

# 藤茶果实中二氢杨梅素的提取工艺研究

李雁云, 周防震\*, 孙梦凡, 刘水松, 程鹏成

(湖北民族大学生物科学与技术学院, 湖北 恩施 445000)

**摘要:** 利用正交试验设计优化藤茶果实中二氢杨梅素的提取工艺。以甲醇为溶剂, 利用索式提取的方法提取藤茶果实和种子中的二氢杨梅素; 在此基础上, 以甲醇体积、提取温度和提取时间为因素, 采用等水平正交表  $L_9(3^4)$  设计三因素三水平试验。结果表明: 藤茶果实中二氢杨梅素的含量显著高于藤茶种子; 二氢杨梅素提取的最佳工艺条件为 1 g 藤茶样本, 甲醇用量 150 mL, 提取温度 85℃, 提取时间 4 h, 该条件下藤茶果实中二氢杨梅素含量为 44.77 mg·g<sup>-1</sup>。藤茶果实二氢杨梅素含量高于藤茶籽, 更适于作为二氢杨梅素提取的材料; 甲醇提取较之乙醇, 更有利于藤茶果实中二氢杨梅素的提取, 而温度是决定提取率的最主要因素。

**关键词:** 藤茶; 二氢杨梅素; 正交试验

**DOI:** 10.13651/j.cnki.fjnykj.2019.05.012

## Study on Extraction Technology of Dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* Fruits

LI Yan-yun, ZHOU Fang-zhen\*, SUN Meng-fan, LIU Shui-song, CHENG Peng-cheng

(College of Biological Science and Technology, Hubei Minzu University, Enshi, Hubei 445000)

**Abstract:** The orthogonal experimental design was used to optimize the extraction technology of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* fruits. With the methanol as solvent, the dihydromyricetin was extracted from the fruits and seeds of *Ampelopsis grossedentata* by using the method of soxhlet extraction. On this basis, the volume of methanol, extraction temperature and extraction time were taken as factors to design the three-factor and three-level orthogonal experiment  $L_9(3^4)$ . The results showed that the content of dihydromyricetin in *Ampelopsis grossedentata* fruits was significantly higher than that in *Ampelopsis grossedentata* seeds. The optimal technological conditions for the extraction of dihydromyricetin were as follows: 1 g *Ampelopsis grossedentata* as the sample, 150 mL methanol, 85℃ extraction temperature, 4 h extraction time, and the content of dihydromyricetin in *Ampelopsis grossedentata* fruit was 44.77 mg·g<sup>-1</sup> under these conditions. As the content of dihydromyricetin in *Ampelopsis grossedentata* fruit was higher than that in *Ampelopsis grossedentata* seed, *Ampelopsis grossedentata* fruit was more suitable material for the extraction of dihydromyricetin. Compared with ethanol, the extraction by methanol was more beneficial to the extraction of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* fruits, and the temperature was the main factor determining the extraction rate.

**Key words:** *Ampelopsis grossedentata*; Dihydromyricetin; Orthogonal experimental

藤茶 *Ampelopsis grossedentata*, 又名显齿蛇葡萄, 是葡萄科蛇葡萄属的一种野生藤本植物, 是一种非常古老的中草药资源、类茶植物资源和药食

两用植物资源。二氢杨梅素是藤茶的主要活性成分, 具有抗氧化、保肝护肝、消炎、止咳、降血糖、降血脂、增强免疫和抗肿瘤<sup>[1]</sup>等多种生理药理

收稿日期: 2019-04-22

作者简介: 李雁云, 女, 1996年生, 本科生, 主要从事酶工程与生物制药研究。

\*通信作者: 周防震, 男, 1976年生, 副教授, 主要从事酶工程与生物制药研究 (E-mail: 2004020@hbmy.edu.cn)。

基金项目: 湖北民族大学大学生创新创业训练计划项目 (201810517240)。

活性。

目前藤茶二氢杨梅素的提取和制备主要采用藤茶幼嫩茎叶为原料<sup>[2-4]</sup>，而有关藤茶果实二氢杨梅素的提取和制备方面的研究鲜见报道。本试验以藤茶果实为原料，以二氢杨梅素含量为指标，通过正交试验设计优化溶剂体积、提取温度和提取时间，确定藤茶果实中二氢杨梅素的最佳提取条件，以期进一步促进藤茶果实的开发与利用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与材料

**1.1.1 仪器** 酶标仪、电子天平、索氏提取器、96孔细胞培养板、干燥箱、DFY-500粉碎机（江阴市新友机械制造有限公司）、恒温水浴锅、移液枪。

**1.1.2 材料** 试验用藤茶果实于2018年10月4日采摘于来凤县大河镇。甲醇、乙醇、二氢杨梅素标准品（98%，HPLC）购于上海同田生物科技有限公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 原料处理** 藤茶果实采摘于恩施市来凤县大河镇两河口，洗净后，分为两部分。其中1份剥皮、留籽，将籽洗净、平铺晾干至恒重，而后置于粉碎机中粉碎成粉末，放于容器中贴好标签备用。另1份藤茶果实直接晾干至恒重，粉碎，备用。

**1.2.2 测定波长的确定** 称取少量二氢杨梅素纯品，溶解取样置于96孔板中，于酶标仪中扫描测定得扫描图谱，根据扫描图谱确定二氢杨梅素的 最大吸收波长。

**1.2.3 试验材料的确定** 各称取1.0000g藤茶果实粉末和藤茶籽粉末，分别用150mL甲醇和150mL乙醇、在80℃的条件下用索氏提取抽提4h，取样置于酶标仪测量。利用OriginPro 8.0软件进行数据作图分析，确定试验材料。

**1.2.4 索氏提取** 用电子天平称取1.0000g样本粉末，用滤纸包成圆柱形，放入索氏提取器内，在烧瓶里加入甲醇，水浴加热回流提取，自然冷却，用倾泻法将烧瓶中的提取液转移到烧杯中，用少量甲醇洗涤烧瓶2~3次，合并提取液，定容至250mL容量瓶。

**1.2.5 正交试验设计** 以二氢杨梅素的含量为指标，对影响二氢杨梅素含量的甲醇用量（100、150、200mL）、提取温度（75℃、80℃、85℃）、

提取时间（4、6、8h）3个因素进行 $L_9(3^4)$ 等水平正交试验设计，确定最佳提取条件。

### 1.3 含量测定

**1.3.1 二氢杨梅素标准曲线的制备** 称取适量二氢杨梅素纯品，制得浓度梯度为2、4、6、8、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准液，并依次于酶标仪中测量。求得291nm处吸光度，以标准溶液的浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

**1.3.2 藤茶果实中二氢杨梅素含量测定** 采用紫外-分光光度法测定藤茶中二氢杨梅素的含量<sup>[5]</sup>。称取1.000g藤茶果实粉末，索氏提取后，将容量瓶中的提取液用200 $\mu\text{L}$ 移液枪移至96孔板中，移4~6个置于酶标仪中，测量291nm下的吸光度，取其平均值，然后在二氢杨梅素标准曲线上查出相应含量。

### 1.4 数据处理

利用OriginPro 8.0软件进行数据分析，采用SPSS 20.0进行正交试验数据的方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 二氢杨梅素的扫描吸收光谱

结合扫描吸收光谱与相关文献报道，确定最大吸收峰为291nm，故采用291nm作为二氢杨梅素浓度测定的波长（图1）。

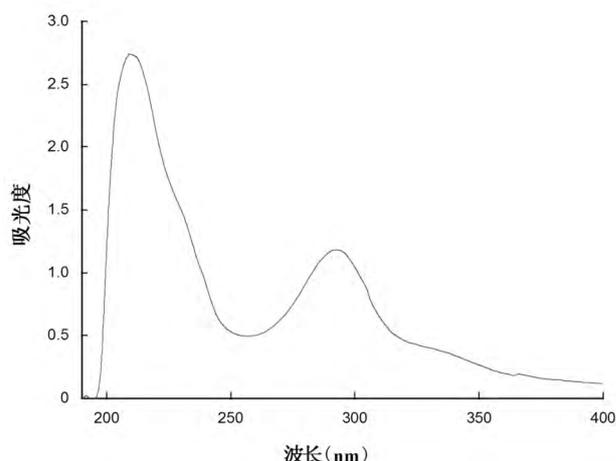


图1 二氢杨梅素的吸收光谱

### 2.2 溶剂及果实部位对二氢杨梅素提取量的影响

藤茶果实中的二氢杨梅素显著高于藤茶种子；且藤茶果实的甲醇提取物中二氢杨梅素含量显著高于乙醇提取物（图2）。故采用甲醇作为藤茶果实中二氢杨梅素的抽提试剂。

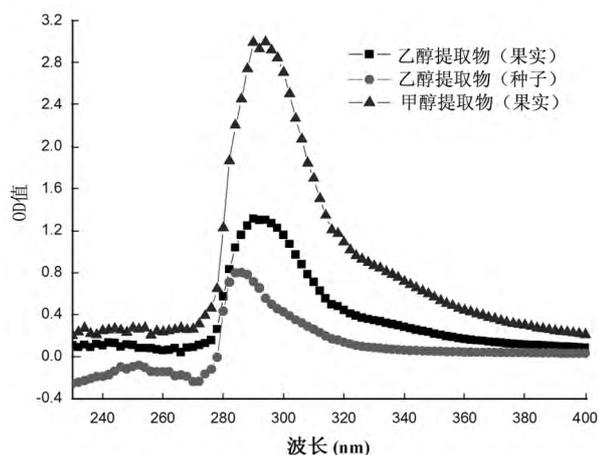


图2 不同溶剂及果实部位对二氢杨梅素提取量的影响

### 2.3 二氢杨梅素标准曲线

以二氢杨梅素浓度为横坐标，291 nm 吸光度值为纵坐标，绘制散点图（图3），通过非线性回归分析，建立回归方程为： $y = -0.04114 + 0.03626 \times e^{0.2039x}$ ， $R=0.93719$ ；回归方程极显著。

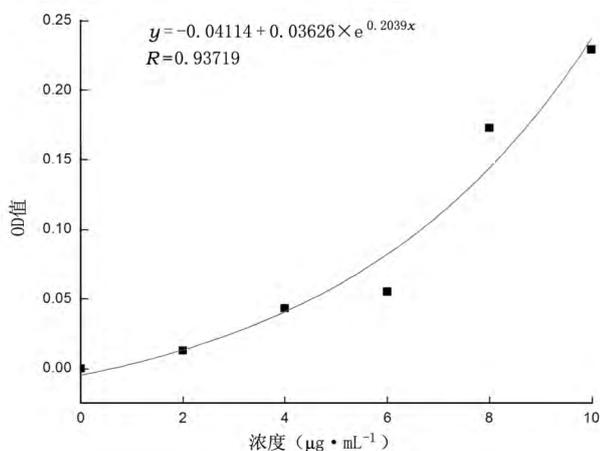


图3 二氢杨梅素标准曲线

### 2.4 正交试验结果

正交试验结果表明，3个因素对藤茶果实二氢杨梅素提取影响程度大小依次为温度、甲醇用量、时间，各因素最优水平组合为A2B3C2（表1）。

方差分析表明（表2），在显著性水平 $\alpha=0.10$ 时，甲醇用量A和时间C两因素的各水平间差异不显著（ $P>0.10$ ）；而温度B各水平间差异显著（ $P<0.10$ ）。综合表1~2结果，得到最佳可行提取工艺组合为A2B3C1，即温度85℃、甲醇用量150 mL、时间4 h，此提取条件下的OD值为2.84。

表1 藤茶果实二氢杨梅素提取结果的极差分析

试验号	甲醇用量 A	温度 B	时间 C	空白列 D	OD值
1	1	1	1	1	2.46
2	1	2	2	2	2.77
3	1	3	3	3	2.71
4	2	1	2	3	2.75
5	2	2	3	1	2.77
6	2	3	1	2	2.84
7	3	1	3	2	2.43
8	3	2	1	3	2.78
9	3	3	2	1	2.80
$K_1$	7.95	7.64	8.09	8.03	
$K_2$	8.35	8.32	8.32	8.04	
$K_3$	8.01	8.35	7.91	8.24	
$k_1$	2.65	2.55	2.70	2.68	
$k_2$	2.78	2.77	2.77	2.68	
$k_3$	2.67	2.78	2.64	2.75	
R	0.14	0.24	0.13	0.07	

表2 藤茶果实二氢杨梅素提取结果的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
甲醇用量 A	0.034	2	0.017	3.608	0.217
温度 B	0.107	2	0.054	11.489	0.080
时间 C	0.028	2	0.014	3.024	0.249
误差 D	0.009	2	0.005		
总变异	0.179	8			

### 2.5 验证试验结果

将最适条件下提取液分别稀释0、5、10、20倍，测得其吸光度值分别为2.7955、0.4999、0.3356、0.1839。其中，稀释20倍的样本吸光数值处在二氢杨梅素标准曲线取值范围内，因此将数据0.1839代入回归方程中，求得 $x = 8.95 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，在该条件下藤茶果实中二氢杨梅素提取量为 $179.06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，换算得出藤茶果实中二氢杨梅素含量 $44.77 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

## 3 讨论与结论

目前，有关用藤茶提取二氢杨梅素的提取工艺已有大量研究报道<sup>[6-9]</sup>，但大多均是以藤茶幼嫩茎

叶为材料进行提取，围绕藤茶果实及种子的二氢杨梅素提取工艺鲜见报道。

研究表明，湖南省张家界藤茶果实中二氢杨梅素含量为 6.255%，而叶片中二氢杨梅素含量为 13.3%~25.5%<sup>[10]</sup>，果实中二氢杨梅素含量显著低于叶片中二氢杨梅素含量。其他研究表明产自湖南郴州、湖南湘潭和福建武夷山的藤茶（存放 1 年）叶片、花和叶柄中二氢杨梅素含量分别为 3.83~3.99 mg·g<sup>-1</sup>、1.29~1.44 mg·g<sup>-1</sup> 和 0.98~1.04 mg·g<sup>-1</sup>；采用晒干方式加工藤茶的二氢杨梅素平均含量为 4.72 mg·g<sup>-1</sup>，是采用热风烘干方式的 1.2 倍；且不同存放时间藤茶二氢杨梅素含量由高到低为存放 2 年、存放 1 年、存放 3 年，存放 2 年的藤茶二氢杨梅素含量平均含量达到 14.42 mg·g<sup>-1</sup>，是存放 3 年的 13.87 倍<sup>[3]</sup>。可以看出不同产地、不同器官、不同加工方法，甚至不同存放时间对藤茶中二氢杨梅素的含量均有较大影响。

本试验显示影响藤茶果实二氢杨梅素提取效果的因素中，温度>甲醇用量>时间，这一结果与藤茶干燥茎叶基于索氏提取的文献报道一致<sup>[11-12]</sup>。试验测得藤茶果实索氏提取法最佳提取条件为温度 85℃，甲醇用量 150 mL，时间 4 h；在此条件下，藤茶果实中二氢杨梅素含量为 44.77 mg·g<sup>-1</sup>。该试验结果可为藤茶果实的开发与利用奠定基础。

#### 参考文献：

- [1] 周防震, 郑小江. 中国良种—藤茶 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2016: 1.
- [2] 雷燕妮, 张小斌, 李多伟. 显齿蛇葡萄叶中二氢杨梅素超声提取工艺的优化 [J]. 贵州农业科学, 2018, 46 (5): 123-126.
- [3] 杨志坚, 温杭凯, 陈选阳, 等. 藤茶总黄酮和二氢杨梅素含量研究 [J]. 福建农业科技, 2017 (10): 6-9.
- [4] 陈玉琼, 李安琪, 孟燕. 藤茶黄酮及二氢杨梅素提取条件的优化 [J]. 华中农业大学学报, 2009, 28 (1): 106-110.
- [5] 刘建兰, 于华忠, 高梦, 等. 藤茶总黄酮和二氢杨梅素的提取检测研究进展 [J]. 广东农业科学, 2013, 40(19): 90-93.
- [6] 陈雁梅, 于华忠, 刘同方, 等. 酶法提取藤茶茎中二氢杨梅素工艺研究 [J]. 应用化工, 2016, 45 (2): 304-307.
- [7] 熊伟, 王慧宾, 李雄辉, 等. 热水浸提法同步提取藤茶中二氢杨梅素和多糖的工艺研究 [J]. 生物化工, 2015 (1): 5-6, 11.
- [8] 刘畅, 邓薇, 刘小英, 等. 藤茶生物活性成分及其制备工艺研究进展 [J]. 食品工业, 2015, 36 (4): 233-237.
- [9] 郑琳, 龚自明. 破壁式方法提取藤茶中二氢杨梅素的工艺研究 [J]. 湖北农业科学, 2018, 57 (22): 118-119, 121.
- [10] 周耀, 丰来, 周政. 藤茶植株叶果与组培物中二氢杨梅素含量的比较研究 [J]. 湖南农业科学, 2012, 7 (13): 105-107.
- [11] 熊璞, 姚茂君, 肖凯军. 藤茶中二氢杨梅素的提取工艺研究 [J]. 现代食品科技, 2009, 25 (8): 907-910.
- [12] 涂招秀, 熊伟, 胡居吾, 等. 藤茶中二氢杨梅素的提取纯化工艺研究 [J]. 江西食品工业, 2011 (2): 33-36.

(责任编辑：柯文辉)