

酶法辅助乙醇优选牡丹种皮总黄酮

孟庆焕<sup>1</sup> 祖元刚<sup>1</sup> 王 化<sup>2</sup> 王洪政<sup>1</sup> 姜 涛<sup>3</sup> 吴薇薇<sup>1</sup> 钟 晨<sup>1</sup> 段喜华<sup>1\*</sup>

(1. 东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室 哈尔滨 150040 ;2. 黑龙江省科学院自然与生态研究所 哈尔滨 150040 ;3. 温州市第二十二中学 温州 325003 )

**摘 要** 研究适合于以牡丹种皮为原料提取总黄酮的方法 ,对其提取方法工艺条件进行优化。考察了酶种类、浓度、酶解孵育温度、孵育时间和 pH 值等因素对提取工艺的影响 ,并在单因素实验基础上 ,利用正交实验法进行工艺优化。考察结果表明在果胶酶 0.05 mg · mL<sup>-1</sup>、酶解孵育温度 45℃、pH4.5 条件下进行酶解孵育 180 min 后 ,总黄酮得率最高可达 74.839 mg · g<sup>-1</sup> ,相对于乙醇提取法牡丹种皮总黄酮得率显著提高。  
**关键词** 牡丹种皮 ;总黄酮 ;果胶酶 ;纤维素酶  
**中图分类号** S567.1+5 **文献标志码** A **doi** :10.7525/j.issn.1673-5102.2015.04.024

Enzyme Assisted Ethanol Extraction of Total Flavonoids from Peony Episperm

MENG Qing-Huan<sup>1</sup> ZU Yuan-Gang<sup>1</sup> WANG Hua<sup>2</sup> WANG Hong-Zheng<sup>1</sup> JIANG Tao<sup>3</sup> WU Wei-Wei<sup>1</sup> ZHONG Chen<sup>1</sup> DUAN Xi-Hua<sup>1\*</sup>  
(1. Key Laboratory of Forest Plant Ecology of Northeast Forestry University ,Ministry of Education ,Harbin 150040 ;2. Institute of Nature and Ecology ,Heilongjiang Academy of Sciences ,Harbin 150040 ;3. Wenzhou No.22 Senior Middle School ,Wenzhou 325003 )

**Abstract** We optimized enzyme assisted ethanol extraction of total flavonoids from peony episperm. We studied the effects of factors including enzymolysis temperature ,enzyme content ,enzymolysis pH ,enzymolysis time on the extraction rates of total flavonoids by single-factor and orthogonal test. The optimal extraction conditions were after enzyming pretreatment under the pectinase content of 0.05 mg · mL<sup>-1</sup> ,enzymolysis temperature of 45℃ ,enzymolysis pH of 4.5 ,enzymolysis time of 180 min ,total flavonoids yield was up to 74.839 mg · g<sup>-1</sup>. Compared with the traditional ethanol extraction ,the total flavonoids yield was improved significantly.  
**Key words** peony episperm ;flavonoids ;pectinase ;cellulase

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)为芍药科(*Paeoniaceae*)芍药属(*Paeonia*)的落叶灌木 ,是一种很好的药食兼备植物<sup>[1]</sup>。2011 年 3 月 22 日 ,卫生部发布了“关于批准元宝枫籽油和牡丹籽油作为新资源食品的公告” ,开启了我国生产木本食用油的新篇章<sup>[2]</sup>。牡丹种皮作为牡丹籽油生产过程中的副产品 ,虽然生物量很大 ,但却一直被作为废物丢弃 ,造成自然资源的极大浪费。如果能对种皮中的有效活性物质进行合理利用 ,对增加牡丹籽油的农业经济效益 ,具有十分重要的社会意义。  
黄酮类化合物是一种生理活性活泼的物质 ,具有降低血管脆性及异常的通透性、降血压、降血

脂及胆固醇、抗病毒、抗炎、抗癌防癌、抗氧化等药理作用 ,尤以对心脑血管疾病的治疗作用而备受重视<sup>[3~6]</sup>。本实验以牡丹种皮为原料 ,采用酶法辅助乙醇提取总黄酮 ,通过单因素和正交实验优化提取工艺 ,获得一种新的方法提取牡丹种皮总黄酮 ,旨在为牡丹种皮的综合开发利用及其活性成分的深入研究提供理论依据。

1 实验材料与仪器

1.1 材料与试剂

牡丹的成熟干燥的种子 ,经脱壳机去皮 ,收集种皮洗净后于 60℃干燥箱烘干过夜 ,粉碎过 40 目筛备用。芦丁标准品(中国药品生物制品鉴定所) ,

基金项目 :中央高校基本科研业务费专项资金项目资助 DL13BA04 ;黑龙江省自然科学基金项目(C201235) ;国家发改委公益性行业科研专项(201404701)  
第一作者简介 :孟庆焕(1979—) ,女 ,工程师 ,博士 ,主要从事植物学方面研究。  
\* 通信作者 E-mail :duanxihua828@163.com  
收稿日期 2015-01-13

甲醇为色谱纯,超纯水自制。纤维素酶 R-10(酶活力  $10\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ,Amresco 美国)、果胶酶(酶活力  $500\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ,Amresco 美国)其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);Mill-Q 去离子水制备系统(美国 Millipore 公司);3K-30 超速离心机(美国 Sigma 公司)。BS124S 电子天平(北京赛多利斯有限公司)。

2 实验方法

2.1 总黄酮含量测定方法

2.1.1 绘制标准曲线

称取 10.0 mg 芦丁,用 80% 乙醇完全溶解后定容至 100 mL 作为标准溶液,精密吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 芦丁标准溶液分别置于 10 mL 具塞试管中,分别加入 5%  $\text{NaNO}_3$  溶液 0.30 mL,摇匀 6 min 后再分别加入 10% 硝酸铝水溶液 0.30 mL,摇匀放置 6 min;然后分别加入 4% 氢氧化钠水溶液 4.00 mL,用 80% 乙醇定容至 10 mL,摇匀,静置 15 min,以试剂为空白,在 510 nm 处测定不同浓度下芦丁溶液吸光值。以吸光值 A 为纵坐标,芦丁浓度为横坐标绘制芦丁标准曲线,得曲线方程为  $y=15.01x-0.0405$ ,  $R^2=0.9993$ 。

2.1.2 样品的制备与测定

准确称取 5.00 g 牡丹种皮,置入 HAc-NaAc 酶缓冲液中经过酶解、孵育处理后,在 90℃ 下灭活 5 min,加入 80% 乙醇溶液 8 mL,混合均匀后,匀浆 8 min,提取 1 次的条件下,得牡丹种皮黄酮类化合物。取 0.1 mL 上述牡丹种皮黄酮提取液,按标准曲线方法操作测定吸光度值,由标准曲线计算出牡丹种皮总黄酮含量。

2.2 酶解处理单因素实验

纤维素酶和果胶酶种类和浓度的筛选:准确称取 8 份 1 g 牡丹种皮,在 45℃、pH4.5 和孵育 180 分钟条件下进行酶解,每份牡丹种皮中加入 HAc-NaAc 酶缓冲液 2 mL,其中酶浓度分别为 0、0.1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  纤维素酶、0.2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  纤维素酶、0.3  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  纤维素酶、0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  纤维素酶、0.01  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  果胶酶、0.05  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  果胶酶和 0.1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  果胶酶。取出后在 90℃ 下灭活 5 min,再加入乙醇溶液 8 mL 匀浆后,测定牡丹种皮总黄酮的含量。

酶解孵育时间的筛选:准确称取 1 g 牡丹种皮 5 份,加入含 0.05  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  果胶酶的 HAc-NaAc 酶缓冲液 2 mL,在 45℃、pH4.5 条件下进行酶解,

酶解孵育时间分别为 60、90、120、150 和 180 min。取出后在 90℃ 下灭活 5 min,再加入乙醇溶液 8 mL 匀浆后,测定牡丹种皮总黄酮的提取率。

酶解孵育温度的筛选:准确称取 1 g 牡丹种皮 4 份,加入含 0.05  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  果胶酶的 HAc-NaAc 酶缓冲液 2 mL,在 pH4.5、时间 150 min 条件下进行酶解,温度分别为 40℃、45℃、50℃ 和 55℃。取出后在 90℃ 下灭活 5 min,再加入乙醇溶液 8 mL 匀浆后,测定牡丹种皮总黄酮的提取率。

酶解孵育 pH 的筛选:准确称取 1 g 牡丹种皮 4 份,加入含 0.05  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  果胶酶的 HAc-NaAc 酶缓冲液 2 mL,在温度为 45℃、时间 150 min 条件下进行酶解,pH 分别为 3.5、4、4.5 和 5。取出后在 90℃ 下灭活 5 min,再加入乙醇溶液 8 mL 匀浆后,测定牡丹种皮总黄酮的提取率。

3 结果与分析

3.1 酶解辅助乙醇提取工艺单因素结果与分析

由图 1~4 表明,经过纤维素酶和果胶酶酶解后,牡丹种皮总黄酮得率呈明显增加趋势,在 0.05 和 0.1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的果胶酶孵育后的牡丹种皮中总黄酮得率增加最多。随着酶孵育时间延长总黄酮得率呈增加趋势,而随着孵育温度和孵育 pH 值升高总黄酮得率出现最高点,呈现先升高后降低的趋势。根据上述实验结果,选取有意义的水平进行下一步实验。选择纤维素酶 0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、果胶酶 0.05 和 0.1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,孵育时间 120、150、180 min,孵育温度 40、45、50℃,孵育 pH 值 4、4.5、5,进行下一步的正交实验。

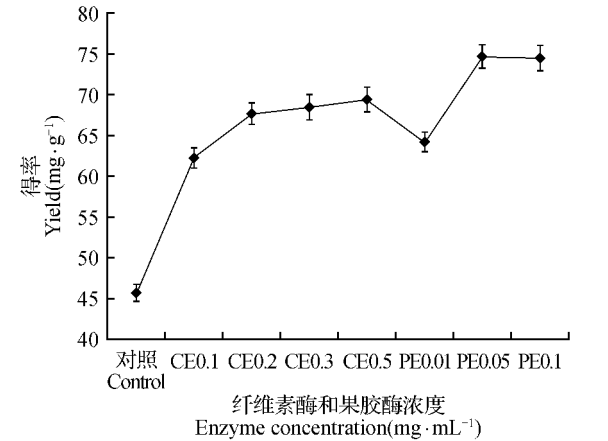


图 1 酶浓度对总黄酮得率的影响 CE. 纤维素酶;PE. 果胶酶 数字代表不同浓度。

Fig.1 Effect of enzyme concentration on the yield of total flavone CE. Cellulase;PE. Pectinase The figures represent the different concentration.

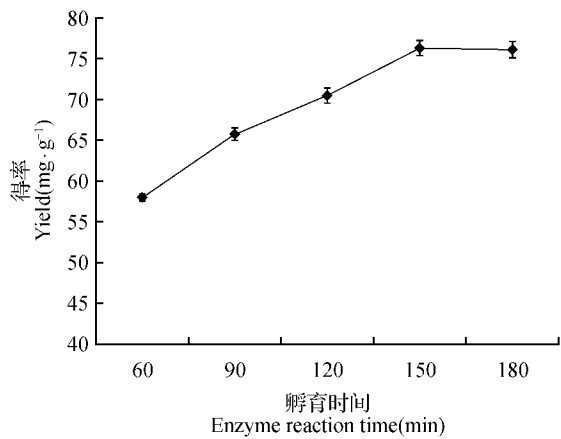


图2 酶解孵育时间对总黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of enzyme reaction time on the yield of total flavone

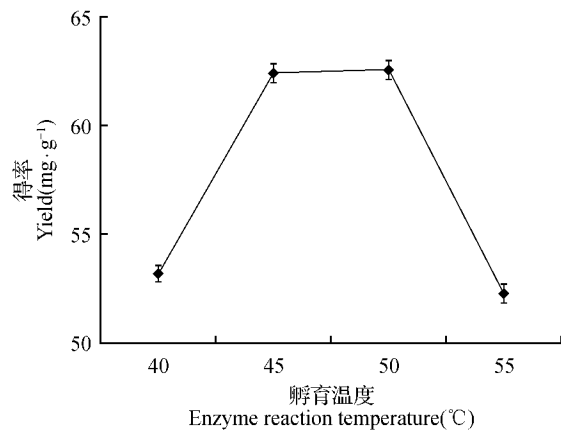


图3 酶解孵育温度对总黄酮得率的影响

Fig.3 Effect of enzyme reaction temperature on the yield of total flavone

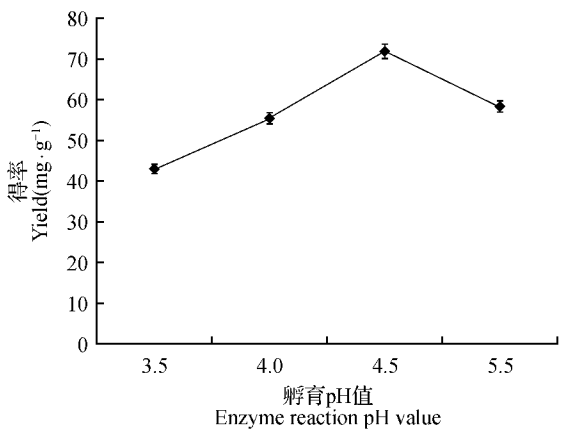


图4 酶解孵育 pH 值对总黄酮得率的影响

Fig.4 Effect of enzyme reaction pH on the yield of total flavone

3.2 酶辅助乙醇提取总黄酮优化工艺

在前期酶解辅助提取总黄酮单因素实验的基础上,对酶解辅助乙醇提取总黄酮工艺进行了正交优化实验,实验设计与结果见表1。影响总黄酮得率的各因素主次顺序是:酶液浓度>孵育温度>孵育时间>孵育 pH 值。极差分析得最佳条件组合为:A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>。即果胶酶浓度为 0.05 mg·mL<sup>-1</sup>,酶解孵育时间为 180 min,孵育温度 45℃、孵育 pH 值为 4.5。

表1 酶解辅助乙醇提取总黄酮正交实验结果

Table 1 Results of orthogonal test of ethanol extraction

实验号 No.	酶种类和 添加量 Enzyme content( % )	酶解时间 Enzyme reaction time( min )	酶解温度 Enzyme reaction temperature	酶解 pH 值 Enzyme reaction pH value	总黄酮提取率 Yield ( mg · g <sup>-1</sup> )
1	CEO.5	120	40	4.0	51.737
2	CEO.5	150	45	4.5	69.472
3	CEO.5	180	50	5.5	62.534
4	PEO.05	120	45	5.5	74.657
5	PEO.05	150	50	4.0	74.436
6	PEO.05	180	40	4.5	72.234
7	PEO.1	120	50	4.5	58.304
8	PEO.1	150	40	5.5	61.346
9	PEO.1	180	45	4.0	72.873
K <sub>1</sub>	61.248	61.566	61.772	66.349	
K <sub>2</sub>	73.776	68.418	72.334	67.684	
K <sub>3</sub>	64.174	69.214	65.091	66.179	
R	12.528	7.648	10.562	1.505	

3.3 最佳工艺的验证实验

根据正交实验中酶解辅助乙醇匀浆提取总黄酮的最佳工艺条件进行验证实验:准确称取 1 g 牡丹种皮 3 份,加入含 0.05 mg·mL<sup>-1</sup>果胶酶的 HAc-NaAc 酶缓冲液 2 mL,在温度为 45℃、pH4.5 条件下进行酶解孵育 180 min。在 90℃ 下灭活 5 min,再加入乙醇溶液 8 mL 匀浆 8 min,提取 1 次,测定牡丹种皮中总黄酮得率平均值为 74.839 mg·g<sup>-1</sup>。均高于单因素实验和正交实验结果,表明此工艺可以有效提高牡丹种皮中总黄酮的得率。

4 讨论

酶解辅助乙醇提取总黄酮的工艺参数为:酶解孵育温度 45℃、果胶酶 0.05 mg·mL<sup>-1</sup>、酶解孵育时间 180 min、酶解孵育 pH 值 4.5,在此最优条件下所得总黄酮得率为 74.839 mg·g<sup>-1</sup>,相较于乙醇提取法所得总黄酮得率显著提高<sup>[7]</sup>。

本文通过酶解法和乙醇匀浆法协同作用对牡丹种皮中的总黄酮进行提取,一方面对牡丹种皮

进行匀浆可以通过机械及液力剪切作用将种皮撕裂和粉碎,使种皮破碎和有效成分的萃取同步进行,以达到对植物有效成分快速提取的目的<sup>[8]</sup>。另一方面经过酶解孵育协同处理后,牡丹种皮黄酮的得率显著提高,并且果胶酶处理后所得总黄酮得率高于纤维素酶,这与牡丹种皮的化学物质组成有密切关系。纤维素酶主要是降解细胞壁中的纤维素,而果胶酶主要是降解细胞壁和胞间质中的果胶<sup>[9~10]</sup>。通过本实验分析得以推断,牡丹种皮中果胶的含量比较高,因此使用果胶酶处理可以使牡丹种皮中的总黄酮相比于纤维素酶处理的样品的得率更高,进而达到强化提取的目的,最终所得总黄酮的优化提取效果最明显。

## 参 考 文 献

1. 中华人民共和国药典(2010 一部) [S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:160-161.
2. 雷克鸿. 卫生部批准元宝枫籽油和牡丹籽油为新资源食品 [N]. 中国食品报, 2011-06-06.
3. Laghari A Q, Memon S, Nelofar A. Extraction, identification and antioxidative properties of the flavonoid-rich fractions from leaves and flowers of *cassia angustifolia* [J]. *American Journal of Analytical Chemistry* 2011, 2: 871-878.
4. Middleton Jr E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function [J]. In *Flavonoids in the Living System*, 1998, 439:175-182.
5. Cushnie T, Lamb A J. Antimicrobial activity of flavonoids [J]. *International journal of antimicrobial agents*, 2005, 26: 343-356.
6. 尤新. 植物多酚黄酮抗氧化剂与人体健康 [J]. *食品与生物技术学报*, 2011, 30(4): 481-488.
7. 孟庆焕, 王化, 王洪政, 等. 牡丹种皮黄酮提取及对 ABTS 自由基清除作用 [J]. *植物研究*, 2013, 33(4): 504-507.
8. Ma Chunhui, Yang Lei, Zu Yuangang. Extraction of dihydroquercetin from larch wood; with ultrasound-assisted and microwave-assisted alternant digestion [J]. *International Journal of Molecular Sciences* 2012, 13: 8789-8804.
9. 魏凤玉, 王欣. 纤维素酶—乙醇协同提取黄芩总黄酮 [J]. *天然产物研究与开发*, 2014, 26: 575-578.
10. 王秋雪, 顾成波, 付丽楠, 等. 响应面优化纤维素酶辅助提取木豆叶总黄酮工艺 [J]. *植物研究*, 2012, 32(6): 765-769.
11. 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京:高等教育出版社, 2000.
12. 刘云鹏, 徐福元, 朱兴俊, 等. 杨树黄化苗木叶部氧化酶及 MDA 响应特征 [J]. *林业科学研究*, 2010, 23(3): 355-361.
13. 赵亚华. 生物化学实验技术教程 [M]. 广州:华南理工大学出版社, 2000:153-154.
14. Cui Xihua, Hosakatte N M, Wu Chunhua, et al. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2010, 103: 7-14.
15. Md. Abdullahil B, Abdullah E, Eun-Jung L, et al. Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* L. [J]. *Acta Physiol Plant* 2012, 34: 405-415.
16. Francisco J P, Pablo M, Maritza B, et al. Effect of carbon source and sucrose concentration on growth and hexose accumulation of grape berries cultured in vitro [J]. *Plant Cell* 2000, 61: 37-40.
17. Low P S, Merida J R. The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction [J]. *Physiologia Plantarum*, 1996, 96: 533-542.
18. 吴月燕, 项锡娜, 王忠华, 等. 光胁迫对容器幼苗生长和生理生化特性的影响 [J]. *植物生理学报*, 2013, 49(5): 469-476.
19. Elstner E F. Oxygen activation and oxygen toxicity [J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1982, 33: 73-96.
20. 刘威, 袁晓婷, 张艳艳, 等. 胭脂红景天引种至西藏日喀则其渗透调节物质及保护酶活性的变化 [J]. *植物研究*, 2013, 33(6): 697-700.
21. 王洁, 李欣, 孙永亮, 等. 碳离子辐照对四尾栅藻光合色素及抗氧化活性的影响 [J]. *植物研究*, 2013, 33(5): 593-598.
22. Shohael A M, Chakrabarty D, Ali M B, et al. Enhancement of Eleutherosides production in embryo genetic cultures of *Eleutherococcus sessiliflorus* in response to sucrose induced osmotic stress [J]. *Process Biochem* 2006, 41: 512-518.
23. 宋晓宏, 沙伟. 毛尖紫萼藓超氧化物歧化酶基因 *GpSOD* 的克隆及表达分析 [J]. *植物研究*, 2014, 34(5): 655-663.