

苦荞叶黄酮的提取及精制

白宝兰¹, 曹柏营¹, 郑鸿雁², 昌友权^{1,*}

(1. 吉林工程技术师范学院生物与食品工程学院, 吉林 长春 130052;

2. 吉林农业大学食品工程学院, 吉林 长春 130118)

摘要: 对苦荞麦叶、茎、壳和籽粒粉碎物中的生物类黄酮进行了定性定量分析, 选用总黄酮含量最高的苦荞叶为原料制备苦荞黄酮精粉, 确定最佳的提取工艺为: 料液比为 1:20、pH8.15 的 60% 乙醇、75℃、浸提 180min。最佳的纯化工艺为: DA-201 树脂, 处理量为 5ml/g 树脂, 洗脱溶剂 60% 乙醇溶液, 洗脱流速 2ml/min, 洗脱剂用量为 180ml。经此工艺制备的苦荞黄酮精粉中芦丁和总黄酮含量达到 85.34% 和 91.36%。

关键词: 苦荞黄酮; 提取; 精制; 大孔树脂

Extraction and Purification of Flavonoids from Tartary Buckwheat Leaves

BAI Bao-lan¹, CAO Bai-ying¹, ZHANG Hong-yan², CHANG You-quan^{1,*}

(1. College of Biological and Food Engineer, Jilin Teachers Institute of Engineer and Techology, Changchun 130052,

China; 2. College of Food Engineer, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The quantitative and qualitative analyses of flavonoids in tartary buckwheat leaves, stems, seeds and crushed shell were carried out respectively. The leaves which contain the highest flavonoids among the materials were selected to produce tartary buckwheat flavonoids powder, and extraction and purification conditions of tartary buckwheat flavonoids were optimized respectively. The optimal extraction conditions are determined as follows: 60% ethanol at pH 8.15 as extraction solution, leaves to the extraction solution 1:20 (g/ml), extraction temperature 75 °C and time 180 minutes, and the optimal purification conditions are determined as follows: selecting DA-201 macroporous resin with the capacity of 5 ml/g for the purification, 60% ethanol as elution solvent with the amount of 180 ml and elution flow rate 2 ml/min. By the processes, the contents of rutin and total flavonoids in tartary buckwheat flavonoids powder are 85.34% and 91.36%, respectively.

Key words: tartary buckwheat flavonoids; extraction; purification; macroporous resin

中图分类号: O658; O653.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)09-0181-05

苦荞麦 [*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn], 属双子叶蓼科 (*Polygonaceae*) 荞麦属 (*Fagopyrum*), 又名鞑靼荞麦 (tartary buckwheat), 是我国特有的荞麦品种, 在西南地区有大量种植, 是一种药食两用植物^[1]。现代科学研究证明, 苦荞麦具有很高的营养价值^[2], 并含有其他谷物所不含有的生物类黄酮物质^[3]。苦荞黄酮具有降血脂、降血糖、抗氧化、抗癌等多种功效, 其中以芦丁的含量最多^[4]。

一直以来, 苦荞麦的利用方式以苦荞粉为主, 苦荞壳、苦荞麸皮、苦荞叶和苦荞茎被用作饲料或被废弃。而这些副产物中含有较苦荞粉更为丰富的生物类黄

酮, 主要成分是芦丁。本实验以苦荞叶为原料提取纯化生物类黄酮, 为充分利用苦荞资源开发其潜在经济价值提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 苦荞叶

于 2007 年 4 月 6 日播种, 分别于播种后第 23d (4 月 29 日)、第 30d (5 月 6 日)、第 37d (5 月 13 日)、第 44d (5 月 20 日)、第 51d (5 月 27 日)、第 58d (6 月 3 日)、

收稿日期: 2008-04-25

基金项目: 吉林省教育厅项目 (2007421)

作者简介: 白宝兰 (1968-), 女, 副教授, 硕士, 主要从事保健食品开发研究。E-mail: bbl6908061@163.com

* 通讯作者: 昌友权 (1966-), 男, 副教授, 博士, 主要从事保健食品开发研究。E-mail: changyouquan2008@163.com

第65d(6月10日)、第72d(6月17日)、第79d(6月24日)、第86d(7月1日)、第93d(7月8日)采摘苦荞叶,将鲜叶在60℃温度下鼓风干燥15h至水分含量为12.0%±1%,用小型粉碎机粉碎制得干燥苦荞叶粉,用塑料袋密封保存于低温暗箱内,及时检测分析。

1.1.2 苦荞茎

于6月3日采摘苦荞茎,将鲜茎在60℃下鼓风干燥15h至水分含量为12.0%±1%,用小型粉碎机粉碎制得干燥的苦荞茎粉,用塑料袋密封保存于低温暗箱内,及时检测分析。

1.1.3 苦荞壳及麦粒粉

苦荞麦粒经淘洗、润麦后,用锤片式粉碎机粉碎,先用10目的样品筛筛分得到苦荞壳,再将筛下物(苦荞麦粒去壳粉)粉碎一次,用80目样品筛筛分得苦荞麦粒粉,用塑料袋密封保存于低温暗箱内,及时检测分析。

1.2 仪器与设备

锤片式粉碎机;SHIMADZU LC-2010 高效液相色谱仪;RE-86 旋转蒸发器;SHZ-型循环水式多用真空泵;752 紫外光栅分光光度计;ZK-82A 型真空干燥箱等。

1.3 方法

1.3.1 苦荞黄酮的颜色反应鉴别试验^[5]

1.3.1.1 与浓硫酸的反应

取样品液5ml放入试管中,加入1ml浓硫酸,轻摇混匀,观察颜色变化。

1.3.1.2 盐酸-锌粉显色反应

取样品液5ml放入试管中,加入少许锌粉,轻摇混匀,加入1ml浓盐酸后继续摇动,观察颜色变化。

1.3.1.3 与硼酸的反应

取样品液5ml放入试管中,加入10%硼酸水溶液5ml,轻摇混匀,观察颜色变化。

1.3.1.4 与4% NaOH水溶液的反应

取样品液5ml放入试管中,加入1ml 4% NaOH水溶液,轻摇混匀,观察颜色变化。

1.3.1.5 三氯化铝显色反应

取样品液5ml放入试管中,加入1% AlCl₃水溶液2ml,轻摇混匀,观察颜色变化。

1.3.2 总黄酮含量的测定^[6]

1.3.2.1 标准曲线的绘制

准确称取以五氧化二磷为干燥剂减压干燥(60℃, 0.09MPa)至恒重的芦丁标准品0.077g,用60%乙醇溶解,定容至250ml,摇匀,得浓度为0.2926mg/ml的标准应用液。分别吸取标准应用液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0ml于25ml容量瓶中,用60%乙醇添至10ml,

加入5%亚硝酸钠溶液1.0ml,摇匀,放置6min,再加入10%硝酸铝溶液1.0ml,6min后加入4% NaOH 10ml,混匀,再用30%的乙醇定容至刻度,摇匀,放置15min后在波长510nm处测定吸光度,与空白对照。

1.3.2.2 样品总黄酮含量的测定

准确称取5.00g干燥样品,用滤纸包好,放入索氏抽提器中,用乙醇95℃条件下抽提直至回流液无色,用乙醇洗涤接收瓶三次。合并抽提液与洗涤液,定容至50ml。准确吸取1ml样品液置于25ml容量瓶中,用60%乙醇添至10ml,其他操作同1.3.2.1测得吸光度。

1.3.3 芦丁含量HPLC测定^[7]

1.3.3.1 HPLC检测条件

色谱柱:Shim-pack VP-ODS C₁₈, (4.6×150mm, 5mm);流动相:甲醇:水:冰乙酸(40:60:1),流速:1.0ml/min;检测波长:330nm,柱温:室温20℃。

1.3.3.2 样品制备

准确称取干燥样品4.00g,用滤纸包好,放入索氏抽提器中,用甲醇70℃条件下抽提至回流液无色,用甲醇洗涤接收瓶3次,合并抽提液与洗涤液,定容至50ml,保存于低温暗箱内待测。

1.3.3.3 标准品的制备

精密称取以五氧化二磷为干燥剂,减压干燥(60℃、0.09MPa)至恒重的芦丁标准品0.0250g,用甲醇配制成0.25mg/ml的标准溶液,放入暗箱内保存备用。

1.3.4 苦荞叶黄酮的提取工艺

通过单因素试验确定影响苦荞叶黄酮浸出率的主要因素,以乙醇浓度、浸提温度、浸提时间、料液比(m/V)、浸提溶剂pH值为因素水平进行正交试验,如表1所示,以黄酮浸出率为指标,优化浸提工艺条件。

表1 正交试验因素水平表
Table1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素				
	A时间(min)	B乙醇浓度(%)	C料液比	D温度(℃)	E溶液pH值
1	90	50	1:10	75	7.8
2	120	55	1:15	80	8.15
3	150	60	1:20	85	8.5
4	180	65	1:25	90	8.85

1.3.5 苦荞叶黄酮浸提液萃取工艺研究

将苦荞叶黄酮浸提液真空浓缩至水浆状,分别量取含总黄酮质量为175.0mg的水浆液于三支分液漏斗中,用石油醚萃取除去油性杂质,各自用200ml乙酸乙酯、丙酮和无水乙醇萃取水相8h,真空抽滤,得萃取液,测定黄酮萃取率和萃取液干燥物的总黄酮纯度。

1.3.6 苦荞叶黄酮的大孔树脂纯化工艺^[8]

1.3.6.1 样品液的静态吸附

分别称取六种型号的大孔树脂 20g 放入三角瓶中, 向各瓶中加入浓度为 0.75mg/ml 的丙酮萃取液 100ml 浸泡 48h, 使大孔树脂充分吸附苦荞叶黄酮, 过滤, 先用 50ml 蒸馏水洗涤大孔树脂, 再用 100ml60% 乙醇浸泡 24h, 解吸苦荞叶黄酮, 过滤得解吸液, 测定吸附率、解吸率和静态解吸液干燥物的总黄酮含量。

1.3.6.2 动态吸附曲线

量取 200ml 总黄酮浓度为 0.75mg/ml 的样品液, 在流速为 2.0ml/min 的条件下通过装好的 DA-201 树脂柱, 用试管接收滤液, 每支试管接收 10ml, 按顺序测定每根试管中总黄酮浓度, 以试管号为横坐标, 总黄酮浓度为纵坐标作图即得动态吸附曲线。

1.3.6.3 洗脱溶剂的选择

分别量取 200ml 总黄酮浓度为 0.75mg/ml 的丙酮溶液, 在流速为 2.0ml/min 的条件下通过装填好的 DA-201 树脂柱, 将流速调为 3.0ml/min, 先用 50ml 蒸馏水通柱除去杂质, 再用 180ml 不同浓度的乙醇洗脱, 收集洗脱液, 测定黄酮洗脱率及洗脱液干燥物的总黄酮纯度, 确定最佳洗脱溶剂。

1.3.6.4 洗脱溶剂流速的选择

分别量取 200ml 总黄酮浓度为 0.75mg/ml 的丙酮溶液, 在流速为 2.0ml/min 的条件下通过装填好的 DA-201 树脂柱, 在不同流速下, 先用 50ml 蒸馏水通柱除去杂质, 再用 180ml 60% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 测定黄酮洗脱率及洗脱液干燥物的总黄酮纯度, 确定最佳洗脱溶剂。

1.3.6.5 洗脱溶剂用量的选择

分别量取 200ml 总黄酮浓度为 0.75mg/ml 的丙酮溶液, 在流速为 2.0ml/min 的条件下通过装填好的 DA-201 树脂柱, 在流速为 3.0ml/min 的条件下, 先用 50ml 蒸馏水通柱除去杂质, 再用不同体积的 60% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 测定黄酮洗脱率及洗脱液干燥物的总黄酮纯度, 确定最佳洗脱溶剂量。

2 结果与分析

表2 不同原料甲醇提取液的颜色反应

Table 2 Phenomena of color reaction of methanol extracts of different materials

原料	提取液颜色	浓硫酸	硼酸	Zn-HCl	NaOH(4%)	三氯化铝
苦荞叶	黄绿色	土黄色	黄绿色	紫红色	深黄色	黄色
苦荞茎	黄绿色	土黄色	黄绿色	深红色	深黄色	黄色
苦荞壳	黄红色	橙色	黄色	深红色	黄色	黄色
苦荞粒粉	黄色	黄色	亮黄色	深红色	深黄色	亮黄色

2.1 苦荞黄酮的颜色反应鉴定

表2 为不同苦荞原料的甲醇浸提液的颜色反应结果。由表2 可知, 各部位浸提液的颜色反应结果相近, 由结果可确定各种苦荞原料中的生物类黄酮都以黄酮醇为主。

2.2 不同生长时期的苦荞叶总黄酮含量变化

不同时期采摘的苦荞叶中的总黄酮含量之间差异极显著($F=35.43>F(10, 22, 0.01)=3.26$)。在测定的 11 次总黄酮含量中, 播种后第 58d 采摘的苦荞叶的总黄酮含量最高为 9.33%, 第 65d 采摘的苦荞叶中的总黄酮含量和第 58d 的差异性不显著, 二者比其他九次采摘的苦荞叶的总黄酮含量高, 差异极显著。第 79d 以后苦荞叶总黄酮含量降低幅度大, 其主要原因是这一阶段苦荞植株衰老, 抗氧化能力降低, 生物类黄酮光敏性强, 见光易分解, 总黄酮含量急剧降低。生产上以收购播种后第 51~65d 之间的苦荞叶用于提取苦荞叶黄酮为佳。结果见表3。

表3 不同生长时期苦荞叶总黄酮含量的变化

Table 3 Contents of total flavonoids in tartary buckwheat leaves in different growth periods

播种后天数(d)	总黄酮含量(%)				差异显著性	
	I	II	III	平均	0.05	0.01
58	9.56	9.33	9.12	9.34	a	A
65	9.24	8.84	9.01	9.03	ab	A
51	8.69	8.91	8.76	8.79	b	AB
72	8.71	8.51	8.9	8.71	b	B
44	8.27	8.42	8.12	8.27	bc	B
79	8.11	8.21	8.29	8.2	c	BC
37	7.53	7.68	7.81	7.67	d	C
30	7.12	7.23	7.41	7.25	d	C
86	8.42	7.23	7.01	7.22	d	C
20	6.54	6.72	6.91	6.72	e	D
93	6.58	6.42	6.29	6.43	e	D

2.3 苦荞叶、苦荞茎、苦荞壳和苦荞麦粒粉中芦丁含量和总黄酮含量

表4 不同原料的总黄酮的含量

Table 4 Contents of total flavonoids in different materials

原料	芦丁峰所占比率(%)	芦丁含量(%)	总黄酮含量(%)	芦丁/总黄酮(%)
苦荞壳	85.87	1.87	3.05	61.31
苦荞麦粒粉	92.95	0.8	0.97	82.25
苦荞茎(第58d)	66.28	1.82	2.53	71.94
苦荞叶(第58d)	95.15	7.03	9.33	75.35

由表4 可知, 芦丁是苦荞麦黄酮的主要组成成分, 各种物料中芦丁在总黄酮中的百分率在 60%~87% 之间。苦荞叶、苦荞茎中芦丁在总黄酮中的百分率分别

为71.94%和75.35%。苦荞壳中芦丁在总黄酮中百分率较其他原料低。苦荞叶中芦丁含量及总黄酮含量最高,因此从苦荞叶中提取总黄酮及芦丁可获得较高的提取率。

2.4 苦荞叶黄酮提取工艺的优化

苦荞叶黄酮浸提正交试验结果见表5。对试验结果直观分析可知,极差 $R_c > R_a = R_b > R_d > R_e$,料液比对黄酮浸出率的影响最大,pH值对黄酮浸出率的影响最小,最佳浸提条件为 $C_3A_4B_3D_1E_2$,即以料液比为1:20、pH8.15的60%乙醇,75℃浸提180min。试验证明,此条件下的黄酮浸出率为89.89%,与表5中各提取试验的黄酮浸出率有显著性差异($0.01 < p < 0.05$),因此以该浸提条件为苦荞叶黄酮提取的最佳工艺条件。

表5 正交试验结果
Table 5 Results of orthogonal test

实验号	A 时间 (min)	B 乙醇 (%)	C 料液比	D 温度 (℃)	E 溶剂 pH值	黄酮浸出质量(mg)	黄酮浸出率(%)
1	90	55	1:20	80	8.5	401.68	86.11
2	150	65	1:10	80	8.15	380.89	81.65
3	120	65	1:20	95	8.85	402.72	86.33
4	180	55	1:10	95	7.8	387.13	82.99
5	90	60	1:10	90	8.85	376.13	80.76
6	150	50	1:20	90	7.8	410	87.89
7	120	50	1:10	75	8.5	399.6	85.66
8	180	60	1:20	75	8.15	419.36	89.89
9	90	50	1:25	85	8.15	392.32	84.1
10	150	60	1:15	85	8.5	401.68	86.11
11	120	60	1:25	80	7.8	415.2	89
12	180	50	1:15	80	8.85	407.92	87.44
13	90	65	1:15	75	7.8	370.49	79.42
14	150	55	1:25	75	8.85	392.38	84.4
15	120	55	1:15	90	8.15	407.92	87.44
16	180	65	1:25	90	8.5	369.45	79.2
K_1	82.6	85.27	82.76	84.77	84.82		
K_2	87.11	86.16	85.1	86.05	85.77		
K_3	84.94	85.44	87.55	84.88	84.97		
K_4	84.88	81.65	84.1	83.82	84.66		
R	4.51	4.51	4.79	2.23	1.5		

2.5 苦荞叶黄酮浸提液萃取工艺研究

不同溶剂的黄酮萃取率和萃取液干燥物的总黄酮纯度如图1所示。

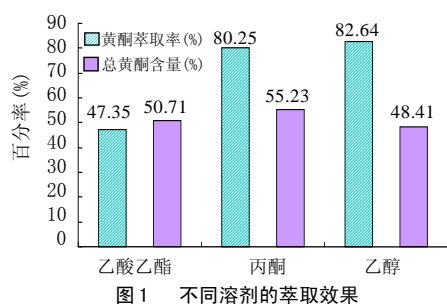


图1 Results of extraction by different solvents

由图1可知,有机溶剂萃取后干燥物中总黄酮含量有极显著升高($p < 0.01$)。由于苦荞叶黄酮在乙酸乙酯中的溶解性较小,所以乙酸乙酯作萃取剂时萃取率和干燥物的总黄酮纯度比另两种有机溶剂低。丙酮和无水乙醇的萃取率差异不显著($p > 0.05$)。因为乙醇的极性较强,萃取过程中溶解的杂质较多,萃取液干燥物的总黄酮含量比丙酮低(极显著, $p < 0.01$),所以选择丙酮为最佳萃取溶剂。

2.6 苦荞叶黄酮的大孔树脂纯化工艺优化

2.6.1 不同树脂静态吸附效果的比较

不同树脂静态吸附的吸附率、解吸率和解吸液干燥物的总黄酮含量如图2所示。DA-201的吸附率、解吸率和干燥物的总黄酮含量高于其他五种树脂(差异极显著, $p < 0.01$),适合于苦荞黄酮的纯化。

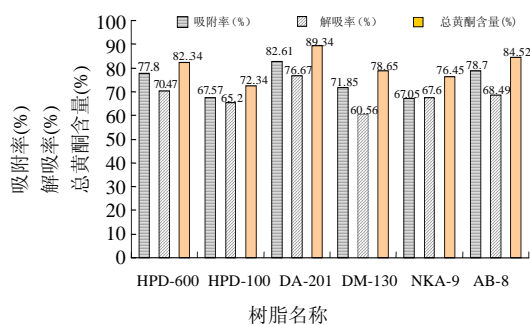


图2 不同树脂静态纯化效果

Fig.2 Results of static purification by different kinds of resins

2.6.2 DA-201 树脂动态吸附曲线

$\Phi 20\text{mm} \times 300\text{mm}$ 装填40g DA-201树脂的树脂柱动态吸附曲线如图3所示。随着萃取液处理量的增大,大孔树脂吸附苦荞黄酮能力减弱,滤液总黄酮浓度逐渐增大,当处理量在200ml以上时滤液总黄酮含量增大很快,当样品液处理量为270ml时滤液总黄酮浓度为0.692mg/ml,滤液总黄酮浓度接近于进样液总黄酮浓度,大孔树脂吸附能力接近饱和。为提高工作效率并充分利用树脂柱,每次40g DA-201树脂柱的处理量以200ml为宜。

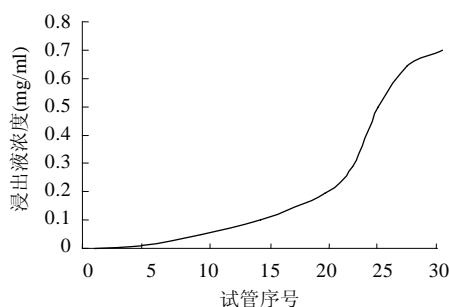


图3 DA-201 树脂动态吸附曲线

Fig.3 Dynamic adsorption curve of DA-201 resin

2.6.3 洗脱溶剂的选择

不同浓度的乙醇洗脱时的黄酮洗脱率及解吸液干燥物的总黄酮纯度如4所示。40%、70% 乙醇水溶液的洗脱百分率很低, 50%、55%、60% 三个浓度乙醇水溶液的洗脱百分率相差不显著($p>0.05$)。由于60% 乙醇洗脱干燥物的总黄酮含量比另外两种高8% 以上, 差异极显著, 所以选择60% 乙醇为洗脱溶剂。

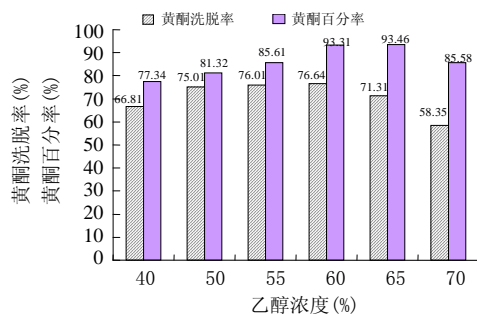


图4 不同浓度乙醇的洗脱效果

Fig. 4 Elution effects of different contents of ethanol

2.6.4 洗脱溶剂流速的确定

在不同流速洗脱的洗脱率见图5。随着洗脱流速增大, 黄酮洗脱百分率降低, 3.5ml/min 与2ml/min 有显著差异性($p<0.05$), 3ml/min 与2ml/min 差异不显著($p>0.05$), 所以选择2ml/min 的洗脱液流速。

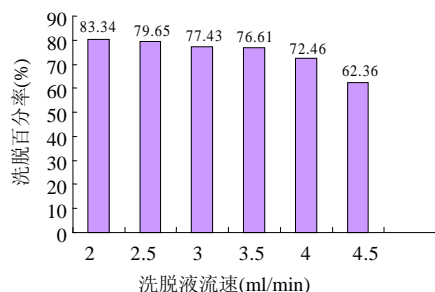


图5 洗脱液流速对洗脱效果的影响

Fig. 5 Effects of elution flow rate on elution

2.6.5 洗脱溶剂用量的选择

不同体积60% 乙醇洗脱的洗脱率如图6所示。随着洗脱溶剂用量的增加, 洗脱率逐渐增加, 洗脱剂用量在180ml 以下时, 增幅较大, 200ml 与180ml 的洗脱率差异不显著($p>0.05$), 选择180ml 为最佳洗脱剂用量。

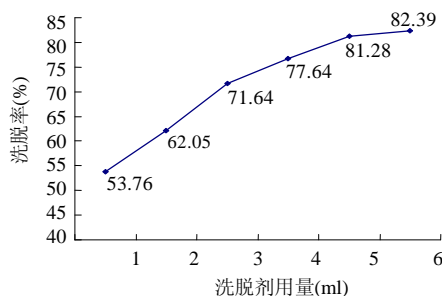


图6 洗脱剂用量对洗脱效果的影响

Fig. 6 Effects of elution solvent amount on elution

2.7 苦荞叶黄酮精粉含量的测定

通过以上提取纯化工艺所得到的洗脱液经过真空干燥(60℃, 0.09MPa)后制得苦荞黄酮精粉, 经测定苦荞黄酮精粉中的芦丁和总黄酮含量达到85.34% 和91.36%。

3 结 论

本实验对苦荞麦叶、茎、壳和籽粒粉碎物中的生物类黄酮进行了定性定量分析, 选用总黄酮含量最高的苦荞叶为原料制备苦荞黄酮精粉, 并确定了苦荞叶黄酮提取的最佳工艺为: 料液比为1:20、pH8.15的60% 乙醇, 75℃浸提180min。苦荞叶黄酮纯化的工艺为: DA-201 树脂, 处理量为5ml/g 树脂, 洗脱溶剂60% 乙醇溶液, 洗脱流速2ml/min, 洗脱剂用量为180ml。通过本工艺制得的苦荞精粉的芦丁和总黄酮含量达到85.34% 和91.36%。

参考文献:

- [1] 赵钢, 唐宇. 苦荞麦的营养和药用价值及其开发应用[J]. 农牧产品开发, 1999(7): 17-18.
- [2] 姜忠丽, 赵永进. 苦荞麦的营养成分及其保健功能[J]. 粮食与食品工业, 2003(4): 33-35.
- [3] 田秀红, 任涛. 苦荞麦的营养保健作用与开发利用[J]. 中国食物与营养, 2007(10): 44-46.
- [4] 胡一冰, 杨敬东, 邹亮, 等. 苦荞麦药理研究及临床应用概况[J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2006(4): 271-276.
- [5] 徐宝才, 丁霄霖. 苦荞黄酮的测定方法[J]. 食品与生物技术, 2003(2): 98-101.
- [6] 张琪, 刘慧灵, 朱瑞, 等. 苦荞麦中总黄酮和芦丁的含量测定方法的研究[J]. 食品科学, 2003(7): 113-116.
- [7] 邹勇, 尹礼国, 贾雪峰, 等. HPLC法测定苦荞叶中芦丁的含量[J]. 粮油食品科技, 2007(3): 57-58.
- [8] 于智峰, 王敏. 大孔树脂精制苦荞总黄酮工艺[J]. 中国中药杂志, 2007(7): 585-589.