

高波, 胡洪瑞, 李河, 等. 超声波辅助提取刺芫荽黄酮条件的优化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(6): 175-177.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.046

超声波辅助提取刺芫荽黄酮条件的优化

高波^{1,2}, 胡洪瑞², 李河^{1,2}, 全舒舟^{1,2}

(1. 云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 云南蒙自 661100; 2. 红河学院生命科学与技术学院, 云南蒙自 661100)

摘要:采用超声波提取法对刺芫荽(*Eryngium foetidum* L.)中总黄酮进行提取,通过单因素及正交试验,确定最佳提取条件。结果显示,随着乙醇体积分数的增大,刺芫荽总黄酮的提取量增大,当乙醇体积分数超过70%后提取量下降;总黄酮提取量随超声提取时间的延长而呈上升趋势,当超声时间超过30 min后提取量下降;总黄酮提取量随料液比的减小而增大,当料液比达1 g:35 mL时,增加幅度明显减缓,1 g:40 mL时提取量达到最大。通过正交试验得出,刺芫荽总黄酮提取量影响因素的顺序为乙醇体积分数>超声时间>料液比,最佳提取工艺是乙醇体积分数为70%,超声时间为30 min,料液比为1 g:35 mL,刺芫荽总黄酮含量为25.33 mg/g。

关键词:刺芫荽;黄酮;超声波;正交试验

中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)06-0175-03

刺芫荽(*Eryngium foetidum* L.)为伞形科(Umbelliferae)2年生或多年生草本植物,别称刺芹、野芫荽、缅甸芫荽、阿瓦芫荽,主要分布于广东、广西及云南德宏、临沧、西双版纳等热带、亚热带地区;刺芫荽具有特殊的香味,是傣族、景颇族、佤族群众喜爱的调味料;刺芫荽还具有驱风清热、健胃、行气消胀、止痛的功效,可用于治疗风寒感冒、胸痛、胃寒呃逆、消化不良、肠炎腹泻、跌打肿痛、急性传染性肝炎、糖尿病、蛇伤等伤病^[1-3]。黄酮类化合物是广泛存在于植物中的一类次生代

谢产物,具有抗氧化、降胆固醇、降血糖、调血脂、抗血栓、抑制心肌肥厚、改善血液循环、促进胰岛素分泌、改善糖尿病引起的视网膜病及毛细血管脆化等疗效,还具有抑菌消炎、抑制炎症性生物酶的渗出、增进伤口愈合和止痛、抗癌、防癌、增强免疫力和延缓衰老等作用^[4-7]。有关超声波辅助刺芫荽总黄酮提取的研究尚未见报道,本研究采用超声波辅助乙醇提取刺芫荽的黄酮类化合物,并通过单因素及正交试验对提取条件进行优化,旨在为进一步开发刺芫荽总黄酮提供技术参考。

收稿日期:2016-02-06

基金项目:云南省教育厅科学研究基金(编号:2012C201)。

作者简介:高波(1980—),男,云南个旧人,硕士,讲师,主要从事特色生物资源开发研究。E-mail:gb_biology2@126.com。

3.3 米饭物性与米饭化学性状之间的关系

本试验结果显示,直链淀粉含量与米饭黏度、平衡性之间达到了极显著负相关,蛋白质含量则与二者呈极显著正相关,说明在一定范围内直链淀粉含量越高,米饭硬度越大,黏度越小,平衡性越差,蛋白质含量越高米饭黏度越大,硬度越小,平衡性越好。米饭黏滞特性RVA谱则主要与米饭的黏度、平衡性相关关系显著,说明在模拟米饭蒸煮过程中,淀粉开始糊化的过程主要体现了米饭黏度上的变化,进而影响了米饭的食味品质。

参考文献:

- [1] 赵凌, 赵春芳, 周朋慧, 等. 中国水稻生产现状与发展趋势[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 105-107.
- [2] 崔晶, 楠谷彰人, 松江勇次, 等. 中日合作水稻品质·食味研究的现状和展望[J]. 北方水稻, 2011, 41(4): 1-6.
- [3] 楠谷彰人. 中日水稻品种的食味比较[J]. 北方水稻, 2007(5): 72-77.
- [4] 徐铨, 唐亮, 徐凡, 等. 粳稻食味品质改良研究现状与展望[J]. 作物学报, 2013, 39(6): 961-968.
- [5] 张巧凤, 吉健安, 张亚东, 等. 粳稻食味仪测定值与食味品尝综合

1 材料与与方法

1.1 仪器、试剂及材料

材料:刺芫荽采自红河学院生命科学与技术学院现代农业与生物技术实习实训基地。仪器:752型可见分光光度计

- 值的相关性分析[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(3): 161-165.
- [6] 陈能, 罗玉坤, 朱智伟, 等. 优质食用稻米品质的理化指标与食味相关性研究[J]. 中国水稻科学, 1997, 11(2): 70-77.
- [7] 徐正进, 陈温福, 马殿荣, 等. 辽宁水稻食味值及其与品质性状的关系[J]. 作物学报, 2005, 31(8): 1092-1094.
- [8] 刘利成, 闵军, 刘三雄, 等. 湖南优质稻品种品质指标间的相关性分析[J]. 中国稻米, 2015, 21(1): 30-33.
- [9] 罗秋香. 粳稻稻米蛋白与蒸煮食味品质的关系[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2003.
- [10] 张春红, 李金州, 张亚东, 等. 食味仪测定与感官评价相结合鉴定优质粳稻食味特性[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(5): 958-965.
- [11] 陈能, 罗玉坤, 谢黎虹, 等. 我国水稻品种的蛋白质含量及与米质的相关性研究[J]. 作物学报, 2006, 32(8): 1193-1196.
- [12] 陈书强. 粳稻米蒸煮食味品质与其他品质性状的典型相关分析[J]. 西北农业学报, 2015, 24(1): 60-67.
- [13] 张欣, 施利利, 丁得亮, 等. 引进水稻品种(系)的产量、品质及RVA特性[J]. 中国农学通报, 2010, 26(19): 120-123.
- [14] 金正勋, 秋太权, 孙艳丽, 等. 稻米蒸煮食味品质特性间的相关性研究[J]. 东北农业大学学报, 2001, 32(1): 1-7.
- [15] 徐正进, 范淑秀, 潘国君, 等. 黑龙江水稻食味和其他品质性状的变化及相互关系[J]. 中国稻米, 2010, 16(4): 15-18.

(上海菁华科技仪器有限公司)、超声波清洗机(深圳市洁盟清洁设备有限公司)、赛多利斯电子天平(塞多利斯仪器北京有限公司制造)等。试剂:芸香苷标准品、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等,以上试剂均为国产分析纯(AR)。

1.2 方法

1.2.1 刺芫荽总黄酮含量测定 在黄酮类化合物溶液中加入铝离子试剂后,黄酮类化合物中的酚羟基与 Al^{3+} 生成有色络合物,在控制适宜的 pH 值条件下,生成的络合物在可见区有特征吸收峰,其质量浓度与吸光度符合比耳定律,而其颜色的深浅与黄酮类化合物的量又呈一定的比例关系,据此可测定样品中总黄酮的含量^[8]。

精密称取干燥至恒质量的芸香苷对照品 10 mg,置于 50 mL 容量瓶中,先加 30 mL 浓度为 30% 乙醇在水浴锅加热使其溶解,再定容至刻度,制成浓度为 0.200 mg/mL 的标准溶液。精密量取标准溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 于 7 支 25 mL 容量瓶中,分别加入 1 mL 5% $NaNO_2$ 摇匀,放置 6 min 后加入 1 mL 10% $Al(NO_3)_3$ 摇匀,放置 6 min 再加入 10 mL 4% $NaOH$ 溶液,混匀,用浓度为 30% 的乙醇稀释至刻度。10 min 后以空白液为参比,调 0 调 100 后在紫外-可见分光光度计波长 510 nm 处测得不同浓度标准溶液的吸光度,以标准溶液浓度(x)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标,得标准曲线方程 $y = 13.397x + 0.0019$, $r^2 = 0.9919$ 。

准确吸取 1 mL 的刺芫荽待测提取液于 25 mL 容量瓶中,按上述制作标准曲线的方法进行操作,分别比色测定其吸光度,再按下列公式计算出黄酮含量。

$$\text{总黄酮(mg/g)} = (C \times V_1 \times V_2) / (m \times V_3)$$

式中: C 为根据标准曲线得出的供试品液质量浓度(mg/mL); V_1 为提取定容体积(mL); V_2 为显色反应定容体积(mL); m 为样品质量(g); V_3 为显色反应取样体积(mL)^[9]。

1.2.2 影响刺芫荽总黄酮超声提取的单因素试验设计

1.2.2.1 乙醇体积分数 精密称取 0.5 g 刺芫荽粉末,在料液比 1 g : 30 mL、提取时间 30 min 的条件下,分别在超声波清洗槽中加入体积分数为 30%、40%、50%、60%、70%、80% 的乙醇,超声波辅助提取刺芫荽总黄酮,提取液过滤,定容到 50 mL,按照“1.2.1”节的方法测其吸光度,分别计算出黄酮的含量。

1.2.2.2 料液比 精密称取 0.5 g 刺芫荽粉末,在乙醇体积分数 70%、提取时间 30 min 的条件下,分别设置 1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35、1 : 40、1 : 45(g : mL) 等不同料液比,超声波辅助提取刺芫荽总黄酮,提取液过滤,定容到 50 mL,按照“1.2.1”节的方法测其吸光度,分别计算出黄酮的含量。

1.2.2.3 提取时间 精密称取 0.5 g 刺芫荽粉末,在乙醇体积分数 70%、料液比 1 g : 30 mL 的条件下,分别超声提取 10、15、20、25、30、35 min,提取液过滤,定容到 50 mL,按照“1.2.1”节的方法测其吸光度,分别计算出黄酮的含量。

1.2.3 影响刺芫荽总黄酮超声提取的多因素正交试验设计 选择乙醇体积分数、料液比、超声时间 3 个因素,以黄酮提取量作为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表,在单因素试验基础上各因素分别选择 3 个水平加入正交试验(表 1)。

1.2.4 数据处理 采用 SPSS 软件进行方差分析,对正交试验结果进行 F 检验^[10]。

表 1 刺芫荽总黄酮超声提取条件 $L_9(3^4)$ 正交试验的因素及水平

水平	因素		
	A:乙醇体积分数 (%)	B:料液比 (g : mL)	C:超声时间 (min)
1	60%	1 : 35	25
2	70%	1 : 40	30
3	80%	1 : 45	35

2 结果与分析

2.1 不同单因素对刺芫荽总黄酮提取量的影响

2.1.1 乙醇体积分数 随着乙醇体积分数的增大,刺芫荽总黄酮的提取量增高,当乙醇体积分数超过 70% 时,刺芫荽总黄酮的提取量反而下降。乙醇体积分数为 70% 时,黄酮提取量最大,为 24.029 mg/g。

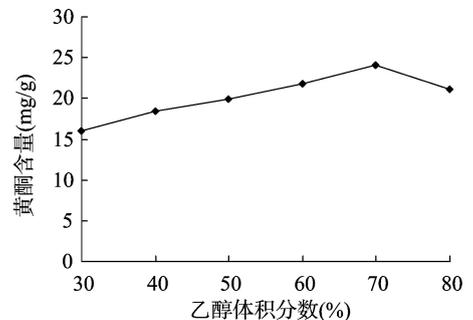


图 1 不同乙醇体积分数对提取总黄酮含量的影响

2.1.2 料液比 刺芫荽总黄酮的提取量随料液比的减小而增大,当料液比小于 1 g : 40 mL 时,总黄酮提取量减小。料液比 1 g : 40 mL 为最佳,最大黄酮提取量为 23.512 mg/g。

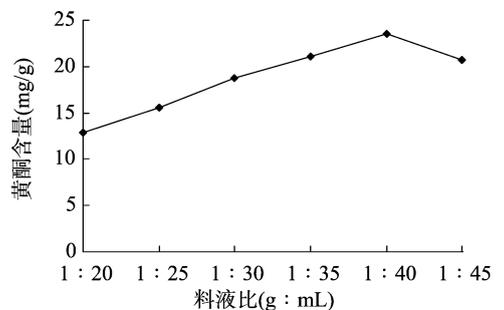


图 2 不同料液比对提取总黄酮含量的影响

2.1.3 超声时间 总黄酮含量随着超声提取时间的延长而增加,25 min 后,黄酮含量增加缓慢,30 min 后黄酮含量有所下降。超声时间为 30 min 时,黄酮提取量最大,为 22.412 mg/g。

2.2 正交试验结果

根据单因素试验结果,选择乙醇体积分数、超声时间、料液比 3 个因素,采用超声辅助法提取刺芫荽中的黄酮,然后按 $L_9(3^4)$ 表,以提取的总黄酮含量为评判指标,对刺芫荽黄酮含量进行分析。

由极差 R 可以看出,3 个影响因素中,对黄酮提取影响的主次顺序是乙醇体积分数 > 超声时间 > 液料比;最佳提取工艺条件是 $A_2C_2B_1$,即乙醇体积分数为 70%、超声时间为 30 min、料液比为 1 g : 35 mL,在此条件下,黄酮的提取量为 25.237 mg/g(表 2)。

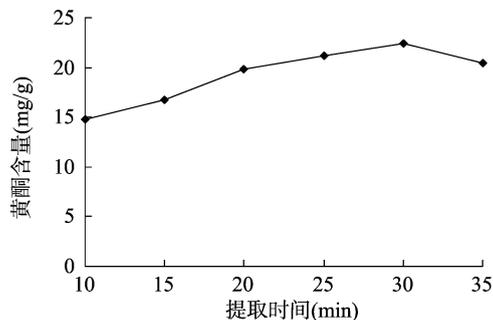


图3 不同超声时间对提取总黄酮含量的影响

表2 超声波辅助刺芫荽黄酮提取正交试验结果

试验号	因素				黄酮提取量 (mg/mL)
	A	B	C	空	
1	1	1	1	1	22.560
2	1	2	2	2	20.643
3	1	3	3	3	20.017
4	2	1	2	3	25.237
5	2	2	3	1	23.217
6	2	3	1	2	23.693
7	3	1	3	2	17.887
8	3	2	1	3	19.493
9	3	3	2	1	20.380
k_1	21.073	21.895	21.915		
k_2	24.049	21.118	22.087		
k_3	19.253	21.363	20.374		
R	4.796	0.777	1.713		

对表2中的正交试验结果进行方差分析,乙醇体积分数和超声时间对刺芫荽黄酮提取量具有极显著的影响,而料液比不具有显著影响(表3)。3种因素对刺芫荽黄酮提取量影响的主次顺序是乙醇体积分数 > 超声时间 > 液料比,分析结果与直观分析结果一致。

表3 影响刺芫荽总黄酮超声提取的3个因素的方差分析

因素	离差平方和	自由度	均方	F	显著性
乙醇体积分数	105.501	2	52.751	97.223	**
超声时间	16.026	2	8.013	14.769	**
料液比	2.842	2	1.421	2.619	
误差	10.851	20	0.542		

注: $F_{0.05}(2,20) = 3.493$, $F_{0.01}(2,20) = 5.849$; “**”表示具有极显著差异。

2.3 验证试验结果

通过以上单因素试验和正交试验确定的最佳提取工艺条件为 $A_2C_2B_1$, 即乙醇体积分数为70%、超声时间为30 min、料液比为1 g : 35 mL, 在此条件下进行3次平行验证试验。试验结果平均值为25.33 mg/g, 大于正交试验结果中的最大值25.237 mg/g(表4), 可以确定该提取条件为超声波辅助刺芫荽总黄酮提取的最佳提取工艺条件。

3 结论与讨论

本试验采用超声波辅助乙醇提取刺芫荽的黄酮类化合物, 在单因素试验(乙醇体积分数、料液比、超声时间)的基础

表4 $A_2C_2B_1$ 验证试验结果

试验号	总黄酮含量 (mg/g)	标准差 (mg/g)
1	25.58	
2	24.65	
3	25.77	
平均值	25.33	0.594

上通过 $L_9(3^4)$ 正交试验确定了超声波辅助刺芫荽总黄酮的最佳提取工艺条件: 乙醇体积分数为70%, 超声时间为30 min, 料液比为1 g : 35 mL, 超声波辅助刺芫荽总黄酮提取中影响因素的排序为乙醇体积分数 > 超声时间 > 料液比, 刺芫荽总黄酮含量为25.33 mg/g。

在一定范围内, 随着乙醇体积分数的增大, 黄酮的溶解量不断增加, 从而使总黄酮提取量逐渐增大; 当乙醇体积分数大于70%时黄酮提取量逐渐减小, 这也许是由于乙醇体积分数较高时, 脂溶性物质溶出量增大、蛋白质变性加剧, 干扰因素随之增多, 给黄酮提取带来不利影响。刺芫荽总黄酮提取量随着料液比的降低先上升后下降, 在一定范围内料液比越小, 溶剂与浸提物的接触越充分, 能在较短时间内溶解出更多的黄酮从而使黄酮提取量增大; 当料液比过小时刺芫荽粉末中的总黄酮在提取液中含量较小, 因此总黄酮提取量也随之减小。当超声提取时间在30 min以下时, 刺芫荽总黄酮提取量随着超声提取时间延长而升高, 然而当超声提取时间达到30 min以上时, 刺芫荽总黄酮提取量反而减少, 这可能是由于提取时间过短则黄酮溶解不充分, 但是过长时间的超声波处理具有较强的机械效应与热效应, 可能会破坏黄酮类物质。

超声波辅助总黄酮提取方法具有操作简单方便、速度快、不需加热、提取率高、提取物不易受到破坏等优点, 是理想的刺芫荽总黄酮提取方法。

参考文献:

- [1] 许又凯, 刘宏茂, 刀祥生, 等. 刺芫荽营养成分和不同光照下栽培生物量[J]. 热带作物学报, 2005, 26(1): 75-78.
- [2] 朱涛, 彭朝忠, 管志斌, 等. 西双版纳民间常作食用的野生药、蔬两用植物[J]. 云南热作科技, 2002, 25(2): 31-33.
- [3] 高燕, 马银海. 刺芫荽挥发性成分研究[J]. 昆明学院学报, 2013, 35(3): 69-70.
- [4] 董晶, 张焱, 曹赵茹, 等. 藜麦总黄酮的超声波提取及抗氧化活性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 267-269.
- [5] 蔡娜, 淡荣, 陈鹏. 水分胁迫对苦荞幼苗黄酮类物质含量的影响[J]. 西北农业学报, 2008, 17(4): 91-93.
- [6] 蓝峻峰, 张春艳. 超声波辅助热提艾蒿黄酮工艺优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 267-268, 269.
- [7] 刘江, 胡彼波, 郝强, 等. 洋葱皮总黄酮提取工艺的优化[J]. 河南农业科学, 2011, 40(6): 153-156, 160.
- [8] 陈丛瑾, 黄克瀛, 李姣娟, 等. 植物中黄酮含量的光学测定方法研究进展[J]. 光谱实验室, 2007, 24(4): 524-530.
- [9] 肖杭, 黎云祥, 蔡凌云, 等. 超声辅助法提取白藜茎皮总黄酮的工艺研究[J]. 光谱实验室, 2010, 27(1): 197-201.
- [10] 杜荣骞. 生物统计学[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2014: 292-299.