

超声波辅助提取苦荞麦黄酮类成分工艺研究

张春艳^{1,2}, 张丽娜^{1,2}

(1. 中国农业科学院 作物科学研究所 重大平台中心, 北京 100089)

(2. 中国仪器仪表学会 科学仪器设备验证评价中心 (生命科学站), 北京 100089)

摘要: 为了优化苦荞麦中芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚的提取工艺, 本研究以芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取含量为指标, 采用单因素实验比较了不同体积分数的甲醇和乙醇作为提取液提取上述三种成分, 结果表明: 对于芦丁和异槲皮素, 以 70%乙醇作为提取液的提取量高于以 80%甲醇为提取液的提取量, 所以本实验采用 70%乙醇作为提取液。以三因素三水平正交实验探究不同体积分数乙醇为提取液对芦丁、异槲皮素、槲皮素和山奈酚提取量的影响。结果表明: 超声提取法在提取液为 70%乙醇, 提取温度 50°C, 超声时间 30 min 条件下对芦丁和异槲皮素提取量最高, 分别为 15.58mg/g 和 0.50mg/g; 而超声提取法在提取液为 60%乙醇, 提取温度 25°C, 超声时间 15 min 条件下, 对槲皮素和山奈酚提取效果最佳。本研究为苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚的提取提供依据。

关键词: 苦荞麦; 超声提取; 黄酮类

Ultrasonic-assisted extraction process of buckwheat flavonoids

Zhang Chunyan^{1,2}, Zhang Lina^{1,2}

(1. Major Platform Center, Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100089, China; 2. Scientific Instruments and Equipment Verification and Evaluation Center of China Instruments and Apparatus Society (Bioscience Station))

Abstract: In order to optimize the extraction process of rutin, isoquercetin, quercetin and kaempferol in buckwheat, this study took the extraction content of rutin, isoquercetin, quercetin and kaempferol as the index, and used the single factor experiment to compare the extraction of the above three components with different volume fractions of methanol and ethanol as the extraction solution. The results showed that: For rutin and isoquercetin, 70% ethanol as the extraction solution was higher than 80% methanol as the extraction solution, so 70% ethanol was used as the extraction solution in this experiment. Then three factors and three levels orthogonal experiments were conducted to explore the effects of different volume fractions of ethanol on the extraction of rutin, isoquercetin, quercetin and kaempferol. The results showed that the maximum extraction amounts of rutin and isoquercetin were 15.58mg/g and 0.50mg/g, respectively, under the conditions of 70% ethanol as extraction solution, 50°C as extraction temperature and 30 min as ultrasonic time. Under the conditions of 60% ethanol, extraction temperature 25°C and ultrasonic time 15 min, the ultrasonic extraction method had the best extraction effect on quercetin and

kaempferol. This study provides the basis for the extraction of rutin, quercetin and kaempferol from Tartary buckwheat.

Key words: buckwheat, ultrasonic extraction, flavonoids

荞麦为蓼科苦荞麦属作物，一年生草本双子叶植物。荞麦分为普通荞麦(甜苦荞麦)及其亲缘种苦苦荞麦(鞑靼苦荞麦)，尤指前者。荞麦别名为乌麦、三角麦。我国是生产和出口苦荞麦的大国，主要种植分布在内蒙古、云南、山西、四川、贵州等地区。

荞麦中主要含有黄酮类、糖苷类及有机酸类等化学成分。黄酮类主要包括芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚等。现代药理研究表明，荞麦具有抗氧化、抗肿瘤、抗敏、抗菌、抗病毒、降血脂、降血压等作用。芦丁作为苦荞麦中含量最高的成分，它难溶于水，可溶于热水、甲醇、乙醇、吡啶等有机溶剂，在光作用下逐渐变暗，熔点为 195°C；异槲皮素难溶于水，熔点为 314-317°C，具有较好的祛痰、止咳、平喘作用；槲皮素几乎不溶于水，易溶于碱性水溶液，熔点为 314-317°C；山奈酚微溶于水，溶于热乙醇，乙醚和碱，熔点为 276°C。荞麦芦丁一直以来都是研究的重点，近年来文献报道也很多，关于芦丁、槲皮素等的提取方法，提取溶剂种类、体积分数的选择多种多样，有采用不同体积分数乙醇的，也有采用不同体积分数甲醇进行提取的，提取方式也各不相同。本文采用三因素三水平正交试验方法超声辅助提取荞麦中四种成分，考察不同体积分数提取液，超声温度、超声时间对芦丁等含量的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与amp;设备

试验主要使用设备如下：

| 仪器名称 | 型号 | 厂家 |
|---------------------|-------------------------|------------------|
| 电子天平 | 2011F145-11 | 赛利多斯科学仪器（北京）有限公司 |
| 粉碎机 | TUBE-MLL 100 | 艾卡（广州）仪器设备有限公司 |
| 超声波清洗仪 | JP-040S | 深圳市洁盟清洗设备有限公司 |
| 福立高效液相色谱仪 | LC5090 | 浙江福立分析仪器股份有限公司 |
| UV 紫外检测器 | LC5090-UV | 浙江福立分析仪器股份有限公司 |
| Agilent XDB-C18 色谱柱 | XDB-C18(4.6x250mm 5 μm) | 安捷伦科技（中国）有限公司 |
| 离心机 | PICO17 | 赛默飞世尔科技（中国）有限公司 |

1.2 材料与amp;试剂

湖南苦荞，来自于中国农业科学院作物科学研究所小棕作物课题高佳老师提供，地方品种；乙醇，甲醇（HPLC Grade）赛默飞世尔科技（中国）有限公司；DMSO hplc 纯度 ≥99.7%

1.3 试验方法

1.3.1 芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚标准曲线制作

精密称取芦丁标准品 20.0mg，置于 10ml 容量瓶中，加入 70%乙醇 1ml，配置浓度为 2mg/ml 的芦丁母液。分别取不同体积母液配置浓度为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.0078125mg/ml 溶液，过 0.22um 膜，放置 2ml 液相小瓶中，待测。福立高效液相色谱仪（配置：5090 二元高压输液泵、5090 在线 3 路脱气器、5090 柱温箱(<室温 10°C-80°C)、5090 自动进样器、5090 紫外检测器、LC5S 工作站）进行检测。

精密称取异槲皮素、槲皮素、山奈酚 10.0mg，置于 10ml 容量瓶中，加入 70%乙醇 1ml，配置浓度为 1mg/ml 异槲皮素、槲皮素、山奈酚母液。分别取不同体积母液配置浓度为 0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.00078125mg/ml 溶液，过 0.22um 膜，放置 2ml 液相小瓶中，待测。福立高效液相色谱仪-紫外检测器进行检测。

1.3.2 芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取方法

苦荞麦用艾卡（广州）仪器设备有限公司生产的 TUBE-MLL 100 高速粉碎机粉成细粉，电子天平准确称取 20.0mg 苦荞麦粉末，放入 2mlPE 管中，加入不同的提取液，称定重量，按照实验前设定的影响因素，放置超声清洗仪中进行提取，放凉，称重，补足损失的提取液，10000r/min 离心 10 分钟，取上清，过 0.22um 膜，收集滤液，放置 2ml 液相小瓶，待测。福立高效液相色谱仪测定，测定方法参考 P Naveen 文章，稍作修改。

1.3.3 单因素试验

不同甲醇（乙醇）体积分数提取液对苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取量的影响。固定超声时间 15min、超声温度 25°C 的条件下，按照 50%、60%、70%、80%、100% 的乙醇体积分数提取苦荞麦中芦丁、异槲皮素、槲皮素，山奈酚。试验重复 3 次，筛选出最佳的提取液。

超声温度对苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取量的影响。在固定乙醇体积分数 70%，超声时间 15min 的条件下，按照 30°C、40°C、50°C、60°C、70°C 处理苦荞麦样品，试验重复 3 次，筛选出最佳提取温度。

超声时间对苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取量的影响。在固定乙醇体积分数 70%，超声温度 40°C 的条件下，按照 15min、30min、40min、50min、60min 处理苦荞麦样品，试验重复 3 次筛选出最佳提取时间。

1.3.4 正交试验

在单因素实验的基础上进行三因素三水平（ $L_9(3^4)$ ）正交实验。

苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取正交实验因素水平见表 1

表 1 苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取正交试验因素水平

| 因素 水平 | 乙醇体积分数 (%) | 超声温度 (°C) | 超声时间 (min) |
|----------|------------|-----------|------------|
| 1 | 60 | 25 | 15 |
| 2 | 70 | 40 | 30 |
| 3 | 80 | 50 | 40 |

2 结果与分析

2.1 标准曲线的制作

分别以芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚的含量 (mg) 为纵坐标，峰面积为横坐标作图，见图 1。

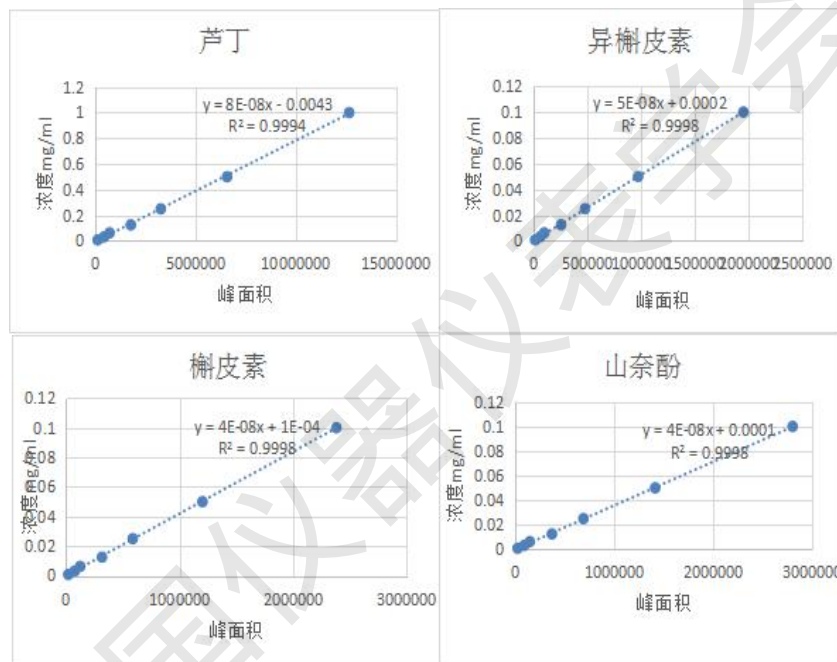


图 1 芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚标准曲线

如图 1 可知，芦丁在浓度为 1-0.0078mg/ml 之间相关系数 $R^2=0.9994$ ，异槲皮素、槲皮素、山奈酚在浓度为 0.1-0.00078mg/ml 之间相关系数 $R^2=0.9998$ ，说明在此范围内线性良好。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 乙醇、甲醇体积分数对苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取量的影响

乙醇、甲醇体积分数对苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取量的影响见图 2。

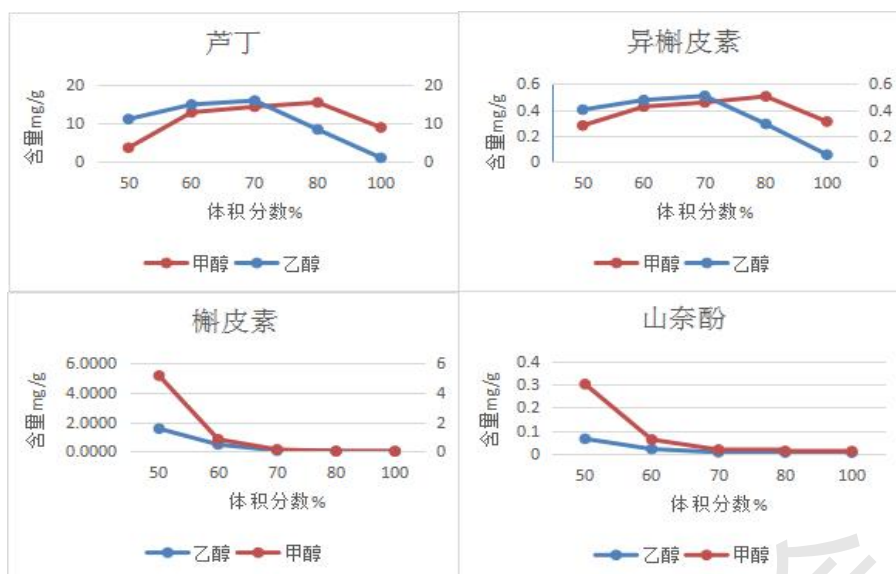


图2 乙醇甲醇体积分数对苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取量的影响

由图2可知，当乙醇体积分数在50%-70%时，芦丁、异槲皮素含量随着乙醇体积分数的增加而增加，乙醇体积分数达到70%时，含量最高。当乙醇体积分数在70%-100%时，随着乙醇体积分数增加，芦丁、异槲皮素含量反而显著降低。当甲醇体积分数在50%-100%时，槲皮素、山奈酚含量随着甲醇体积分数的增加而减少。从图2可以看出对于芦丁、异槲皮素来说乙醇作为提取溶剂优于甲醇；而对槲皮素、山奈酚来说甲醇作为提取溶剂优于乙醇；本文以研究芦丁、异槲皮素为主，故选择70%乙醇作为提取溶剂进行考察。

2.2.2 超声提取温度对苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取量的影响

超声温度对苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取量的影响见图3。

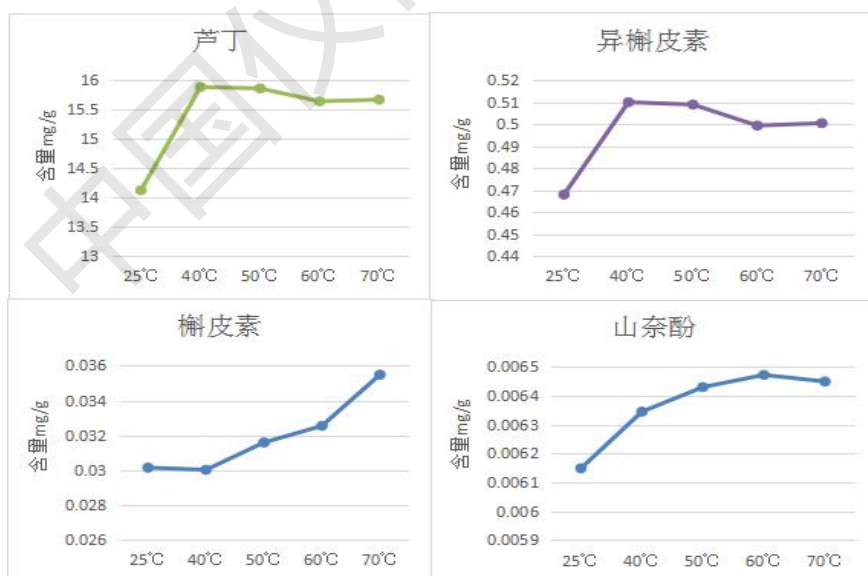


图3 超声温度对苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取量的影响

由图3可知，随着超声温度的增加，芦丁、异槲皮素提取量先增加后降低，在超声温度为40°C时，提取量最佳；槲皮素、山奈酚随着提取温度增加而增加，70°C时有利于槲皮素提取，60°C时，山奈酚提取量最佳。

2.2.3 超声时间对苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取量的影响

超声时间对苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取量的影响见图 4。

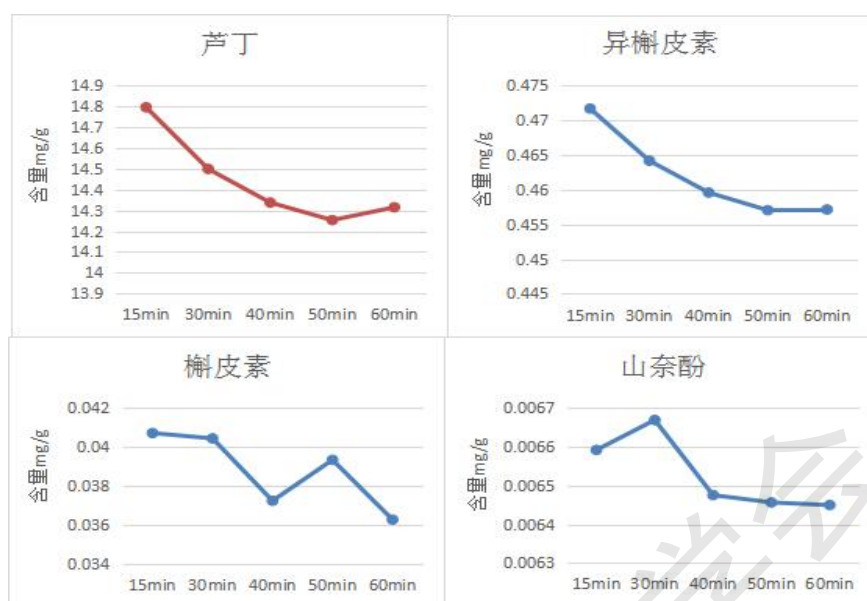


图 4 超声时间对苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取量的影响

由图 4 可知，随着超声时间的增加，芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚含量逐渐降低。随着时间增加，其他杂质溶出率增大，影响了有效成分的提取，从而导致芦丁等四种成分的含量下降。

2.3 正交试验结果

2.3.1 正交试验设计

在单因素实验的结果上，选择三因素三水平进行正交试验

正交试验设计及结果见表 2。

表 2 苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚正交试验结果

| 试验号 | A | B | C | 空白 | 芦丁含量 mg/g | 异槲皮素含量 mg/g | 槲皮素含量 mg/g | 山奈酚含量 mg/g |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------------|------------|------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 12.84 | 0.419 | 0.226 | 0.0129 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 13.15 | 0.427 | 0.192 | 0.0115 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 13.24 | 0.430 | 0.201 | 0.0119 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 13.22 | 0.423 | 0.046 | 0.0069 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 13.72 | 0.440 | 0.033 | 0.0063 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 13.57 | 0.436 | 0.038 | 0.0064 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 8.10 | 0.279 | 0.025 | 0.0061 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 11.89 | 0.398 | 0.029 | 0.0063 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 13.23 | 0.426 | 0.029 | 0.0062 |
| K ₁ | 39.24 | 34.16 | 38.31 | 39.79 | | | | |

| | | | | | | | | |
|---------|-------|------|-------|------|-------|------|--------|------|
| 借母溪乡样品 | 13.83 | 0.69 | 0.441 | 0.94 | 0.033 | 2.95 | 0.0063 | 0.96 |
| | 13.64 | | 0.435 | | 0.031 | | 0.0063 | |
| | 13.78 | | 0.443 | | 0.032 | | 0.0064 | |
| 湖南沅陵县样品 | 13.50 | 0.72 | 0.456 | 2.98 | 0.034 | 0.38 | 0.0064 | 2.51 |
| | 13.31 | | 0.430 | | 0.034 | | 0.0063 | |
| | 13.37 | | 0.450 | | 0.034 | | 0.0066 | |
| 泸溪县样品 | 15.85 | 1.94 | 0.511 | 2.93 | 0.037 | 2.77 | 0.0064 | 0.68 |
| | 15.65 | | 0.499 | | 0.036 | | 0.0065 | |
| | 15.25 | | 0.482 | | 0.038 | | 0.0065 | |

从表 3 可知, 三个不同产地样品, 重复三次测得芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚的平均含量分别在 13.39-15.58mg/g、0.440-0.497mg/g、0.032-0.037mg/g、0.063-0.065mg/g 之间, RSD%值均小于 5,该优化后的方法与文献比较具有一定的优势。

4 讨论

试验研究了乙醇体积分数、超声温度、超声时间三个因素对苦荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚提取含量的影响, 结果表明, 乙醇体积分数为 70%, 超声温度 50℃、超声时间 30min 条件下, 不同产地苦荞麦中芦丁、异槲皮素提取量最高。乙醇体积分数为 60%、超声温度 25℃、超声时间 15min 时更利于槲皮素、山奈酚的提取。通过试验研究可以看出, 芦丁、异槲皮素在有机溶剂体积比较高时, 有较佳的提取效率, 相反, 槲皮素、山奈酚在有机溶剂体积比较小的时候, 提取效率更高一些。通过该方法的建立可以为荞麦芦丁、异槲皮素、槲皮素、山奈酚的提取方法提供依据。

参考文献:

- [1] P Naveen, H B Lingaraju, Anitha, K Shyam Prasad. Simultaneous determination of rutin, isoquercetin, and quercetin flavonoids in *Nelumbo nucifera* by high-performance liquid chromatography method *Int J Pharm Investig.* 2017,7(2):94-100.
- [2] Sabbi Jan, Javaid Ahmad, Mohd Masarat Dar, Aijaz A Wani, Inayatullah Tahir. Development and validation of a reverse phase HPLC-DAD method for separation, detection & quantification of rutin and quercetin in buckwheat. *J Food Sci Technol.* 2022,59(7):2875-2883.
- [3] 罗凤莲,蒲培瑶.超声波辅助提取苦苦荞麦总黄酮工艺研究 *农产品加工.* 2018,7(02):90-96.
- [4] 王丽,魏茂琼,邵金良.苦荞麦类黄酮成分的含量测定与分析研究 *食品安全质量检测学报.* 2018,9(20):7676-7682.
- [5] 张继斌, 王玉, 徐浪, 陈志元, 丁苗不同产地苦苦荞麦中黄酮类成分的含量测定与分析 *食品研究与开发.*2018,129(20):78-87.

- [6] Jia Gao, Tingting Wang, Minxuan Liu¹, Jing Liu, Zongwen Zhang. Transcriptome analysis of filling stage seeds among three buckwheat species with emphasis on rutin accumulation PLoS One. 2017, 12(12):24-30.
- [7] 任强, 吴昊, 聂其婷, 刘伟. HPLC-DAD 法同时测定苦荞麦保健品中芦丁槲皮素山奈酚含量 济宁医学院学报, 2016, 39(05):17-21.

中国仪器仪表表学会