

李 光,余 霜,邓 银,等. 金荞麦叶黄酮提取技术研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):264–266.

金荞麦叶黄酮提取技术研究

李 光^{1,2,3}, 余 霜¹, 邓 银¹, 周永红², 陈庆富¹

(1. 贵州师范大学生命科学学院植物遗传育种研究所/荞麦产业技术研究中心, 贵州贵阳 550001;

2. 四川农业大学小麦研究所, 四川温江 611130; 3. 安顺学院化学与生物农学系, 贵州安顺 561000)

摘要:通过正交试验设计的方法主要考察了 6 因素 3 水平对金荞麦叶黄酮提取的影响,初步探究金荞麦叶中黄酮的提取工艺,并对提取工艺条件进行了优化。结果表明:最佳提取工艺为 60% 乙醇、固液比 1 g : 20 mL、提取温度 40 ℃、提取时间 20 min、提取 3 次、提取功率 70% (187.5 W)。正交试验获得的最佳方案提取量稳定,提取效率高。

关键词:正交试验;金荞麦叶;黄酮;提取

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)07–0264–02

金荞麦为双子叶植物纲(Dicotyledoneae)石竹亚纲(Caryophyllidae)蓼目(Polygonales)蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum*)植物,别称金锁银开(《李氏草秘》)、苦荞头(《草木便方》)、野荞子(《分类草药性》)、铁石子(《天宝本草》)、透骨消(《植物实名图考》)、蓝荞头(《民间常用草药汇编》)、荞麦三七(《浙江民间常用草药》)、野南荞、天荞麦、赤地利(《唐本草》)、苦荞麦、野桥荞麦^[1]。金荞麦为国家Ⅱ级重点保护野生植物(国务院 1999 年 8 月 4 日批准),有较强的抗氧化性,具有抗癌、抑菌作用,药用价值极大。

唐宇等曾对金荞麦籽粒的总黄酮提取工艺作了研究,并得出最佳工艺条件^[2],而叶与籽粒属于不同器官,在提取过程中会受到其他因素的影响,因而提取工艺也有所不同。王庆云等对苦荞麦叶黄酮的提取作了研究,但研究过程中忽略了超声对提取效果的影响^[3]。金荞麦全株富含黄酮类化合物,特别是花、叶中含量较高^[4]。黄酮类化合物是一类重要的天然有机化合物,是植物在长期自然选择过程中产生的一类次生代谢产物。它能清除生物体内的自由基,具有抗氧化作用^[5]。近年来,对荞麦不同器官黄酮类化合物的应用研究日益受到国内外医药学界的关注,国内外的农业、食品、营养、医疗卫生等部门对荞麦籽粒的营养成分及其食用价值的研究已取得了许多成果。但以往对荞麦种子研究较多,而对荞麦花、叶研究报道较少,在花叶提取研究中,对金荞麦叶的提取工艺研究相对更少。随着人类对健康的关注越来越高,金荞麦作为保健品开发新品种的发展速度也越来越快,金荞茶等^[6]逐步出现在市场上,为充分利用金荞麦资源,本研究以贵州师范大学生命科学学院植物遗传育种研究所培育的金荞

1 号品种植株叶片为试验原料,探讨黄酮提取工艺,为金荞麦的开发利用提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

DHG–90A(101AB)干燥箱(上海索谱仪器有限公司);UV–1800 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);AR1140 电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司);WB–400 小型高速粉碎机(北京维博创机械设备有限公司);TDL–5C 型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);AKJY–20 超纯净水机;KQ–250DE 型数控超声波清洗机(江苏省昆山超声仪器有限公司);PHS–3C 型酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司)。

1.2 材料与试剂

金荞麦叶取自贵州师范大学生命科学学院植物遗传育种研究所培育的金荞 1 号植株;芸香苷标准品,购自贵州迪大科技有限公司;NaNO₂、Al(NO₃)₃、NaOH、无水乙醇为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线的绘制 准确称取 100 mg 芸香苷标准品于 100 mL 容量瓶中,定容至刻度,即得 1 mg/mL 芸香苷标准品溶液。用移液器取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 芸香苷标准品置于 10 mL 容量瓶中,用 60% 乙醇补充至 5.0 mL,分别加入 0.3 mL 5% NaNO₂ 溶液,摇匀,放置 6 min;依次加入 0.3 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液,摇匀,静置 6 min;再分别加入 4 mL 1 mol/L NaOH 溶液,用 60% 乙醇定容至刻度,摇匀,静置 20 min,于 510 nm 下测吸光度^[7]。以吸光度为横坐标、总黄酮提取液浓度为纵坐标绘制标准曲线,建立回归方程。

1.3.2 黄酮含量的测定 准确吸取提取液 1 mL,依次加入 4 mL 60% 乙醇、0.3 mL 5% NaNO₂ 溶液,摇匀,放置 6 min;加入 0.3 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液,摇匀,静置 6 min,再加入 4 mL 1 mol/L NaOH 溶液,用 60% 乙醇定容至刻度,摇匀,静置 20 min,510 nm 下测吸光度,利用标准曲线可求得黄酮含量。

1.3.3 正交试验 通过 L₁₈(3⁶) 正交试验,综合考虑乙醇浓度、固液比、提取温度、提取时间、提取次数、提取功率对金荞麦黄酮提取的影响,并优化提取工艺条件。正交试验的因素和水平见表 1。

收稿日期:2012–12–30

基金项目:国家自然科学基金(编号:31060207、31171609);国家现代农业产业技术体系专项(编号:CARS–08–A4);贵州省农业攻关项目(编号:黔科合 NY 字[2010]3094);贵州省科技创新团队项目[编号:黔科合人才团队(2011)4007];贵州省贵阳市科技计划(编号:筑科合同[2011102]1–12)。

作者简介:李 光(1980—),男,河南商丘人,博士研究生,副教授,研究方向为作物遗传育种。E–mail:lg20029@126.com。

通信作者:陈庆富。E–mail:cqf1966@163.com。

表 1 金荞麦黄酮提取 L₁₈(3⁶) 正交试验的因素和水平

水平	因素					
	A:乙醇浓度 (%)	B:固液比 (g : mL)	C:提取温度 (℃)	D:提取时间 (min)	E:提取次数	F:提取功率 (%)
1	40	1 : 10	20	10	1	40
2	60	1 : 20	40	20	2	70
3	80	1 : 30	60	30	3	100

1.3.4 验证试验 利用正交试验优选出的最佳提取工艺条件进行验证试验。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

标准曲线方程为 $y = 0.1017x - 0.0139$, $r^2 = 0.9993$, 其中 x 为吸光度, y 为总黄酮提取液浓度, 单位为 mg/mL。

2.2 正交试验结果

取 100 g 金荞麦叶 80 ℃ 烘至恒重, 粉碎后过 40 目筛, 每次准确称取 3 g 干粉, 按“1.3”中的试验方法提取黄酮, 获得的提取液 2 000 r/min 离心 1 min, 合并提取液即为黄酮提取液, 测定提取液的吸光度并换算黄酮含量, 正交试验结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 2 金荞麦黄酮提取 L₁₈(3⁶) 正交试验结果

处理	A:乙醇浓度	B:固液比	C:提取温度	D:提取时间	E:提取次数	F:提取功率	黄酮含量 (mg/g)
1	1	1	1	1	1	1	0.276 0
2	1	2	2	2	2	2	1.381 2
3	1	3	3	3	3	3	0.505 2
4	2	1	1	2	2	3	0.291 3
5	2	2	2	3	3	1	1.299 9
6	2	3	3	1	1	2	0.767 1
7	3	1	2	1	3	2	0.009 6
8	3	2	3	2	1	3	0.005 8
9	3	3	1	3	2	1	0.286 2
10	1	1	3	3	2	2	0.495 0
11	1	2	1	1	3	3	0.673 2
12	1	3	2	2	1	1	0.857 5
13	2	1	2	3	1	3	0.359 8
14	2	2	3	1	2	1	0.988 3
15	2	3	1	2	3	2	1.656 8
16	3	1	3	2	3	1	0.201 8
17	3	2	1	3	1	2	0.017 0
18	3	3	2	1	2	3	0.201 8
k ₁	0.698	0.272	0.533	0.486	0.381	0.652	
k ₂	0.894	0.728	0.685	0.732	0.607	0.721	
k ₃	0.120	0.712	0.494	0.494	0.724	0.340	
R	0.774	0.456	0.191	0.246	0.343	0.381	

由表 2、表 3 可知, 乙醇浓度对试验结果有显著影响, 其他因素对提取结果无显著影响, 各因素对提取的影响大小依次是乙醇浓度 > 固液比 > 提取功率 > 提取次数 > 提取时间 > 提取温度。本研究确定的最佳提取工艺为 A₂B₂C₂D₂E₃F₂, 即使用 60% 乙醇、固液比 1 g : 20 mL、提取温度 40 ℃、每次提取

表 3 金荞麦黄酮提取正交试验各因素的方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值
乙醇浓度	1.941	2	14.325 *	6.940
固液比	0.803	2	5.926	
提取温度	0.122	2	0.900	
提取时间	0.235	2	1.734	
提取次数	0.367	2	2.708	
提取功率	0.496	2	3.661	
误差	0.27	4		

注: * 表示在 0.05 水平上差异显著。

20 min、提取 3 次、提取功率 70% (187.5 W)。

2.3 验证试验

使用最适提取工艺, 即 60% 乙醇、固液比 1 g : 20 mL、提取温度 40 ℃、提取 20 min、提取 3 次、提取功率 70% (187.5 W) 的提取条件进行验证试验, 结果黄酮含量为 1.730 2%。

3 讨论

比色法是被《中国药典》所收录的最常见的总黄酮测定方法, 其中又以 NaNO₂ - Al(NO₃)₃ - NaOH 比色法最常用^[8], 约占总使用频率的 70%。基本原理是以芸香苷为标准品, Al(NO₃)₃ 络合体系显色, 全波段扫描在 510 nm 处有最大吸收峰, 测定其吸光度, 据此来计算黄酮含量^[9]。本研究以金荞麦叶为原料, 结果表明 NaNO₂ - Al(NO₃)₃ - NaOH 比色法适用于金荞麦叶黄酮的提取。

本研究综合考虑了乙醇浓度、固液比、提取温度、提取时间、提取次数、提取功率等 6 个因素对金荞麦黄酮提取的影响, 解决了相关报道中提取因素水平较少、步骤繁琐的问题, 进行的验证试验结果较稳定。与其他研究者的试验结果比较, 因素水平全面, 方法科学, 步骤少, 获得的提取工艺较理想。

本试验中乙醇浓度、固液比、提取温度、提取时间、提取次数、提取功率对总黄酮提取都有一定影响。随着人们对金荞麦的利用越来越广泛, 其高黄酮的利用价值也随之显现, 在实际生产中应当充分考虑各方面的因素, 如提取温度、提取时间、提取功率等, 以降低生产成本。由于对金荞麦叶的提取工艺研究较少, 而本试验综合考虑乙醇浓度、固液比、提取温度、提取时间、提取次数、提取功率等因素做了详细研究, 结果真实可信, 得出了最佳提取工艺, 提取时间相对较短, 提取温度低, 能量耗费少, 固液比为 1 g : 20 mL, 与其他研究结果相比减少了物质的浪费, 本试验还增加了超声^[10] 这一因素, 提取方法简单可行, 期望能够为今后的生产活动提供一定的科学依据和借鉴作用。

参考文献:

[1]《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 88 - 90.
[2]唐宇, 彭德川, 孙俊秀, 等. 金荞麦籽粒中总黄酮提取工艺研究[J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(6): 54 - 57.
[3]王云庆. 苦荞麦叶中总黄酮的乙醇提取工艺研究[J]. 特产研究, 2008, 30(3): 59 - 64.

刘畅,王芳,张蓉,等. 正交试验优选金雀花碱提取工艺[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):266-268.

正交试验优选金雀花碱提取工艺

刘畅,王芳,张蓉,南宁丽

(宁夏农林科学院植物保护研究所,宁夏银川 750002)

摘要:以金雀花碱含量为评价指标,采用正交试验法筛选金雀花碱的最佳提取工艺条件。结果表明,最佳提取工艺为乙醇体积分数 70%、料液比 1 g : 6 mL、提取时间 1.5 h、提取次数 3 次。其中,提取次数是影响披针叶黄华中金雀花碱得率的最主要因素,最优条件下提取浸膏得率为 32.02%,披针叶黄华中金雀花碱含量为 20.05 mg/g。优化的提取工艺科学、合理,可以作为金雀花碱的最佳提取方法。

关键词:披针叶黄华;金雀花碱;加热回流法;正交试验

中图分类号: TQ453.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0266-03

披针叶黄华(*Thermopsis lanceolata*)是我国西部地区早春的重要野生蜜源植物,也是一种重要的固沙植物^[1]。披针叶黄华属豆科野决明属,主要分布在中国西北地区,20 世纪 60 年代前苏联人对其生物碱研究较多^[2],近 20 年有关这方面的报道较少。该植物全草可祛痰,所含生物碱有药用价值,具有潜在的应用前景。披针叶黄华中的生物碱具有一定的毒性,其中金雀花碱具有强烈的兴奋呼吸作用^[3-5],其 0.15% 注射液相当于 1% 山梗菜碱注射液的效果,并有升高血压的作用^[6],且金雀花碱对山楂叶螨、橘全爪螨均表现出较好的拒食活性^[7]。在已有的药理研究中,水提法对披针叶黄华中金雀花碱的提取率很低。本试验改变了传统的提取方法,获得了较高含量的金雀花碱,可为披针叶黄华资源的开发利用提供实用技术。

1 材料与方法

1.1 试验材料

披针叶黄华采于宁夏自治区盐池县,金雀花碱对照品购于陕西大河药业有限责任公司。甲醇为色谱纯,水为超纯水,乙醇为分析纯。

主要仪器:Agilent 1260 高效液相色谱仪(手动进样器、DAD 检测器、在线脱气机、四元泵和 Agilent 化学工作站,安捷伦科技有限公司);HX501T 电子天平(浙江省慈溪市天东衡器厂);HDM 数显调温电热套(江苏省金坛市白塔新宝仪器厂);RE-6000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D(Ⅲ)循环水多用真空泵(上海予英仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 金雀花碱含量的测定

1.2.1.1 色谱条件 色谱柱 C₁₈,流动相甲醇-水(体积比 85:15),流速 1 mL/min,柱温 30 ℃,检测波长 256 nm。

1.2.1.2 溶液制备 (1)对照品溶液制备。精确称取金雀花碱对照品适量,加甲醇溶解制成 0.02 g/L 的溶液。(2)供试品溶液制备。称取披针叶黄华,乙醇回流,取醇提干膏,加甲醇溶解,用微孔滤膜(0.45 μm)过滤。

1.2.1.3 检测方法^[8] 分别精确吸取金雀花碱对照品溶液、供试品溶液、样品溶液各 10 μL,注入液相色谱^[9],检测,金雀花碱对照品和供试品在 1.8 min 左右出现金雀花碱吸收峰,对照无干扰。高效液相色谱图见图 1。

1.2.1.4 线性关系考察^[10] 吸取 0.4 g/L 对照品溶液适量,稀释,配成浓度为 0.02、0.04、0.08、0.16、0.24、0.32 g/L 的溶液,并测定。以峰面积为纵坐标、进样量为横坐标绘制标准曲线,在金雀花碱浓度为 0.02~0.32 g/L 时,曲线线性关系良好,回归方程为 $y = 1\,653.226x + 1.561\,6$, $r = 0.998\,4$ 。

1.2.1.5 精密度试验 精确吸取金雀花碱对照品溶液 10 μL,重复进样 5 次,以计算金雀花碱峰面积, RSD 为 0.86%。

1.2.1.6 稳定性考察 精确吸取同一供试品 10 μL,分别在 0、2、4、6、8、10 h 测定峰面积, RSD 为 1.20% ($n = 6$),表明供

收稿日期:2012-12-10

基金项目:宁夏回族自治区科技攻关(编号:KGX-09-10-10);国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201003079)。

作者简介:刘畅(1985—),女,辽宁沈阳人,硕士,研究实习员,研究方向为植物源农药的开发与利用。Tel:(0951)6882367;E-mail:liuchangamy@126.com。

通信作者:张蓉,研究员,主要从事生物农药研究。Tel:(0951)6886823;E-mail:zhangrong_nx@yahoo.com.cn。

[4]李文生,王峰,韩淑英. 水提取荞麦叶总黄酮的工艺研究[J]. 华北煤炭医学院学报,2008,10(4):476-477.

[5]延玺,刘会青,邹永青,等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J]. 有机化学,2008,28(9):1534-1544.

[6]刘光德,李名扬,祝钦洸,等. 资源植物野生金荞麦的研究进展[J]. 中国农学通报,2006,22(10):380-389.

[7]张岩,曹国杰,张燕,等. 黄酮类化合物的提取以及检测方法

的研究进展[J]. 食品研究与开发,2008,29(1):154-158.

[8]国家药典委员会. 中国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005:256.

[9]李敏晶,游景艳,刘忠英,等. 微波辅助流动萃取槐花中的黄酮类成分[J]. 高等学校化学学报,2004,25(5):850-852.

[10]王景峰. 超声波法提取山竹皮中总黄酮的研究[J]. 化工科技,2011,19(6):47-50.