

正交设计在红薯叶黄酮提取中的应用

李 光^{1,3}, 余 霜^{2,3}, 陈庆富³

(1. 安顺学院 化学与生物农学系, 贵州 安顺 561000; 2. 安顺学院 资源管理与环境科学系, 贵州 安顺 561000;

3. 贵州师范大学 生命科学院, 贵州 贵阳 550001)

摘 要:以“渝紫 263”红薯叶为试材, 采用六因素三水平正交实验设计提取红薯叶黄酮, 优选红薯叶黄酮的提取工艺。结果表明: 60% 的乙醇, 固液比 1: 20, 温度 40℃、20 min、提取 3 次、功率 187.5 W 为最佳提取方案; 该方案提取量稳定、方法简单、可行。

关键词:正交实验; 红薯叶; 黄酮; 提取

中图分类号:S 531 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)01-0041-02

红薯属旋花科 1a 生或多年生蔓生草本植物, 又称番薯、山芋、甘薯、地瓜等。红薯起源于墨西哥以及哥伦比亚、厄瓜多尔到秘鲁一带的热带美洲, 16 世纪末从南洋引入中国^[1]。在我国, 红薯是仅次于水稻、小麦和玉米的第四大粮食作物。红薯通常以食用块根为主, 我国每年有近亿吨的红薯茎叶(除部分地区作为饲料外)被抛弃掉, 造成极大的资源浪费和环境污染。所以, 对红薯藤叶进行资源化利用, 有较好的社会效益和经济效益。

黄酮类化合物是一类重要的天然有机化合物, 是植物在长期自然选择过程中产生的一类次生代谢产物。它能清除生物体内的自由基, 具有抗氧化作用^[2]。红薯叶富含黄酮, 有较好的开发利用前景。目前有关红薯黄酮的报道大多是关于普通红薯的, 有关紫薯叶黄酮含量的报道较少, 该研究以紫薯“渝紫 263”叶为原料, 优选红薯叶黄酮的提取工艺, 以期对紫色红薯的综合开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以红薯叶“渝紫 263”为试验材料, 采自贵州师范大学植物遗传育种研究所。

试验仪器: DHG-90A(101AB)干燥箱(上海索谱仪器有限公司); 紫外可见分光光度计 UV-1800(岛津公司); AR1140 电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司); WB-400 小型高速粉碎机(北京维博创机械设备有限公司);

TDL-5C 型低速台式离心(上海安亭科学仪器厂); AKJY-20 超纯净水机(艾柯); KQ-250DE 型数控超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司); PHS-3C 型; 酸度计(上海虹仪仪器有限公司)。

试验药剂: 芦丁标准品购自贵州迪大生物有限公司; NaNO₂、Al(NO₃)₃、NaOH、无水乙醇为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的绘制 准确称取 100 mg 芦丁标准品, 定容至 100 mL, 获得 1 mg/mL 芦丁标准品。用移液器吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 芦丁标准品置于 10 mL 容量瓶中, 用 60% 的乙醇补充至 5.0 mL, 分别加入 0.3 mL 5% 的 NaNO₂, 摇匀, 放置 6 min; 再依次加入 0.3 mL 10% 的 Al(NO₃)₃, 摇匀, 静置 6 min, 再分别加入 4 mL 1 mol/L 的 NaOH, 用 60% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 静置 20 min, 然后于 510 nm 下测吸光度^[3]。y = 0.101 7x - 0.013 9, R² = 0.999 3 (x 为吸光度值, y 为总黄酮提取液浓度, 单位为 mg/mL)。

1.2.2 黄酮含量的测定 准确吸取提取液 1 mL, 依次加入 4 mL 60% 的乙醇、分别加入 0.3 mL 5% 的 NaNO₂, 摇匀, 放置 6 min; 依次加入 0.3 mL 10% 的 Al(NO₃)₃, 摇匀, 静置 6 min, 再加入 4 mL 1 mol/L 的 NaOH, 用 60% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 静置 20 min, 510 nm 下测吸光度。

1.2.3 因素水平的选择 按照 L₁₈(3⁷) 正交实验表综合考虑酒精浓度、固液比、提取温度、提取时间、提取次数、提取功率对红薯黄酮提取的影响(表 1)。

表 1 因素水平

水平	因素					
	酒精浓度/%	固液比	温度/℃	时间/min	次数	功率/%
1	40	10	20	10	1	40
2	60	20	40	20	2	70
3	80	30	60	30	3	100

第一作者简介:李光(1980-), 男, 河南商丘人, 在读博士, 研究方向为作物遗传育种及天然产物提取。E-mail: lg20029@126.com。

责任作者:陈庆富(1966-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为作物遗传育种及天然产物提取。E-mail: cqf1966@163.com。

基金项目:贵州省农业攻关资助项目(黔科合 NY 字[2010]3014)。

收稿日期:2001-10-24

2 结果与分析

2.1 正交实验设计分析

取 100 g 红薯叶 60℃ 烘至恒重,粉碎后过 40 目,每次准确称取 3 g 干粉,每次获得的提取液 2 000 r/min 离心 1 min,合并提取液即为黄酮提取液,测定提取液的吸光度并换算黄酮含量,结果及极差分析见表 2, 方差分析见表 3。

由表 2、3 知,酒精浓度对试验结果有较显著的影响,因素 B、C、D、E、F 对提取结果无显著影响,各因素对提取的影响强弱依次是:酒精浓度>固液比>提取功率>提取次数>提取时间>提取温度。该研究确定的最佳提取条件为 $A_2B_2C_2D_2E_3F_2$,即使用 60% 的乙醇,固液比 1:20、提取温度 40℃、提取 20 min、提取 3 次、提取功率 70%(187.5 W)。

表 2 $L_{18}(3^7)$ 正交实验设计

因素	浓度(A)	固液比(B)	温度(C)	时间(D)	次数(E)	功率(F)	试验结果/%
1	1	1	1	1	1	1	0.276
2	1	2	2	2	2	2	1.381
3	1	3	3	3	3	3	0.505
4	2	1	1	2	2	3	0.291
5	2	2	2	3	3	1	1.900
6	2	3	3	1	1	2	0.767
7	3	1	2	1	3	2	0.010
8	3	2	3	2	1	3	0.006
9	3	3	1	3	2	1	0.286
10	1	1	3	3	2	2	0.495
11	1	2	1	1	3	3	0.673
12	1	3	2	2	1	1	0.858
13	2	1	2	3	1	3	0.360
14	2	2	3	1	2	1	0.988
15	2	3	1	2	3	2	1.657
16	3	1	3	2	3	1	0.202
17	3	2	1	3	1	2	0.017
18	3	3	2	1	2	3	0.202
均值 1	0.698	0.272	0.533	0.486	0.381	0.652	
均值 2	0.894	0.728	0.685	0.732	0.607	0.721	
均值 3	0.120	0.712	0.494	0.494	0.724	0.340	
极差	0.774	0.456	0.191	0.246	0.343	0.381	

表 3

方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
浓度/%	1.941	2	14.325	6.940	*
固液比	0.803	2	5.926	6.940	
温度/℃	0.122	2	0.900	6.940	
时间/min	0.235	2	1.734	6.940	
次数	0.367	2	2.708	6.940	
功率/W	0.496	2	3.661	6.940	
误差	0.27	4			

注: * 表示在 $\alpha=0.05$ 浓度具显著性。

2.2 验证试验

使用 60% 的乙醇,固液比 1:20、温度 40℃、20 min、提取 3 次、提取功率 70%(187.5 W)的提取条件进行 3 次验证试验,提取结果为 1.6902%。

3 讨论

比色法是被《中国药典》所采用的最常见的总黄酮测定方法,其中又以 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法常用^[4],约占总使用频率的 70%。其基本原理是以芦丁为标准品, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 络合体系显色,全波段扫描在 510 nm 处有最大吸收峰,测定其吸光度,以此来计算含量^[5]。该研究以紫薯“渝紫 263”的叶为原料,表明 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法适用于紫薯红薯叶黄酮的提取。

该研究综合考虑了乙醇浓度、固液比、提取温度、提取时间、提取次数、提取功率等 6 个因素对红薯黄酮提取的影响,解决了相关报道中提取因素水平较少,步骤繁琐的问题,进行的验证试验结果较稳定。与其它研究者的试验结果相比,因素水平全面、方法科学,步骤少,获得的提取工艺较为理想。

参考文献

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1979, 64(1):88-90.
- [2] 延玺,刘会青,邹永青,等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J]. 有机化学,2008,28(9):1534-1544.
- [3] 张岩,曹国杰,张燕,等. 黄酮类化合物的提取以及检测方法的研究进展[J]. 食品研究与开发,2008,29(1):154-158.
- [4] 国家药典委员会. 中国药典, I 部[S]. 北京:化学工业出版社, 2005:256.
- [5] 李敏晶,游景艳,刘忠英,等. 微波辅助流动萃取槐花中的黄酮类成分[J]. 高等学校化学学报,2004(5):850-852.

The Application of Extracting Flavonoids from Sweet Potato Leaves by Orthogonal Method

LI Guang^{1,3}, YU Shuang^{2,3}, CHEN Qing-fu³

(1. Department of Chemistry and Biological Agronomy, Anshun University, Anshun, Guizhou 561000; 2. Department of Resource and Environment, Anshun University, Anshun, Guizhou 561000; 3. School of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang Guizhou 550001)

Abstract: In order to select the optimum extraction scheme of flavonoids from sweet potato leaves, the six-factor-three-level orthogonal experiment was established to extract flavonoids from sweet potato leaves, using ‘Yuzi-263’ as the experimental materials. The results showed that when alcohol concentration was 60%, liquid material ratio 1:20(w/v), extraction temperature 40℃, distilled 20 minutes, extract times 3 times, ultrasonic wave power 187.5 W were the optimum extraction method, under this scheme, it was stable in extraction amount, simple in operation and feasible in practice.

Key words: orthogonal test; sweet potato leaves; flavonoids; extraction