

金桂花中总黄酮的微波辅助提取工艺优化

Microwave-assisted extraction of flavones in *Osmanthus fragrans var thunbergii*

陈铁壁 肖乐 杨盟盟 彭云凤

CHEN Tie-bi XIAO Le YANG Meng-meng PENG Yun-feng

(湖南科技学院生命科学与化学工程系, 湖南 永州 425100)

(Department of Biology and Chemistry, Hunan University of Science and Engineering,
Yongzhou, Hunan 425100, China)

摘要:以金桂花为原料,综合运用单因素和正交试验设计,考察乙醇体积分数、料液比、微波功率和提取时间对黄酮类化合物提取率的影响。结果表明:影响微波辅助提取金桂花中总黄酮提取率的因素主次为提取时间>料液比>乙醇浓度>微波功率,其最佳提取条件为:乙醇浓度 50%,料液比 1:35($m:V$),提取时间 8×20 s (提取 8 次,每次 20 s,每次时间间隔 2 min)、微波功率 300 W,该条件下,金桂花中总黄酮的提取率达 20.30%。

关键词:金桂花;总黄酮;微波辅助提取;提取率

Abstract: Single factor and $L_9(3^4)$ orthogonal experiments were conducted to evaluate the effect of ethanol concentration, the liquid-solid ratio, and microwave power, extraction time on extraction yield of flavonoids from *Osmanthus fragrans var. thunbergii* flowers. The results show that the factors affecting microwave-assisted extraction yield of the flavones is extraction time, liquid-solid ratio, ethanol concentration, and microwave power in sequence. The optimum microwave-assisted extraction conditions are as follows: ethanol concentration of 50%, the liquid-solid ratio of 1:35($m:V$), extraction time of 8×20 s and microwave power of 300 W, and the extraction rate under this condition is 20.30%.

Keywords: *Osmanthus fragrans var. thunbergii* flower; total flavones; microwave-assisted extraction; extraction yield

黄酮类化合物是植物在长期自然选择过程中产生的一类次级代谢产物、以黄酮(2-苯基色原酮)为母核而衍生的一类黄色色素,作为天然抗氧化剂的一种,其具有清除体内自由基,延缓衰老,增强机体免疫等生理活性^[1,2],如芦丁、槲皮素等,因其生理活性众多,深受国内外研究人员关注,目前已

发现 8 000 多种^[3]。

近年来,微波萃取因提取时间短、萃取效率高、溶剂消耗低、产生污染小、所需设备简单等优点而倍受各领域研究人员的广泛重视^[4,5]。桂花中蕴含着丰富的黄酮类物质,朱沛沛等^[6]采用功率 300 W、微波连续提取 120 s,桂花总黄酮提取率达 16.61%。本研究拟在此基础上,以金桂花为原料,通过间歇式微波辅助提取,探讨乙醇浓度、提取时间、料液比和微波功率四因素对金桂花中总黄酮提取率的影响,从而确定出最佳的提取方法及总黄酮含量,为微波辅助提取桂花总黄酮工艺的完善提供科学依据与技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

金桂花:摘选自湖南科技学院校园;

芦丁:分析纯,中国医药集团;

石油醚:分析纯,淄博市临淄东方红化工厂;

无水乙醇:分析纯,深圳市华昌化工有限公司;

硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

试验专用微波炉:NTJ07-3 型,南京金微波设备有限公司;

紫外—可见分光光度计:UV-2600 型,上海舜宇恒平有限公司;

循环水式多用真空泵:SHB-3 型,郑州长城科工贸有限公司;

电子天平:BS-124S 型,德国赛多利斯公司;

旋转蒸发器:RE-52A 型,上海亚荣生化仪器厂;

中草药粉碎机:WF-117 型,天津天斯特仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线的绘制和最大吸收波长的确定 准确称取

基金项目:湖南省普通高等学校“十二五”重点建设学科(编号:2011-76);湖南省普通高等学校科技创新团队(编号:2012-318);湖南科技学院湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室开放基金(编号: XNZW14C04)

作者简介:陈铁壁(1975—),男,湖南科技学院实验师,硕士。

E-mail: ctb5588@163.com

收稿日期:2015-04-11

20 mg 芦丁标准品,以 30% 的乙醇溶液溶解,并于 100 mL 的容量瓶中定容,即得芦丁标准溶液(0.2 mg/mL)。为确定其最大吸收波长,以溶剂为空白,于 200~760 nm 波长范围内进行可见—紫外扫描。准确量取芦丁标准溶液 0,1,2,3,4,5 mL,分别置于 25 mL 的容量瓶中,先后加入 30% 的乙醇溶液 10 mL,5% 的 NaNO_2 溶液 0.7 mL,摇匀后,加入 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.7 mL,4% 的 NaOH 溶液 5 mL,混匀后,用 30% 的乙醇溶液定容至 25 mL,静置 10 min,于上述最大吸收波长处测定各标准溶液的吸光值(以溶剂为空白对照)。分别以标准溶液浓度为横坐标,体系吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,并建立标准曲线方程。

1.3.2 金桂花中总黄酮的提取

(1) 原料预处理:将新采摘的金桂花洗净,干燥,粉碎,过 60 目筛,于低温避光条件下保存备用。

(2) 金桂花中总黄酮的微波辅助提取:称取金桂花粉末若干,放入三角瓶中,加入适量溶剂,混匀,于微波炉中在设定功率下间歇萃取一定时间后,取出待测溶液,冷却至室温,减压抽滤,即得金桂花中总黄酮的乙醇溶液,滤液于 50 mL 的容量瓶中定容,即得其提取液。

1.3.3 金桂花中总黄酮提取率的计算 总黄酮提取率计算公式见式(1)。

$$R = \frac{n \times c \times V}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R ——金桂花中总黄酮提取率,%;

n ——稀释倍数;

c ——总黄酮浓度,g/mL;

V ——提取液的总体积,mL;

m ——提取所用的金桂花粉干重,g。

1.3.4 微波辅助提取的单因素试验设计 称取质量恒重的金桂花粉末 0.25 g,分步确定以下各因素对金桂花中总黄酮提取率的影响。

(1) 乙醇体积分数:预设料液比 1 : 30($m : V$)、提取时间 10×20 s(提取 10 次,每次 20 s,每次间隔 2 min)、微波功率 300 W,分别考察乙醇体积分数为 40%,45%,50%,55%,60%,65% 时金桂花中总黄酮提取率的变化。

(2) 料液比:预设提取时间 10×20 s,微波功率 300 W,乙醇体积分数 55%,分别考察料液比为 1 : 20,1 : 25,1 : 30,1 : 35,1 : 40,1 : 45($m : V$) 时金桂花中总黄酮提取率的变化情况。

(3) 提取时间:预设微波功率 300 W,乙醇体积分数 55%,料液比 1 : 30($m : V$),分别考察提取时间为 2×20 s, 4×20 s, 6×20 s, 8×20 s, 10×20 s, 12×20 s 时金桂花中总黄酮提取率的变化情况。

(4) 微波功率:设定提取时间 10×20 s,乙醇体积分数 55%,料液比 1 : 30($m : V$),分别考察微波功率为 100,

200,300,400,500,600 W 时金桂花中总黄酮提取率的变化。

1.3.5 正交试验设计 在单因素试验的基础上,以总黄酮提取率为考察指标,分别选取影响总黄酮提取率的乙醇体积分数、料液比、提取时间、微波功率,开展四因素三水平的正交试验,根据正交试验结果分析得出各因素影响金桂花中总黄酮提取率的主次顺序,进而确定其最佳提取工艺条件。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

2.1.1 金桂花中总黄酮最大吸收波长的确定 采用分光光度法于 200~600 nm 波长范围内扫描测定金桂花乙醇溶液的最大吸收波长,结果显示其在 510.20 nm 处有明显吸收峰,与所测芦丁标准溶液的最大吸收波长(510.00 nm)基本一致,由此可确定金桂花中确含黄酮类化合物。

2.1.2 标准曲线方程 按照 1.3.1 标准曲线的绘制方法,分别以芦丁浓度 C (mg/mL) 为横坐标、体系吸光度 A 为纵坐标,经一元线性回归分析得回归方程为 $A = 4.3976C + 0.0058$ ($R^2 = 0.9979$),表明芦丁乙醇溶液在 0~0.04 mg/mL 范围内浓度 C 与吸光度 A 间具有良好的线性关系。

2.2 乙醇体积分数对金桂花中总黄酮提取率的影响

在植物花朵中黄酮类化合物多以苷类形式存在,其水溶性随糖苷分子中糖基的增多和糖链的增长而增强。试验发现,当乙醇体积分数小于 40% 时,提取液中糖类成分含量多,离心后体系比较浑浊,严重影响总黄酮含量的测定及后期的精制纯化;当乙醇体积分数小于 50% 时,总黄酮提取率随乙醇浓度的上升而逐步升高;当乙醇体积分数为 50% 时,其提取效果最好,提取率最高,达 17.45%;随着乙醇体积分数的进一步增大,其提取率不升反降。由图 1 可知,在此提取条件下,金桂花中总黄酮微波辅助提取工艺中乙醇体积分数以 50% 最佳。

2.3 料液比对金桂花中总黄酮提取率的影响

料液比是有效成分提取时最重要的影响因素之一,料液比越大,固、液两相浓度差越小,传质速率不高,有效成分萃

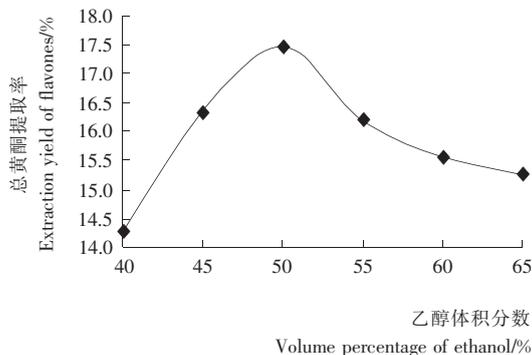


图 1 乙醇体积分数对金桂花中总黄酮提取率的影响
Figure 1 Effect of volume percentage of ethanol on extraction yield of flavones

取不完全;而随液料比的减少,提取率会随之增大。由图 2 可知,随料液用量的增加,总黄酮提取率逐步升高;当料液比达到 1 : 35($m : V$)以后,其提取率渐趋平衡。综合考虑原料及后续进一步精制提纯的成本和工序的难易,在当前提取条件下,以料液比 1 : 35($m : V$)为最佳。

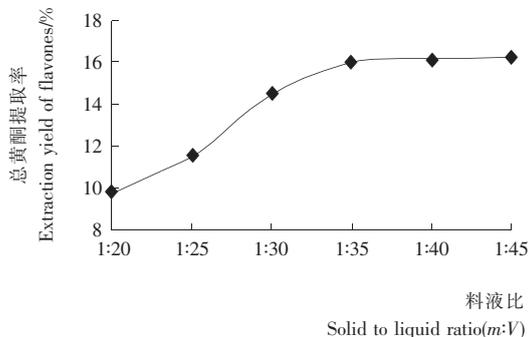


图 2 料液比对金桂花中黄酮类化合物提取率的影响
Figure 2 Effect of solid to liquid ratio on extraction yield of flavones

2.4 提取时间对金桂花中总黄酮提取率的影响

微波辅助提取是基于在微波产生的电磁场中不同结构的物质吸收微波能力的差异,从而使提取体系中的目的组分被选择性地加热,并从体系中分离进入微波吸收能力相对较差的提取溶剂中^[7,8]。微波所产生的电磁场可加速目的组分向萃取溶剂界面的扩散,使目的组分能在较低温度下以较快的速度被萃取出来,可最大限度地保证萃取的质量^[9]。由图 3 可知,间歇式微波辅助提取的时间在 $2 \times 20 \text{ s} \sim 8 \times 20 \text{ s}$ (提取 2~8 次,每次 20 s,每次间隔 2 min)时,随微波辅助提取时间的延长,金桂花中总黄酮提取率不断增大,此后,随反应时间的延长总黄酮提取率呈下降趋势。可能是,时间过短时,反应所产生的微波辐射能尚不足以引起细胞结构的改变和细胞膜电位的变化,导致黄酮类化合物的溶出受阻;当辅助提取时间过长则乙醇挥发严重,也影响了黄酮类化合物的溶出。因此,在当前提取条件下,从时间效益角度考虑,提取时间以 $8 \times 20 \text{ s}$ 为宜。

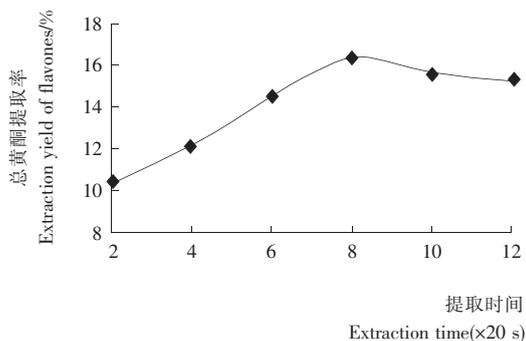


图 3 提取时间对金桂花中总黄酮提取率的影响
Figure 3 Effect of extraction time on extraction yield of flavones

2.5 微波功率对金桂花中总黄酮提取率的影响

由图 4 可知,微波功率在 100~300 W 时,提取率随微波功率的增大呈上升趋势,当功率超过 300 W 时,随着微波功率的上升,金桂花中总黄酮提取率反呈下降趋势,有可能是因为在当前微波功率条件下,部分黄酮类化合物在微波的热效应作用下分解与破坏,从而导致提取率下降,因此,在当前提取条件下,选择微波功率 300 W 为宜。

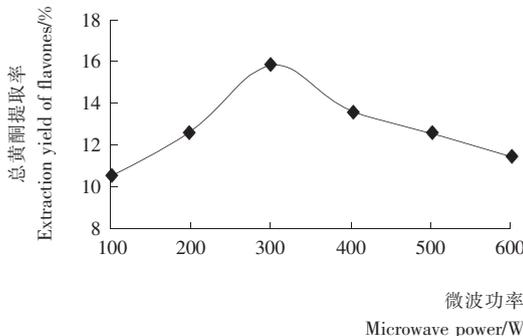


图 4 微波功率对金桂花中总黄酮提取率的影响
Figure 4 Effect of microwave power on extraction yield of flavones

2.6 正交试验

试验因素水平取值见表 1,具体试验设计方案与试验结果见表 2。由表 2 可知,根据各因素极差 R 的大小可判断得出,影响微波辅助提取金桂花中总黄酮提取率的因素主次顺序依次为 $B(\text{提取时间}) > C(\text{料液比}) > A(\text{乙醇体积分数}) > D(\text{微波功率})$,表 2 中最佳提取工艺组合为 $A_1 B_2 C_2 D_2$,其总黄酮提取率为 19.45%。对正交试验结果直观分析发现,各因素水平的最佳组合是 $A_2 B_2 C_2 D_2$,因在表 2 正交试验设计中并无该组合,故需进一步实验验证。称取金桂花粉末 0.25 g,以 $A_2 B_2 C_2 D_2$ 中各因素水平开展试验,重复 5 次,得金桂花中总黄酮的平均提取率为 20.30%。由此可见,微波辅助提取金桂花中总黄酮的最优工艺组合为:乙醇体积分数 50%、料液比 1 : 35($m : V$)、提取时间 $8 \times 20 \text{ s}$ 、微波功率 300 W。

本试验的正交表各列除因子列外,无空列设置,旨在确定各因素对金桂花中总黄酮提取率影响的差异,特征性地将偏差平方和最小项(D项)视作误差项,则误差自由度可视为

表 1 试验因素水平表

Table 1 Orthogonal factor level table

水平	A 乙醇体积分数/%	B 提取时间($\times 20 \text{ s}$)	C 料液比($m : V$)	D 微波功率/W
1	40	6	1 : 30	200
2	50	8	1 : 35	300
3	55	10	1 : 40	400

表2 金桂花中总黄酮微波辅助提取的正交试验设计及结果分析

Table 2 Design and result analysis of orthogonal tests for extraction optimization of flavones

试验号	A	B	C	D	总黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	9.23
2	1	2	2	2	19.45
3	1	3	3	3	9.46
4	2	1	2	3	16.83
5	2	2	3	1	15.34
6	2	3	1	2	9.37
7	3	1	3	2	9.89
8	3	2	1	1	11.49
9	3	3	2	3	10.42
k_1	12.71	11.98	10.03	11.66	
k_2	13.85	15.43	15.57	12.90	
k_3	10.60	9.75	11.56	12.59	
R	3.25	5.68	5.54	1.24	

2 (表3中误差行括号内数值分别被视作误差偏差平方和与误差自由度),由此可依次计算出各因子列的 F 值,方差分析具体结果见表2,提取时间和料液比对总黄酮提取率的影响显著($P < 0.05$),而乙醇体积分数和微波功率对提取率的影响甚微。

3 讨论与结论

微波辅助提取法是利用微波能提高动植物中有效成分提取效率的一种新技术^[10],具有得率高、选择性大、易控温、加热快等一系列优点^[11-13],且微波提取设备的尺寸不大、提取过程中溶剂消耗不高、提取过程中无污染能源的利用,且废物产生及对产品的污染少^[9,13]。本试验综合运用单因素和正交试验设计,确定了影响微波辅助提取金桂花中总黄酮提取率的因素主次顺序,即提取时间>料液比>乙醇体积分数>微波功率;优化得出了微波辅助提取金桂花中总黄酮的最佳工艺条件:提取时间 8×20 s(提取8次,每次20 s,每次时间间隔2 min)、料液比1:35($m:V$)、乙醇体积分数50%、微波功率300 W,在此条件下总黄酮的提取率达20.30%,与朱沛沛等^[6]的研究相比,在微波功率和料液比相同、乙醇体积分数相当条件下,通过连续提取与间歇提取方式的变换,金桂花中总黄酮提取率提高22.21%(16.61%

表3 正交试验结果的方差分析表

Table 3 Variance analysis of orthogonal test results

差异源	偏差平方和	自由度	F 值	$F_{\text{临界值}}$	显著性
A	16.291	2	6.519	19.000($\alpha=0.05$)	
B	49.069	2	19.636	9.000($\alpha=0.10$)	* *
C	49.032	2	19.621		* *
D	2.499	2	1.000		
误差	116.891(2.499)	0(2)			

vs. 20.30%),对微波辅助提取总黄酮工艺条件的完善提供了新的技术支持。

参考文献

- 1 马博,张婷婷,黎远成,等. 麻疯树籽壳总黄酮的提取及其羟基自由基清除作用[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 202~205, 211.
- 2 文开新,王文章,严学兵,等. 黄酮类化合物生物学活性研究进展[J]. 草业科学, 2010, 27(6): 116~119.
- 3 徐怀德. 天然产物提取工艺学[M]. 北京:中国轻工出版社, 2009: 338~353.
- 4 Mandal V, Dewanjee S, Mandal S C. Microwave-assisted extraction of total bioactive saponin fraction from *Gymnema sylvestre* with reference to gymnemagenin: a potential biomarker [J]. Phytochem Anal, 2009, 20(6): 491~497.
- 5 骆健美,卢学英,张敏卿. 微波萃取技术及其应用[J]. 化工进展, 2001, 12(5): 46~49.
- 6 朱沛沛,梁晶,李宁宁. 桂花总黄酮的微波辅助提取工艺研究

[J]. 中国调味品, 2012, 37(8): 40~42, 55.

- 7 李扬,赵树法,李婷,等. 微波辅助萃取技术在食品工业中的研究进展[J]. 中国酿造, 2006(9): 5~8.
- 8 Song Jing-Zheng, Mo Shi-Fu, Yip Yue-Keung, et al. Development of microwave assisted extraction for the simultaneous determination of isoflavonoids and saponins in *radix astragali* by high performance liquid chromatography [J]. J. Sep. Sci., 2007, 30(6): 819~824.
- 9 周泉城,区颖刚,申德超. 微波辅助提取挤压后大豆皂苷工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(5): 42~45.
- 10 隋大鹏. 枇杷叶熊果酸微波辅助提取工艺的优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 164~166, 174.
- 11 周海旭,李忠海,钟海雁,等. 微波辅助乙醇提取樟树叶多酚工艺优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 167~169, 209.
- 12 马萍,郭希娟,郭增旺. 黑米黑色素微波辅助提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 235~237.
- 13 王建辉,刘永乐,李赤翎,等. 丝兰皂甙的微波辅助提取工艺研究[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 58~62.