

文章编号:1673-1689(2008)02-0071-04

## 纤维素酶提取陈皮黄酮的工艺条件

王岩岩, 李文娟

(长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434100)

**摘要:** 研究了纤维素酶提取陈皮黄酮的工艺条件。结果表明,与传统化学法相比,纤维素酶法提取陈皮黄酮较好,黄酮提取率从 2.78% 提高到 4.35%。对酶法提取工艺进行正交优化,得到最佳优化条件为:酶解温度为 60 ℃,酶解时间 1.5 h,提取 pH 6.0,酶用量为 0.1%。在优化条件下,纤维素酶法所得黄酮提取率可达到 6.96%,为化学法黄酮提取率的 2.5 倍。采用薄层层析对提取黄酮进行分析,发现酶法与化学法提取黄酮成分相同。

**关键词:** 纤维素酶; 黄酮; 陈皮

**中图分类号:** TQ 925

**文献标识码:** A

### Study on Conditions of Extracting Flavone from *Pericarpium citri* Reticulate by Cellulase

WANG Yan-yan<sup>1</sup>, LI Wen-juan

(College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434100, China)

**Abstract:** The conditions for extracting flavone from *Pericarpium Citri* Reticulate by cellulase were investigated. Compared with that of the chemical method, the extraction efficiency of flavone raised up to 4.35% from 2.78% by cellulase. The orthogonal results showed that the optimum extraction conditions by cellulase were listed as fellows: extraction temperature 60 ℃, extracting time 1.5 hours, pH of extracting media 6.0 and the enzyme dosage 0.1%. With optimum conditions, the extraction rate of flavone reach at 6.96%, was 2.5 times than that of the chemical method. Flavone extracted with different methods were further analyzed by TLC (thin-layer chromatography), and the identical composition of the extracted flavone were detected.

**Key words:** cellulase; flavone; *Pericarpium citri* Reticulate

陈皮,又名橘皮,为芸香科植物橘及其栽培变种的成熟果皮,是我国传统中草药之一,具有行气健脾,和胃止呕,燥湿化痰的功效<sup>[1]</sup>。陈皮主要成分为黄酮类化合物,是强自由基清除剂,具有强抗氧化作用。纤维素酶是具有纤维素降解能力的酶的总称。近年来,纤维素酶逐渐应用于中草药有效

成分提取,如马田田等<sup>[2]</sup>将纤维素酶用于黄柏小檗碱提取的预处理,小檗碱的收率可从 0.87% 提高到 1.17%。作者将纤维素酶用于陈皮黄酮的提取,以陈皮中提取的粗黄酮质量、总黄酮质量、提取率为指标,对纤维素酶提取陈皮黄酮的工艺条件进行了初步优化。

收稿日期:2006-12-06.

作者简介:王岩岩(1980-),女,湖北荆州人,工学硕士,讲师,主要从事食品生物技术方面的研究. Email: unclia@sina.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

陈皮:安徽省亳州市中药饮片厂,100℃通风干燥3h,粉碎过60目筛备用。纤维素酶:上海国药集团化学试剂公司产品(酶活性大于10U/mg);芦丁标准品:分析纯,中国药品生物制品检定所产品。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 陈皮黄酮的提取

1) 化学法:称取陈皮粉10.00g,加50%甲醇<sup>[3]</sup>水溶液200mL浸提24h,收集浸提液,滤渣重复浸提一次,合并两次的浸提液,过滤,蒸馏浓缩,用蒸发皿挥干得粗黄酮类物质。

2) 纤维素酶法:称取陈皮粉10.00g,放入200mL烧瓶中,加入0.05g纤维素酶,加入50mL pH 4.8的HAc-NaAc缓冲液,50℃水浴1.5h。然后用Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液调pH至9.0,85℃水浴15min使酶灭活。以等体积的纯甲醇加入酶解液中使甲醇浓度为50%,浸提24h,回收浸提液,滤渣再加入50%甲醇溶液100mL重复浸提一次,合并两次的浸提液,过滤,蒸馏浓缩,用蒸发皿挥干得陈皮粗黄酮(W<sub>1</sub>)<sup>[4-5]</sup>。

#### 1.2.2 黄酮含量的测定

1) 标准曲线的绘制<sup>[1]</sup>:准确称取0.0212g芦丁,用30%乙醇溶解,完全移入200mL容量瓶中定容。取此芦丁标准液0,2.5,5.0,7.5,10.0,12.5mL分别放入6支25mL容量瓶中,用30%乙醇补至12.5mL,加入0.7mL 5%NaNO<sub>2</sub>溶液摇匀放置5min;加入0.7mL 10%Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>溶液摇匀,放置5min;加入5mL 10%NaOH溶液摇匀,用30%乙醇定容放置10min,于波长510nm处测吸光度,得回归方程: $y=10.026x-0.604$ , $R^2=0.9992$ 。

2) 提取物中黄酮含量测定:准确称取提取的陈皮粗黄酮质量W<sub>2</sub>,用30%乙醇溶解,定容至100mL;取3mL放入3支25mL容量瓶中,用30%乙醇补至10mL,加入0.7mL的5%NaNO<sub>2</sub>溶液摇匀,放置5min,加0.7mL 10%的Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>溶液摇匀,放置5min;再加入5mL 10%NaOH溶液摇匀,用30%乙醇溶液定容10min后,在波长510nm处测定,将测定的吸光值A带入芦丁标准曲线中,得总黄酮量和黄酮提取率。

$$\text{总黄酮质量(g)} = \frac{0.025 \times W_1 \times (10.026A - 0.604)}{W_2}$$

$$\text{黄酮提取率(\%)} = \frac{\text{总黄酮} \times 100\%}{\text{总量}}$$

式中:W<sub>1</sub>为提取得到的陈皮粗黄酮质量(g),W<sub>2</sub>为称取的适量陈皮粗黄酮质量(g),A为测得的吸光度。

1.2.3 正交设计 根据单因素实验,选取对提取工艺有影响的主要因素(酶用量E,酶解温度T,pH值,酶解时间t),按照四因素三水平进行L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)实验,因素水平见表1。

表1 实验因素水平表

Tab.1 Factors and level of experiment

水平	因素			
	A 加酶量/%	B 温度/℃	C 时间/min	D pH
1	0.1	50	90	5.2
2	0.2	55	120	5.6
3	0.3	60	150	6.0

1.2.4 薄层层析检验 以氯仿:甲醇:水(体积比7:2.5:0.5)为展开剂在层析缸中展开,展开完毕后,在紫外灯下观察色斑,对照两样品(化学法和酶法提取液样品)色斑的差异,具体方法见文献[6]。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶法提取陈皮黄酮工艺条件的初步优化

在酶法提取陈皮黄酮的过程中,对黄酮提取影响较大的4个因素:酶解温度(T),pH值,酶解时间(t)及酶用量(E)进行了研究。

2.1.1 酶解温度对提取的影响 在pH 4.8,t为1.5h,E为0.1%条件下,酶解过程中分别采用不同的温度进行水浴,研究温度对纤维素酶提取陈皮黄酮的影响,结果见表2。可以看出,在50℃的粗黄酮提取量最高,为4.588g;而55℃下提取的粗黄酮最低,为2.823g。但是由于50℃时陈皮中总黄酮的提取量较少,仅能达到0.548g,提取率为5.48%;而55℃下黄酮的提取率可达到6.46%,因此最佳温度以55℃为宜。

表2 酶解温度(T)对黄酮提取的影响

Tab.2 Effect of enzymolysis temperature on the extraction of flavone

温度/℃	粗黄酮量/g	总黄酮量/g	提取率/%
40	2.888	0.602	6.02
45	2.929	0.589	5.89
50	4.588	0.548	5.48
55	2.823	0.646	6.46
60	3.023	0.612	6.12

**2.1.2 pH值对提取的影响** 在  $T$  为  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t$  为  $1.5\text{ h}$ ,  $E$  为  $0.1\%$  的情况下, 研究不同 pH 值的 HAc-NaAc 缓冲液对黄酮提取的影响。由表 3 可知, 当 pH 值大于  $4.4$  时, 随着 pH 值的升高, 陈皮中黄酮提取率也呈上升趋势, 可达  $7.34\%$ , 故最佳 pH 值可选用  $5.6$ 。

表3 pH值对黄酮提取的影响

Tab. 3 Effect of pH value on the extraction of flavone

pH 值	粗黄酮量/g	总黄酮量/g	提取率/%
4.0	3.113	0.476	4.76
4.4	3.421	0.424	4.24
4.8	3.044	0.574	5.74
5.2	3.602	0.646	6.46
5.6	3.287	0.734	7.34

**2.1.3 酶解时间对提取的影响** 在  $T$  为  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 为  $5.6$ ,  $E$  为  $0.1\%$  时, 研究酶解时间对陈皮黄酮的提取的影响。从表 4 中可以看出, 酶解  $2\text{ h}$  时, 黄酮的提取率最高可达到  $7.67\%$ , 因此宜选用酶解时间为  $2\text{ h}$ 。

表4 酶解时间(t)对黄酮提取的影响

Tab. 4 Effect of enzymolysis time on the extraction of flavone

时间/h	粗黄酮量/g	总黄酮量/g	提取率/%
0.5	5.076	0.567	5.67
1.0	2.789	0.464	4.64
1.5	3.399	0.537	5.37
2.0	3.538	0.767	7.67
2.5	3.948	0.737	7.37

**2.1.4 酶用量对提取工艺的影响** 在选定酶解温度  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , HAc-NaAc 缓冲液 pH  $5.6$ , 酶解时间为  $2\text{ h}$  的条件下, 研究酶用量对黄酮提取的影响。由表 5 可知: 在纤维素酶的用量为  $0.2\%$  时, 黄酮的提取率最高, 为  $6.47\%$ 。因此纤维素酶解陈皮提取黄酮的用量选用  $0.2\%$ 。

表5 酶用量(E)对黄酮提取的影响

Tab. 5 Effect of cellulase dosage on the extraction of flavone

酶量/%	粗黄酮量/g	总黄酮量/g	提取率/%
0.1	3.5416	0.432	4.32
0.2	3.1625	0.647	6.47
0.3	3.1001	0.384	3.84
0.4	3.1538	0.642	6.42
0.5	3.2694	0.532	5.32

实验结果表明, 纤维素酶解提取陈皮黄酮的初步优化条件为: pH  $5.6$ ,  $T$  为  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t$  为  $2\text{ h}$ ,  $E$  为  $0.2\%$ 。

## 2.2 正交优化

通过单因素实验发现, 酶用量、酶解时间、酶解 pH 及酶解温度对总黄酮得率影响较大。且初步优化工艺条件为:  $E$  为  $0.2\%$ 、 $T$  为  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为  $5.6$ 、 $t$  为  $2\text{ h}$ 。在此基础上设计上述四因素的正交实验, 所得结果见表 6。

表6 正交实验表

Tab. 6 Orthogonal results of experiment

序号	A 加酶量/%	B 温度/ $^{\circ}\text{C}$	C 时间/min	D pH 值	总黄酮量/g	提取率/%
1	1	1	1	1	0.645	6.45
2	1	2	2	2	0.655	6.55
3	1	3	3	3	0.685	6.85
4	2	1	1	3	0.656	6.56
5	2	2	3	1	0.612	6.12
6	2	3	2	2	0.707	7.07
7	3	1	3	2	0.617	6.17
8	3	2	1	3	0.683	6.83
9	3	3	2	1	0.621	6.21
$M_1$	1.985	1.918	1.984	1.878		
$M_2$	1.975	1.950	1.983	1.979		
$M_3$	1.921	2.013	1.914	2.024		
$R$	0.064	0.095	0.070	0.146		
$M_1'$	19.85	19.18	19.84	18.78		
$M_2'$	19.75	19.50	19.83	19.79		
$M_3'$	19.21	20.13	19.14	20.24		
$R'$	0.64	0.95	0.70	1.46		

从表 6 的  $M$  值和极差  $R$  值可以看出, 在 4 个影响总黄酮得率的因素中, 影响顺序为: pH 值  $>$  酶解温度 ( $T$ )  $>$  酶解时间 ( $t$ )  $>$  加酶量 ( $E$ )。其中  $A1B3C1D3$  为最佳优化条件, 即 pH 为  $6.0$ , 酶解温度为  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 酶解时间为  $1.5\text{ h}$ , 酶用量为  $1\%$ 。比较初步优化和正交优化的结果可以看出, 两者条件基本不同。原因可能在于 4 个主要因素相互影响, 有交互作用。正交优化条件从酶用量、酶解时间上都优于初步优化条件, 更有利于节约成本和减少作用时间。

## 2.3 酶法与化学法提取陈皮黄酮的比较

化学法和酶法提取陈皮黄酮的比较见表 7。与化学法相比, 纤维素酶水解法在陈皮黄酮的提取过

程中大大提高了黄酮的提取率。在纤维素酶解工艺条件未优化(pH 4.8,  $T$  为  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t$  为 1.5 h,  $E$  为 0.2%)时,陈皮黄酮的提取率可达到 4.35%,与化学法的黄酮提取率 2.78% 相比提高了 56%。在 pH 5.6,  $T$  为  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t$  为 2 h,  $E$  为 0.2% 的纤维素酶解初步优化条件下,黄酮的提取率明显提高,达到 6.66%,为化学法提取率的 2.4 倍,而在正交优化条件(pH 6.0,  $T$  为  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t=1.5\text{ h}$ ,  $E$  为 0.1%)下,酶用量较初步优化只有少量的提升,为 6.96%。

表 7 酶法与化学法比较

Tab. 7 Comparison of flavone extraction by enzyme and chemical method

方法	粗黄酮量/g	总黄酮量/g	黄酮提取率/%
化学法	1.412	0.278	2.78
纤维素酶法(未优化)	3.361	0.435	4.35
纤维素酶法(初步优化)	3.209	0.666	6.66
纤维素酶法(正交优化)	3.345	0.696	6.96

#### 2.4 薄层层析检验

将采用化学法和初步优化条件下酶法提取的两种黄酮样品进行薄层层析。图 1 表明,每一样品在距点样线 5 cm 和 7 cm 处都各有一色斑,两样品色斑位置基本相同,因此可以认为纤维素酶解后提取的黄酮与化学法直接提取的黄酮成分基本相同。

#### 参考文献(References):

- [1] 左锦静,陈复生,姚永志. 陈皮中黄酮类化合物的最佳提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(3): 61-64.  
ZUO Jin-jing, CHEN Fu-sheng, YAO Yong-zhi. Optimum extraction conditions of flavonoids from citrus[J]. *Food Research and Development*, 2005, 26(3): 61-64. (in Chinese)
- [2] 马田田. 纤维素酶用于中药提取的初步研究[J]. 中草药, 1994, 25(3): 123-129.  
MA Tian-tian. Preliminary study of extracting Chinese traditional medicine with cellulase[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 1994, 25(3): 123-129. (in Chinese)
- [3] 田维平,塔娜,李蜀眉,等. 桔皮黄酮类化合物提取方法的研究[J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2002, 23(3): 66-68.  
TIAN Wei-ping, Tana, Li Shu-mei, et al. Study of orange peel flavonoid extraction method[J]. *Journal of Inner Mongolia Institute of Agriculture and Animal Husbandry*, 2002, 23(3): 26-28. (in Chinese)
- [4] 侯嵘娟,孟宪纾,徐育新. 以酶解法从中药及药渣制备  $\beta$ -葡萄糖的研究[J]. 沈阳药学院学报, 1994, 11(4): 289.  
HOU Rong-qiao, MENG Xian-shu. A study on the production of  $\beta$ -Glucose through enzymatic hydrolysis of Chinese medicine and residues of decoction[J]. *Journal of Shen Yang Medical College*, 1994, 11(4): 289. (in Chinese)
- [5] Mandels M, Reese E T. Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fabric[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1999, 22(4): 225-240.
- [6] 田秀兰. 纤维素酶在杭白菊总黄酮提取中的应用[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2002, 26(5): 542.  
TIAN Xiu-lan. Study on extraction flavonoids in chrysanthemum morifolium by cellulase[J]. *Journal of Qiqihar Medical College*, 2002, 26(5): 542. (in Chinese)
- [7] 薛伟明,张效林,刘袖洞,等. 酶—膜法药用植物有效成分提取分离过程应用研究[J]. 西北大学学报: 自然科学版, 1997, 27(6): 494-498.  
XUE Wei-ming, ZHANG Xiao-lin. Application study on extraction and separation process of effective components from medicinal plants by enzyme-membrane method[J]. *Journal of Northwest University (Natural Science Edition)*, 1997, 27(6): 494-498. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)

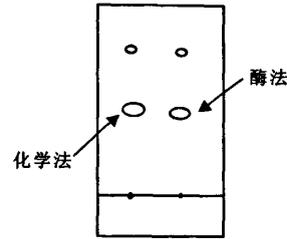


图 1 化学法与酶法(优化)提取的黄酮的薄层展开图

Fig. 1 Thin-layer chromatography of flavone by chemical and enzyme method

#### 3 结 语

植物的细胞壁由纤维素组成,而有效成分往往被包裹在细胞壁内。纤维素酶可以破坏细胞壁,从而使有效成分容易溶出<sup>[7]</sup>。本研究中先通过纤维素酶处理陈皮,再提取其中的黄酮类有效成分,结果表明,纤维素酶处理后的提取率明显增加。纤维素酶的正交优化工艺条件为:pH 6.0,  $T$  为  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t$  为 1.5 h,  $E$  为 0.1%。在优化条件下,酶法提取黄酮的提取率可达到 6.96%,与化学法相比,黄酮提取率有明显提高。

采用薄层层析对酶法与化学法提取的黄酮类物质进行检测,可知纤维素酶酶解后提取的黄酮与化学法直接提取的黄酮成分基本相同,说明纤维素酶酶解提取陈皮黄酮时并不破坏其中的有效成分,纤维素酶可用来提取陈皮黄酮。