

文章编号:1671-1513(2011)04-0042-04

高粱黄酮的提取及其测定方法的建立

袁蕊¹, 敖宗华², 丁海龙², 徐勇², 付勋¹, 沈才洪², 黄治国¹

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川自贡 643000; 2. 泸州老窖股份有限公司, 四川泸州 646000)

摘要: 选用乙醇作为提取溶剂, 对高粱中总黄酮进行提取, 研究乙醇浓度、浸提温度、浸提时间、料液比对高粱黄酮提取率的影响. 并通过单因素及正交试验, 确定了高粱黄酮的最佳提取工艺: 乙醇浓度为 65%, 80℃下浸提 2 h, 料液比为 6:100. 此工艺下提取的高粱黄酮含量为 0.54%.

关键词: 高粱; 黄酮; 测定

中图分类号: TS261

文献标志码: A

高粱, 又称蜀黍, 其产品用途广泛, 经济价值高, 既可食用、饲用, 又可用于加工. 高粱是生产白酒的主要原料, 在酿酒过程中有着不可替代的作用. 高粱籽粒中除含有碳水化合物、脂类、蛋白质、单宁、香气成分以及多种有机酸外, 还含有黄酮类化合物. 黄酮类化合物具有抗氧化、降血糖、降压、抗肿瘤、抗菌、抗病毒等作用^[1]. 在医学领域人们利用黄酮研发出抗心血管药物、止咳平喘药等, 临床上用来治疗冠心病、心绞痛、高血压等疾病^[2-3]. 研究表明在适宜温度下, 发酵中总黄酮含量呈上升趋势^[4], 而高粱作为酿酒的原料, 随着发酵周期的延长, 经过微生物作用, 发酵过程中生成的酒精浓度也越高, 而黄酮类化合物易溶于乙醇, 在白酒蒸馏过程中即被带入到酒体中. 因此, 高粱作为酒体中黄酮类化合物的主要来源, 研究其黄酮的提取与测定具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

高粱粉, 国窖红 1 号高粱, 实验室制取; 芦丁, 中国药品生物制品检定所; 95% 乙醇, 镁粉, 成都市科

龙化工试剂厂; 浓盐酸, 四川西陇化工有限公司. 以上试剂均为分析纯.

1.2 试验仪器设备

高速中药粉碎机, 浙江省永康市溪岸五金药具厂; 电热恒温水浴锅, 北京市永光明医疗仪器厂; UV-1600 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司.

1.3 试验方法

1.3.1 原料预处理

高粱样品除杂后, 粉碎过 40 目筛, 备用.

1.3.2 芦丁标准溶液

准确称取 10 mg 芦丁标准品, 用 95% 乙醇溶解, 并定容到 100 mL 得质量浓度为 100 μg/mL 的标准溶液.

1.3.3 标准曲线的绘制

精确吸取芦丁标准溶液 0.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15 mL 分别置于 50 mL 容量瓶中, 加 95% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 以 95% 乙醇为空白对照, 于 359 nm^[5]处测定吸光度, 以吸光度值(A)对浓度(c)作图, 建立回归方程: $c = A \times X + b$.

收稿日期: 2011-04-26

基金项目: 泸州老窖科研奖学金项目“有机原粮收储工艺研究”(09ljzk16).

作者简介: 袁蕊, 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程;

敖宗华, 男, 高级工程师, 博士, 主要从事发酵工程方面的研究. 通讯作者.

1.3.4 样品的定性及含量的测定

吸取黄酮粗提液 5 mL,加入到 50 mL 容量瓶中,用 95% 乙醇定容至刻度,于 359 nm 处测定吸光度. 盐酸-镁粉反应和氨水反应进行定性分析^[6],确定提取液中黄酮类化合物的含量.

1.3.5 单因素试验

称取一定量的高粱样品于 250 mL 锥形瓶中,加入 100 mL 一定浓度的乙醇溶液,浸提相应时间,提取高粱中黄酮类物质. 分别分析乙醇浓度、浸提温度、浸提时间以及料液比对提取黄酮类化合物的影响程度.

1.3.6 正交试验

各因素之间存在着相互影响,为了确定最佳的提取工艺条件,在单因素试验的基础上,以乙醇浓度、浸提温度、提取时间、料液比为分析因素,以测得的高粱黄酮类物质提取量为分析指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交表对高粱黄酮类化合物的提取工艺进行研究,见表 1.

表 1 正交试验 $L_9(3^4)$ 因素水平表

Tab. 1 Factor and levels of orthogonal test $L_9(3^4)$

水平	因素			
	A/%	B/h	C/°C	D(比例)
1	65	1	60	4:100
2	75	1.5	70	5:100
3	85	2	80	6:100

2 结果与分析

2.1 芦丁标准曲线的绘制

以吸光度值(A)对浓度(c)作图,建立回归方程: $c = 68.026 \times A - 0.6101$,标准曲线见图 1.

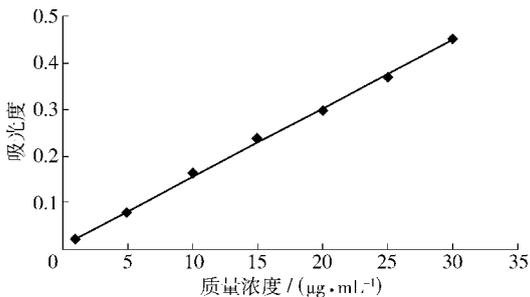


图 1 黄酮标准曲线

Fig. 1 Flavonoids standard curve

2.2 单因素试验

2.2.1 乙醇浓度对提取黄酮的影响

采用不同浓度的乙醇对高粱粉进行浸提,实验条件为:水浴温度 70 °C,料液比 3:100,浸提 2 h,溶剂(V/V)为 55%,65%,75%,85%,95%,实验结果见图 2. 可以看出随着乙醇浓度的提高,吸光度呈上升的趋势,75%时达到最大值;乙醇浓度再增高,黄酮类物质减少,这可能是由于一些醇溶性杂质、色素等成分溶出量增加,导致黄酮类的溶解度降低,提取量下降^[7].

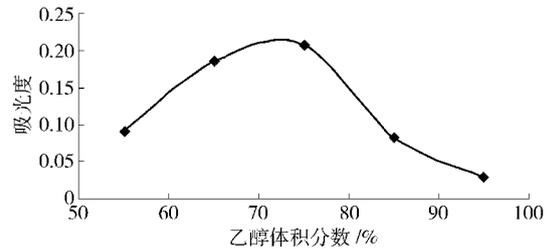


图 2 乙醇浓度对黄酮提取的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of alcohol on extraction of flavonoids

2.2.2 浸提温度对提取黄酮的影响

采用不同水浴温度对高粱粉进行浸提,实验条件为:75%乙醇溶液,料液比 3:100,浸提 2 h,水浴温度为 50,60,70,80,90 °C,实验结果见图 3. 从图 3 中可以看出温度在 60~70 °C 时,温度升高黄酮提取量逐渐增大,这是由于温度升高,分子的运动加剧,渗透、扩散、溶解速度加快^[8],黄酮物质转移到溶剂的几率更大. 当温度继续升高时,黄酮物质可能被氧化破坏,导致其含量有所下降,而且温度越高,乙醇挥发程度也越严重,浸提过程需不断补加溶剂,不

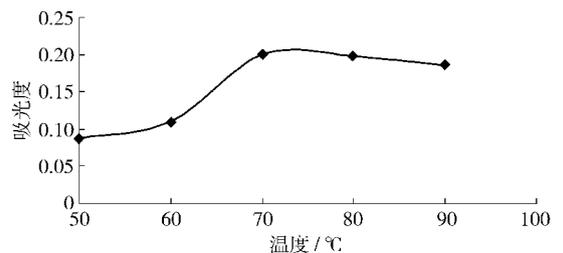


图 3 不同浸提温度对黄酮提取的影响

Fig. 3 Effect of different temperature on extraction of flavonoids

利于节约成本。

2.2.3 浸提时间对黄酮提取的影响

采用不同浸提时间对高粱粉进行浸提,实验条件为:75%乙醇溶液,70℃水浴,料液比3:100,浸提0.5,1,1.5,2,2.5 h。实验结果见图4。由图4可知在0.5~1.5 h时,黄酮提取量逐渐增大,1.5 h时达到最大,时间过短,黄酮类物质未完全溶出,当时间延长,由于过长时间的加热会使部分黄酮类物质氧化破坏,杂质的溶出也对产量有影响,在1.5~2 h浓度稍有下降,在2~3 h黄酮类物质的浓度趋于平衡。

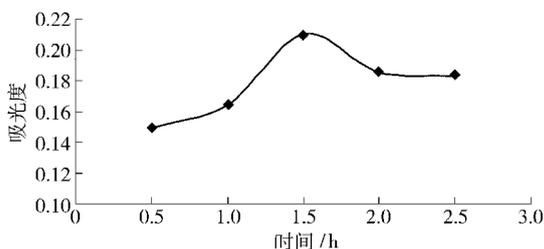


图4 不同浸提时间对黄酮提取的影响

Fig. 4 Effect of different time on extraction offlavonoids

2.2.4 料液比对黄酮提取的影响

采用不同料液比进行浸提,实验条件:75%乙醇溶液,70℃水浴温度,浸提2 h,料液比为1:100,2:100,3:100,4:100,5:100,6:100,7:100,8:100,实验结果见图5。由图5可知当料液比增加到6:100时,再增加料液比吸光度趋于稳定。

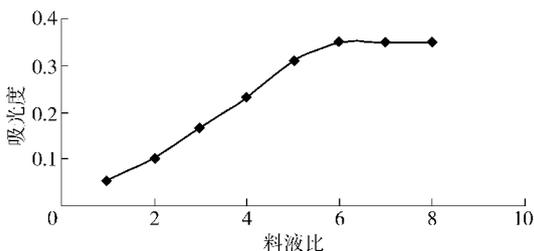


图5 不同料液比对黄酮提取的影响

Fig. 5 Effect of different material - liquid ratio on extraction of flavonoids

2.3 高粱黄酮提取最佳工艺确定

在单因素试验的基础上,以高粱黄酮含量为考察指标,对4个因素采用正交试验确定最佳提取工

艺,见表2。A因素为溶剂浓度,B因素为浸提时间,C因素为浸提温度,D因素为料液比,由表2中的极差R来看,正交试验所考查的4个因素对黄酮提取效果的影响程度从大到小依次为 $A > C > D > B$,乙醇浓度对高粱黄酮提取率的影响最大,其最优组合为 $A_1 B_3 C_3 D_3$,即乙醇体积分数为65%,80℃下浸提2 h,料液比为6:100。

表2 正交试验结果

Tab. 2 Results of orthogonal test

试验号	A/%	B/h	C/℃	D(比例)	含量/%
1	1	1	1	1	0.296
2	1	2	2	2	0.409
3	1	3	3	3	0.541
4	2	1	2	3	0.408
5	2	2	3	1	0.401
6	2	3	1	2	0.304
7	3	1	3	2	0.241
8	3	2	1	3	0.121
9	3	3	2	1	0.137
k_1	0.415	0.315	0.240	0.278	
k_2	0.371	0.310	0.318	0.318	
k_3	0.166	0.327	0.394	0.357	
R	0.249	0.017	0.154	0.079	
主次顺序	$A > C > D > B$				
优水平	A_1	B_3	C_3	D_3	
优组合	$A_1 B_3 C_3 D_3$				

2.4 验证试验

在确定的最佳提取工艺下,将滤渣按最佳提取条件做二次提取,然后在选定波长下测定吸光度,结果无吸收,证明本法已将黄酮提取完全。

2.5 回收率试验

精确移取2.5 mL芦丁标准溶液和5 mL最佳工艺下提取的黄酮提取液5 mL于50 mL容量瓶中,共5份,用95%乙醇溶液定容,摇匀,测吸光度,计算回收率,得平均回收率为99.57%,结果见表3。

表3 回收率试验结果

Tab.3 Results of recovery test

编号	样品量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加标量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	吸光度	测得量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/ %
1	3.245	5	0.129 5	8.204	99.08
2	3.245	5	0.129 9	8.226	99.62
3	3.245	5	0.131 3	8.322	101.54
4	3.245	5	0.128 6	8.138	97.86
5	3.245	5	0.130 0	8.233	99.76

3 结 论

通过定性分析证明高粱粗提液中含有黄酮类物质。通过正交试验确定了高粱黄酮的最佳提取工艺为乙醇体积分数为65%,80℃下浸提2小时,料液比为6:100。此工艺不仅提取黄酮完全,重现性良好,而且具有较高回收率,在此工艺下测得国窖红1号高粱黄酮含量为0.54%。

参考文献:

- [1] 宋小凯. 天然药物化学[M]. 北京:化学工业出版社, 2004:72-113.
- [2] 郭长江. 食物类黄酮物质有营养学意义[J]. 中国食物与营养, 2004(5):38-42.
- [3] 林琳. 仙人掌的天然活性成分研究回顾[J]. 广西植物, 2002,22(4):375-381.
- [4] 靳桂敏, 林朝朋, 钟瑞敏. 岗稔黄酮苷在果酒发酵过程中稳定性研究[J]. 食品科技, 2006(5):91-94.
- [5] 杨铭, 吴志谊, 吴川, 等. 可见光及紫外分光光度法测定菊花总黄酮含量的研究[J]. 广东化工, 2007,34(9):113-114.
- [6] 刘金荣, 赵文斌, 王航宇. 超声提取快速鉴定黄酮类化合物[J]. 华西药学杂志, 2002,17(2):141-143.
- [7] 范媛媛, 李新华, 刘兰英. 绿豆黄酮提取工艺研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2005,36(5):619-622.
- [8] 刘北林, 董继生, 霍红. 山楂黄酮最佳提取工艺探讨[J]. 食品科学, 2007,28(6):167-170.

Extraction and Quantitative Determination of Flavonoids in Sorghum

YUAN Rui¹, AO Zong-hua², DING Hai-long², XU Yong², FU Xun¹,
SHEN Cai-hong², HUANG Zhi-guo¹

(1. College of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong 643000, China;

2. Luzhou Laojiao Co. Ltd., Luzhou 646000, China)

Abstract: Extraction of flavonoids in sorghum using ethanol was studied. The effects of ethanol concentration, temperature, extraction time, and ratio of material to solvent were studied. The optimum conditions of extraction were obtained as follows: 65% ethanol, solid/liquid ratio of 6:100, extraction time of 120 min under 80℃ under the optimal conditions, the content of total flavonoids was 0.54%.

Key words: sorghum; flavonoids; determination

(责任编辑:檀彩莲)