

芹菜总黄酮提取工艺的优化

陈欲云^a, 杨跃寰^b, 蒋斌^a, 宋丹^a

(四川理工学院 a. 化学与制药工程学院; b. 生物工程学院, 四川 自贡 643000)

摘要:采用“超声波提取法”优化芹菜总黄酮提取条件并对芹菜总黄酮的稳定性进行探讨。考察了固液比、溶剂的浓度、提取时间等因素对芹菜总黄酮含量的影响。正交试验结果表明:芹菜总黄酮超声提取的最佳条件为固液比 1:40, 乙醇浓度 80%, 提取 30 min, 此工艺条件下所得芹菜总黄酮含量为 9.015 4 mg/g; 芹菜总黄酮提取液在 PH 为 4-6、温度低于 50 ℃ 时、低浓度的葡萄糖溶液(≤1%)、氯化钠溶液(≤0.5%)、柠檬酸溶液(≤1.5%) 等条件下稳定性比较好。

关键词:芹菜; 总黄酮; 提取工艺

中图分类号:Q814

文献标志码:A

芹菜, 属伞形科植物。有水芹、旱芹两 Abstract: 种, 功能相近, 药用以旱芹为佳。旱芹香气较浓, 又名“香芹”, 亦称“药芹”。芹菜茎叶中含有丰富的黄酮类物质, 具有抗氧化、抗高血脂、抗高血压, 抗肿瘤等药理活性^[1-2], 本研究旨在优化芹菜总黄酮提取条件, 并研究芹菜总黄酮稳定性的影响因素, 为其保存条件和深加工提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及药品

芹菜, 购于自贡菜市场; 芦丁标准品 (uv > 98%) 购于上海源叶生物科技有限公司。

1.2 实验仪器

可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司, 756PC 型); 超声波提取器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司, As20500T)

1.3 实验方法

1.3.1 芹菜前期处理

新鲜芹菜去杂后清洗干净, 然后沥干并切断, 置于 60 ℃ 烘箱中干燥, 最后用粉碎机粉碎并装于锥形瓶中密

封备用。

1.3.2 芦丁标准曲线的制备

总黄酮含量测定采用 $Al(NO_3)_3$ Abstract: - $NaNO_2$ 分光光度方法^[3-4], 黄酮与铝离子在碱性条件下与亚硝酸钠形成黄酮的铝络合物, 生成稳定的黄色。黄色的深浅与黄酮含量呈一定的比例关系, 可与芦丁标准品作对照, 于 510 nm^[5] 波长处比色定量测定。

标准曲线的制备: 精确称取芦丁标准品 20 mg 于 100 mL 容量瓶中, 用 60% 乙醇定容至刻度处。精确从中量取 25 mL 于 50 mL 容量瓶中, 用 30% 乙醇定容至刻度, 即得 0.1 mg/mL 芦丁标准液。

精确量取 0.0 mL, 1.0 mL, 2.0 mL, 3.0 mL, 4.0 mL, 5.0 mL, 0.1 mg/mL 芦丁标准液于 6 支 10 mL 具塞管中。用 30% 乙醇定容至 5 mL, 分别加入 0.3 mL、5% $NaNO_2$, 摇匀并静置 6 min, 再分别加入 0.3 mL、10% $Al(NO_3)_3$, 摇匀静置 6 min 后加入 4 mL、1mol/L $NaOH$, 分别用蒸馏水定容至刻度, 摇匀静置 15 min 后以 0 管为空白对照, 用紫外分光光度计在 510 nm 处测定其吸光度。线性回归得芦丁浓度与吸光度的标准曲线如图 1 所示, $A = 6.98C + 0.0003$ (A: 吸光度值; C: 浓度, mg/mL), $R^2 = 0.9994$ 。

收稿日期:2013-05-08

项目基金:四川理工学院科研基金项目(2100XJKYL003); 四川省教育厅科研项目(10ZB125)

作者简介:陈欲云(1977-), 女, 福建平潭人, 讲师, 硕士, 主要从事天然产物及应用方面的研究, (E-mail)chenyuyun@yeah.net

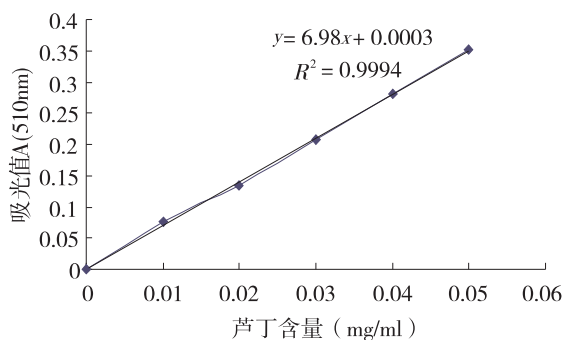


图1 芦丁标准曲线

1.3.3 总黄酮含量的测定

精确量取 2.00 mL 样品液于 10 mL 具塞管中。用 30% 乙醇定容至 5 mL, 分别加入 0.3 mL 15% NaNO₂, 摇匀并静置 6 min, 再分别加入 0.3 mL 10% Al(NO₃)₃, 摇匀静置 6 min 后加入 4 mL 1mol/L NaOH, 分别用蒸馏水定容至刻度, 摇匀静置 15 min 后于 510 nm 处测定吸光度。根据吸光度利用标准曲线由下式求出样品总黄酮含量:

$$m = C \times V_1 \times 10 / (W \times V)$$

其中: m 为总黄酮含量 (mg/g); C 为溶液中总黄酮的测定浓度 (mg/mL); V_1 为芹菜总黄酮提取液总体积 (mL); W 为芹菜干粉质量 (g); V 为所取待测液体积 (mL)。

1.3.4 芹菜黄酮稳定性研究

黄酮溶液的浓度与吸光度值成正比, 吸光度值越大, 黄酮溶液浓度越大。参照文献^[6-7]的方法将最优条件下提取的芹菜黄酮溶液置于不同条件下保存一段时间,

然后按照 1.3.3 的方法测定吸光度, 观察其在不同条件下吸光度的变化, 评价芹菜总黄酮提取液的稳定性。

(1) PH 值对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响

将芹菜总黄酮溶液用 HCl、NaOH 分别调节 pH 值为 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 静置 10 min 后, 在 510 nm 处测其吸光度值。

(2) 温度对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响

将芹菜总黄酮溶液分别在 25 °C、37 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 等不同温度下保温 2 h, 在 510 nm 处测吸光度值。

(3) 葡萄糖对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响

将芹菜总黄酮溶液分别配制成浓度为 1%、5%、10%、15%、20% 的葡萄糖溶液, 摇匀, 静置 30 min 后, 在 510 nm 处测其吸光度值。

(4) NaCl 对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响

将芹菜总黄酮溶液配制成浓度分别为 0.5%、1.0%、2.5%、5.0%、10% 的 NaCl 溶液, 摇匀, 静置 30 min 后, 在 510 nm 处测其吸收光度值。

(5) 柠檬酸对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响

将芹菜总黄酮溶液配制成浓度分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 的柠檬酸溶液, 摇匀, 静置 30 min 后, 在 510 nm 处测定吸光值。

2 结果及讨论

2.1 芹菜黄酮的提取

芹菜总黄酮提取正交实验结果见表 1。

表 1 正交试验结果

序号	固液比	提取时间	乙醇浓度	黄酮含量(mg/mL)			合计
1	1	1	1	5.99	6.35	6.28	18.62
2	1	2	2	6.64	6.60	6.49	19.73
3	1	3	3	6.75	6.78	6.60	20.17
4	2	1	2	7.03	6.82	6.96	20.81
5	2	2	3	7.17	7.14	7.21	21.63
6	2	3	1	6.71	6.10	6.46	19.27
7	3	1	3	6.92	7.10	7.07	21.09
8	3	2	1	6.21	7.07	6.67	19.95
9	3	3	2	7.32	7.57	7.35	22.28
I _j	58.49	60.53	57.85	$G = \sum_{i=1}^9 y_i = 183.37$			
II _j	61.60	61.21	62.78	$CT = G^2 / (9 * 3) = 1245.34$			
III _j	63.28	61.64	62.74	$S_{总} = \sum_{i=1}^9 \sum_{k=1}^3 y_{ik}^2 - CT = 4.21$			
I _j ²	3421.05	3663.55	3346.20	$f_{总} = 26$			
II _j ²	3794.51	3746.22	3941.22	$S_{总1} = 1/4 \sum_{i=1}^9 y_i^2 - CT = 3.47$			
III _j ²	4004.31	3798.91	3936.74	$f_{总1} = 8$			
$R_j = I_j^2 + II_j^2 + III_j^2$	11219.87	11208.68	11224.16	$S_{e2} = S_{总} - S_{总1} = 0.74$			
$S_j = R_j / 9 - CT$	1.312	0.069	1.789	$f_{e2} = 18$			

显著性检验,用试验误差 S_{e2} 检验各因素及交互作用的显著性,作方差分析(表 2)。

表 2 方差分析表

方差来源	离均差平方和	自由度	方差 F 值	显著性
固液比	1.312	2	0.656	16.00 * *
提取时间	0.069	2	0.035	0.85
乙醇浓度	1.789	2	0.895	21.83 * *
误差 S_{e2}	0.740	18	0.041	

$$F_{0.05(2,18)} = 3.55; F_{0.01(2,18)} = 6.01$$

方差分析表明料液比和乙醇浓度对试验结果的影响非常显著,提取时间为次要因素。借助于表 2 选取显著因素的最高水平,得到最佳工艺条件为料液比 1:40,乙醇浓度为 80%,提取时间可根据缩短工时原则取 30 min,所以最终的较优方案为:80% 乙醇以 1:40 的料液比提取 30 min。

2.2 芹菜黄酮稳定性研究

2.2.1 pH 值对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响

不同 pH 值对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响结果见表 3。由表 3 可以看出,芹菜总黄酮溶液在 pH 为 4-6 的环境中吸光度变化小,稳定性较好。当溶液过酸或者过碱时,芹菜总黄酮溶液的吸光度都有明显变化,说明稳定性较差。

表 3 pH 值对芹菜总黄酮稳定性的影响

pH 值	A_{510nm}
2	0.260
3	0.284
4	0.290
5	0.291
6	0.294
7	0.287
8	0.283
9	0.275
10	0.263
11	0.255

2.2.2 温度对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响

不同温度对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响结果见表 4。由表 4 可以看出,当温度低于 50 °C 时,芹菜总黄酮溶液的吸光度变化较小,当温度高于 50 °C 时,芹菜总黄酮的稳定性较差,所以尽量在低于 50 °C 的条件下制备和保存。

表 4 温度对芹菜总黄酮稳定性的影响

T(°C)	A_{510nm}
25	0.298
37	0.295
50	0.294
60	0.287
70	0.282
80	0.276

2.2.3 葡萄糖对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响

不同浓度葡萄糖溶液对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响结果见表 5。由表 5 可知,芹菜总黄酮在低浓度($\leq 1\%$)的葡萄糖溶液中比较稳定,高浓度葡萄糖溶液使其吸光度明显降低,稳定性波动较大。

表 5 葡萄糖对芹菜总黄酮稳定性的影响

葡萄糖浓度(%)	A_{510nm}
0	0.298
1	0.297
5	0.278
10	0.274
15	0.266
20	0.260

2.2.4 氯化钠对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响

不同浓度氯化钠溶液对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响结果见表 6。由表 6 可以看出,氯化钠溶液由 0.5% 增大到 10%,芹菜总黄酮溶液的吸光度有较大波动,说明在氯化钠存在的情况下芹菜总黄酮的稳定性较差。

表 6 氯化钠对芹菜总黄酮稳定性的影响

NaCl 浓度(%)	A_{510nm}
0.0	0.298
0.5	0.287
1.0	0.282
2.5	0.279
5.0	0.274
10.0	0.252

2.2.5 柠檬酸对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响

不同浓度柠檬酸溶液对芹菜总黄酮溶液稳定性的影响结果见表 7。由表 7 可知,芹菜总黄酮在低浓度的柠檬酸溶液中($\leq 1.5\%$)比较稳定,当柠檬酸溶液浓度较高时其稳定性变差。

表 7 柠檬酸对芹菜总黄酮稳定性的影响

柠檬酸浓度(%)	A_{510nm}
0.0	0.298
0.5	0.298
1.0	0.297
1.5	0.294
2.0	0.289
2.5	0.281

3 结束语

采用乙醇作为溶剂,对芹菜总黄酮超声提取的最佳条件为:固液比 1:40,80% 乙醇,提取 30 min,此工艺下所得芹菜总黄酮含量为 9.0154 mg/g。乙醇浓度和固液比对芹菜总黄酮的提取影响最大,而提取时间的影响较小。

本研究采用超声提取法提取芹菜中黄酮类化合物,

此法简便、稳定、可行、重现性好,超声提取提高了破碎速度,缩短了破碎时间,从而极大地提高提取效率。

芹菜总黄酮溶液的稳定性受很多因素的影响,在pH为4-6、温度低于50℃、低浓度的葡萄糖溶液($\leq 1\%$)、氯化钠溶液($\leq 0.5\%$)、柠檬酸溶液($\leq 1.5\%$)等条件下稳定性比较好。

研究结果为芹菜的开发利用提供了技术支持。如将其开发成安全的天然食品添加剂,具有较好的实际应用价值。

参考文献:

- [1] 李勇,乌莉娅·沙依提,陈妍,等.芹菜的最新研究进展[J].中国野生植物资源,2010,29(1):15-17.
- [2] 陈欲云,刘春丽,边名鸿.芹菜黄酮抗氧化作用的研究[J].时珍国医国药,2012,23(7):1718-1719.
- [3] 隋焕平,夏薇,张玉梅.芹菜提取物总黄酮含量测定[J].中国公共卫生,2001(4):332-333.
- [4] 杨立红.芹菜叶柄与叶片中总黄酮含量的研究[J].山东师大学报:自然科学版,1998,13(4):434-436.
- [5] 王玉春,杨洁.芹菜叶总黄酮提取工艺的优选[J].农产品加工,2009(6):69-71.
- [6] 张宏,李佳,库尔班吐松,等.短毛柽柳不同部位中总黄酮含量及稳定性研究[J].生物技术,2009,19(6):32-34.
- [7] 杜海珍.食品添加剂对柿叶黄酮稳定性的影响[J].食品研究与开发,2010,31(6):45-46.

Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoids in Celery

CHEN Yu-yun^a, YANG Yue-huan^b, JIANG Bin^a, SONG Dan^a

(a. School of Chemical and Pharmaceutical Engineering; b. School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: Extraction technology by ultrasonic is used to optimize the extraction condition of flavonoids, and stability of the total flavonoids in celery is studied. Extract factors include: solid-liquid ratio, solvent concentration, extraction time and so on, and their influence on the content of the total flavonoids in celery is discussed. Orthogonal test result shows: The optimal processing conditions are that the solid-liquid ratio is 1:40, ethanol concentration is 80% and extract for 30 minutes. The content of celery total flavonoids is 9.0154mg/g in this condition. The stability of celery total flavones is better in the conditions of that pH is 4-6, temperature belows 50℃, and the low concentration glucose solution ($\leq 1\%$), sodium chloride solution ($\leq 0.5\%$) and citric acid solution ($\leq 1.5\%$).

Key words: celery; total flavonoids; extraction technology