

# 正交实验优选向日葵叶片提取总黄酮的研究

孙海燕, 郭伟

(黑龙江八一农垦大学, 黑龙江 大庆 163319)

**摘 要:**以向日葵叶片为试材,采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法,以芦丁作为标准品,采用分光光度法测定了向日葵总黄酮的含量,并进行了精密度和加标回收试验,比较不同提取工艺以期优选出向日葵总黄酮的最佳提取工艺。结果表明:向日葵叶片中总黄酮最佳提取工艺为乙醇浓度 60%,提取时间为 3 h,提取温度为 80℃。

**关键词:**向日葵;叶片;总黄酮;正交实验

**中图分类号:**S 565.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0016-03

向日葵(*Helianthus annuus*)属菊科向日葵属 1a 生草本植物,亦称葵花。株高 1~3 m,茎直立,粗壮,圆形多棱角,被白色粗硬毛,瘦果,倒卵形或卵状长圆形,稍扁压,果皮木质化,灰色或黑色,俗称葵花子。

黄酮类化合物是指具有色酮环与苯环为基本结构的一类化合物的总称。是植物光合作用产生的一类天然有机物,也是普遍植物的次级代谢产物,它可以分为黄酮类、黄酮醇类、异黄酮类、黄烷酮类等<sup>[1]</sup>。目前已发现有 2 000 余种植物含有黄酮类化合物。目前,人们对提取分离出具有较高生物活性的黄酮类化合物研究表现出极大的关注<sup>[3]</sup>。研究表明,黄酮类化合物具有多种生物活性,可用于抗菌、消炎、抗突变、降压、清热解毒、镇静、利尿等,在抗氧化、抗癌、防癌、抑制脂肪酶等方面也有显著效果<sup>[4-6]</sup>,还具有软化血管,防止动脉硬化的功能<sup>[6-7]</sup>。

黄酮类化合物一般难溶于水,易溶于乙醇、甲醇、乙酸乙酯、乙醚等有机溶剂。现已经探寻出多种黄酮类化合物的提取条件,有热水提取法、有机溶剂萃取法、碱性水提法、超声提取法及微波法等<sup>[2]</sup>。黄酮类化合物的含量测定有 HPLC、薄层扫描法、示波滴定法、分光光度法等<sup>[8]</sup>。该试验采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法,即利用黄酮类化合物与铝盐反应生成红色络合物,以芦丁作为标准品<sup>[9]</sup>,采用分光光度法,以向日葵总黄酮的含量为考察指标,进行精密度和加标回收试验,并对向日葵的不同提取工艺进行了比较,以期优选出向日葵总黄酮的最佳提取工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试 2 种向日葵种子来源于内蒙古,分别为食用“三道眉”和油用“墨葵”,盆栽试验 40 d 后分别取叶片,晾晒后置 70℃烘箱中烘干,粉碎后装入封口袋并置于干燥器中备用。

仪器与试剂: TU-1901 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、水浴锅(上海亚荣生化仪器厂)、芦丁(中国药品生物制品鉴定所)、石油醚、乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等试剂均为分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 样品的制备 精密称取干燥的向日葵叶片粉末 1 g(精确至 0.001 g),用石油醚脱脂,至提取液无色,弃去醚液,挥干,加入一定浓度的乙醇,水浴提取,然后转移到 100 mL 容量瓶,用乙醇溶解、定容,作为供试样品溶液。

1.2.2 波长的选择 将标准溶液和样品溶液以乙醇为空白对照,进行紫外可见扫描。结果表明,样品溶液和标准溶液均在 510 nm 处有最大吸收峰,因此选定 510 nm 为测定波长。

1.2.3 标准曲线的制定 精密称取芦丁标准品 13 mg,用乙醇溶解,定容于 50 mL 容量瓶中摇匀,得 0.26 mg/mL 溶液,精确吸取标准溶液 0、1、2、3、4、5、7 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,用乙醇稀释至 7 mL,加入 5% NaNO<sub>2</sub> 1 mL,摇匀,放置 5 min;加入 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 1 mL,摇匀,放置 5 min;加入 4% NaOH 10 mL,再加乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15 min。以试剂空白作为参比溶液。用 1 cm 比色皿,在 510 nm 波长处测定吸光度。以芦丁标准品浓度  $x$  为横坐标,吸光度  $y$  为纵坐标,芦丁溶液的标准曲线见图 1,其回归方程是  $y = 12.513x - 0.0131$ ,  $r = 0.9994$ 。

**第一作者简介:**孙海燕(1979-),女,硕士,助理研究员,现主要从事农产品及食品分析和检测等的研究工作。E-mail:shysun7908@126.com.

**收稿日期:**2012-03-23

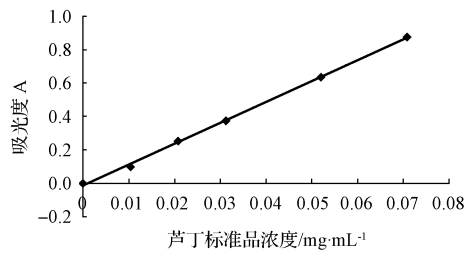


图 1 芦丁溶液的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of rutin solution

1.2.4 样品含量的测定 准确移取 5.0 mL 样品液到 25 mL 具塞刻度试管中,用乙醇稀释至 5 mL,加入 5% NaNO<sub>2</sub> 1 mL,摇匀,放置 5 min;加入 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>

1 mL,摇匀,放置 5 min;加入 4% NaOH 10 mL,再加乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15 min。以试剂空白作为参比溶液。用 1 cm 比色皿,在 510 nm 波长处测定吸光度。2 次重复。利用标准曲线计算样品总黄酮的含量。样品总黄酮含量(mg/g)=Y×V<sub>1</sub>/W×V,式中:Y 为从回归方程求得芦丁量(mg),V<sub>1</sub>为样品溶液总积(mL);V 为测定时取样体积(mL);W 为样品重(g)。

1.2.5 精密度和回收率试验 分别量取油用、食用向日葵样品提取液 5 mL 样品于具塞刻度试管中,进行加标回收试验,计算样品中总黄酮含量和相对标准偏差(表 1)。

表 1 样品中总黄酮回收率和精密度(n=5)

Table 1 Recovery and precision of total favonoids in sample(n=5)

序号 No.	食用葵 Edible sunflower					油用葵 Oilseed sunflower				
	加标量 Add content /mg·mL <sup>-1</sup>	初始量 Initial content/mg·mL <sup>-1</sup>	测定量 Measured content/mg·mL <sup>-1</sup>	回收率 Recovery/%	RSD /%	初始量 Initial content/mg·mL <sup>-1</sup>	测定量 Measured content/mg·mL <sup>-1</sup>	回收率 Recovery/%	RSD /%	
1	0.26	1.763	1.830	97.9	3.6	1.425	1.678	97.3	2.9	
2	0.52	1.763	2.29	101.3	3.2	1.425	1.954	101.7	3.4	
3	0.78	1.763	2.547	100.5	2.8	1.425	2.195	98.7	3.1	

2 结果与分析

2.1 向日葵总黄酮提取工艺设计

采用正交实验设计,以提取时间、提取温度和乙醇浓度为影响因素,以总黄酮提取量为指标,采用 3 因素 3 水平的正交表 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)进行试验,各因素和水平见表 2。

表 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验因素水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal test of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)

因素 Factors	A 乙醇浓度 Ethanol concentration/%	B 提取时间 Extracting time/h	C 提取温度 Extracting temperature/℃
1	40	2	60
2	60	3	70
3	70	4	80

2.2 正交实验结果

根据正交实验因素,芦丁标准曲线和样品的吸光度计算各水平中食用、油用向日葵中总黄酮含量、提取总量并进行方差分析,试验结果为 2 次平均值。

由表 3 中食用向日葵总黄酮提取量可知,A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub> 为最佳提取方案,即乙醇浓度 60%,提取时间 3 h,提取温度 80℃。由表 4 可知,因素 A、B、C 的 F 值均远远大于 F<sub>0.05</sub>、F<sub>0.01</sub> 的值,差异显著。因此,因素 A、B、C 即乙醇浓度、提取时间、处理温度对食用向日葵叶片总黄酮提取量的影响均为极显著。

由表 5 中油用向日葵总黄酮提取量可知,最佳提取方案为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>,即乙醇浓度 60%,提取时间 3 h,提取温度 80℃。由表 6 方差分析可知,因素 A、B、C 的 F 值均

远远大于 F<sub>0.05</sub>、F<sub>0.01</sub> 的值,差异极显著,因此,因素 A、B、C 即乙醇浓度、提取时间、处理温度对油用向日葵叶片总黄酮提取量的影响均为极显著。

表 3 食用向日葵正交实验设计及结果

Table 3 Orthogonal test and result of edible sunflower

试验号 No.	水平 Levels			总黄酮含量 Total flavonoid content/mg·g <sup>-1</sup>
	A	B	C	
1	1	1	1	8.823
2	1	2	2	9.124
3	1	3	3	8.964
4	2	1	2	11.387
5	2	2	3	18.564
6	2	3	1	10.605
7	3	1	3	14.627
8	3	2	1	13.893
9	3	3	2	11.468
K <sub>1</sub>	26.911	34.837	33.321	
K <sub>2</sub>	40.556	41.581	31.979	
K <sub>3</sub>	39.988	25.073	42.155	
$\bar{k}_1$	8.970	11.612	11.107	
$\bar{k}_2$	13.519	13.860	10.660	
$\bar{k}_3$	13.329	8.358	14.052	
R	4.548	5.503	3.392	
最佳方案	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	

表 4 食用向日葵试验方差分析结果

Table 4 Variance analysis result of edible sunflower

方差来源 Variance	SS	DF	MS	F	P
区组	0.148	1	0.148		
A	79.448	2	39.724	19.862	$F_{0.05}=3.98$
B	38.022	2	19.011	9.505.5	$F_{0.01}=7.20$
C	40.754	2	20.377	10.188.5	
误差	0.018	8	0.002		

表 5 油用向日葵正交实验设计及结果

Table 5 Orthogonal test and result of oilseed sunflower

试验号 No.	水平 Levels			总黄酮含量 Total flavonoid content/mg · g <sup>-1</sup>
	A	B	C	
1	1	1	1	7.105
2	1	2	2	8.216
3	1	3	3	7.432
4	2	1	2	10.114
5	2	2	3	15.396
6	2	3	1	9.301
7	3	1	3	12.589
8	3	2	1	11.072
9	3	3	2	10.365
K <sub>1</sub>	22.753	29.808	27.478	
K <sub>2</sub>	34.811	34.684	28.695	
K <sub>3</sub>	34.026	27.098	35.417	
$\bar{k}_1$	7.584	9.936	9.159	
$\bar{k}_2$	11.604	11.561	9.565	
$\bar{k}_3$	11.342	9.033	11.806	
R	4.019	2.529	2.646	
最佳方案	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	

表 6 油用向日葵试验方差分析结果

Table 6 Variance analysis result of oilseed sunflower

方差来源 Variance	SS	DF	MS	F	P
区组	0.248	1	0.248		
A	60.687	2	30.343	7.585.75	$F_{0.05}=3.98$
B	19.704	2	9.852	2.463	$F_{0.01}=7.20$
C	24.376	2	12.188	3.047	
误差	0.029	8	0.004		

### 3 结论与讨论

采用紫外分光光度法,以芦丁为标准对照品,测定向日葵叶片中总黄酮含量。采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交水平表进行筛选,从乙醇浓度、提取时间、提取温度 3 个因素确定最佳的提取工艺。结果表明,向日葵叶片中总黄酮最佳提取工艺为乙醇浓度为 60%,提取时间为 3 h,提取温度为 80℃。

向日葵中叶片含有较为丰富的黄酮类化合物,具有广泛的开发前景和利用价值,关于向日葵叶片中黄酮类化合物的分离、纯化有待进一步研究。

样品的前处理中,提取方法还有超声波提取、索氏提取等,该试验采用了乙醇-水浴提取方法,其它的提取方法还有待于进一步研究。

向日葵是一种药用价值较高的植物,但国内对其研究不是很深入。因此,试验下一步研究方向的重点将会放在向日葵根、茎、子粒等的应用价值。同时,不同时期叶片中总黄酮的含量是否存在显著差异,也将作为重要的研究内容之一。

### 参考文献

- [1] 宋慧,李勇. 黄酮类化合物的保健作用[J]. 中国食物与营养,2004(11):45-47.
- [2] 徐小丽,曹雁平. 超声技术在食品工业中的研究进展[J]. 食品科技,2006(7):12-16.
- [3] 毛杏飞,罗佳波. 白花蛇舌草中总黄酮提取分离工艺的研究[J]. 中药材,2002,25(7):499-500.
- [4] 马晓丽. 生物类黄酮的研究进展[J]. 山西职工医学院学报,2005,15(2):113-116.
- [5] 高中松,丁文,高亮,等. 超声波提取桑叶中总黄酮的工艺研究[J]. 中国农学通报,2006,24(4):122-125.
- [6] 林娇芬,林河通,谢联辉,等. 柿叶的化学成分、药理作用、临床应用及开发利用[J]. 食品与发酵工业,2005,31(7):90-96.
- [7] 陈光. 柿叶化学成分及生物活性的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2003.
- [8] 曹伟国,刘志勤,邵云,等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报,2003,23(12):2241-2247.
- [9] 杜进,郭磊,陶慧颖. HPLC 法测定银杏叶提取物中总黄酮含量[J]. 黑龙江医药,2005,15(6):426-427.

## Study on the Total Flavonoids Extrated from the Leaves of Sunflower by Orthogonal Test

SUN Hai-yan, GUO Wei

(Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319)

**Abstract:** Taking the leaves of sunflower as materials, total flavonoids in sunflower was determined by sodium nitrite-aluminum nitrate colorimetric with rutin as a standard substance. Precision and coefficient of recovery were discussed by studying total flavonoids content in sunflower, and different extraction process were compared in order to optimize optimum extraction process of total flavonoids content in sunflower. The results showed that the sunflower leaves flavonoids optimum extraction process were ethanol concentration 60%, extracting time 3 h, extraction temperature 80℃.

**Key words:** sunflower; leaf; total flavonoids; orthogonal test