

紫山药中花色苷的快速溶剂萃取

唐晓伟, 何红巨, 宋曙辉, 王文琪, 高华杰

(北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 北京 100097)

摘 要:通过正交实验和方差分析,采用快速溶剂萃取(ASE)法研究紫色山药中花色苷的提取温度、循环次数、冲洗体积及静态时间等因素对提取效率的影响。结果表明:快速溶剂萃取技术萃取紫山药花色苷的最佳提取条件为:温度 80℃,循环提取 4 次,冲洗体积 120%,静态时间 2 min,影响提取效率的主要因素是温度。该技术与常规溶剂提取法相比,具有提取时间短、溶剂用量少、萃取效率高等优点,具有潜在的开发应用价值。

关键词:紫山药;花色苷;快速溶剂萃取

中图分类号:S 632.1 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)18-0144-04

花色苷(Anthocyanin)是花色素(Anthocyanidin)的糖苷衍生物,属于酚类化合物中的类黄酮类化合物。是广泛存在于植物界中的一类植物生物活性物质^[1]。它存在于几乎所有的高等植物中,使植物呈现出五彩缤纷的绚丽色彩^[2];在高等植物中,常见的花色素有 6 种,分别是天竺葵素(Pelargonidin)、矢车菊素(Cyanidin)、飞燕草素(Delphinidin)、芍药色素(peonidin)、牵牛色素(petunidin)及锦葵色素(Malvidin)。花色苷(Anthocyanin)对人类健康保健有多方面的作用。特别是花色苷和花色素的抗氧化性,比维生素 C 和维生素 E 的抗氧化性高^[1,3]。目前花色苷的研究越来越受到重视,已经成为植物学、药学及营养学的研究热点。未来,花色苷在食品、保健品、化妆品等领域有着巨大的应用潜力^[6]。花色苷的提取、分离、纯化是研究花色苷的前提,游离状态下的花色苷很不稳定,非常容易降解^[20],随着科学的发展,花色苷的提取、分离、纯化方法也不断革新,提取效率不断提高。

加速溶剂萃取(Accelerated solvent extraction ASE)是由 Richter 等于 1995 年提出的一种从固体和半固体基质中提取分析物的样品萃取技术^[5-6]。与索氏提取、超声、微波、超临界和经典的分液漏斗振摇等成熟方法相比,加速溶剂萃取具有快速、溶剂用量少、萃取效率高、安全、全自动等突出优点,已经被美国国家环保局批准为 EPA3545 号标准方法。其原理是在高压和较高温度下,目标物质在溶剂中的溶解度和溶出速率会不同程度的提高,从而提高提取效率。近年来,国内外已有多位学者将 ASE 用于天然活性成分的研究^[2-3,7-10]。该试验采用正交实验设计法,对紫山药

中花色苷的加速溶剂萃取条件进行优化,希望为花色苷研究及工业开发提供一种高效提取方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

紫山药选自北京市农林科学院蔬菜研究中心试验农场。将采收的紫山药块茎洗净,切片,冷冻干燥,磨成粉末,过 40 目筛,装于密封袋中,冷藏备用。真空冷冻干燥机(沈阳北冰洋食品工程有限公司 GZS1.0),加速溶剂萃取仪(美国戴安公司 ASE-300),高效液相色谱-质谱联用仪(岛津公司 LCMS-IT/TOF)。

1.2 试验方法

1.2.1 花色苷的加速溶剂萃取 准确称取紫山药样品粉末 2.0000~2.001 g,装进 33 mL 型萃取池中(装紫山药样品前,先在萃取池底部填加少量石英砂,将称好的样品装进萃取池后再添加少量石英砂,总体积约占萃取池体积的 2/3,最后将石英砂和样品搅拌均匀)。萃取剂是 0.1% 盐酸-甲醇溶液。

1.2.2 花色苷的常规提取 准确称取紫山药样品粉末 2.0000~2.001 g,在室温常压下,用 0.1% 盐酸-甲醇溶液提取 12 h,过滤,滤液转移至 250 mL 容量瓶中,滤渣重复提取 2 次,最后合并滤液,定容。

1.2.3 花色苷相对含量的检测 将收集到的萃取液转移到旋转蒸发瓶中,在 35℃ 条件下旋转蒸发至干。用 0.01% 的盐酸水溶液溶解旋转蒸发瓶中的残留固体,并转移到 5 mL 容量瓶中定容,得到紫山药花色苷水溶液,放在 4℃ 冰箱中冷藏备用。取 1 mL 紫山药花色苷溶液至 1.5 mL 离心管中,在 12 000 r/min、4℃ 的条件下离心 40 min,取上清液用 0.45 μm 过滤膜过滤,所得紫山药花色苷溶液用于 HPLC 检测。

1.2.4 LCMS-IT-TOF 检测条件 色谱条件:色谱柱:150×4.6 mm i.d., 5UMSS Wakosil C18,柱温为 35℃,检测波长:250~600 nm;进样量:20 μL。流动相 A 为

第一作者简介:唐晓伟(1965-),女,硕士,副研究员,研究方向为蔬菜营养与健康及食品安全。E-mail:tangxiaowei@nrcv.org。
收稿日期:2011-06-28

甲酸:水=10:90(v/v),流动相 B 为甲酸:甲醇:乙腈:水=10:22.5:22.5:45(v/v)。质谱条件:毛细管温度 200℃,CDL 温度 200℃,ESI 正离子模式下的喷雾电压 4.5 kV;碰撞能量 20%~50%;氮气流速 1.5 L/min,检测器电压 1.75 kV。

1.2.5 正交实验设计 使用 ASE-300 加速溶剂萃取仪提取花色苷,仪器自带可以改变的因素及其范围:温度(0、40~200℃)、静态时间(1~99 min)、循环次数(1~5 次)、冲洗体积(0%~150%)、萃取池体积(33、100 mL)。考虑到花色苷在高温下会降解,所以提取温度控制在 100℃ 以下,而且仪器对温度控制的精确度决定各温度水平间相差应该在 10℃ 以上,该试验选定温度间隔为 20℃;为了节省时间,参照该仪器一般提取所需静态时间,将静态时间设定在 5 min 以下;循环次数最多可以设定 5 次,参照该仪器一般提取所需循环次数,设定在 4 次以下;考虑到接收瓶的容量,冲洗体积(最大 150%)设定在 120% 以下,只选择体积为 33 mL 规格的萃取池(各因素、水平如表 1)。采用正交实验助手 V3.1 专业版软件选取 $L_{16}(4^5)$ 拟合水平法安排实验(表 1、2)。根据实验设计的方案,按照表 1 中的方法依次萃取,2 次重复。所得花色苷溶液按照 1.2.4 中的方法检测得紫山药色谱图(图 1),参照鉴定结果选定各峰,并计算总的峰面积(S)。以归一化值(Normalized value)为试验指标,考察各试验提取率的高低,计算公式如下:归一化值(%)=($S_{\text{加速溶剂萃取}}/S_{\text{常规提取}}$) $\times 100$ 。均值、标准差及方差分析等使用 Spss 16.0 统计软件进行。

表 1 正交实验因素和水平

水平	因 素				
	A 温度/℃	B 静态时间/min	C 循环次数/次	D 吹扫体积/%	E 空白列
1	40	2	1	60	1
2	60	3	2	80	1
3	80	4	3	100	1
4	100	5	4	120	1

表 2 正交实验设计

试验编号	A(温度)	B(时间)	C(循环次数)	D(吹扫体积)	E(空白列)
4	40	5	4	120	1
5	60	2	2	100	1
6	60	3	1	120	1
7	60	4	4	60	1
8	60	5	3	80	1
9	80	2	3	120	1
10	80	3	4	100	1
11	80	4	1	80	1
12	80	5	2	60	1
13	100	2	4	80	1
14	100	3	3	60	1
15	100	4	2	120	1
16	100	5	1	100	1

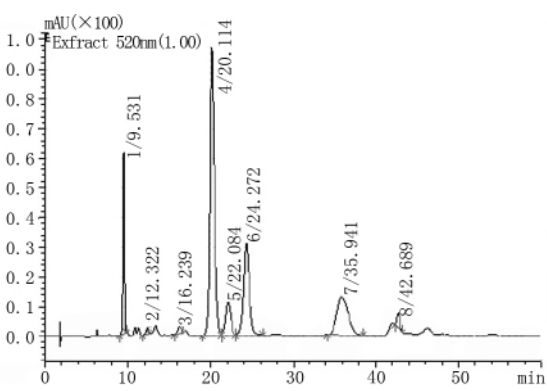


图 1 紫山药花色苷 HPLC-DAD 色谱图(520 nm)

2 结果与分析

影响紫山药花色苷提取率的因素很多,该试验采取常规的材料预处理方法处理紫山药样品,主要考察 ASE-300 加速溶剂萃取仪提取花色苷的最优条件,所以选取仪器自带的几项可变参数,在仪器允许的范围内,并结合紫山药花色苷的特点进行试验设计,选取温度、静态时间、循环次数、冲洗体积等因素进行试验。由于花色苷不稳定,种类较多,标准品难以保存等不便,该试验采用高效液相色谱分离技术,通过统计色谱图中花色苷总的峰面积代表紫山药中花色苷的含量,以花色苷的加速溶剂萃取与常规提取峰面积的比值(即归一化值)为试验指标研究各因素对提取率的影响。

由表 3 可知,所有试验的归一化值都在 150% 以上,充分说明加速溶剂萃取技术比常规提取技术的提取率要高。再从提取花费的时间、所消耗的溶剂等方面考察,加速溶剂萃取技术更是占有很大优势,所以,加速溶剂萃取技术在花色苷提取方面将有很广阔的发展前景。由表 3 可知,极差值 RA、RB、RC、RD、RE 由大到小排列为 RA>RC>RD>RE>RB,由此可知,温度对紫山药花色苷的提取率影响最大,不同温度下紫山药花色苷的提取率有显著差别(表 4),温度是影响紫山药花色苷提取率的主因素,结合效应曲线图(图 2)可以发现,温度从 40℃ 上升到 80℃ 时,提取效率逐渐提高,从 80℃ 到 100℃ 时,提取率逐渐下降,在图 2 中,80℃ 是提取率的最高点,说明 80℃ 是最佳的提取温度;紫山药花色苷对温度比较敏感,当温度超过 80℃ 时将会发生降解,导致花色苷含量的降低。

另外循环次数、冲洗体积对紫山药花色苷的提取率影响也比较大,而静态时间对花色苷提取效果影响不大,空白列代表的不确定因素对花色苷提取也有一定影响。由于所称样品的质量相同、萃取池大小相同,所以冲洗体积的不同实际上反映的是不同的物料比对提取率的影响,由效应曲线图可以看出,提取率从冲洗体积 100% 开始上升,60%、80%、100% 时提取率基本相同,说明该试验中紫山药样品量与冲洗体积之间的

比例偏高,不利于对冲洗体积这一因素的考察,应该适当减少称样量,称样量还有待后续试验的不断摸索。

均值 1、均值 2、均值 3、均值 4 分别代表各因素的 4 个水平,由表 3 及图 2 可知,不同温度下提取效果由高到低排列依次是: A3>A2>A4>A1;不同循环次数对提取效果的影响由高到低排列依次是: C4>C3>C1>C2;不同冲洗体积对提取效果的影响由高到低排列依次是: D4>D2>D1>D3;不同静态时间对提取效果的影响由高到低排列依次是: B1>B2>B3>B4。所以紫山药花色苷最优提取条件就是 A3C4D4B1,即 80℃、4 次循环、120%吹扫体积、2 min。

表 3 正交实验结果

所在列	因 素					归一化值
	A	B	C	D	E	/%
1	1	1	1	1	1	153.9863
2	1	2	2	2	2	154.8747
3	1	3	3	3	3	155.3361
4	1	4	4	4	4	175.4989
5	2	1	2	3	4	175.5585
6	2	2	1	4	3	197.1004
7	2	3	4	1	2	205.1634
8	2	4	3	2	1	187.8583
9	3	1	3	4	2	219.108
10	3	2	4	3	1	205.4151
11	3	3	1	2	4	183.5659
12	3	4	2	1	3	178.9487
13	4	1	4	2	3	174.0157
14	4	2	3	1	4	161.2018
15	4	3	2	4	1	163.3299
16	4	4	1	3	2	160.6016
均值 1	159.924	180.667	173.814	174.825	177.647	
均值 2	191.42	179.648	168.178	175.079	184.937	
均值 3	196.759	176.849	180.876	174.228	176.35	
均值 4	164.787	175.727	190.023	188.759	173.956	
极差 R	36.835	4.94	21.845	14.531	10.981	

表 4 正交实验方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
温度	4 132.546	3	3.373	3.29	*
静态时间	64.493	3	0.053	3.29	
循环次数	1 066.526	3	0.871	3.29	
冲洗体积	593.632	3	0.485	3.29	
萃取池体积	268.481	3	0.219	3.29	
误差	6 125.68	15			

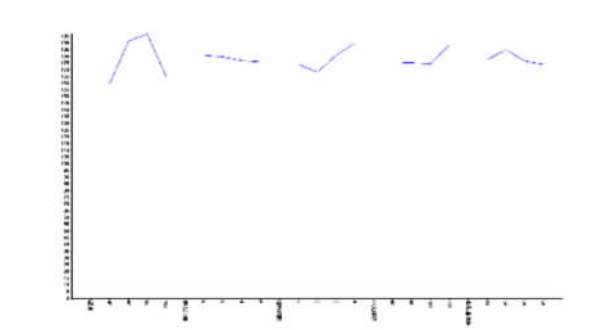


图 2 正交实验结果效应

3 结论

采用加速溶剂萃取技术结合正交实验研究确定了紫山药花色苷的最佳提取条件为:温度 80℃,循环提取 4 次,冲洗体积 120%,静态时间 2 min。其中影响提取效率的主要因素是温度,所设定 4 个水平之间,提取效率呈现显著的差异,80℃的提取温度是提取效率上升与下降的分水岭,80℃以上的温度,将会加快紫山药花色苷的降解速率,从而影响紫山药花色苷的提取效率。ASE 与常规溶剂提取法相比,对紫山药花色苷的提取具有如下显著特点:时间短、溶剂少、萃取效率高,有重要应用价值。

参考文献

- [1] 叶明立,朱岩. ASE 加速溶剂萃取技术在食品、农残方面的分析应用[J]. 现代科学仪器,2003(1):35-37.
- [2] 喻凌寒,宋之光,陈江韩,等. 快速溶剂萃取反相高效液相色谱法测定青蒿中的青蒿素[J]. 分析试验室,2006(8):68-71.
- [3] 刘平怀,刘洋洋,时杰,等. 加速溶剂萃取(ASE)技术提取海南罗布麻活性成分[J]. 精细化工,2009,26(11):1120-1123.
- [4] Giusti M M, Wrolstad R E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems[J]. Biochemical Engineering, 2003, 14(3):217-225.
- [5] 陈军辉,杨佰娟,李文龙,等. 加速溶剂萃取技术在中药有效成分分析中的应用[J]. 色谱,2007,25(5):628-632.
- [6] 赵保成,王艳玲,孙明山,等. 加速溶剂萃取技术在检测分析中的应用[J]. 农业与技术,2009,29(6):85-87.
- [7] Papaefstathiou G, Polychronopoulos P, Aligiannis N, et al. Comparative study of accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction of total phenolics and flavonoids from *Sideritis raeseri* subsp. *attica* and study of antioxidant activity[J]. Poanta Medica, 2008, 74(9):1122.
- [8] 宋文斌,代英成,许敏,等. 加速溶剂萃取—液相色谱—紫外检测法测定人参中多种人参皂甙含量[J]. 现代科学仪器,2009(6):104-108.
- [9] Arapitsas P, Sjöberg P J R, Turner C. Characterisation of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2008, 109:219-226.
- [10] Murat Gizir A, Nuzhet Turker, Erdem Artuvan. Pressurized acidified water extraction of black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) anthocyanins[J]. Eur Food Res Technol, 2008, 226:363-370.

桔梗雄性不育种质的杂种优势初探

李美善¹, 严一字¹, 朴雪梅², 吴松权¹, 吴基日¹, 李贞姬³

(1. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边农业科学研究院, 吉林 龙井 133400; 3. 龙井市开山屯镇农业技术推广站, 吉林 龙井 133417)

摘要:为了探讨桔梗雄性不育种质的利用前景, 将供试的桔梗雄性不育材料与 10 个正常可育材料杂交, 获得 10 个组合的 F_1 , 对 F_1 及 P_1 和 P_2 分析株高等 8 个主要农艺性状杂种优势。结果表明: 杂种优势在各组合间及各性状间有很大的差异, 杂种优势最高组合 8 个性状的平均优势为 49.40%; 最小组合为 13.60%; 10 个组合平均杂种优势最高的性状是单根鲜重, 为 41.80%, 最小的性状是主根长, 为 18.05%; 2 个性状间杂种优势的相关性达到极显著水平的有株高与茎粗、茎部鲜重与侧根数, 达到显著水平的有株高和根长、株高与侧根数、单根鲜重与茎粗以及单根鲜重与侧根数。该研究旨在为杂种优势在桔梗生产中的利用提供参考依据。

关键词:桔梗; 雄性不育; 种质资源; 杂种优势

中图分类号:S 503.51; S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)18-0147-03

桔梗 (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC) 为桔梗科桔梗属植物, 其根为著名的中药材, 具有宣肺、祛痰、散寒、镇咳、消肿、排脓等功效^[1]。桔梗根还可以制成美味的菜肴, 是中国东北地区及日本、韩国、朝鲜等东亚国家常用蔬菜之一^[2]。

现代农业生产对杂种优势的利用已成为提高产量和品质的重要措施, 在有性繁殖植物中利用杂种优势的基础在于发现该植物的雄性不育种质。在高等植物中雄性不育是一种很普遍的遗传现象, 到目前为止, 已在 43 科 162 属 297 个种中发现雄性不育种质的存在^[3]。吴基日等^[4]于 2006 年发现 1 株桔梗雄性不育种质, 经花药发育及小孢子发生过程的观察, 认为雄性不

育花粉的败育主要发生小孢子发育时期, 绒毡层细胞过早解体, 因而小孢子发育中途停止是桔梗雄性不育花粉败育的主要原因^[4]。通过该桔梗雄性不育种质遗传模式的研究表明, 桔梗雄性不育性属于质核互作不育类型, 用作物育种学常用的三系配套法加以利用杂种优势是可行的。

该研究利用供试的桔梗雄性不育种质与 10 种正常可育种质杂交的 F_1 及其亲本, 用分析杂种优势的方法来探讨桔梗雄性不育种质的利用前景, 旨在为桔梗杂种优势在生产中的利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

桔梗雄性不育种质(三合野生)与金科 1 号等 10 个杂交组合的 F_1 及各组合的亲本列于表 1。

1.2 试验方法

于 2008 年夏季用人工套袋方法配制杂交组合的同时进行父本的自交, 秋季收获种子。杂种优势的测定在延边大学农学院桔梗试验田里进行, 试验地为沙

第一作者简介: 李美善 (1964-), 女, 吉林龙井人, 本科, 高级实验师, 现从事中草药遗传育种及栽培研究工作。

责任作者: 严一字 (1964-), 女, 博士, 副教授, 现从事植物遗传育种研究工作。E-mail: yiziyi@yahoo.com.cn。

基金项目: 吉林省科技引导计划资助项目 (吉科合字 20080570); 延边大学科技发展计划资助项目 (延大科合字 (2008) 第 03 号)。

收稿日期: 2011-06-11

Extraction of Anthocyanin in Purple Yam by Accelerated Solvent

TANG Xiao-wei, HE Hong-ju, SONG Shu-hui, WANG Wen-qi, GAO Hua-jie
(Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

Abstract: The influence of temperature, cycling time, the solvent volume and stable time on the extraction efficiency of anthocyanin in Purple yam were discussed by the method of accelerated solvent extraction using orthogonal experiments and the analysis of variance. The results showed that the separation and identify by HPLC, the best extraction condition was at 80°C, cycling four times, 120% washing solvent and keeping 2 min. Meanwhile, the most important factor on extraction efficiency was the temperature. This technology had the advantage of saving time, little solvent consumption, high extraction efficiency etc, and would be developed in the future.

Key words: Purple yam; anthocyanin; ASE