

超声波辅助提取五倍子中单宁的工艺优化

Optimization on ultrasonic extraction technology of tannin from gallnut

李倩云¹ 张双灵² 周国燕¹

LI Qian-yun¹ ZHANG Shuang-ling² ZHOU Guo-yan¹

(1. 上海理工大学, 上海 200093; 2. 青岛农业大学, 山东 青岛 266109)

(1. University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;

2. Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

摘要:五倍子单宁具有抗氧化、抗突变、抗肿瘤等多种生物活性功能。为了研究五倍子中单宁的超声波辅助提取工艺,以盐酸体积分数、乙醇体积分数、超声温度、料液比作为考察因素,在单因素试验基础上采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,对单宁的提取工艺进行优化。结果表明,在盐酸体积分数为 1.0%、乙醇体积分数为 50%、超声温度为 40 °C、料液比为 1:30($m:V$)的条件下,提取效果最佳。该工艺条件下,单宁的提取率为 10.97%。

关键词:超声波;五倍子;提取;单宁

Abstract: Gallic tannins have extensive bioactivities functions, including antioxidant, antitumor and anticancer. In order to investigate the extraction technology of Chinese gallnut tannin by ultrasonic, the effect factors, including the volume fraction of HCl, the volume fraction of ethanol, ultrasonic temperature and the ratio of material were optimized through orthogonal tests $L_9(3^4)$ on the basis of single factor experiment. The result showed the optimal extracting conditions were as follows: hydrochloric acid volume fraction 1.0%, ethanol volume fraction 50%, ultrasonic temperature 40 °C, the ratio of material to liquid was 1:30($m:V$). Under the optimal conditions, the extraction rate of Chinese gallnut tannin was 10.97%.

Keywords: ultrasonic; gallnut; extraction; tannins

五倍子主要分布于中国的四川、湖南、湖北等地,是一种重要的经济中药材,可缓解肺热引发的咳嗽、常泄不止、痢疾不愈等^[1]。单宁具有纯天然、效率高、安全无毒性、保护健康等优点,其利用价值很高,发展前景极其广阔。目前,测定五倍子中单宁的方法主要有紫外分光光度法、药典法(皮酚法)、HPLC法(高效液相色谱法)等^[2]。药典法是各国同行认可的单宁测定方法,虽然其提取的试验结果较为稳定,但是所用的时间很长,过程复杂,不适合微量和低含量测

定^[3]。高效液相色谱法操作简单迅速,具有较高的灵敏度,但需要较高的分析技能和高纯度的标准品,检测成本高^[4]。在众多单宁含量的测定方法中,紫外分光光度法的应用最为广泛,具有简单、迅速等优点^[5],因此本试验采用此法进行测定。

超声波辅助提取方法具有操作简单快速、提取率高、花费少、安全等优势^[6],已广泛用在提取多种自然物质的研究中,如:超声波辅助提取锁阳多糖的工艺研究^[7],超声辅助法提取桑葚叶中的多糖^[8],超声波辅助提取酵母源类金属硫蛋白工艺的优化^[9],超声波辅助提取山豆根中的黄酮和多糖工艺优化^[10],超声复合酶法提取大蒜多糖的工艺优化^[11]。从五倍子中提取单宁的工艺研究^[12,13]较多,但报道的结果不尽相同。目前没有对盐酸体积分数、乙醇体积分数、超声温度及料液比 4 种因素同时进行研究的报道,本试验拟采用超声波辅助提取技术从五倍子中提取单宁,探究盐酸体积分数、乙醇体积分数、超声温度、料液比 4 个因素对超声辅助法提取五倍子单宁提取效率的影响,并利用正交试验优化工艺条件,从而为五倍子开发的工业化提供理论依据,为进一步研究单宁的生物活性提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

五倍子:肚倍,产于四川省德阳市,市售;
无水乙醇、单宁标准品、香草醛固体、甲醇、浓盐酸,均为市售分析纯。

1.2 主要仪器与设备

紫外分光光度计:754型,上海光谱仪器有限公司;
电子天平:AR224CN型,上海奥豪斯仪器有限公司;
超声波清洗机:KQ-500E型,昆山市超声仪器有限公司;
九阳粉碎机:JYL-0012型,上海高桥粉碎机厂。

作者简介:李倩云(1994-),女,上海理工大学在读硕士研究生。

E-mail: 1228942956@qq.com

通讯作者:张双灵

收稿日期:2014-10-26

1.3 试验方法

1.3.1 样品预处理 首先挑选出饱满干净的五倍子,将五倍子破壳,去虫尸,取一定量的五倍子碎片粉碎,得五倍子粉末,将其放于棕色瓶中,干燥、避光保存,备用。

1.3.2 单宁的提取 分别称取多份 1.0 g 的五倍子粉末,根据不同的料液比,用乙醇溶液溶解,辅助加入盐酸溶液,将其放在超声波清洗机内浸提,持续 120 s,完成后进行过滤,滤液转移到 25 mL 的容量瓶中,加乙醇溶液到刻度线,摇晃均匀。准确移取 2.50 mL 于具塞试管中,加入 4% 的香草醛溶液 3.00 mL,慢慢滴加 1.50 mL 的浓盐酸,在无光常温条件下静放 25 min,于 505 nm 处测量不同溶液的吸光度值,同时以空白试剂作参比。

1.3.3 单宁标准曲线的绘制 根据文献[14],精密称量 0.5 g 单宁,用甲醇溶解并定容到 50 mL 的容量瓶中,得到浓度为 0.01 g/mL 的单宁标准溶液。依次量取 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00 mL 的单宁标准溶液放在 6 个 25 mL 的容量瓶内,加甲醇溶液到刻度线,摇晃均匀。依次精密吸取以上各单宁溶液 2.50 mL 放在 6 只具塞试管中,各加 3.00 mL 的 4% 的香草醛溶液,慢慢滴入浓盐酸 1.50 mL,在无光常温下静放 25 min,于 505 nm 处测吸光值,以空白试剂作为参比。纵轴是测得的各溶液的吸光度值,横轴是不同的单宁浓度,制作单宁的标准曲线。

1.3.4 单因素试验设计

(1) 盐酸体积分数对五倍子单宁提取率的影响:称取 1.0 g 五倍子粉末,加入 70% 的乙醇溶液,超声温度为 50 °C,料液比为 1:30 (m:V),盐酸体积分数分别为 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 研究盐酸体积分数对五倍子单宁提取率的影响。

(2) 乙醇体积分数对五倍子单宁提取率的影响:称量 1.0 g 五倍子粉末,超声温度为 50 °C,料液比为 1:30 (m:V),盐酸体积分数为 1.0%,乙醇体积分数分别为 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 研究乙醇体积分数对五倍子单宁提取率的影响。

(3) 超声温度对五倍子单宁提取率的影响:称取 1.0 g 五倍子粉末,盐酸体积分数为 1.0%, 70% 的乙醇溶液,料液比为 1:30 (m:V),超声温度分别为 40, 50, 60, 70, 80 °C, 研究超声温度对五倍子单宁提取率的影响。

(4) 料液比对五倍子单宁提取率的影响:称取 1.0 g 五倍子粉末,以 70% 的乙醇溶液为提取溶剂,盐酸体积分数为 1.0%,提取温度为 50 °C,料液比分别为 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40 (m:V), 考察料液比对五倍子单宁提取率的影响。

1.3.5 正交试验设计 在单因素试验的基础上,选用 $L_9(3^4)$ 进行正交试验设计,每个试验重复 3 次。

1.4 五倍子单宁提取率测定

以五倍子为样品,用乙醇溶解,按照 1.3.2 方法在 505

nm 波长下测吸光度。对照标准曲线,由回归方程可得单宁浓度。按式(1)求出五倍子单宁的提取率。

$$R = \frac{C \times V_1 \times V_2}{M \times V_3} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R——单宁提取率, %;

C——由标准曲线求得的单宁浓度, mg/mL;

V_1 ——稀释体积, mL;

V_2 ——样品溶液的体积, mL;

M——样品质量, g;

V_3 ——吸取样品溶液的体积, mL。

1.5 数据统计方法

利用 Spss17.0 版软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

2.1.1 单宁的标准曲线 由单宁浓度 (C mg/mL) 和吸光度值 (A), 得到单宁的标准曲线 (见图 1), 拟合得到: $A = 0.1458C + 0.0845$, $R^2 = 0.9990$, 表明单宁质量浓度在 1.0 ~ 4.0 mg/mL 时具有良好的线性关系。

2.1.2 盐酸体积分数对五倍子单宁提取率的影响 由图 2

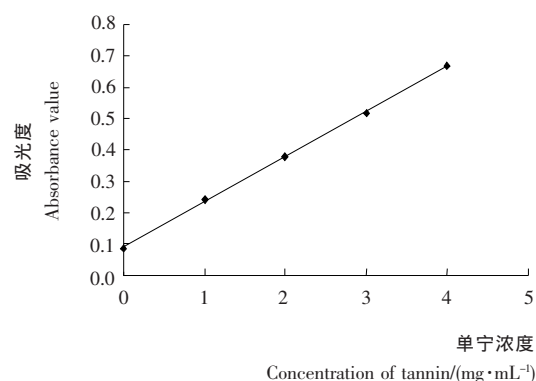


图 1 不同浓度单宁吸光度值的标准曲线

Figure 1 Standard curves of different concentration of tannin absorbance value

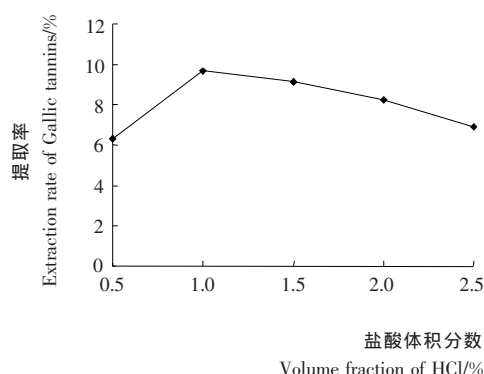


图 2 盐酸体积分数对五倍子单宁提取率的影响

Figure 2 Effects of volume fraction of HCl on the extraction rate of Gallic tannins

可知,盐酸体积分数对单宁的提取率有极显著影响($P < 0.01$)。当体积分数为 0.5%~1.0%时,单宁的提取率随着盐酸体积分数的增大而升高;但高于 1.0%时,提取率不再呈上升趋势。说明盐酸的体积分数影响单宁的提取率,下降是由于乙醇—水体系不但能断裂单宁与金属离子的络合键,而且还能帮助断裂单宁和蛋白质、多糖以及其自身之间的疏水键和氢键。因此较优的盐酸体积分数为 0.5%~1.5%。

2.1.3 乙醇体积分数对五倍子单宁提取率的影响 由图 3 可知,乙醇体积分数对单宁的提取率有显著影响($P < 0.05$)。在乙醇体积分数为 40%~50%时,单宁的提取率因乙醇的浓度变大而提高;高于 50%时,提取率降低。原因是当乙醇体积分数增大时,乙醇溶液能够溶解的单宁的量也随之增大;下降可能是由于五倍子中某些物质释放出来抑制了单宁的溶解,所以较优的乙醇体积分数为 40%~60%。

2.1.4 超声温度对五倍子单宁提取率的影响 由图 4 可知,超声温度对单宁的提取率有极显著影响($P < 0.01$)。当超声波温度在 40~50℃时,单宁的提取率会因温度的提高而增大;高于 50℃时提取率不断降低。原因是当温度上升

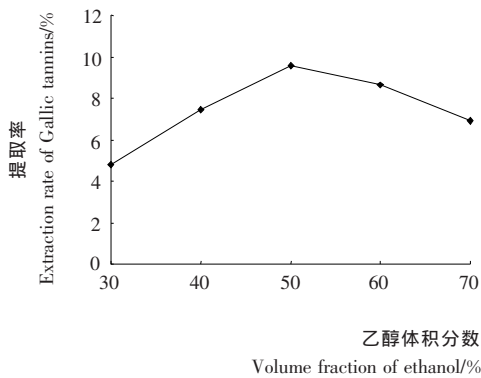


图 3 乙醇体积分数对五倍子单宁提取率的影响
Figure 3 Effects of volume fraction of ethanol on the extraction rate of Gallic tannins

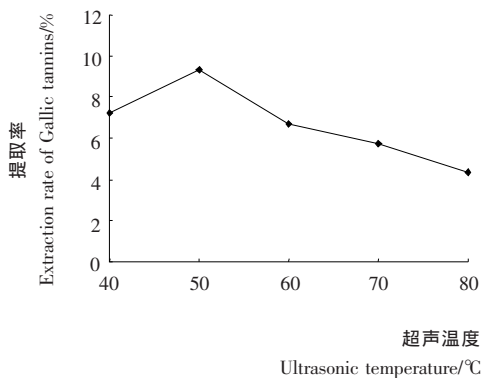


图 4 超声温度对五倍子单宁提取率的影响
Figure 4 Effects of Ultrasonic temperature on the extraction rate of Gallic tannins

时,单宁等酚类物质活性提高,于溶剂里面的溶解度也会升高;下降是因为单宁的结构不够牢固,当处于较高的温度时会分解,或者容易被氧化;也可能是因为温度太高,导致细胞内的胶体等析出物数量上升,使溶液的粘稠度提高,阻碍了单宁的溶出。因此较优的超声温度为 40~60℃。

2.1.5 料液比对五倍子单宁提取率的影响 由图 5 可知,料液比对单宁的提取率有显著影响($P < 0.05$)。当料液比在 1:20~1:30($m : V$)时,料液比渐渐升高,提取率亦会升高;大于 1:30($m : V$)时,提取率下降。原因可能是溶剂体积增多,与五倍子接触面积增大,使其中的单宁能与溶剂充分接触,从而提取率增大;下降是因为当料液比升高时,溶剂增多,单位体积内的单宁浓度会下降,易引发氧化作用。因此当不断提升料液比时,单宁的提取率会降低。因此较优的料液比为 1:25~1:35($m : V$)。

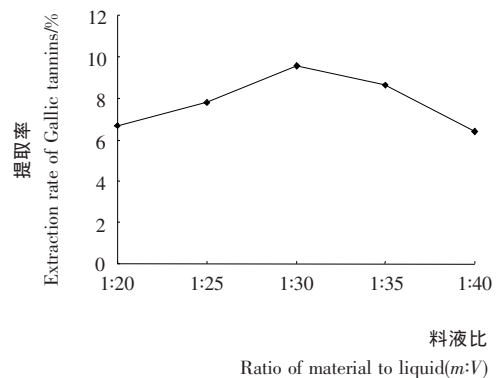


图 5 料液比对五倍子单宁提取率的影响
Figure 5 Effects of Ratio of material to liquid on the extraction rate of Gallic tannins

2.2 正交试验结果

2.2.1 正交试验及结果分析 在单因素试验的基础上,选取盐酸浓度、乙醇浓度、超声温度、料液比 4 个因素设计正交试验。正交试验因素水平设计见表 1,试验组合及结果见表 2。

由表 2 中的极差分析能够得出,对五倍子单宁提取率影响由大到小的因素是:料液比>超声温度>乙醇体积分数>盐酸体积分数,由 K 值大小可以选出最优水平组合为 A₂B₂C₁D₂,即 1.0%的盐酸溶液、50%的乙醇溶液、超声波温度为 40℃、料液比 1:30($m : V$)。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Single factor selection table

水平	A 盐酸体积分数/%	B 乙醇体积分数/%	C 超声波温度/°C	D 料液比 (m : V)
1	0.5	40	40	1 : 25
2	1.0	50	50	1 : 30
3	1.5	60	60	1 : 35

表2 正交试验结果及极差分析
Table 2 The results of orthogonal test and range

序号	A	B	C	D	提取率/%		
					1	2	3
1	1	1	1	1	5.26	6.33	5.64
2	1	2	2	2	8.64	8.10	8.07
3	1	3	3	3	7.29	6.56	7.60
4	2	1	2	3	7.84	7.18	8.52
5	2	2	3	1	5.78	6.50	5.28
6	2	3	1	2	8.41	7.51	8.80
7	3	1	3	2	6.61	5.70	6.94
8	3	2	1	3	8.31	9.14	7.77
9	3	3	2	1	5.09	5.47	4.84
K_1	7.053	6.923	7.333	5.757			
K_2	7.307	7.380	7.260	7.903			
K_3	6.967	7.023	6.733	7.667			
R	0.340	0.457	0.600	2.146			

2.2.2 方差分析 由表3可知,当显著水平在0.05时,乙醇体积分数、超声温度、料液比对单宁提取率影响结果具有显著性($P < 0.05$)。

表3 方差分析表
Table 3 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F比	显著性
盐酸体积分数	1.997 6	2	3.06	0.072
乙醇体积分数	3.553 6	2	5.45	0.014
超声温度	4.489 8	2	6.89	0.006
料液比	27.919 8	2	42.51	0.000
误差	5.868 6	18		

2.2.3 验证实验 按照最佳方案 $A_2B_2C_1D_2$ 进行验证实验,平行做3次,取平均值,测得五倍子中单宁的平均提取率为10.97%。该结果大于正交试验表中的最大值,因此 $A_2B_2C_1D_2$ 为本试验的最优组合。

3 结论

本试验以单因素试验为基础,采用正交试验优化超声辅助提取五倍子单宁的工艺条件。研究表明盐酸体积分数、乙醇体积分数、超声温度可以显著影响五倍子单宁的提取效率,得到超声波辅助法提取五倍子中单宁最优工艺条件是:盐酸体积分数为1.0%、乙醇体积分数为50%、超声温度为40℃、料液比为1:30(m:V)。在此条件下,单宁的最大提取率为10.97%,提取率比文献[15]报道的7.32%明显提

高。本研究得到的工艺条件可为工业提取单宁提供参考,为五倍子中单宁的进一步开发利用提供帮助。

参考文献

- 周劲光. 五倍子的药理作用与临床研究进展[J]. 海峡药学, 2010, 22(2): 55~59.
- 王书园, 俞凌云, 朱云. 单宁的分析研究现状[J]. 开发与研究, 2008, 25(5): 16~19.
- 王全杰, 任方萍, 高龙. 植物单宁的含量测定方法[J]. 西部皮革, 2010, 32(23): 26~31.
- 吕翔, 杨子祥, 李杨, 等. 五倍子单宁含量测定方法的比较研究[J]. 西南农业学报, 2012, 25(10): 80~84.
- 李晓文, 严聃, 盛灿梅. 邻二氮菲-铁(III)分光光度法测定茶叶中微量单宁[J]. 食品与机械, 2006, 22(2): 90~101.
- 张宗和, 闵凡芹, 秦清, 等. 超声波辅助提取五倍子单宁酸的响应面优化试验[J]. 生物质化学工程, 2012, 46(6): 12~16.
- 杨国伟, 危晴, 刘卉, 等. 超声波辅助提取锁阳多糖的工艺研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 141~144.
- Ying Zhi, Han Xiao-xiang, Li Jian-rong. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1 273~1 279.
- 李冰, 王颖, 徐炳政, 等. 超声波辅助提取酵母源类金属硫蛋白工艺的优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 194~197.
- 赖红芳, 黄秀香, 陆俊宇. 超声波辅助提取山豆根中的黄酮和多糖工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 196~198.
- 贯云娜, 吴昊, 杨绍兰, 等. 超声复合酶法提取大蒜多糖的工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 199~204.
- 江凯, 李建科. 五倍子单宁的超声提取工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(11): 194~197.
- 杜瑞莲, 杨中林. 五倍子中鞣质提取工艺研究[J]. 中成药, 2008, 30(6): 839~841.
- 李永霞, 王红, 刘军海. 超声波辅助提取五倍子中单宁[J]. 化工技术与开发, 2011, 40(8): 18~21.
- 王红, 李永霞, 吕佳飞, 等. 响应面法优化五倍子单宁酸的超声波提取工艺[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(15): 69~72.