

文章编号: 1673-1689(2007)01-0060-05

苦瓜植株各部分黄酮的提取与粗黄酮含量的测定

申湘忠^{1,2}, 杨民生², 刘志成¹

(1. 湖南人文科技学院 化学与材料科学系, 湖南 娄底 417000; 2. 湖南师范大学 化学与化工学院, 湖南 长沙 410081)

摘要:介绍了以苦瓜植株各部分为原料用微波法提取黄酮,通过正交试验对该方法进行了最佳条件的探讨。实验结果表明:以体积分数50%乙醇水溶液作提取溶剂,固液比1:30(g/mL),微波照射2 min,浸提时间1 h,提取温度80℃,苦瓜叶中黄酮提取率最高。并用该最佳条件分别提取苦瓜叶、茎、果、根的黄酮类化合物,测其质量分数分别为1.616%、0.453%、1.535%、0.875%。

关键词:苦瓜 粗黄酮 提取 测定 微波

中图分类号: Q 946

文献标识码: A

Study on Extraction and Determining the content of Flavonoids in *Momordica charantia* L of Variety Parts

SHEN Xiang-zhong^{1,2}, YANG Min-sheng², LIU Zhi-cheng¹

(1. Department of Chemistry and Material Science, Hunan Institute of the Humanities, Science and Technology, Loudi 417000, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: The optimum conditions for flavonoids extraction from different party of *Momordica charantia* L through microwave irradiation were careful investigated. The optimum conditions for flavonoids extraction were as follow: the ratio of solid to liquid was 1:30 with 50% ethanol, microwave time was 2 min, extraction time was 1 h and temperature was 80℃. By combinational optimal extraction conditions, a highest flavonoids extraction rate 1.616%, 0.453%, 1.535% and 0.875% was achieved in leaf, stem, fruit and foot, respectively.

Key words: *Momordica charantia* L flavonoids extraction determination microwave

苦瓜又称凉瓜、锦荔枝,是葫芦科苦瓜属植物,在我国各地均有种植。苦瓜不仅是人们喜爱的瓜类蔬菜,其众多的药用功能更引起人们关注,它有消暑解热、明目解毒的作用,而且还有抗癌、降低血糖、治疗糖尿病的作用。近来研究表明,苦瓜对艾滋病也有治疗作用。由于提取工艺的优劣直接关系到药用植物中有效成分的收率、后加工的难易程度以及生产成本的高低,所以,研究苦瓜组分的提

取体系对开发苦瓜保健品及药品都具有很好的参考价值和指导意义。通过采用微波和乙醇相结合的方法提取苦瓜叶、茎、果、根中的黄酮类化合物^[1-4],探讨了从苦瓜类植物中提取黄酮类化合物的最佳工艺条件,利用所得的最佳工艺条件分别提取了苦瓜叶、茎、果、根中的黄酮类化合物,并测定了它们的含量,为苦瓜类植物的充分利用提供了新的方法。

收稿日期: 2006-06-21.

作者简介: 申湘忠(1965-),男,湖南邵东人,生化仪器测试分析硕士研究生. Email: jdsxz7656@163.com

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

材料 : 苦瓜叶、茎、果、根 , 采自娄底市郊。
UV2501 紫外可见分光光度计 : 日本岛津公司产品 ; 721 型分光光度计 : 厦门分析仪器厂生产 ; SYZ550 型石英亚沸高纯水蒸馏器 : 上海浦东物理光学仪器厂生产 ; AE-240 型电子分析天平 : 梅特勒托利多仪器(上海)有限公司产品 ; HH-2 型电热恒温水浴锅 : 上海浦东物理光学仪器厂生产 ; 101-2AB 电热鼓风干燥箱 : 天津市泰斯特仪器有限公司产品 ; SHB-Ⅲ型循环式多用真空泵 : 郑州长城科技工贸有限公司产品 ; 微波炉 : 上海松下微波炉有限公司生产 ; 粉碎机 : 武艺县屹立工具有限公司产品。无水乙醇、石油醚、亚硝酸钠溶液(5 g/dL)、硝酸铝溶液(10 g/dL)、氢氧化钠溶液(4 g/dL)。所用试剂均为分析纯 , 水为亚沸高纯蒸馏水。芦丁 : 中国医药集团上海化学试剂公司(生化试剂)产品。

1.2 实验方法

1.2.1 材料的处理 用自来水快速冲洗苦瓜叶、茎、果、根 , 自然干燥 , 然后置于 50 ℃ 恒温干燥箱中干燥 12 h , 取出后粉碎 , 将它们依次过 200 目、140 目、70 目、40 目、20 目分样筛 , 取其相应的级分 , 装入干燥的磨口瓶中备用。条件实验选择用苦瓜叶。

1.2.2 标准溶液的配制和标准曲线的制作 准确称取在 120℃ 干燥至恒重的芦丁标准试剂 0.050 g , 用体积分数 30% 乙醇超声溶解 , 并完全移入 500 mL 容量瓶中 , 用体积分数 30% 乙醇定容。分别取上述芦丁标准溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mL 于 8 只 25 mL 容量瓶中 , 用体积分数 30% 乙醇补充至 12.5 mL , 加入 5 g/dL 的 NaNO_2 1.0 mL , 摇匀 , 放置 5 min 后加入 10 g/dL 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 1.0 mL , 6 min 后再加入 4 g/dL 的 NaOH 5.0 mL , 摇匀 , 用体积分数 30% 乙醇稀释至刻度 , 10 min 后于波长 505 nm 处比色测定 , 试剂为空白参比 , 结果见表 1。

根据表 1 结果用最小二乘法作线性回归 , 得芦丁质量浓度(Y)与吸光度(A)的关系曲线的回归方程式 : $Y = 0.073\ 8A + 0.000\ 233$ 。相关系数 $r = 0.999\ 7$ 。本检测方法芦丁质量浓度与吸光度有良好的线性关系。

1.2.3 苦瓜植株各部分黄酮类化合物的提取和测定 称取 2.0 g 苦瓜果类植物粉 , 用体积分数 50% 乙醇以固液比 1 : 30(g/mL)先在微波炉中用解冻挡

表 1 芦丁标准质量浓度—吸光度的关系
Tab.1 Standard rutin concentration-absorbance

标样体积/mL	质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	吸光度 A
1	0.00	0.000
2	0.004	0.050
3	0.008	0.105
4	0.012	0.153
5	0.016	0.214
6	0.020	0.269
7	0.024	0.323
8	0.028	0.376

处理 2 min , 然后在一定温度下加热回流提取 , 趁热减压过滤 , 滤液用石油醚分次萃取出叶绿素及可溶性脂类后完全移入 100 mL 容量瓶 , 用体积分数 30% 乙醇定容至刻度。取提取液 2 mL 分别置于 4 只 25 mL 容量瓶中 , 用体积分数 30% 乙醇补充至 12.5 mL , 加入 5 g/dL 的 NaNO_2 1.0 mL , 摇匀 , 放置 5 min 后加入 10 g/dL 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 1.0 mL , 6 min 后再加入 4 g/dL 的 NaOH 5.0 mL , 混匀 , 用体积分数 30% 乙醇稀释至刻度 , 10 min 后于波长 505 nm 处比色测定 , 试剂为空白参比。测定吸光度 , 取其中 3 次的平均值 , 根据回归方程得到其质量分数 , 然后计算提取率。

提取率 = (黄酮类化合物质量 / 干物料质量) $\times$ 100%

1.3 显色时间的选择及其稳定性试验

分别考察芦丁标样和提取液的稳定性 , 按 1.2.1 和 1.2.2 所述方法操作 , 每隔 3 min 测定一次吸光度值 , 观察吸光度值在 3 ~ 60 min 内的变化。

1.4 干扰试验

在混合液中分别加入 4.0 g/L 的葡萄糖、蔗糖和麦芽糖和常见的 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 进行实验 , 观察吸光度的变化。

1.5 回收率实验

在不同提取液中加等量芦丁标样 , 按 1.2.1 和 1.2.2 所述方法操作 , 测定其回收率。

2 结果与讨论

2.1 最佳波长的选择

分别用 0.8、1.0、1.2 mL 芦丁标准溶液 , 按 1.2.2 节方法操作 , 在 400 ~ 600 nm 范围内进行波长选择。实验结果表明 , 溶液的最大吸收波长为 505 nm。

2.2 浸提条件的选择

2.2.1 浸提溶剂的选择 黄酮类化合物无论是游离的黄酮甙元还是黄酮甙都易溶于乙醇、甲醇等溶剂中。根据文献 [4],丙酮的提取效果比乙醇、甲醇的好,以体积分数 70% 丙酮提取最好。但是由于丙酮价格较贵且含有毒成分,生产上一般不用。实验选择常使用的乙醇进行初步实验,结果表明:提取苦瓜叶中的总黄酮时,乙醇的体积分数低于 50% 时过滤出现困难,乙醇体积分数高于 60% 时叶绿素等脂溶性物质的溶出也增大,造成待测液中杂质较多,分离纯化难度也大大增加。为了后续的过滤、回收溶剂、干燥、纯化等操作比较容易,本实验中选择以体积分数 50% 的乙醇溶剂进行提取。

2.2.2 粉碎粒度对浸提效果的影响 粒度不同浸提效果也不同,粒度小浸提效果好,但粒度不宜过小,否则过滤出现困难。本实验中以过 20、40、70、140、200 目筛的几种粒度的苦瓜叶粉末进行比较(见表 1)。结果表明,以 140 ~ 70 目的粉末浸提效果最好。

表 2 粒度大小对黄酮提取的影响

Tab.2 Effect of granularity on the flavonoids extraction

粒度/目	吸光度(A)	粗黄酮质量分数/%
<200 目	0.181 1	0.981
200 目 ~ 140 目	0.191 7	1.039
140 ~ 70 目	0.207	1.122
40 ~ 20 目	0.198	1.073
0 ~ 20 目	0.188 1	1.02

注:条件:苦瓜叶 2 g,70 ℃,回流 1 次,每次 1 h,体积溶剂/苦瓜叶量(mL/g)=30: 1。

2.2.3 微波处理时间对浸提效果的影响 准确称取苦瓜叶粉末 2.0 g 选择不同微波解冻挡处理时间。按实验方法 1.2.2 提取,测定吸光度,结果见表 3:

表 3 微波处理时间对黄酮提取的影响

Tab.3 Effect of microwave time on the flavonoids extraction

微波处理时间/min	吸光度(A)	粗黄酮质量分数/%
0.5	0.210 7	1.142
1.0	0.236 9	1.284
1.5	0.241 5	1.309
2.0	0.257 4	1.395
2.5	0.249 6	1.353
3.0	0.235 6	1.277
4.0	0.211 3	1.145

取效果最好,因为微波处理可以促进苦瓜叶细胞中有效活性成分的溶出,而且通过微波的强辐射使苦瓜叶细胞的内部结构破坏,使黄酮分子快速地从细胞里扩散到细胞外的溶剂中,从而使提取率大大的增加。而当微波处理时间超过 2 min 之后吸光度反而下降则是由于微波的强热辐射时间太长,导致了温度过高,造成了黄酮结构的破坏吸光度反而下降。另外长时间的微波处理也导致了乙醇溶剂的挥发和暴沸,反而不利于提取。

2.2.4 温度对浸提效果的影响 准确称取苦瓜叶粉末 2 g,选择不同处理温度。按实验方法 1.2.2 提取,测定吸光度,结果见表 4。

表 4 温度对黄酮提取的影响

Tab.4 Effect of temperature on the flavonoids extraction

温度/℃	吸光度(A)	粗黄酮质量分数/%
50	0.106 7	0.578
60	0.125 5	0.680
70	0.234 4	1.271
80	0.261 2	1.416
90	0.242 6	1.315

由表 4 中数据分析得知,当温度达到 80 ℃,此时吸光度最大、提取率最高。当温度为 50 ~ 60℃时吸光度变化不大,当温度升高到 70 ℃以上,吸光度大幅度增加,这主要是由于黄酮类化合物在乙醇中的溶解度随温度的升高而增加,同时由于提取温度的增加提取液的黏度减小,扩散系数增加促进提取速度的加快;而当提取温度超过 80 ℃时提取率反而下降则是由于温度过高,破坏了黄酮分子的结构,导致了提取率下降。

2.2.5 回流时间对浸提效果的影响 准确称取苦瓜叶粉末 2.0 g,选择不同回流时间。按实验方法 1.2.2 提取,测定吸光度,结果见表 5。

表 5 回流时间对黄酮提取的影响

Tab.5 Effect of reflux time on the flavonoids extraction

回流时间/min	吸光度(A)	粗黄酮质量分数/%
15	0.264 7	1.435
30	0.235 9	1.279
45	0.273 0	1.480
60	0.276 0	1.496
120	0.258 2	1.399
180	0.202 9	1.100
240	0.144 6	0.784
300	0.120 1	0.651

从表 3 中数据分析得知,当微波处理 2 min 提

实验结果表明 , 当提取时间为 60 min 时提取效果最好 , 提取时间过短黄酮类化合物没有完全浸出到溶剂中 , 而当时间超过 60 min 提取率反而下降 , 这是由于提取时间太长有部分乙醇被挥发 , 导致沸点逐渐增大 , 从而破坏了某些黄酮类化合物。

2.2.6 固液比对浸提效果的影响 准确称取苦瓜叶粉末 2.0 g , 选择不同固液比。按实验方法 1.2.2 提取 , 测定吸光度 , 结果见表 6。

表 6 固液比对黄酮提取的影响
Tab.6 Effect of solid to liquid ratio on the flavonoids extraction

固液比(g/mL)	吸光度(A)	粗黄酮质量分数/%
1: 15	0.154 2	0.836
1: 20	0.189 1	1.025
1: 25	0.213 8	1.159
1: 30	0.243 3	1.319
1: 35	0.228 6	1.239
1: 40	0.229 2	1.242

结果表明黄酮类化合物的浸出率随着溶剂量的增加而增大 , 一般来说溶剂体积越大有效成分浸出越完全 , 提取率越大 , 但过大的固液比会造成溶剂和能源的浪费 , 并且给后续的浓缩工作带来困难。因此 , 从降低成本等综合考虑 , 确定固液比为 1: 30(g/mL) 左右比较合适。

2.3 正交实验确定提取的最佳条件

根据上述各种因素影响的试验结果和已有的资料介绍及实际情况 , 确定以回流时间、提取温度、固液比、微波处理时间 4 因素 , 进行正交实验设计 , 测定苦瓜叶浸提样品中的总黄酮的提取率。正交试验的设计及结果与分析见表 7、表 8。

表 7 正交实验方案 $L_9(3^4)$
Tab.7 The program of experiment by orthogonal design

因子	微波处理	固液比 B/	回流时间	提取温度
水平	时间 A/min	(g/mL)	C/min	D/℃
1	1.5	1: 25	45	70
2	2.0	1: 30	60	80
3	2.5	1: 35	75	90

相同实验条件同一批次平行提取 3 份样品。按实验方法测定各提取液中总黄酮的含量。从表中通过极差分析可知 , 影响黄酮类化合物提取的主次顺序为 : 微波处理时间(A) > 回流时间(C) > 固液比(B) > 回流温度(D) , 最好的提取条件为乙醇的体积分数为 50% , 提取时间为 45 min , 微波处理

时间为 2.5 min , 提取温度为 80 ℃ , 固液比为 1: 35 (g/mL) , 即 $A_3B_3C_1D_2$ 。

表 8 黄酮化合物提取正交实验结果
Tab.8 The results of the flavonoids with orthogonal design experiment

水平	因素				粗黄酮 质量分数/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.011
2	1	2	2	2	1.132
3	1	3	3	3	1.392
4	2	3	2	2	1.203
5	2	2	1	3	1.226
6	2	1	3	1	1.345
7	3	1	2	3	1.258
8	3	3	3	1	1.312
9	3	2	1	2	1.529
k1	3.53	3.60	3.75	3.66	
k2	3.76	3.87	3.58	3.85	
k3	4.08	3.90	4.04	3.86	
K1	1.18	1.20	1.25	1.22	
K2	1.25	1.29	1.19	1.28	
K3	1.36	1.30	1.35	1.29	
R	0.18	0.10	0.16	0.06	

2.4 浸提次数的确定

称取 2 g 苦瓜叶粉末 , 在最佳条件下提取 4 次 , 结果见表 9。

表 9 不同提取次数对黄酮提取的影响
Tab.9 Effect of operation times on the flavonoids extraction

次数	粗黄酮 质量分数/%	相对 提取率/%	累计 提取率/%
1	1.531	94.16	94.16
2	0.085	5.23	99.39
3	0.009	0.55	99.94
4	0.001	0.06	100

由表 9 可知 , 浸提次数越多 , 累积提取率越高 , 但提高幅度显著下降。第 3、4 次提取率都较低 , 合计只有 0.61%。因此 , 本方法只需提取 2 次 , 即可将 99% 以上的黄酮化合物提取出来。

2.5 显色时间的选择及其稳定性试验

按实验方法 , 样品每隔 3 min 测定一次吸光度值 , 吸光度值在 10 ~ 30 min 内基本不变。本实验中选择 15 min 为显色时间。显色反应结束 30 min 后 , 在室温小于 25 ℃ 的环境中 , 其吸光度 1 h 内保持不

变。

2.6 干扰试验

在混合液中分别加入 4.0 g/L 的葡萄糖、蔗糖和麦芽糖,测定结果表明:相对误差在 ± 5% 以内,这些组合不干扰黄酮的测定;K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺对反应无影响,Fe³⁺对实验测定有一定的影响,本实验选择 EDTA 做掩蔽剂。

2.7 回收率实验

在不同提取液中加等量芦丁标样,按实验方法测得其回收率,结果见表 10。

表 10 回收率试验结果(n =4)

Tab. 10 Results of recovery

样品含 黄酮量/mg	加标量/mg	测得量/mg	回收率/%
0.166 1	0.100 0	0.266 3	100.2
0.199 8	0.100 0	0.299 4	99.7
0.066 6	0.100 0	0.166 8	100.3
0.116 4	0.100 0	0.217 5	101.0

2.8 苦瓜叶、茎、果、根总黄酮含量的测定

按实验所得的最佳条件提取苦瓜叶、茎、果、根中的黄酮类化合物,分别测其含量,结果见表 11。

黄酮类化合物在苦瓜茎、叶、果、根中的含量不同,可能与黄酮类化合物的合成、运输、积累有关,黄酮类化合物在叶、果中含量较高,原因可能是因为次生代谢化合物,它的形成以光合作用为基

础,叶、果是黄酮类化合物的产生部位。同时根作为内源生长素运输的调节物,定位在生长素运输的调节点上,也积累了一定的含量。茎作为运输通道,黄酮类化合物积累较小。

表 11 苦瓜不同器官总黄酮含量(n =5)

Tab. 11 Results of flavonoids from momordica charantial of variety organs

样品	黄酮质量分数/%
茎	0.453
叶	1.616
果	1.535
根	0.875

3 结 论

在苦瓜植株各部分黄酮类化合物提取中,影响提取效率的次要顺序为:微波处理时间 > 回流时间 > 固液比 > 回流温度。最好的提取条件为乙醇的体积分数为 50%;提取时间为 45 min;微波处理时间为 2.5 min;提取温度为 80 ℃;固液比为 1: 30 (g/mL)。苦瓜植株叶、茎、果、根中黄酮类化合物的质量分数分别为 1.616%、0.453%、1.535%、0.875%。

参考文献(References):

[1] 蔡为荣. 微波提取荷叶黄酮及其清除羟基自由基的研究 [J]. 食品科学 2004 24(9) :112 – 113.
CAI wei-rong. Study on the extraction of flavonoids from lotus leaf by microwave and It 's hydroxyl radicals scavenging capacity [J]. **Food Science** 2004 24(9) :112 – 113.(in Chinese)

[2] 曾里,刘世贵. 微波技术应用于银杏黄酮浸提的研究 [J]. 四川大学学报 :自然科学版 2004 41(4) 833 – 836.
ZENG Li ,LIU Shi-gui. Study on the process fro flavonoids extracted of ginkgobilob leaves by microwave treatmen[J]. **Journal of Sichuan University**(Natural Science Edition) 2004 41(4) 833 – 836.(in Chinese)

[3] 胡静利,陈健初. 杨梅叶黄酮类化合物最佳提取工艺研究 [J]. 食品科学 2003 23(1) 96 – 99.
HU Jing-li ,CHEN Jian-chu. Study on the optimum extracting conditions of flavonoids from myrica ruba leaves[J]. **Food Science** 2003 23(1) 96 – 99.(in Chinese)

[4] 黄泽元,王海滨,刘志伟. 芝麻叶中总黄酮的最佳提取工艺研究 [J]. 农业工程学报 2004 20(6) 201 – 203.
HUNG Zey-uan ,WANG Hai-bin ,LiU Zhi-wei. Optimum extraction technology of flavonoids in sesame leaves[J]. **Transactions of the CSAE** 2004 20(6) 201 – 203.(in Chinese)

(责任编辑 杨 萌)