

微波法提取葛头总黄酮和稳定性研究

黄洪波, 喻超文, 王文轩, 罗洋, 王健, 肖圣雄, 刘文奇, 邓斌* (湘南学院化学与生命科学系, 湖南郴州 423043)

摘要 [目的]研究葛头中总黄酮的微波辅助提取方法。[方法]通过单因素试验和正交试验,探讨影响微波辅助提取葛头中总黄酮的优化工艺条件,还研究 NaCl、KCl、MgCl₂、Na₂SO₃ 溶液对总黄酮提取液稳定性的影响。[结果]葛头中总黄酮的最佳提取工艺条件为乙醇体积分数 70%、料液比 1:70(g/ml)、微波作用时间 15 min、微波功率 350 W、提取温度 65 °C, K⁺、Mg²⁺ 和还原剂 Na₂SO₃ 对总黄酮提取液稳定性的影响相对较大。[结论]运用微波辅助提取法从葛头中提取总黄酮可以加快提取速度、提高提取效率,该方法简单、稳定、可靠、可重复,是提取葛头中总黄酮的有效途径,该研究可为葛头中总黄酮的进一步开发利用奠定试验基础。

关键词 葛头;总黄酮;微波提取;正交试验;稳定性

中图分类号 S567.2;O624.42⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)17-095-03

Study on the Microwave-assisted Extraction of Total Flavonoids from *Allium chinense* and Its Stability

HUANG Hong-bo, YU Chao-wen, WANG Wen-xuan, DENG Bin* et al (Department of Chemistry and Life Science, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan, 423000 China)

Abstract [Objective] The research aimed to study the microwave-assisted extraction method of total flavonoids from *Allium chinense*. [Method] The optimum technological conditions of total flavonoids from *Allium chinense* with microwave-assisted method were studied by single factor and orthogonal experiments. In addition, the stability of total flavonoids extract were studied. [Result] The optimum conditions for extracting total flavonoids from *Allium chinense* were found to be: 70% ethanol, 1:70 (g/ml) solid liquid ratio, 10 min microwave action time, 350 W microwave power and 60 °C microwave temperature. And K⁺, Mg²⁺ and reductant Na₂SO₃ had a great impact on the stability of the total flavonoids extract in NaCl, KCl, MgCl₂ and Na₂SO₃ solution. [Conclusion] The microwave-assisted extraction method could speed up the velocity of reaction and improve the extract efficiency. The method was simple, stable, reliable and repeatable. It was an ideal way to extract the total flavonoids of *Allium chinense*. Which laid the foundation for its further development.

Key words *Allium chinense*; Total flavonoids; Orthogonal experiment; Stability

葛头是多年生宿根草本植物,属于百合科葱属植物,主要生长在我国长江以南地带。葛头成熟后个体肥大,洁白晶莹,香味特殊,含有人体所需的多种营养物质^[1],食用葛头可以起到增强食欲、开胃、醒酒、解除油腻的作用^[2]。此外还含有丰富的膳食纤维和黄酮类化合物^[3],动物和临床试验表明,黄酮类化合物具有抗氧化、降血脂、降胆固醇、抗炎症和增强免疫功能等药理作用^[4],若能将葛头这种价廉、可再生的资源作为提取药物与食品用天然抗氧化剂和防腐剂的原料,必定具有十分广阔的市场应用前景。

鉴于黄酮类化合物的药食两用以及提升葛头的附加价值,葛头的研究势在必行,目前国内学者主要研究了葛头的挥发性成分、皂苷化合物和含氮化合物^[5],对于葛头中总黄酮含量的提取条件和稳定性研究还未见报道,而采用微波辅助提取天然植物中的总黄酮,具有快速、高效、环保、节能等特点,该试验探究了葛头中总黄酮的微波辅助提取优化条件及其稳定性。

1 材料与与方法

1.1 主要仪器 MH-200A 电脑微波固液相合成/萃取仪(北京祥鹤科技发展有限公司);723B 可见分光光度计(上海济成分析仪器有限公司);DF110 型电子分析天平(中国轻工业机器总公司常熟衡天)等。

1.2 试材 葛头粉,郴州本地葛头,80 °C 烘箱内烘干 24 h 后粉碎放入干燥器内备用;无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、NaCl、KCl、MgCl₂、Na₂SO₃ 等为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线的测定。准确称取 0.02 g 芦丁标准试剂,用体积分数 60% 的乙醇溶解,再用体积分数 60% 的乙醇定容至 100 ml 容量瓶中,摇匀,制成质量浓度为 0.2 mg/ml 的标准溶液^[6]。分别取上述芦丁标准溶液 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0、16.0、18.0、20.0 ml 于 11 个 50 ml 容量瓶中,用体积分数 60% 乙醇补充至 25 ml,加入质量分数为 5% 亚硝酸钠 1.4 ml,摇匀。放置 5 min 后,加入质量分数为 10% 硝酸铝 1.4 ml,6 min 后再加入 1 mol/L 氢氧化钠 10 ml,摇匀。最后,用体积分数 60% 乙醇稀释至刻度,10 min 后测量吸光度,记录最大吸光度,得标准曲线如图 1 所示,其回归方程为 $y = 0.01025x + 0.01435$ 。

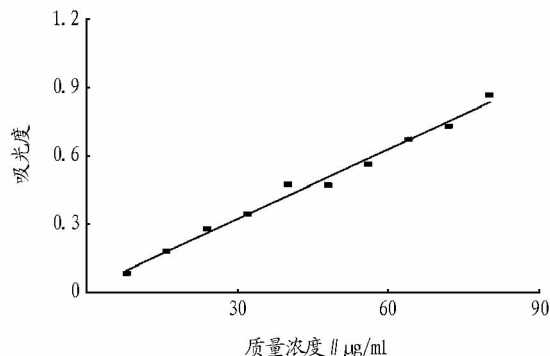


图1 芦丁标准曲线

1.3.2 总黄酮的提取及提取率的测定。称取 0.5 g 葛头粉

基金项目 湖南省基础化学大学生创新训练中心项目(湘教通[2013]295号)。

作者简介 黄洪波(1963-),男,湖南郴州人,讲师,从事天然活性成分的提取研究。*通讯作者,教授,博士,硕士生导师,从事绿色化学、天然产物化学、物理化学、纳米材料等方面的教学与研究工作。

收稿日期 2015-04-17

于烧杯中,加入不同体积分数的乙醇溶液,在一定功率下微波提取一段时间,过滤,定容至50 ml,然后按照“1.3.1”方法显色,进行全波长扫描,得出最大吸光度在502 nm处,因此选取502 nm作为测量波长。测定各样品的吸光度,计算总黄酮的提取率。

1.3.3 微波辅助提取葛头中总黄酮的单因素试验

1.3.3.1 料液比对总黄酮提取率的影响。在微波炉功率为500 W、乙醇体积分数为60%、微波作用时间为15 min的条件下,探讨1:60、1:70、1:80、1:90、1:100(g/ml)不同料液比对葛头中总黄酮提取率的影响。

1.3.3.2 微波作用时间对总黄酮提取率的影响。在微波炉功率为500 W、乙醇体积分数为60%、料液比为1:70(g/ml)的条件下,探讨不同微波作用时间(5、10、15、20、25 min)对葛头中总黄酮提取率的影响。

1.3.3.3 提取温度对总黄酮提取率的影响。在微波功率500 W、乙醇体积分数为60%、微波作用时间为10 min、料液比为1:70(g/ml)的条件下,探讨不同的微波提取温度(45、55、60、65、75 ℃)对葛头中总黄酮提取率的影响。

1.3.3.4 微波功率对总黄酮提取率的影响。在微波炉温度60 ℃、作用时间为10 min、乙醇体积为60%、料液比为1:70(g/ml)的条件下,研究350、400、450、500、550 W不同微波功率对葛头中总黄酮提取率的影响。

1.3.3.5 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响。在微波炉功率为350 W、料液比为1:70(g/ml)、微波作用时间为10 min的条件下,探讨不同乙醇体积分数(40%、50%、60%、70%、80%)对葛头中总黄酮提取率的影响。

1.3.4 微波辅助提取葛头中总黄酮的正交试验。根据单因素试验结果,选择料液比、提取时间、提取温度、乙醇体积分数4因素3水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表(表1)进行正交试验,以进一步研究各因素对微波辅助提取葛头中总黄酮的影响。

表1 微波提取葛头中总黄酮量的正交试验设计

水平	因素			
	料液比	微波作用时间	提取温度	乙醇体积分数
		min	℃	%
1	1:70	5	55	60
2	1:75	10	60	70
3	1:80	15	65	80

1.3.5 不同离子对葛头中总黄酮提取液稳定性的影响。采用最佳工艺提取葛头中的总黄酮,分别向提取液中加入不同离子,探究不同离子对总黄酮提取液稳定性的影响。

1.3.5.1 还原剂 Na_2SO_3 的影响。配制2.5 g/L的 Na_2SO_3 溶液,取6个试管分别加入 Na_2SO_3 溶液0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 ml,用水稀释至5 ml,然后加入5 ml提取液,再通过亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色,10 min后测量吸光度,探讨吸光度与 Na_2SO_3 用量的关系。

1.3.5.2 金属离子 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 的影响。分别配制2.5 g/L的 KCl 、 MgCl_2 、 NaCl 溶液,分别取18个试管分别加入上述金属离子溶液0、0.05、0.10、0.20、0.30、0.40 ml,用水稀释至5 ml,然

后加入5 ml提取液,再通过亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色,10 min后测量吸光度,记录最大吸光度和波数。

2 结果与分析

2.1 微波辅助提取葛头中总黄酮的单因素试验

2.1.1 料液比对总黄酮提取率的影响。由图2可知,总黄酮提取率在料液比为1:70、1:80(g/ml)时较高,可能是料液比处于这一范围段时,微波破碎葛头细胞完全,总黄酮较溶出^[7],所以提取率较高,因此合适的料液比可选择在1:70(g/ml)左右。

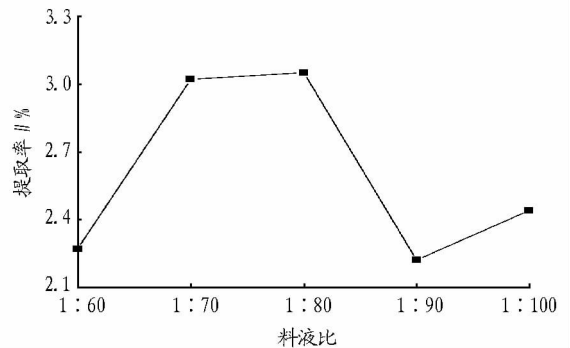


图2 料液比对总黄酮提取率的影响

2.1.2 微波作用时间对总黄酮提取率的影响。由图3可知,微波加热至10 min时可达到较为理想的总黄酮提取率,这是因为在一定时间内,随着微波时间的延长,细胞破坏程度上升,黄酮类物质溶出增多,总黄酮提取率随之升高。但微波时间过长,会导致细胞内其他一些杂质的浸出,黄酮类化合物和杂质不容易分离,同时也浪费能源,故试验时选择微波作用时间在10 min左右为好。

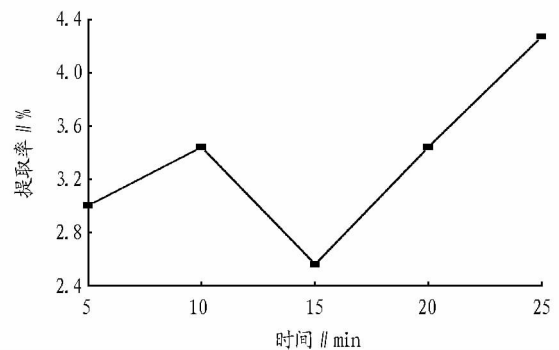


图3 微波作用时间对总黄酮提取率的影响

2.1.3 提取温度对总黄酮提取率的影响。从图4可看出,在微波提取温度60 ℃时,吸光度最高。在60 ℃之前,随温度升高,提取效果越好,但温度过高时,总黄酮提取率反而会下降。原因是在高温下黄酮类化合物易被破坏,杂质的溶出量增加,导致提取率下降。

2.1.4 微波功率对总黄酮提取率的影响。由图5可知,在350 W时总黄酮的提取率最高,随着功率的增加,黄酮类化合物结构被氧化破坏,提取率随之降低,当功率为550 W时,许多的脂溶性物质被提取出来,引起吸光度的突增,故控制微波功率为350 W为佳。

2.1.5 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响。从不同乙醇

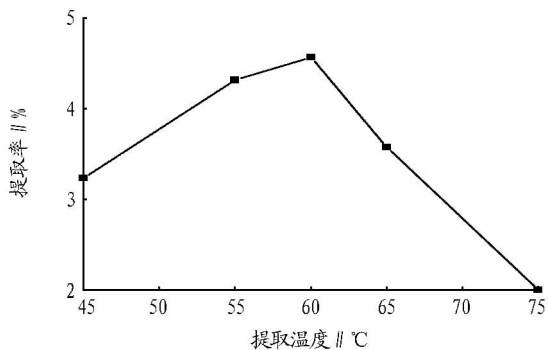


图4 提取温度对总黄酮提取率的影响

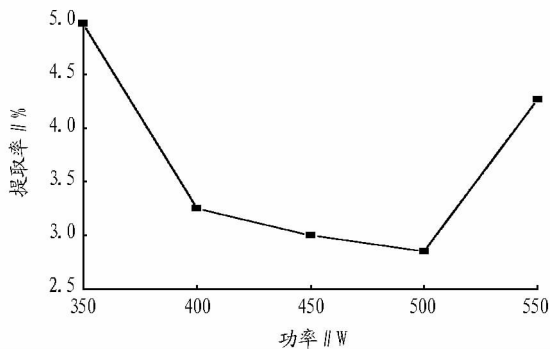


图5 微波功率对总黄酮提取率的影响

体积分数对葛头中总黄酮提取率的影响(图6)可以看出,随着乙醇浓度的增加,总黄酮提取率随着增大,当乙醇浓度达70%时,黄酮类化合物的溶解最多,提取率最高;之后进一步提高乙醇浓度,因体系温度下降而不再利于总黄酮的提取,故乙醇体积分数选择在70%为好。

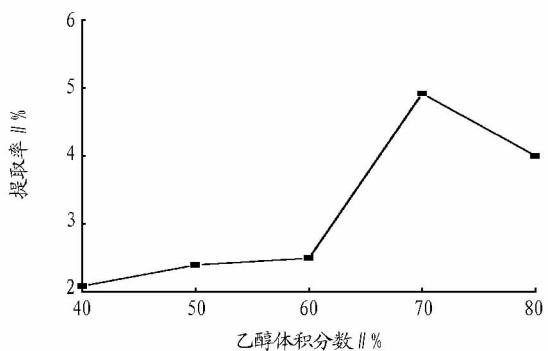


图6 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响

2.2 微波辅助提取葛头中总黄酮的正交试验 从表2可知,各因素对葛头中总黄酮提取率的影响顺序是乙醇体积分数 > 微波作用时间 > 料液比 > 提取温度,微波辅助提取葛头中总黄酮的最佳工艺条件是料液比1:70(g/ml)、微波作用时间15 min、提取温度65 °C、乙醇体积分数为70%,在此条件下,总黄酮的提取率为6.02%。

2.3 不同离子对总黄酮提取液稳定性的影响

2.3.1 还原剂 Na₂SO₃ 的影响。从吸光度与 Na₂SO₃ 用量的关系(图7)可知,Na₂SO₃ 对葛头中总黄酮提取液的稳定性影响较为明显,少量的 Na₂SO₃ 对总黄酮提取液有增色效应,故吸光度较大。随着 Na₂SO₃ 量的增加,吸光度一直在下降,这

是因为 Na₂SO₃ 比黄酮类化合物更容易氧化,加入 Na₂SO₃ 对葛头中总黄酮提取液有破坏作用,并随浓度增加,破坏作用进一步增强。因此,葛头中总黄酮在贮藏时应避免接触亚硫酸盐。

表2 微波提取葛头中总黄酮的正交结果

水平	料液比	微波作用时间	提取温度	乙醇体积分数	提取率 %
1	1	1	1	1	3.45
2	1	2	2	2	4.92
3	1	3	3	3	4.00
4	2	1	2	3	0.80
5	2	2	3	1	1.34
6	2	3	1	2	5.84
7	3	1	3	2	5.25
8	3	2	1	3	0.95
9	3	3	2	1	2.06
<i>k</i> ₁	4.12	3.17	3.41	2.28	
<i>k</i> ₂	2.66	2.40	2.59	5.34	
<i>k</i> ₃	2.75	3.97	3.53	1.92	
<i>R</i>	1.46	1.57	0.94	3.42	

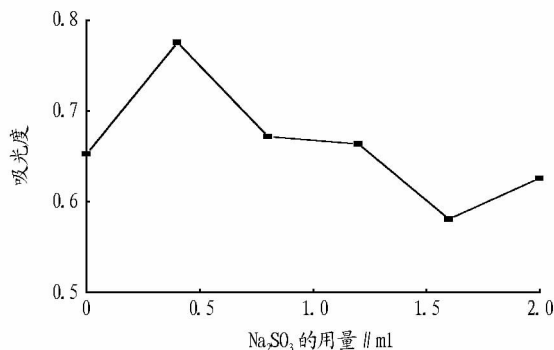


图7 亚硫酸钠对黄酮提取液稳定性的影响

2.3.2 金属离子 K⁺、Mg²⁺、Na⁺ 的影响。由图8可知,加入金属离子 Mg²⁺ 和 K⁺ 对葛头中总黄酮提取液的稳定性影响

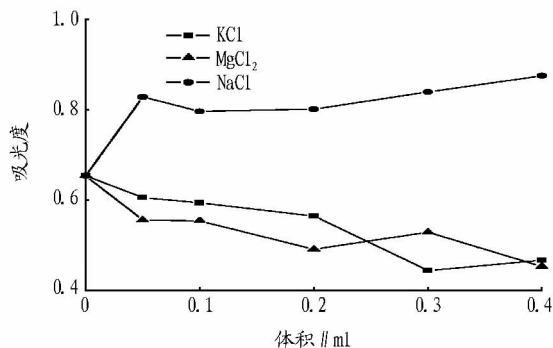


图8 金属离子对总黄酮提取液稳定性的影响

较为明显,随着金属离子的用量增加,其吸光度逐渐降低,其原因是黄酮化合物具有邻二酚羟基,可以与金属产生络合导致吸光度变化。因此在总黄酮生产、贮存及使用过程中应避免与含 Mg²⁺ 和 K⁺ 离子的溶液接触。随着 NaCl 的加入,吸光度有所增大,但其吸光度波动范围相对较小,其原因是加入 NaCl 使提取液中脂类化合物凝聚性增强,间接保护了黄酮类化合物,而 NaCl 的体积增加对凝聚性增强影响很小。

(下转第164页)

表1 青虾苗繁育的产出效益

虾苗池	面积 hm ²	抱卵虾投入量 kg	青虾苗产量 kg	总收入 元	平均收入 元/hm ²	总成本 元	总利润 元	平均利润 元/hm ²
试验池	0.80	72	804	45 024	56 280	19 646	25 378	31 725
对照池	0.87	91	689	38 584	44 520	19 357	19 227	22 185

2.2 成虾养殖结果 该试验自7月下旬开始,历经为期120 d的养殖,至春节前捕捞结束,成虾池10口,面积2.80 hm²,其中试验池5口,面积1.47 hm²,产青虾1 892 kg,青虾平均产量1 290 kg/hm²,其中捕获体长4.0 cm以上商品虾1 235.5

kg,占青虾产量的65.3%;对照池5口,面积1.33 hm²,产青虾1 460 kg,青虾平均产量1 095 kg/hm²,其中捕获体长4.0 cm以上商品虾776.7 kg,占青虾产量的56.4%(表2)。

表2 成虾养殖的产出效益

成虾池	面积 hm ²	产量 kg	商品虾比例 %	总收入 万元	平均收入 元/hm ²	总成本 万元	总利润 万元	平均利润 元/hm ²	饲料系数
试验池	1.47	1 892	65.3	16.08	109 635	7.17	8.91	60 750	2.36
对照池	1.33	1 460	53.2	11.75	88 125	6.42	5.33	39 975	2.52

3 讨论

(1) 虾苗培育试验池繁育优质青虾苗804 kg,实现收入45 024元,扣除亲本、饲料等生产成本19 646元,获利润25 378元,平均利润31 725元/hm²;而对照池繁育青虾苗689 kg,实现收入38 584元,扣除扣除亲本、饲料等生产成本19 357元,实现收入19 227元,获利润1 479元,平均利润相差达9 540元/hm²。同时,试验池抱卵虾产卵、孵化时间相对集中,虾苗培育时耗氧点低,不容易缺氧,虾苗出池规格整齐,活力强;而对照池抱卵虾产卵、孵化时间早晚不一,虾苗培育时耗氧点高,多次引起缺氧,虾苗出池规格大小差异大,抗逆性差;经过对比分析发现,选育亲本繁育虾苗试验池,抱卵虾产卵、孵化时间较自育亲本繁育虾苗对照池时间推迟7~10 d,但虾苗培育期间,试验池虾苗长势好于对照池,虾苗出池时间相对一致。

(2) 虾苗繁育过程中,因青虾幼体出现时间间隔较长,为适时掌握好池塘的轮虫数量,保持虾苗培育池良好水色,提高青虾幼体成活率,选用鱼用杀虫剂,沿塘埂四周浅滩等局部泼洒,杀死部分轮虫,杀虫剂泼洒24 h后再用水体解毒剂解毒,池水水色(藻相)明显好转。

(3) 成虾养殖试验池与对照池养殖青虾产量均相差195

kg/hm²,实现收入相差21 510元/hm²,获利润差距达到20 775元/hm²,饲料系数相差0.14,青虾商品率相差12.1%;自繁自育虾苗下塘时因虾苗规格大小不一,直接影响到下塘后的成活率。9月中旬,成虾养殖过程中对照池虾苗秋繁现象严重,加大了池水调节难度,直接影响到饲料的消化吸收,加大了养殖生产风险;为了降低虾苗秋繁的几率,虾苗下塘后10~15 d套养8~10 cm黄白鲢火片,既保持了水体的生物多样性,又可由虾池内养殖鱼种摄食池中大量的浮游生物和青虾变态前的蚤状幼体,从而控制青虾苗的数量。

(4) 成虾养殖过程中,为有效控制成虾池内养殖青虾密度,7月上旬放养青虾苗的塘口,9月中下旬可用虾笼分批捕捞,捕大留小,不但可以提高饲料的转化率,而且有利于降低养殖生产风险,提升养殖青虾产量及品质,对促进增产增收效果明显。

参考文献

- [1] 宋光同,丁凤琴,汪翔,等.安徽省长江水系3个水域青虾群体形态参数及生产性能比较[J].水产科技情报,2012(5):219-223.
- [2] 赵继民.“太湖1号”青虾繁育试验[J].科学养鱼,2011(4):6-7.
- [3] 王万兵.青虾良种网箱繁育技术[J].科学养鱼,2006(9):12-13.
- [4] 乔国祥,江山.青虾池塘生态高效养殖技术[J].渔业致富指南,2010(13):37-38.

(上接第97页)

3 结论

(1) 在单因素试验基础上,采用正交试验确定的微波辅助提取藟头中总黄酮最佳工艺条件是提取剂乙醇的体积分数为70%、料液比1:70(g/ml)、微波作用时间15 min、微波功率350 W、提取温度为65℃,在此条件下藟头中总黄酮的提取率为6.02%。

(2) 藟头中总黄酮在还原剂、K⁺、Mg²⁺的环境下稳定性差,在NaCl的影响下脂类的凝聚性增强,可起到保护黄酮化合物的作用。

(3) 微波辅助提取藟头中总黄酮的方法具有提取时间短、提取率高、工艺简单、环境友好等特点,值得进一步推广

应用。

参考文献

- [1] 吕莉萍,夏延斌.藟头中的植物化合物对人体的保健作用[J].企业技术开发,2010,29(17):74-75.
- [2] 周福萍,王亚林.藟头——有待大力开发药食两用的资源[J].中国酿造,2006,164(11):5-7.
- [3] 苏伟,赵利,袁美兰,等.藟头叶中水溶性膳食纤维提取工艺[J].食品科学,2010,31(24):192-194.
- [4] 毛莉娟,刘学文,冉旭.苦丁茶中黄酮的提取工艺[J].食品科技,2002(11):18-19,24.
- [5] 周向荣,夏延斌,周跃斌,等.藟头的主要功能成分及其作用的研究进展[J].食品与机械,2006,22(3):73-75.
- [6] 高梦祥,张佳兰,王江明.微波浸提竹叶黄酮的工艺研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(7):147-150,154.
- [7] 戴玉锦,卢明,冯玲.微波法从柚皮中提取黄酮类化合物的工艺研究[J].江苏农业科学,2006(1):121-123.