

doi:10.3969/j.issn.1001-3776.2017.06.007

## 马尾松松针中槲皮素提取工艺优化

张雪辉, 唐蕊, 丁园园, 王 龙

(邢台学院 化学工程与生物技术学院, 河北 邢台 054000)

**摘要:** 以马尾松 *Pinus massoniana* 松针为材料, 采用乙醇浸提法提取槲皮素。采用单因素法试验乙醇浓度、浸提时间、浸提温度和料液比对槲皮素提取率的影响, 从中筛选出4个因素的3个不同水平进行正交试验, 乙醇浓度分别为60%, 70%, 80%; 浸提温度60℃, 70℃, 80℃; 浸提时间90 min, 120 min, 150 min; 料液比1:15, 1:20, 1:25 (g:mL)。运用正交试验方法, 选出提取槲皮素的最佳浸提法工艺为: 料液比1:20 (g:mL), 浸提温度60℃, 浸提时间90 min, 乙醇浓度70%, 槲皮素提取率达2.649%。

**关键词:** 槲皮素; 马尾松; 单因素试验; 正交试验

中图分类号: S719.248; TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-3776 (2017) 06-0040-05

## Optimization of Technology for Extraction of Quercetin from Needles of *Pinus massoniana*

ZHANG Xue-hui, TANG Rui, DING Yuan-yuan, WANG Long

(School of Chemical Engineering and Biotechnology, Xingtai University, Xingtai 054000, China)

**Abstract:** Quercetin from needles of *Pinus massoniana* collected from Hezhou of Guangxi in February 2016 was extracted by ethanol. Single factor experiments were conducted for selection of ethanol concentration, extraction time, extraction temperature and material to liquid ratio. Orthogonal tests were implemented with ethanol concentration of 60%, 70% and 80%, extraction temperature of 60℃, 70℃ and 80℃, extraction time of 90 minutes, 120 minutes and 150 minutes, material to liquid ratio of 1:15, 1:20, 1:25. The result demonstrated that the best test technology for extraction of quercetin was as follows: material to liquid ratio of 1:20 (g:mL), extraction temperature of 60℃ for 90 minutes, with 70% ethanol concentration. The extract rate of quercetin was 2.649%.

**Key words:** Quercetin; *Pinus massoniana*; the single factor test; Orthogonal test

马尾松 *Pinus massoniana*, 松科 Pinaceae 松属 *Pinus* 常绿乔木, 广泛分布于中国南方各省区。马尾松松针不仅具有行气活血的作用, 还有清热解毒、祛风止血等功能<sup>[1]</sup>, 具有重要的药用和经济价值。黄酮类化合物是松针的主要化学成分, 而槲皮素是黄酮类化合物中最重要的化合物之一<sup>[2]</sup>。

槲皮素, 2-(3,4-二羟基)-3,5,7-三羟基-1-苯并吡喃-4-酮, 从其化学结构来看可溶于某些酸, 如冰醋酸; 其碱性水溶液颜色常为黄色, 且几乎不与水相溶。可作为药品使用, 具有止咳平喘祛痰之功效。近年来, 发现槲皮素在清除自由基方面具有显著的效果, 是药用植物的活性成分之一, 相关药理和临床实验证明槲皮素具有广泛的药用价值, 如在抑制乳腺癌、肝癌等癌细胞方面具有一定的作用以及在心血管保护、抗病毒等方面同样

收稿日期: 2017-03-20; 修回日期: 2017-10-30

基金项目: 河北省教育厅青年基金 (QN2016312)

作者简介: 张雪辉, 副教授, 从事植物提取物研究与生物教学工作; E-mail: xtxyzxh@126.com。

具有显著的疗效<sup>[1-4]</sup>。此外,还可以治疗慢性支气管炎、冠心病及高血压<sup>[5]</sup>。对于马尾松松针中槲皮素的提取方法鲜有报道,本研究采用乙醇浸提法对马尾松松针中的槲皮素进行提取,并结合使用正交试验法,旨在找到最佳的提取方法,现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

马尾松松针粉末的制备:试验所用的马尾松松针于 2016 年 2 月 29 日采自广西壮族自治区贺州市平桂管理区黄田镇下排村坳背, 24°31'31" N, 111°29'44" E, 1 颗树龄约 15 a 的下部枝干顶端松针 2kg, 用吸水纸包好后, 立即带回实验室。80℃下杀青处理后, 60℃条件下干燥, 粉碎, 过 80 目筛, 装入真空袋中, 低温避光保存, 备用。槲皮素标准品(上海宝曼生物科技有限公司), 95%乙醇(分析纯)。

### 1.2 方法

1.2.1 槲皮素标准品溶液标准曲线制作 用电子天平称取槲皮素标准品 1.49 mg, 置于 25mL 三角瓶中, 用 5mL 浓度为 60%的乙醇溶解, 将溶解的槲皮素溶液转移至 25 mL 容量瓶中, 并用 60%的乙醇定容、摇匀, 即得到 59.6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的槲皮素标准品溶液。量取槲皮素标准品溶液 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL 分别置于 10 mL 的容量瓶中, 再用浓度为 60%的乙醇定容、摇匀, 得 2.98, 5.96, 8.94, 11.92, 14.90, 17.88  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  槲皮素标准溶液。用 UV-5200 紫外可见分光光度计在 255 nm 的波长下分别测量各溶液的吸光值, 以所测得的槲皮素标准品的吸光值为纵坐标, 槲皮素的浓度为横坐标, 制作标准曲线<sup>[6-8]</sup>, 见图 1。其标准曲线方程为:

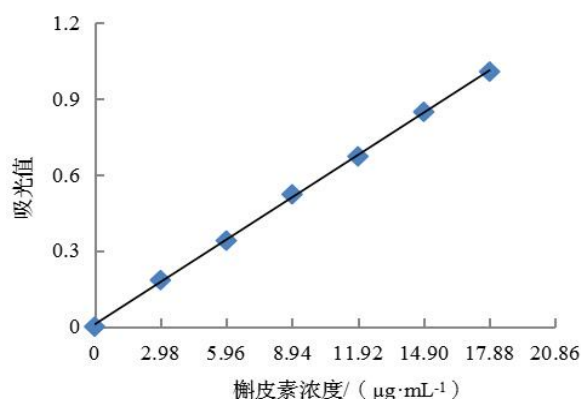


图 1 槲皮素标准曲线

Figure 1 Standard curve of quercetin

$$y = 0.0556x + 0.0165, R^2 = 0.9995。$$

### 1.2.2 马尾松松针槲皮素提取率计算

按照下面公式计算提取率:

$$W(\%) = (A - 0.0165) / 0.0556 \times 250 \times 10^{-6} / 10^{-1} \times 100$$

式中,  $W$  为马尾松松针浸提液中槲皮素提取率;  $A$  为吸光值; 250 为浸提液体积;  $10^{-6}$  换算单位;  $10^{-1}$  为马尾松松针粉末质量, 100 为换算百分数。

### 1.2.3 单因素提取试验

1.2.3.1 乙醇浓度对马尾松松针槲皮素提取率的影响 称取 0.1 g 样品分别置于 5 个离心管中, 将体积分数为 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 的乙醇, 分别加入到 5 个离心管中, 封口膜封好, 置于 70℃ 的恒温水浴锅中, 水浴时间为 60 min<sup>[6,11]</sup>, 测试不同乙醇浓度与浸提液中槲皮素提取率的关系, 重复 3 次。

1.2.3.2 水浴浸提温度对马尾松松针槲皮素提取率的影响 称取 0.1 g 样品分别置于 5 个离心管中, 将体积分数为 60% 的乙醇, 按照料液比 1:30 (g:mL) 分别加入到五个离心管中, 封口膜封好后, 分别在温度为 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃ 的水浴锅中, 水浴时间为 60 min<sup>[6,11]</sup>, 测试不同水浴浸提温度与槲皮素提取率的关系, 重复 3 次。

1.2.3.3 水浴浸提时间对马尾松松针槲皮素提取率的影响 称取 0.1 g 样品分别置于 5 个离心管中, 将体积分数为 60% 的乙醇, 按照料液比 1:30 (g:mL) 加入到 5 个离心管中, 封口膜封好后, 置于温度为 70℃ 的水浴锅, 各个离心管水浴的时间分别为 30, 60, 90, 120, 150 min<sup>[6,11]</sup>, 测试不同水浴提取时间与槲皮素提取率的关系, 重复 3 次。

1.2.3.4 料液比对马尾松松针槲皮素提取率的影响称取 0.1 g 样品分别置于 5 个离心管中, 体积分数为 60% 的乙醇分别按照 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35 (g:mL) 的料液比加入到 5 个离心管中, 封口膜封好后, 放置到温度为 70℃ 的水浴锅中, 水浴时间为 60 min<sup>[6,11]</sup>, 测试不同料液比与槲皮素提取率的关系, 重复 3 次。

1.2.4 正交试验

从单因素试验的结果确定正交试验的最佳梯度, 采用  $L_9(3^4)$  正交表<sup>[12-15]</sup>, 进行正交试验设计 (见表 1), 以测试马尾松松针中槲皮素的最佳提取方法。

表 1 正交试验设计  
Table 1 Orthogonal experimental design

水平	因素			
	乙醇浓度/%	浸提时间/min	浸提温度/℃	料液比/(g:mL)
1	60	90	60	1:15
2	70	120	70	1:20
3	80	150	80	1:25

1.3 数据处理

试验数据用 Excel 2007 和 SPSS 16.0 进行统计处理, 所有数据为 3 次重复的平均值。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 乙醇浓度对马尾松松针中槲皮素提取率的影响

将测得的不同乙醇浓度下马尾松松针粉末浸提液的吸光值换算成提取率, 结果见图 2。由图 2 可知, 在乙醇浓度达到 70% 前, 浸提液的吸光值与乙醇浓度呈正相关。当乙醇浓度继续增大时, 吸光值反而呈减小趋势。这可能是由于乙醇浓度增大导致松针中其他物质出现, 进而降低了槲皮素在乙醇中的溶解度而导致浸提液吸光值降低。试验说明乙醇浓度为 70% 时槲皮素含量达最高值。因此, 选择 60%, 70%, 80% 水平梯度作为正交试验的 3 个水平。

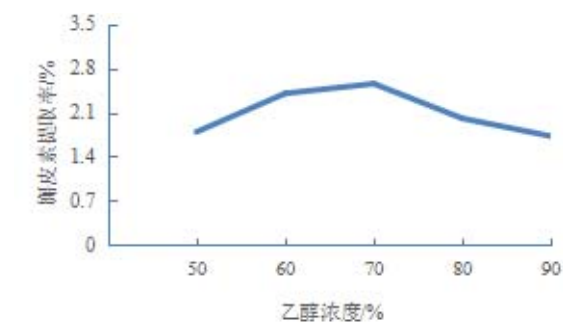


图 2 乙醇浓度对槲皮素提取率的影响

Figure 2 Effect of ethanol concentration on rate of quercetin extraction

2.1.2 浸提温度对马尾松松针中槲皮素提取率的影响

将测得的不同浸提温度条件下马尾松松针浸提液的吸光值换算成提取率 (见图 3)。由图 3 可知, 浸提温度达到 70℃ 前, 浸提液吸光值随浸提温度的升高而增大, 在浸提温度为 70℃ 时浸提液的吸光值达到最高值, 温度持续升高时, 吸光度反而降低。这可能是由于过高的温度导致槲皮素等相关物质的破坏或者是导致槲皮素在乙醇中溶解度降低, 从而使得浸提液吸光值减小。实验结果表明当浸提温度为 70℃ 时槲皮素含量最高, 槲皮素的溶解度最大, 结构最完整。因此, 选择了 60℃, 70℃, 80℃ 作为正交试验时的 3 个水平。

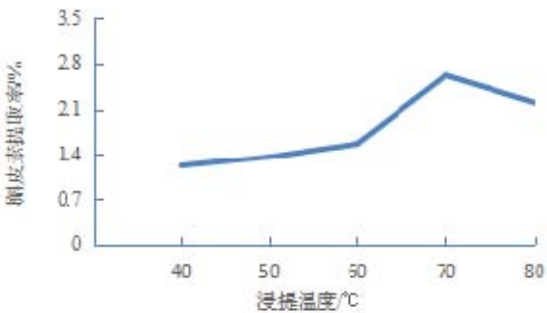


图 3 浸提温度对槲皮素提取率的影响

Figure 3 Effect of leaching temperature on rate of quercetin extraction

2.1.3 浸提时间对马尾松松针中槲皮素提取率的影响

将测得的不同浸提时长马尾松松针浸提液的吸光值换算成提取率, 详见图 4。由图 4 可知, 随着浸提时间延长, 浸提液的吸光值增大, 在浸提时间为 120 min 时, 吸光值最高, 当时间持续延长, 吸光度降低。可能是

由于浸提时间过长导致槲皮素物质流失, 导致浸提液吸光值的降低。实验结果表明浸提时间 120 min 时槲皮素含量最高, 保存量最高。因此, 选择了 90 min, 120 min, 150 min 作为正交试验的 3 个水平。

2.1.4 料液比对马尾松松针中槲皮素提取率的影响

将测得的不同料液比条件下马尾松松针浸提液的吸光值换算成提取率, 如图 5。由图 5 可知, 料液比增大的时候, 浸提液的吸光值随着增大, 料液比为 1:20 时浸提液的吸光值达到最高, 其后随着料液比持续增大, 吸光值反而降低。这可能是由于料液比达到一定程度后该成分已完全浸提出, 再增加料液比反而使浸提液浓度降低, 从而导致吸光值也相应减小。实验结果表明料液比为 1:20 时槲皮素含量最高。因此, 选择 1:15, 1:20, 1:25 (g:mL) 作为正交试验的 3 个水平。

2.2 正交试验法测定马尾松针中槲皮素含量结果及分析

正交试验结果见表 2。极差 R 值可以判断乙醇浓度、料液比、浸提温度、浸提时间 4 个因素使对马尾松针浸提槲皮素含量变动的程度, 极差越大说明在试验过程中使槲皮素得量的变动越大<sup>[12]</sup>。由表 2 可知, 料液比的极差值最大, 说明对槲皮素含量变动最明显, 其次是乙醇浓度、浸提时间、浸提温度。所以, 4 个因素对槲皮素得率的影响为料液比>乙醇浓度>浸提时间>浸提温度。

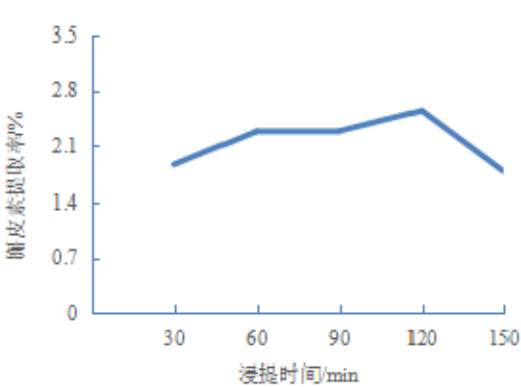


图 4 浸提时间对槲皮素提取率的影响

Figure 4 Effect of extraction time on rate of quercetin

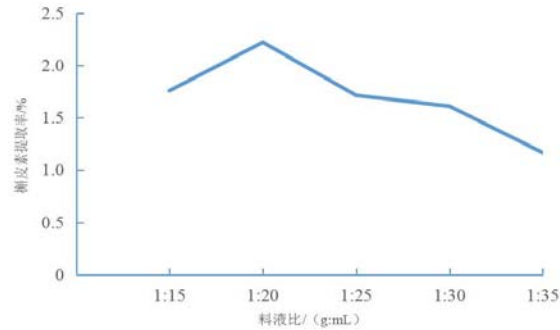


图 5 料液比对槲皮素提取率的影响

Figure 5 Effect of material to liquid ratio on rate of quercetin extraction

表 2 正交试验设计及结果  
Table 2 Orthogonal experimental design and result

试验序号	因素				吸光值	槲皮素得量/mg	槲皮素提取率/%
	乙醇浓度	料液比	浸提温度	浸提时间			
1	1	1	1	1	0.331	1.414	1.414
2	1	2	2	2	0.188	0.771	0.771
3	1	3	3	3	0.310	1.320	1.320
4	2	1	2	3	0.320	1.365	1.365
5	2	2	3	1	0.393	1.693	1.693
6	2	3	1	2	0.471	2.044	2.044
7	3	1	3	2	0.188	0.771	0.771
8	3	2	1	3	0.337	1.441	1.441
9	3	3	2	1	0.447	1.936	1.936
K1	3.505	3.550	4.899	5.043			
K2	5.102	3.905	4.072	3.586			
K3	4.148	5.300	3.784	4.126			
$\bar{K}_1$	1.168	1.183	1.633	1.681			
$\bar{K}_2$	1.701	1.302	1.357	1.195			
$\bar{K}_3$	1.383	1.767	1.261	1.375			
极差 R	0.533	0.584	0.372	0.486			

K1, K2, K3 反映了因子的各个水平对实验结果的影响, 因此 K 值最大的因子水平对应于该因子最好的水平<sup>[15]</sup>。由正交实验表可知, 最优的提取方法为: 乙醇浓度 70%, 料液比 1:20, 浸提温度 60℃, 浸提时间 90 min。经过 3 次平行试验测得槲皮素提取率为 2.649%, 高于正交实验表里最高槲皮素提取率 2.044%, 因此为最优实验条件。

### 3 结论与讨论

本试验通过单因素试验和正交试验相结合的方法,确定了提取马尾松针中槲皮素的最佳方法是料液比 1:20 (g:mL),浸提温度 60℃,浸提时间 90 min,乙醇浓度 70%的乙醇浸提法,槲皮素提取率为 2.649%。

在单因素试验中,浸提时间 120 min,浸提温度 70℃时槲皮素提取率最高,但是,在正交试验中,浸提时间 90 min,浸提温度 60℃时槲皮素的提取率最高。两个试验结果不一样的原因一是单因素试验是用来确定各因子的最佳的水平范围,从而采用最佳的水平范围来设计正交试验,再从正交试验中找出最优组合,因而,单因素试验的结果和正交试验有所不同;二是温度过高和浸提时间过久会导致大量乙醇蒸发,从而使槲皮素在乙醇溶液中的溶解度减小以及使某些槲皮素结构遭到破坏,降低了浸提液的吸光值,槲皮素提取率反而降低。

王明力等<sup>[9]</sup>利用乙醇作为溶剂进行提取,采用高效液相色谱进行槲皮素含量的测定,最终证实了从马尾松针中提取槲皮素的提取率为 1.12%。本实验同样利用乙醇作为溶剂,利用乙醇浸提法进行提取,采用紫外分光光度计对马尾松针浸提液中槲皮素含量进行测定,槲皮素提取率为 2.649%。

本研究采用正交试验法进行马尾松针中槲皮素提取工艺的优化。正交试验法是一种最常见的优化方法,例如,席丹莹等用吸附法提取二氢槲皮素采用单因素结合正交试验法探究了提取温度、提取时间、料液比以及聚酰胺添加量等因素对落叶松木屑中槲皮素的提取率的影响,并找出最佳提取方法,槲皮素提取率为 0.814%<sup>[16]</sup>;何勤等在正交实验法优选槐米中槲皮素提取工艺的研究中,采用正交实验法找出最佳提取工艺,提高了槲皮素的提取率<sup>[17]</sup>。

水浴浸提法,以乙醇作为溶剂进行槲皮素的提取。金建忠在落叶松二氢槲皮素的提取工艺研究中采用萃取的方法,进行槲皮素的提取,并用正交试验法进行优化<sup>[18]</sup>;刘妍等在二氢槲皮素的提取与抗氧化性研究中,以丙酮-水为溶剂,采用水浴浸提的方法从落叶松中提取槲皮素<sup>[19]</sup>。本研究选取操作简单的乙醇浸提法,以成本较低、无毒性、可回收的乙醇作为溶剂进行槲皮素的提取有明显的优势。

#### 参考文献:

- [1] 张晋蔚. 槲皮素通便功能机制研究及松针槲皮素提取工艺优化的研究[D]. 广州: 广州医科大学, 2014.
- [2] 王巍, 王晓华, 尹江峰, 等. 马尾松松针的黄酮类化学成分的分离鉴定[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(7): 549-552.
- [3] 孙渭, 余世春. 槲皮素的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 85-87.
- [4] 杨丽华. 马尾松松针抗氧化活性研究及其抗氧化功能饮料研制[D]. 广州: 广州医科大学, 2014.
- [5] 刘文朵. 马尾松针抗菌物质对常见食品腐败细菌抑制作用的研究[D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2013.
- [6] 刘焱, 付玉, 李丽, 等. 金樱子槲皮素提取工艺的优化[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(12): 2564-2573.
- [7] 杨泽民, 罗少洪, 李明, 等. 关于比色测定法中标准曲线制作的思考[J]. 中医药导报, 2012, 18(5): 78-79.
- [8] 周敏聪. 分光光度法中制作标准曲线及影响因素[J]. 地方病通报, 2007, 22(4): 134-135.
- [9] 王明力, 梁桂娟, 张丽萍, 等. 松针中槲皮素的提取分离及含量测定[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(5): 24-25.
- [10] 谢济运. 松针有效成分的提取与分析研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 29(22): 13498-13500.
- [11] 马泽刚, 袁小红, 徐春霞, 等. 费约果叶片槲皮素的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(36): 12881-12882.
- [12] 刘瑞江, 张业旺. 正交试验设计和分析方法研究[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(9): 53-55.
- [13] 程红, 胡彦波. 科技文献中正交试验表的组合设计与编排[J]. 编辑学报, 2014, 26(2): 134-136.
- [14] 赵永明, 王书华, 刘泽华, 等. 正交实验法优化款冬花中槲皮素的提取工艺[J]. 医药导报, 2014, 33(6): 800-802.
- [15] 王刚, 兰鸿, 常明泉, 等. 正交试验优选槲皮素提取精制工艺[J]. 中国药师, 2010, 13(10): 1413-1415.
- [16] 席丹莹, 王正平, 宁正祥, 等. 吸附法提取二氢槲皮素的研究[J]. 食品科技, 2007, 12(8): 142-144.
- [17] 何勤, 徐雄良, 柯尊洪, 等. 正交实验法优选槐米中槲皮素提取工艺[J]. 中草药, 2003, 34(5): 409-412.
- [18] 金建忠. 落叶松中二氢槲皮素的提取工艺研究[J]. 林产化工通讯, 2005, 39(4): 12-15.
- [19] 刘妍, 王遂. 二氢槲皮素的提取及抗氧化研究[J]. 化学研究与应用, 2011, 23(1): 108-111.