

# 桂西野生蕨菜黄酮提取工艺优化研究

张婷婷, 马 博, 李荣峰, 苏仕林

(百色学院 化学与生命科学系, 广西 百色 533000)

**摘 要:**以产自广西乐业的野生蕨菜为试材,在考察单因素对蕨菜黄酮提取效率影响的基础上,运用正交实验优化了蕨菜黄酮的提取工艺。结果表明:影响蕨菜黄酮提取因素大小依次为回流温度、乙醇浓度、液料比及回流时间;最佳提取工艺条件为回流温度 90℃,乙醇浓度 50%(V/V),液料比 55:1(V/m),回流时间 2.0 h;在该条件下,蕨菜黄酮提取率达 7.29%。

**关键词:**蕨菜;黄酮;回流提取;正交实验

**中图分类号:**R 284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)16-0163-03

蕨菜为蕨类植物蕨(*Pteridium aquilinum* (L.) var. *latiusculum*)处在拳卷期的幼苗,是典型的药食两用植物。作为绿色保健食品,其营养丰富,含有萜类、胡萝卜素、甾体及有机酸等活性成分和多种矿质元素,具有抑菌、抗氧化、抗肿瘤、降血脂及免疫调节等多种药理作用,可用于治疗高血压、糖尿病、湿热黄疸、风湿性关节炎等症状<sup>[1-6]</sup>。此外,蕨菜还富含包括紫萁云苔、山奈酚、槲皮素及槲皮素在内的黄酮类物质<sup>[5,7]</sup>。然而,蕨菜季节性较强,采后易褐变、老化变质,保鲜较为困难,且当前蕨菜产业还不成熟,其产品科技含量低,蕨菜资源的潜在价值还未充分挖掘<sup>[8]</sup>。为了促进蕨菜资源的深度开发和精深加工,该试验以蕨菜黄酮提取率为目标,在单因素试验的基础上,采用 SPSS 13.0 软件设计 4 因素 3 水平正交实验,优化蕨菜黄酮提取工艺,以期对蕨菜资源综合利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

蕨菜:产自广西百色乐业县;芦丁(国药集团化学试剂有限公司)、氢氧化钠(广州市东红化工厂)、九水合硝酸铝和亚硝酸钠(广东省化学试剂工程技术研究开发中心)、无水乙醇(天津市福晨化学试剂厂)、石油醚(天津市富宇特精细化工有限公司),以上试剂均为分析纯。

**第一作者简介:**张婷婷(1984-),女,硕士,讲师,研究方向为食品生物技术。

**责任作者:**苏仕林(1962-),男,副教授,研究方向为生物多样性及其资源化利用。

**基金项目:**广西高等学校特色专业及课程一体化建设资助项目(GXTSZY224);广西教育厅科研基金资助项目(201203MS171);百色学院科研资助项目(2010KB12;2011KA01;2012KA01)。

**收稿日期:**2013-04-15

**仪器与设备:**721 型分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);FA2004 电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);HH-S2 数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);DHG-9146A 型鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);LD-200 中药粉碎机(长沙市常宏制药机械设备有限公司)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 工艺流程** 鲜蕨菜清洗、沥干→60℃干燥→粉碎过筛→回流提取→提取液离心,上清液真空减压浓缩,定容。

**1.2.2 黄酮标准曲线的制作** 称取对照品芦丁 10 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加入适量 30%乙醇溶液,超声溶解并定容;准确量取 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 芦丁对照品溶液置于 25 mL 容量瓶中,加入 5%亚硝酸钠 1.0 mL,摇匀静置 6 min;加入 10%九水合硝酸铝 1 mL,摇匀静置 6 min,再加 4%氢氧化钠 10 mL,用 30%乙醇定容至刻度,放置 15 min 后,以空白试剂为参比液,于 510 nm 下测其吸光度;以吸光度为纵坐标,以芦丁标准液浓度为横坐标,绘制标准曲线。芦丁标准曲线回归方程: $Y_1 = 0.3641X - 0.0002$  ( $R^2 = 0.9988$ ),式中, $Y_1$  为吸光度, $X$  为芦丁浓度(mg/mL)。

**1.2.3 蕨菜样品中黄酮测定** 吸取样品液 1.0 mL,置于 25 mL 容量瓶中,按 1.2.2 方法,在 510 nm 下测定其吸光度,根据方程  $Y_1$  计算提取液中总黄酮质量浓度,带入方程  $Y_2$  计算黄酮提取率: $Y_2 = (A \times B \times V/W) \times 100\%$ ,式中, $Y_2$  为蕨菜黄酮提取率; $A$  为提取液中黄酮浓度(mg/mL); $B$  为提取液的稀释倍数; $V$  为提取液体积(mL); $W$  为蕨菜干粉质量(g)。

**1.2.4 单因素试验** 乙醇浓度对蕨菜黄酮提取率的影响:在液料比 25:1 mL/g,70℃下回流提取 2 h,考察乙醇浓度(30%、40%、50%、60%、70%、80%)对蕨菜黄酮提取率的影响。回流温度(50、60、70、80、85、90℃)对蕨

菜黄酮提取率的影响:在液料比 25 : 1 mL/g, 50% 的乙醇浓度下回流 2 h, 考察提取温度对蕨菜黄酮提取率的影响。液料比对蕨菜黄酮提取率的影响:在提取溶剂乙醇浓度 50%, 85℃ 下回流提取 2 h, 考察液料比 (25 : 1、30 : 1、40 : 1、45 : 1、50 : 1、55 : 1、60 : 1 mL/g) 对蕨菜总黄酮提取率的影响。回流时间对蕨菜黄酮提取率的影响:在液料比 50 : 1 mL/g, 提取溶剂乙醇浓度 50%, 85℃ 下回流提取蕨菜黄酮, 考察回流时间 (1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h) 对蕨菜总黄酮提取率的影响。

1.2.5 正交实验优化 在单因素试验的基础上, 确定不同浓度乙醇、回流温度、液料比和回流时间的最优组合, 试验因素及水平见表 1。

表 1 正交实验因素及水平

因素	1	2	3
A: 乙醇浓度/%	40	50	60
B: 回流温度/℃	80	85	90
C: 液料比/mL · g <sup>-1</sup>	45	50	55
D: 回流时间/h	2	2.5	3

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇浓度对蕨菜黄酮提取率的影响 由图 1 可知, 蕨菜黄酮提取率随着乙醇浓度的增加, 先增大后降低; 乙醇浓度为 50% 时, 其最大提取率为 4.23%。提高乙醇浓度, 提取剂对物料的渗透力增加, 一些配基极性较弱的黄酮苷类容易析出, 但同时一些醇溶性和脂溶性物质溶出量也会增加, 达到一定阈值后, 这些物质与蕨菜黄酮竞争性结合乙醇-H<sub>2</sub>O 分子, 使溶液粘度和传质阻力变大, 蕨菜黄酮向主体溶剂的扩散速度减缓, 导致蕨菜总黄酮提取率下降。

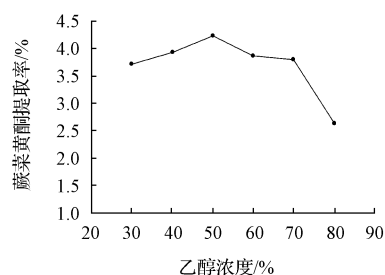


图 1 乙醇浓度对蕨菜黄酮提取率的影响

2.1.2 回流温度对蕨菜黄酮提取率的影响 由图 2 可知, 随着温度的上升, 蕨菜黄酮在提取溶剂中的溶解度和扩散系数增大, 提取溶剂的渗透力增强, 而使蕨菜总黄酮提取率逐渐增加; 但当温度在 90℃ 时, 蕨菜黄酮提取率明显下降, 可能是由于温度过高, 蕨菜黄酮氧化导致, 故选取 85℃ 为最适提取温度。

2.1.3 液料比对蕨菜黄酮提取率的影响 由图 3 可知,

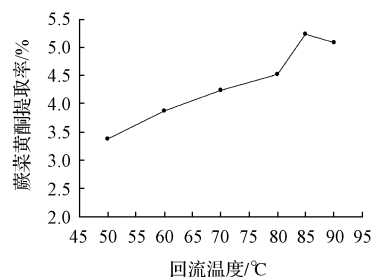


图 2 回流温度对蕨菜黄酮提取率的影响

蕨菜黄酮提取率随着液料比的增加, 先逐渐增大, 液料比超过 50 : 1 mL/g 后趋于平稳。因为提取溶剂倍数的增大, 蕨菜粉末与溶剂之间的接触面积增大, 且物料体系和提取溶剂体系之间的黄酮浓度差提高, 从而提高了蕨菜总黄酮提取率, 但达到一定比值后, 蕨菜粉末中的黄酮基本溶出, 故提取率增加不明显。考虑到提取成本和后续的蕨菜总黄酮浓缩、纯化等精制工序, 选取 50 : 1 mL/g 为最佳液料比。

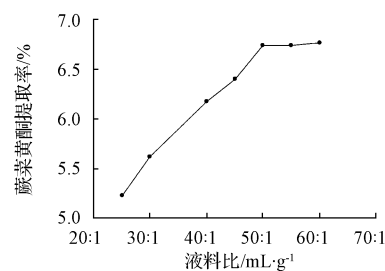


图 3 液料比对蕨菜黄酮提取率的影响

2.1.4 回流时间对蕨菜黄酮提取率的影响 由图 4 可知, 回流时间在 2.5 h 时, 蕨菜黄酮的提取率最大, 为 7.14%; 回流时间超过 2.5 h 后, 蕨菜黄酮提取率随时间增加而下降, 这可能是由提取溶剂中的热不稳定黄酮降解或转化而造成的。

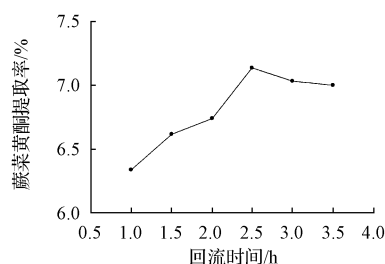


图 4 回流时间对蕨菜黄酮提取率的影响

### 2.2 正交实验结果

由表 2 正交实验直观分析的极差可知, 影响蕨菜黄酮得率的主次因素依次为: 回流温度 > 乙醇浓度 > 液料比 > 回流时间, 而 SPSS 统计学软件对正交实验分析得出类似结果。由表 3 可知, 因素回流温度贡献的离差平方和和均方均最大, 为 10.435 和 5.217; 其次为提取溶剂

乙醇的浓度,分别为 2.993 和 1.496;再次为液料比,分别为 0.837 和 0.419;最后为回流时间,分别为 0.007 和 0.004; $F$  值依次为 431.701、123.804、34.645 和 0.296;回流温度、乙醇浓度和液料比 3 个因素对蕨菜黄酮提取率有极显著影响。另外,有正交实验直观分析表还可看出,蕨菜黄酮最佳提取工艺为: $B_3A_2C_3D_2$ ,即回流温度  $90^{\circ}\text{C}$ ,乙醇浓度 50%,液料比为 55:1 mL/g,回流时间 2.5 h。但由于回流时间对蕨菜黄酮提取没有显著影响,考虑到经济、节能、省时等因素,回流时间取 2.0 h。

表 2 正交实验直观分析

实验号	因素				黄酮提取率/%	
	A	B	C	D	重复I	重复II
1	40	80	45:1	2.0	4.93	5.05
2	40	85	50:1	2.5	6.97	6.80
3	40	90	55:1	3.0	7.20	7.11
4	50	80	50:1	3.0	5.29	5.53
5	50	85	55:1	2.0	7.24	7.17
6	50	90	45:1	2.5	6.71	6.91
7	60	80	55:1	2.5	4.70	4.79
8	60	85	45:1	3.0	5.82	5.64
9	60	90	50:1	2.0	6.15	6.21
$K_1$	19.03	15.15	17.53	18.38		
$K_2$	19.43	19.82	18.48	18.44		
$K_3$	16.66	20.15	19.11	18.30		
$k_1$	6.34	5.05	5.84	6.13		
$k_2$	6.48	6.61	6.16	6.15		
$k_3$	5.55	6.72	6.37	6.10		
$R$	0.93	1.67	0.53	0.05		

表 3 正交实验方差分析

变异来源	离差平方和	自由度	均方	$F$ 值	Sig.
Corrected Model	14.274*	9	1.586	131.230	**
Intercept	674.902	1	674.902	55842.753	**
乙醇浓度	2.993	2	1.496	123.804	**
回流温度	10.435	2	5.217	431.701	**
液料比	0.837	2	0.419	34.645	**
回流时间	0.007	2	0.004	0.291	
重复组	0.002	1	0.002	0.186	
Error	0.097	8	0.012		
Total	689.272	18			
Corrected Total	14.371	17			

注: a;  $R$  Squared = 0.993 (Adjusted  $R$  Squared = 0.986); \*\* 为极显著, Sig. < 0.05。

### 2.3 验证试验

为了验证正交实验优化工艺的可靠性,取 10.0 g 蕨菜粉,用 50%乙醇,液料比 55:1 mL/g,在  $90^{\circ}\text{C}$  下回流时间 2.0 h,提取蕨菜黄酮,重复 3 次。结果显示,蕨菜黄酮提取率平均为 7.29%,略高于正交实验中的最高组,说明正交实验优化得到的提取工艺切实可行。

### 3 结论

蕨菜作为一种广受欢迎的绿色天然食品,分布广阔,资源蕴藏量大,营养丰富,具有巨大的经济价值,开发前景广阔。该研究以产自广西乐业的野生蕨菜为试验材料,在单因素试验的基础上,采用正交实验优化了蕨菜总黄酮提取工艺条件。在最佳的提取工艺:乙醇浓度 50%、液料比 55:1 mL/g,回流温度  $90^{\circ}\text{C}$ ,回流提取 2.0 h,蕨菜总黄酮提取率为 7.29%。该试验结果可为蕨菜功能食品和保健品开发提供参考。

#### 参考文献

- [1] Park J H, Kim R Y, Park E. Antidiabetic activity of fruits and vegetables commonly consumed in Korea; inhibitory potential against  $\alpha$ -glucosidase and insulin-like action *in vitro* [J]. Food Sci Biotechnol, 2012, 21 (4): 1187-1193.
- [2] Xu W T, Zhang F F, Luo Y B, et al. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum* [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344: 217-222.
- [3] Rajyalakshmi P, Venkatalaxmi K, Venkatalakshamma K, et al. Total carotenoid and beta-carotene contents of forest green leafy vegetables consumed by tribals of south India [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2001, 56: 225-238.
- [4] Borah S, Baruah A M, Arup K D, et al. Determination of mineral content in commonly consumed leafy vegetables [J]. Food Anal Methods, 2009, 2: 226-230.
- [5] 马博, 苏仕林, 李荣峰. 蕨菜化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(3): 245-247.
- [6] 李南薇, 范媛媛, 陈家生. 蕨菜抑菌活性物质提取工艺优化 [J]. 食品科技, 2012, 37(5): 240-243.
- [7] 陈乃富. 蕨菜黄酮类化合物的提取及其抗氧化作用 [J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(11): 63-66.
- [8] 苏仕林. 蕨菜贮藏保鲜与产品开发研究现状 [J]. 食品研究与开发, 2012, 33(10): 216-219.

## Study on the Optimization of Extraction Technology of Flavonoids from Wild *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum* in Western Guangxi

ZHANG Ting-ting, MA Bo, LI Rong-feng, SU Shi-lin

(Department of Chemistry and Life Science, Baishan College, Baishan, Guangxi 533000)

**Abstract:** Taking wild *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum* from western Guangxi as material, the extraction technology of flavonoids from it was optimized by orthogonal experiment based on the influence of single factor. The results showed that the importance of effect factor for extracting flavonoids were extraction temperature, ethanol content, liquid to solid ratio, and extraction time by turns; and the optimum extraction conditions were as follows: 50% ethanol (V/V), extraction temperature  $90^{\circ}\text{C}$ , liquid to solid ratio 55:1 (V/m), extraction time 2.0 h; under these conditions, the yield of flavonoids was up to 7.29%.

**Key words:** *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*; flavonoids; reflux extraction; orthogonal experiment