

正交设计优选苦荞黄酮成分的超声提取工艺^{*}

季春燕, 周 乐, 王 欣, 王国强

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 试验优选了超声提取苦荞黄酮类化学成分的最佳工艺条件。通过 $L_{16}(4^3 \times 2^6)$ 正交表设计超声提取苦荞的方案, 以芦丁为考察黄酮含量的指标, 以溶剂浓度(A)、提取温度(B)、提取时间(C)和溶剂种类(D)为考察因素, 用紫外分光光度计测定苦荞中芦丁含量并最终确定了最佳的提取条件。结果表明, 影响苦荞超声提取的因素为溶剂浓度> 提取温度> 提取时间> 溶剂种类; 最佳工艺条件为: 以950 mL/L 甲醇为溶剂, 提取温度30℃, 提取时间30 min。

[关键词] 正交设计法; 超声提取; 苦荞; 芦丁

[中图分类号] R284.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)05-0105-03

苦荞(*Fagopyrum tartaricum* (L.) Gaetn)是蓼科荞麦属植物, 作为一种重要的小宗杂粮作物和药食同源植物, 在我国西南、华北、中南等省区均有分布。苦荞中富含黄酮类化合物, 尤其富含芦丁, 具有抗氧化、降脂降糖等多种药理活性。近年来, 关于苦荞的研究报道很多, 但主要集中在其化学成分和药理作用方面^[1], 而有关超声提取苦荞黄酮类成分的研究尚未见报道。本试验以苦荞中主要活性成分芦丁为质量控制指标, 采用正交试验设计考察溶剂浓度、提取温度、提取时间和溶剂种类对超声提取效果的影响, 优选出了最佳提取方案。

1 材料、试剂与仪器

1.1 材料与试剂

材料 苦荞(西农903-636)全株粉末; 芸香叶苷(芦丁)对照品(中国医药集团上海化学试剂公司)。

试剂 亚硝酸钠(AR, 天津海光化学制药厂), 硝酸铝(AR, 天津市耀华化工厂), 甲醇和无水乙醇(AR, 天津市化学试剂三厂), 工业乙醇。

1.2 仪 器

SP-2100型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); 隆达HF-100B超声循环提取器(北京弘祥生物技术有限公司); JA3003型天平(上海精密科学仪器有限公司); EB-280-12型天平(日本, SHIMADZU); LD5-10型离心机(北京医用离心机厂)。

2 试验方法

2.1 正交试验设计及各因素水平设定

选取溶剂浓度(A)、提取温度(B)、提取时间(C)和溶剂种类(D)为主要考察因素, 各因素的水平设定如表1所示。正交试验采用3因素4水平与1因素2水平的混合正交表^[2], 即 $L_{16}(4^3 \times 2^6)$ 正交表进行, 如表2所示。

表1 从苦荞中提取黄酮的试验因素及其水平设置

Table 1 Factors and levels in the extraction of flavonoids from *F. tartaricum*

水平 Levels	A (溶剂浓度)/(mL · L ⁻¹) Concentration	B (提取温度)/ Temperature	C (提取时间)/min Time	D (溶剂种类) Types
1	400	30	15	MeOH
2	600	40	30	EtOH
3	800	50	45	
4	950	60	60	

[收稿日期] 2004-08-02

[作者简介] 季春燕(1980-), 女, 新疆乌鲁木齐人, 在读硕士, 主要从事天然产物化学研究。

[通讯作者] 周 乐(1965-), 男, 陕西蒲城人, 教授, 博士, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: betterzlj@163.com

表 2 从苦荞中提取黄酮的 $L_{16}(4^3 \times 2^6)$
正交试验设计及结果

Table 2 Results of orthogonal test of $L_{16}(4^3 \times 2^6)$
in the extraction of flavonoids from *F. tartaricum*

试验号 No	A	B	C	D	芦丁含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Rutin content
1	1	2	3	2	52.70
2	3	4	1	2	119.25
3	2	4	3	1	188.08
4	4	2	1	1	267.21
5	1	3	1	1	60.35
6	3	1	3	1	253.06
7	2	1	1	2	236.71
8	4	3	3	2	243.72
9	1	1	4	2	70.93
10	3	3	2	2	256.97
11	2	3	4	1	192.73
12	4	1	2	1	252.69
13	1	4	2	1	36.30
14	3	2	4	1	234.07
15	2	2	2	2	230.30
16	4	4	4	2	233.92
K_1	220.30	813.39	683.52	1 483.51	
K_2	847.82	784.28	776.28	1 444.50	
K_3	863.35	753.77	737.56		
K_4	997.54	577.57	731.65		
R	777.24	235.82	92.76	39.01	

2.2 超声提取方法

按 10 g/份取样(苦荞干燥种子粉末)48 份, 每克样品加入甲醇或乙醇 12.5 mL, 采取间歇式超声提取方法进行提取, 每一处理重复 3 次。超声功率为 1 600 W 左右, 超声间隔时间为 2 s, 超声频率为 20 kHz。各处理提取液分别经离心后过滤, 收集滤液并用相同提取溶剂定容至 250 mL 作为 2.3.2 中芦丁待测样。

表 3 影响苦荞中黄酮提取的四因素方差分析结果

Table 3 Variance analysis of four factors which influenced flavonoids extraction

方差来源 Source	自由度 DF	离差平方和 SS	方差 MS	F	P
A	3	90.754	30.521	24.17	$P < 0.01$
B	3	8.420	2.807	2.24	$F_{0.05}(3, 1) = 5.41$
C	3	1.085	362	0.29	$F_{0.01}(3, 1) = 12.06$
D	1	100	100	0.08	
E(误差)	5	6.295	1.252		

对表 2 的试验结果进行方差分析和 F 检验, 结果见表 3。 F 检验结果表明, 溶剂浓度(A 因素)对黄酮提取率具有极其显著的影响, 其余 3 种因素的影

2.3 提取液中芦丁的定量测定

2.3.1 标准曲线的制作 以芦丁为标样, 硝酸铝-亚硝酸钠为显色剂, 选择 500 nm 为测定波长, 参照文献[3]的方法进行。

2.3.2 提取液中芦丁含量的测定 采用与标准曲线类似的方法分别测定 2.2 中各芦丁待测样的吸光度($A_{500\text{nm}}$)^[4]。 将各吸光度数值带入标准曲线方程计算各处理提取液中芦丁的含量。

2.4 正交试验结果分析

分别采用极差法和 F 检验法对正交试验结果进行差异分析和显著性检验, 确定各因素对试验结果的影响程度。

2.5 验证试验

按优选的最佳工艺条件, 重复 3 次提取苦荞样品, 测定苦荞提取液中黄酮类化合物的含量及总固物的得率。

3 结果与分析

3.1 标准曲线的确立

以芦丁标准浓度为自变量, 对应吸光度 A 为因变量, 对各管测定结果进行线性回归。 其线性方程为 $y = 11.188x - 4 \times 10^{-5}$, $r = 0.9997$, 表明芦丁在 0.300 0~1.800 0 mg/mL 呈良好线性关系。

3.2 各处理液中芦丁含量的测定结果

将每种处理 3 个重复的吸光度平均值分别带入标准曲线中, 计算出各处理液中的芦丁含量, 结果见表 2。 由表 2 中的 R 值可以看出, 4 种因素对芦丁提取率的影响程度依次为 $A > B > C > D$, 其中 A 因素的影响远远大于其他 3 种因素。 从表 2 还可以看出, 超声提取苦荞黄酮的最佳工艺为: 以 950 mL/L 甲醇为溶剂, 提取温度 30℃, 提取时间 30 min, 即 $A_4B_1C_2D_1$ 。

响不显著。

3.3 最佳工艺验证结果

在最佳工艺条件下所提取的黄酮类化合物的含

量为 255 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 总固体得率为 6 30%。

4 讨 论

目前关于苦荞的研究比较多, 本试验可为今后芦丁的提取提供理论参考。常规的提取方法^[5, 6]普遍存在耗时、耗能、提取效率低等问题。通过优化试验, 筛选出最佳超声提取工艺, 既节省了提取时间, 又提高了一次性提取的效率, 适合实验室及工业生产上广泛使用。

苦荞提取过程中的影响因素有溶剂种类、溶剂浓度、提取温度、液固比、提取时间等^[6]。本试验经分析比较, 选取溶剂浓度(A)、提取温度(B)、提取时间(C)和溶剂种类(D)为主要影响因素, 结果表明除浓度因素对提取效果有极显著影响外, 其余 3 种因素的影响均不显著。分析其原因认为, 芦丁在不同溶剂中的溶解性依次为: 甲醇> 乙醇> 水, 并且随醇浓度的增大, 芦丁的溶解性也随之增大, 因此提取液中芦丁的含量便显著提高。常规提取通过升高温度增加

目标物的溶解度并提高传质速度, 而超声提取主要通过细胞破碎作用促进固相物质向液相传递, 而非常规的传质作用, 故温度在超声提取中作用不显著, 适度增加温度有利于提高溶剂的溶解度, 但超过 60

则导致溶剂挥发而使溶剂浓度减小。由此可见, 超声提取法尤其适合那些不适于高温提取的物质。而时间因素对提取效果的影响不显著, 证明了超声提取的效率很高, 短时间即可实现比较完全的提取。溶剂种类对提取效果的影响差异不明显, 主要原因是甲醇和乙醇效果相似, 但甲醇价格便宜且沸点较低, 这是大规模工业生产的理想选择, 而乙醇对操作人员的身體无害, 亦有不错的提取效果, 故需要结合实际情况找出最佳搭配, 经对比试验最后确定最佳工艺条件。

考虑到时间安排和工作量等原因, 本试验在正交设计方面未考虑到交互作用的影响, 在个别处理的 3 次重复过程中, 某些数据的重现性欠佳。

致谢: 本研究在试验前期的正交设计及后期的数据处理方面得到了本校袁志发教授的热情指导和帮助, 在此表示诚挚的谢意!

[参考文献]

- [1] 朱 瑞, 高南南, 陈建民. 苦荞麦的化学成分和药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(2): 7- 9
- [2] 袁志发, 周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000
- [3] 欧阳平, 张高勇, 康保安. 分光光度法测苦荞麦中总黄酮[J]. 粮油加工与食品机械, 2003, (11): 57- 59
- [4] 王淑兰, 胡奎三. 紫外分光光度法测复方芦丁片中芦丁含量[J]. 分析化学, 1995, (4): 15- 16
- [5] 贾冬英, 耿 磊. 苦荞麦茎及籽壳中黄酮类化合物(芦丁)的提取及其鉴定[J]. 食品科学, 1998, 19(9): 46- 47.
- [6] 李 裕, 刘有智, 霍 红. 苦荞麦中提取芦丁的工艺研究[J]. 华北工学院学报, 2002, 23(2): 130- 132

Study on the method for ultrasonic extraction of flavonoids from *F. tartaricum* with orthogonal test

J I Chun-yan, ZHOU L e, WANG X in, WANG Guo-qiang

(College of L ife Sciences, N orthw est A & F U niversity, Yang ling, Shannx i 712100, China)

Abstract: We have got the best ultrasonic extraction technology of flavonoids from *F. tartaricum*. Through orthogonal test, a scheme to extract *F. tartaricum* was designed. With rutin as investigating quota, and reagent concentration, temperature, time and reagent types as influenced factors, the content of rutin in *F. tartaricum* was determined with UV/V is Spectrometer and defined the best extraction technology. Finally, the order of the factors which affected extraction was: reagent concentration> extraction temperature> extraction time> reagent types. The best extraction technology was A₄B₁C₂D₁.

Key words: orthogonal method; ultrasonic extraction; *F. tartaricum*; rutin