄色葡萄球菌
0.120	-	-	-
0.100	+	+	-
0.080	+	+	+
0.060	+	+	+
0.030	+	+	+
0.015	+	+	+

注:“+”表示有菌生长,“-”表示无菌生长。

2.5 热稳定性试验结果 由最低抑菌浓度结果继续做蜀本草多糖提取物的抗热性测定试验,结果发现(表 5),金黄色葡萄球菌在 80 °C 下有菌生长,在 100 和 121 °C 下无菌生长;大肠杆菌在 3 种温度下均无菌生长;枯草芽孢杆菌在 80 和 100 °C 下有菌生长,在 121 °C 下无菌生长。3 种试验细菌的耐热性分别为金黄色葡萄球菌 80 °C 加热 30 min 致死,大肠杆菌 75 °C 下加热 1 min 致死,枯草芽孢杆菌 121 °C、0.1 Mpa 下加热 30 min 致死。以上分析可见,蜀本草多糖提取物在 80 °C 是稳定的,在 100 °C 下也是稳定的,在 121 °C 下多糖性质被改变,使其不能抑菌。

表 5 3 种菌在不同温度下的生长情况

温度//°C	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌
80	-	+	+
100	-	+	-
121	-	-	-

注:“+”表示有菌生长,“-”表示无菌生长。

3 结论

(1)蜀本草多糖的提取方法主要有热水提法、酶提法、超声辅助提法,试验中发现蜀本草叶片经过组织匀浆后再用热水提效果较好,有可能成为替代超声波辅助提法的又一工艺,并通过正交试验对该工艺进行了条件优化,找到了最佳

工艺条件为提取温度 65 °C、料液比(m/v)1:45、提取时间 75 min,多糖得率最高为 6.28%。

(2)试验中按照最优条件提取的蜀本草多糖对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等 3 种试验细菌有抑制作用,对酵母菌无作用。其中对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度范围在 0.100 ~ 0.120 g/ml,金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度范围为 0.080 ~ 0.100 g/ml。

(3)蜀本草多糖在 100 °C 下具有抗菌活性,具备良好的热稳定性,具有良好的应用前景。

(4)素有“天然抗生素”之美称的蜀本草,其具有广谱的抗菌作用^[10-11],这一点对于在抗生素滥用的今天来说尤为重要。近年来,关于蜀本草多糖的研究屡见不鲜,诸多文献对其化学结构和药理作用的研究还处于初步阶段,相关研究工作有待进一步深入。如能将多糖进行分离纯化后,探究单一成分的作用,将体外与体内试验有机结合,并从宏观到微观层次上研究蜀本草多糖作用机制,则能更好地将相关理论应用于生产实践。如今,保健食品市场不断扩大,越来越多的人对其认知度和购买欲随之提高,而活性多糖现已成为天然药物学和保健食品学的研究热点,寻找高效天然无毒副作用药物是保健食品研究项目之一。

参考文献

- [1] 王玉生,蔡岳文. 南方药用植物图鉴[M]. 汕头:汕头大学出版社,2004:60.
- [2] 李海燕,王旭深. 马齿苋多糖提取方法的比较[J]. 第一军医大学分校学报,2005,28(2):186-187.
- [3] 陈钧辉,李俊,张冬梅,等. 生物化学实验[M]. 4 版. 北京:科学出版社,2008:15-16.
- [4] 曲晓兰,苏延友,高红莉. 马齿苋不同采收期多糖含量的测定[J]. 时珍国医国药,2006,17(10):1960-1961.
- [5] 朱丹,牛广财,孟宪军. 马齿苋多糖提取工艺的研究[J]. 中国农学通报,2006,22(8):119-122.
- [6] 曹光明. 中药浸提物生产工艺学[M]. 北京:化学工业出版社,2009:51-61.
- [7] PALAILISWAMYA U R, BIBLE B B, MCAVOY R J. Oxalic acid concentrations in Purslane(*Portulaca oleraceae* L.) is altered by the stage of harvest and the nitrate to ammonium ratios in hydroponics[J]. Journal of American Society for Horticultural Science,2004,102(2):267-275.
- [8] 屠鹏飞. 天然糖化学[M]. 北京:化学工业出版社,2013:116-122.
- [9] DING S, DUDLEY E, PLUMMER S, et al. Fingerprint profile of Ginkgo biloba nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS[J]. Phytochem,2008,69(13/14):1555-1564.
- [10] 刘绍军,周丽艳,赵希艳. 马齿苋提取物抑霉作用及其在番茄贮藏上的应用[J]. 食品科技,2006,31(2):103-105.
- [11] RADHAKRISHNAN R, ZAKARIA M N, ISLAM M W. Neuropharmacological actions of *Portulaca oleraceae* L. v. *sativa* (Hawk) [J]. Journal of Ethnopharmacology,2001,76(2):171-176.
- [12] 曹伟国,刘志勤,邵云,等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报,2003,3(12):2241-2247.
- [13] 陈辉. 槲皮素的心血管保护作用[J]. 国际心血管病杂志,2007,34(2):57-59.
- [14] 舒毅,谭陶,张恩宇,等. 槲皮素的药理学研究进展[J]. 华西药理学杂志,2008,23(6):689-691.

(上接第 12882 页)

- [2] VUOTTO M L, BASILE A, MOSCATIELLO V, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit[J]. Int J Antimicrob Agents, 2000,13(3):197-201.
- [3] 宋慧,李勇. 黄酮类化合物的保健作用[J]. 中国食物与营养,2004(11):45-47.