

超声波辅助酶法提取板栗壳总黄酮的工艺优化

赖红芳,潘立卫,黄秀香\*  
(河池学院 化学与生物工程学院,广西 宜州 546300)

**摘要:** 为了研究超声波辅助酶法提取板栗壳中总黄酮的最佳工艺条件,以超声波辅助果胶酶进行提取,采用单因素试验和  $L_{18}(3^7)$  正交试验,研究超声时间、超声功率、超声温度、酶用量、pH 值 5 个因素对板栗壳总黄酮提取率的影响。结果表明,超声波辅助酶法提取板栗壳总黄酮的最佳工艺条件:超声时间 30 min、超声功率 80 W、超声温度 50 ℃、酶用量 10 mg、pH 值 5,在此条件下得到的总黄酮提取率最高,为 5.96%,回收率为 92.90%。  
**关键词:** 板栗壳;总黄酮;超声波辅助  
**中图分类号:** S664.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2015)07-0153-04

Extraction Technology of Total Flavonoids from Chestnut Shell by  
Ultrasound-assisted Enzymatic Method

LAI Hongfang, PAN Liwei, HUANG Xiuxiang\*  
(College of Chemistry and Bio-engineering, Hechi University, Yizhou 546300, China)

**Abstract:** In order to study the optimal technics of total flavonoids from chestnut shell by ultrasound-assisted enzymatic method, the effects of ultrasonic time, ultrasonic power, ultrasonic temperature, enzyme dosage and pH value on extraction yield of total flavonoids from chestnut shell by ultrasound-assisted pectin enzyme method using  $L_{18}(3^7)$  orthogonal test. The optimal extraction conditions of total flavonoids from chestnut shell by ultrasound-assisted pectin enzyme method were as follows: ultrasonic time of 30 min, ultrasonic power of 80 W, ultrasonic temperature of 50 ℃, enzyme dosage of 10 mg, pH value of 5, under the above conditions the flavonoid extraction yield was the highest with 5.96%, the recovery rate was 92.90% .  
**Key words:** chestnut shell; total flavonoids; ultrasound-assisted

板栗 (*Castanea mollissima* Blume), 又名栗子、毛栗、刺果, 是壳斗科栗属植物的果实, 广泛分布于温带和亚热带, 在我国大部分地区均有种植。其果实除供食用外, 还有补肾强筋、养胃健脾、活血止血等功效<sup>[1]</sup>。由于人们对板栗食用的需求量大, 从而会产生数量众多的板栗壳废弃物。板栗壳为坚果的果皮, 占栗实质量的 10%, 含有酚类、有机酸、黄酮、多糖、植物甾醇等化学成分<sup>[2-4]</sup>, 具有很好的药用价值<sup>[5]</sup>。为了提高板栗的综合利用价值, 从板栗壳中提取生物活性物质成为研究的热点。冉靛等<sup>[6]</sup>利

用乙醇溶液回流方法提取板栗壳中黄酮类化合物, 提取后利用大孔树脂进行上柱纯化, 纯化率为 47.86%。但在试验中并没有对提取工艺进行研究, 而且乙醇回流方法历时较长, 提取率不高。郭雷等<sup>[7]</sup>利用响应面分析法优化板栗壳总黄酮提取工艺, 提取率为 19.66%, 此工艺虽然提取率高, 但费时费力, 不利于工业化生产。本研究以板栗壳中总黄酮的提取率为目标, 尝试将超声波辅助酶法应用于板栗壳黄酮的提取中, 从超声提取时间、超声提取功率、超声提取温度、酶用量以及 pH 值 5 个因素进

收稿日期:2014-12-11  
基金项目:广西教育厅科研重点项目(ZD2014113);河池学院科研重点项目(2013ZA-N004)  
作者简介:赖红芳(1975-),女(壮族),广西柳州人,副教授,硕士,主要从事天然产物有效成分提取及分析研究。  
E-mail:laihongfang263@163.com  
\* 通讯作者:黄秀香(1969-),女(壮族),广西都安人,教授,硕士,主要从事天然有机化学研究。E-mail:hxx1372@163.com

行研究,以优选出超声波辅助酶法提取板栗壳总黄酮的最佳工艺参数,为板栗壳总黄酮的工业化提取提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

板栗:购于广西东兰。试剂:芦丁(纯度≥98%,上海源叶生物科技有限公司)、果胶酶(活性≥1 000 U/mg,上海源叶生物科技有限公司),无水乙醇、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、石油醚、去离子水、盐酸、醋酸、醋酸钠均为分析纯。

1.2 仪器

AR224CN 型电子天平(奥豪斯上海仪器有限公司),G2X-6F101-2S 型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂),UV-2802 型紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司),KQ2200DE 型数控超声波(昆山市超声仪器有限公司),PHS-3B 型精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),SHA-C 型国华恒温振荡器(中外合资深圳天南海北有限公司)。

1.3 样品预处理及样品溶液的制备

将购买回来的板栗去果肉后干燥,用粉碎机粉碎,过 0.42 mm 筛,放入干燥器内备用。准确称取 1 g 板栗壳粉末置于锥形瓶中,按各预设条件(提取功率、时间、温度、酶用量、pH 值)进行超声波处理,提取后高温灭酶 2 min,减压抽滤,收集滤液,在滤液中加入石油醚萃取脱脂和去除色素后,转移到 100 mL 的容量瓶中,加水定容,摇匀,备用。

1.4 标准曲线的绘制

精密称取 50 ℃下干燥的芦丁 5 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加 60% 乙醇溶液定容至刻度,摇匀,配制 成 0.1 g/L 的标准芦丁溶液。分别准确吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mL 0.1 g/L 的标准芦丁溶液置于 25 mL 比色管中,加入 1.0 mL 5% 的亚硝酸钠溶液,摇匀,放置 6 min 后加入 1 mL 10% 的硝酸铝溶液,放置 5 min 后加入 2 mL 4% 的氢氧化钠溶液,摇匀,然后用 60% 乙醇溶液定容,摇匀,静置 10 min 后,作空白对照,于 500 nm 的波长处测定吸光度<sup>[8-10]</sup>。以芦丁含量(C)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标作标准曲线,得回归方程: $A = 9.491\ 1C + 0.003\ 3$ , $r = 0.999\ 6$ 。

1.5 板栗壳总黄酮含量的测定

吸取 1.3 制备好的溶液 1 mL 至 25 mL 比色管中,按 1.4 标准曲线绘制的操作方式进行显色,根据吸光度回归方程求出总黄酮浓度,并计算提取液中

总黄酮的质量及提取率。

1.6 超声波辅助酶法提取板栗壳总黄酮的单因素及正交试验

在 pH 值 5、超声功率 50 W、超声时间 25 min、超声温度 50 ℃条件下,考虑不同果胶酶用量(10、20、30、40、50 mg)对板栗壳总黄酮提取率的影响;在果胶酶用量 30 mg、超声功率 50 W、超声时间 25 min、超声温度 50 ℃条件下,考虑不同 pH 值(2、3、4、5、6)对板栗壳总黄酮提取率的影响;在果胶酶用量 30 mg、pH 值 5、超声时间 25 min、超声温度 50 ℃条件下,考虑不同超声功率(50、60、70、80、90 W)对板栗壳总黄酮提取率的影响;在果胶酶用量 30 mg、pH 值 5、超声功率 50 W、超声温度 50 ℃条件下,考虑不同超声时间(10、20、30、40、50 min)对板栗壳总黄酮提取率的影响;在果胶酶用量 30 mg、pH 值 5、超声功率为 50 W、超声时间 25 min 条件下,考虑不同超声温度(30、40、50、60、70 ℃)对板栗壳总黄酮提取率的影响。并在单因素试验的基础上,设计  $L_{18}(3^7)$  正交试验,进一步优化板栗壳总黄酮的提取条件。正交试验具体因素及水平见表 1。

表 1 超声波辅助酶法提取板栗壳总黄酮的正交试验设计

水平	因素				
	果胶酶用量 (A)/mg	超声时间 (B)/min	pH(C)	超声温度 (D)/℃	超声功率 (E)/W
1	10	20	4	40	70
2	20	30	5	50	80
3	30	40	6	60	90

1.7 验证试验

为了考察优化工艺的稳定性,按最佳的工艺条件进行重复性试验 5 次,按 1.3 样品溶液的制备和 1.4 标准曲线绘制的操作方法,测定其吸光度之后代入回归方程计算其总黄酮含量,再计算总黄酮提取率。

1.8 加标回收率试验

分别量取已知总黄酮含量的样品溶液 5 份,每份 1.0 mL 于比色管中,再分别加入芦丁标准品溶液 5 mL,按照 1.4 标准曲线绘制的方法测定其吸光度,带入回归方程计算其总黄酮含量,并按公式计算加样回收率(R): $R = [(M - P) / A] \times 100\%$ ,其中 P 为样液中总黄酮含量,A 为加入总黄酮的标准品含量,M 为加标后总黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 超声波辅助酶法提取板栗壳总黄酮的单因素试验结果

2.1.1 酶用量对板栗壳总黄酮提取率的影响 由图 1 可知,在酶用量为 10~30 mg 时,吸光度随酶用

量的增大而增加,酶用量达到 30 mg 后吸光度反而逐渐降低。这可能是因为继续加大酶的用量,底物浓度不能使酶达到饱和,导致了酶的作用受到抑制。因此,初步选用果胶酶用量为 30 mg。

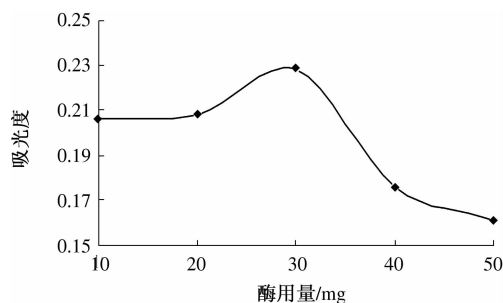


图 1 酶用量对板栗壳总黄酮提取率的影响

2.1.2 pH 值对板栗壳总黄酮提取率的影响 由图 2 可知,pH 值在 2~5 时,随着 pH 值的升高,吸光度逐渐增大;到 pH 值为 5 时,果胶酶发挥最大活性,吸光度最大;再增大 pH 值,吸光度降低,可能是因为过酸或过碱导致酶活性下降。因此,初步选择缓冲液的 pH 值为 5。

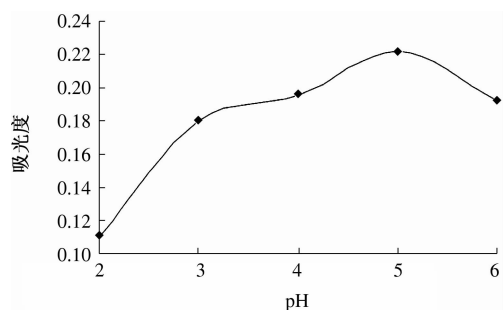


图 2 pH 值对板栗壳总黄酮提取率的影响

2.1.3 超声温度对板栗壳总黄酮提取率的影响 由图 3 可知,随着超声温度的增大(30~50 ℃),吸光度也增大,在 50 ℃ 时达到最大,之后随着超声提取温度的增加,吸光度反而下降。这可能是因为酶在 50 ℃ 左右活性最强,当超声温度较低时,酶活性低;当超声温度超过 50 ℃ 时,酶蛋白质变性,酶活性减弱甚至丧失。因此,初步选择超声温度为 50 ℃。

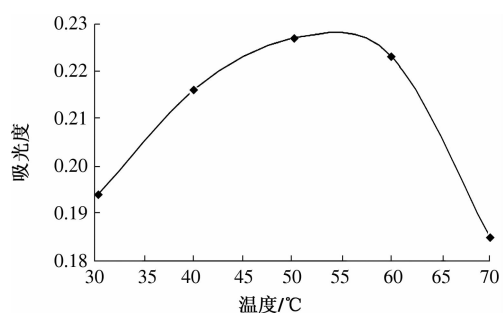


图 3 超声温度对板栗壳总黄酮提取率的影响

#### 2.1.4 超声功率对板栗壳总黄酮提取率的影响

由图 4 可知,随着超声功率的增大,吸光度也增大,超声功率为 80 W 时吸光度达到最大,之后随着超声功率的增大,吸光度反而下降。这可能是因为功率过大会增大超声波的机械剪切力,溶出更多杂质而影响黄酮的溶出。因此,初步选择超声功率为 80 W。

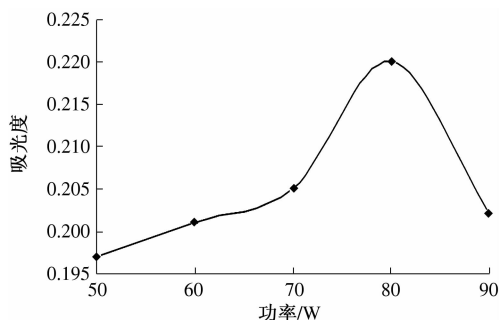


图 4 超声功率对板栗壳总黄酮提取率的影响

#### 2.1.5 超声时间对板栗壳总黄酮提取率的影响

由图 5 可知,在超声时间达到 30 min 之前吸光度随时间的延长而增加,提取时间达到 30 min 后吸光度随时间的延长反而逐渐降低。这可能是因为超声时间短,黄酮没有完全溶出;而长时间作用可能会使酶活性有所下降从而影响黄酮提取率。所以,选择超声时间为 30 min。

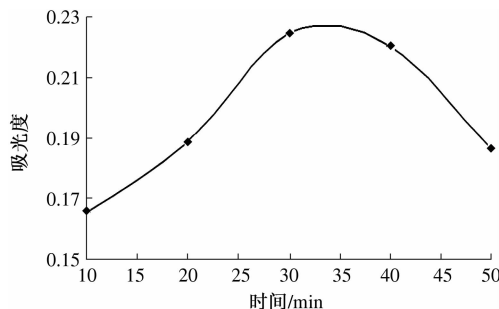


图 5 超声时间对板栗壳总黄酮提取率的影响

### 2.2 超声波辅助酶法提取板栗壳总黄酮的正交试验结果

由表 2 可知,最佳的超声提取条件为:酶用量为 10 mg,超声时间为 30 min, pH 值为 5,超声温度为 50 ℃,超声功率为 80 W,即方案  $A_1B_2C_2D_2E_2$ 。通过对比极差  $R$  可知,酶用量对板栗壳总黄酮的提取结果影响最大,然后是超声温度、pH 值、超声功率,而超声时间的影响程度最小,即  $A > D > C > E > B$ 。

#### 2.3 验证试验

按最佳工艺条件进行 5 次试验,板栗壳总黄酮提取率分别为 6.00%、5.95%、5.95%、5.97%、5.94%,平均提取率为 5.96%,提取率优于正交试验中的任何一组。

表 2 超声波辅助酶法提取板栗壳总黄酮的正交试验结果

编号	A	B	C	D	E	提取率/%
1	1	1	1	1	1	5.47
2	1	2	2	2	2	5.95
3	1	3	3	3	3	5.58
4	2	1	1	2	2	5.50
5	2	2	2	3	3	5.39
6	2	3	3	1	1	4.87
7	3	1	2	1	3	5.05
8	3	2	3	2	1	5.18
9	3	3	1	3	2	5.42
10	1	1	3	3	2	5.37
11	1	2	1	1	3	5.58
12	1	3	2	2	1	5.76
13	2	1	2	3	1	5.81
14	2	2	3	1	2	5.86
15	2	3	1	2	3	5.73
16	3	1	3	2	3	5.60
17	3	2	1	3	1	5.55
18	3	3	2	1	2	5.47
$k_1$	5.618	5.467	5.542	5.383	5.440	
$k_2$	5.527	5.585	5.572	5.620	5.595	
$k_3$	5.378	5.472	5.410	5.520	5.488	
$R$	0.240	0.118	0.162	0.237	0.155	

2.4 加标回收率试验

按回收率试验操作,结果如表 3,平均回收率为 92.90%,结果在正常范围之内,说明此方法具有良好的加标回收率。

表 3 样品加标回收试验结果

编号	样液中黄酮含量/mg	加入黄酮含量/mg	加标后黄酮含量/mg	回收率/%	平均回收率/%
1	0.148 7	0.02	0.167 3	93.00	92.90
2	0.148 7	0.02	0.167 3	93.00	
3	0.148 7	0.02	0.167 5	94.00	
4	0.148 7	0.02	0.167 3	93.00	
5	0.148 7	0.02	0.167 0	91.50	

3 结论

采用单因素试验研究超声时间、超声功率、超声温度、酶用量、pH 值 5 个因素对板栗壳中总黄酮提

取率的影响,并采用五因素三水平进行正交试验。结果表明,果胶酶用量为 10 mg,超声时间为 30 min,酶解 pH 值为 5,超声温度为 50 ℃,超声功率为 80 W 为板栗壳总黄酮提取最佳工艺条件,在此条件下,板栗壳总黄酮的平均提取率为 5.96%,虽然比文献[7]中的提取率(19.66%)低,但所花时间确是其 1/6。其次本研究所用提取剂为水,而文献[7]使用的是乙醇溶液,从而说明超声波辅助酶法提取板栗壳中总黄酮效果良好,此方法操作简单、绿色环保、省时节能,具有一定的推广价值。

参考文献:

[1] 鲁晓翔,赵晨光,连喜军. 板栗壳多酚提取条件及其抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(3): 32-36.

[2] 赵德义,高文海,花成文,等. 板栗壳化学成分的初步研究[J]. 陕西林业科技,2003(2):1-2.

[3] 贾陆,席芳,王娜,等. 板栗壳化学成分研究[J]. 中国医药工业杂志,2010,41(2):98-102.

[4] 金在文,葛明. 板栗的化学成分及药理研究进展[J]. 山西医药杂志,2005,34(9):751-753.

[5] 张鞅灵,刘国强,高锦明,等. 黄酮类化合物生物活性与结构的关系[J]. 西北林学院学报,2001,16(2): 75-79.

[6] 冉靓,武子敬,冉阳,等. 大孔吸附树脂纯化板栗壳总黄酮的研究[J]. 安徽农业科学,2013,41(2):827-829.

[7] 郭雷,郝倩. 响应面分析法优化板栗壳总黄酮提取工艺的研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(32): 15979-15980.

[8] 赖红芳,温晓娟. 果胶酶法提取翠云草中总黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23): 34-36.

[9] 刘姗,胡洪利,陈惠. 响应面法优化金龙胆草总黄酮的超声波提取工艺研究[J]. 河南农业科学,2013,42(1):148-151,159.

[10] 袁玲,姜益泉. 超声水提紫荆花总黄酮的工艺研究[J]. 河南农业科学,2013,42(3):154-156.