

苦荞黄酮的提取分离及抗氧化活性研究

郭刚军^{1,2}, 何美莹¹, 邹建云¹, 龚加顺²

(1.云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100; 2.云南农业大学食品科技学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 采用正交试验研究苦荞黄酮提取过程中的浸提时间、乙醇浓度、料液比、浸提温度, 得到最佳的提取条件为: 提取时间 5h、乙醇浓度 70%、料液比 1:15、浸提温度 70℃。利用最佳提取条件对苦荞粉进行了苦荞黄酮的提取分离, 并进行了纯化、成分分析, 得到了含量高达 72.32% 的高纯度苦荞黄酮。以 VC、芦丁为对照, 研究苦荞黄酮、荞籽醇提物、荞壳醇提物在不同浓度, 不同 pH 值下对 DPPH· 的清除能力。结果表明, 苦荞黄酮的清除 DPPH· 的能力仅次于 VC, 大于芦丁和荞籽醇提物, 远大于荞壳醇提物, 清除 DPPH· 的能力随着浓度的增大而升高, 在 pH2~8 范围内, 随着 pH 值的增大清除 DPPH· 的能力先降低后增大, 在 pH7 时最低。
关键词: 苦荞黄酮; 正交试验; 提取分离; 抗氧化性

Extraction, Isolation and Antioxidant Activity of Flavonoids from Tartary Buckwheat

GUO Gang-jun^{1,2}, HE Mei-ying¹, ZOU Jian-yun¹, GONG Jia-shun²

(1.Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong 666100, China ;

2.College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract : In this study orthogonal tests were applied to optimize the extraction conditions of flavonoids from tartary buckwheat, including extraction time, ethanol concentration, ratio of sample to solvent and extraction temperature. The optimal extraction conditions are: extraction time 5 hours, ethanol concentration 70%, ratio of sample to solvent 1:15 and extraction temperature 70℃. After purification, the flavonoids extracted from tartary buckwheat with the purity of 73.32% were obtained. Antioxidant activities of flavonoids of tartary buckwheat, ethanol extract of tartary buckwheat powder, and ethanol extract of tartary buckwheat hull were studied at different concentrations and pH values and compared with those of rutin and vitamin C. Results suggested that the antioxidant activity of flavonoids of tartary buckwheat is lower than that of vitamin C, but stronger than that of rutin or the ethanol extract of tartary buckwheat powder, and much higher than that of the ethanol extract of tartary buckwheat hull, and the scavenging capability on DPPH free radical increases with is concentration increasing. When pH is in the scope of 2 to 8, the scavenging capability on DPPH free radical firstly increases and then decreases, which is the lowest at pH 7.

Key words: flavonoids of tartary buckwheat; orthogonal test; extraction; antioxidant activity

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)12-0373-04

苦荞麦属双子叶蓼科(*Polygonaceae*)荞麦属植物, 又名春荞、野荞麦, 学名鞑鞑荞麦(*F.tataricum*), 为一年生或多年生宿根性植物, 原产于我国东北和西南部的四川凉山地区。苦荞耐旱耐寒、耐酸耐脊、适应性较强、生长周期短, 主要分布在海拔约 2000 米左右的高寒地带, 属于无污染的绿色食品资源。苦荞是一种药食两用植物, 味苦, 营养价值高, 具有良好的医疗保健作用, 富含蛋白质、淀粉、脂肪、矿物质及维生素等^[1]。而且它的是含有极为丰富的生物活性成分——黄酮类化合物(flavonoids) 又称生物类黄酮

(bioflavonoids), 是植物经光合作用产生的一大类化合物。一般能溶于水、乙醇、乙酸乙酯等极性溶剂中, 难溶于乙醚、氯仿和苯。药效学的动物实验及临床观察表明: 黄酮作为一种功能成分, 具有较明显的降血糖、降血脂、抗氧化、增强心血管功能、血压、中风等。芦丁(rutin)又名芸香苷、VP, 是苦荞中主要的黄酮类物质。现代医学证明, 芦丁具有多方面的生理活性, 可用来防治毛细血管脆性引起的脑出血、肺出血、出血性肾炎、胃炎、胃溃疡及牙龈出血等^[2-4]。国外还用芦丁制备多种芦丁衍生物, 如槲皮素、羟乙基芦

收稿日期: 2007-10-25

作者简介: 郭刚军(1980-), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事食品加工和植物中天然产物提取分离与功能研究。

E-mail: guogangjun2001@126.com

丁等。因此,开发苦荞麦具有广阔的市场和发展前景。本研究选用云南高寒山区苦荞麦为原料,采用乙醇热浸提法提取分离纯化苦荞黄酮^[5],利用 DPPH· 对其抗氧化活性进行研究,为云南苦荞的集成开发利用提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

苦荞粉、苦荞壳、苦荞籽 昭通鹤乡绿色食品有 限责任公司。

亚硝酸钠;硝酸铝;氢氧化钠;无水乙醇;芦丁 (HPLC > 98%) 成都思科华生物技术有 限公司;VC 湖南南化化学试剂厂;DPPH(2,2-二苯基-1-苦肼基,2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) 美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 仪器与设备

722 可见分光光度计 上海精密科学仪器有 限公司;SHZ-III 型循环水真空泵 上海亚荣生化仪器厂;101A-Z 型电热鼓风干燥箱 上海实验仪器有 限公司;HH-Z 电热恒温水浴锅 常州市华普达教学仪器有 限公司;电子天平(感量 0.0001g) 沈阳龙腾电子有 限公司。

1.3 黄酮提取及分离纯化

1.3.1 黄酮标准曲线的绘制

黄酮标准曲线绘制参照文献[6]、[7],以芦丁标准品为标样,最小二乘法作线性回归,得芦丁标准液浓度(mg/ml)C 与吸光度 A 的关系曲线的回归方程: $Y=0.8977X-0.0057$ (相关系数 $R^2=0.9969$)。

1.3.2 苦荞黄酮的提取方法及得率计算

准确称取 3.00g 苦荞粉于三角烧瓶中,加入一定比例、一定浓度的乙醇作为提取剂,在一定的温度下提取一定的时间,将提取液趁热减压抽滤,转移并定容至 100ml 容量瓶中,作为待测液。然后参照文献[8]测定,计算黄酮得率。

1.3.3 正交试验设计

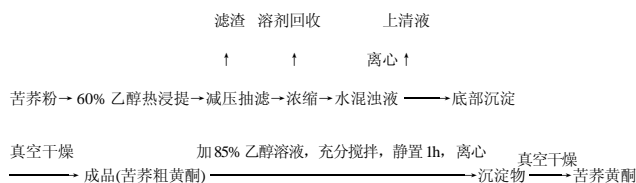
选择浸提时间(A)、乙醇浓度(B)、料液比(C)、浸提温度(D)四个因素,每个因素选择三个水平,以黄酮得率为考察指标,选用 $L_9(3^4)$ 进行正交设计来选择最佳提取条件,因素水平表见表 1。

表 1 苦荞中黄酮提取方法因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test on flavonoids extraction from tartary buckwheat

水平	因素			
	A 浸提时间(h)	B 乙醇浓度(%)	C 料液比(g/ml)	D 温度(°C)
1	3	60	1:15	60
2	4	70	1:20	70
3	5	80	1:25	80

1.3.4 苦荞黄酮的提取工艺



上述提取工艺黄酮的提取率按下式计算:

$$\text{提取率}(\%) = \frac{\text{苦荞粗黄酮重}(\text{g})}{\text{苦荞黄酮重}(\text{g})} \times 100$$

1.3.5 苦荞黄酮、苦荞粉、苦荞籽、苦荞壳成分分析

黄酮的测定:测定方法同 1.3.1;蛋白质的测定:考马斯亮蓝比色法,标准溶液为牛血清蛋白,参照文献[9],重复测定三次;氨基酸的测定:茚三酮比色法,参照文献[9],重复测定三次;总糖的测定:蒽酮-硫酸比色法,标准溶液为葡萄糖,参照文献[10],重复测定三次;脂肪的测定:索氏抽提法,参照文献[11],重复测定三次;灰分的测定:参照文献[11],重复测定三次;水分的测定:参照文献[11],重复测定三次。

1.4 苦荞黄酮抗氧化能力的测定^[11-12]

1.4.1 DPPH 贮备液的配制

准确称取 DPPH 标准品 4mg,用无水乙醇溶解,转入 100ml 的容量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,摇匀得浓度为 0.04mg/ml 的 DPPH 贮备液,置于冰箱中备用。

1.4.2 苦荞黄酮抗氧化能力的测定

在试管中依次加入 3.9ml 0.04mg/ml 的 DPPH 溶液和 0.1ml 浓度均为 1mg/ml 的芦丁标准溶液、VC 标准溶液、苦荞黄酮溶液、苦荞壳醇提取液以及苦荞籽醇提取液,混匀后静置 30min,用 1cm 比色皿在 517nm 波长处测定吸光度 A,并记为 A_r;加入 0.04mg/ml 的 DPPH 溶液用 1cm 比色皿在 517nm 波长处测定吸光度 A,测定值标记为 A₀。按下式计算自由基清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_r}{A_0} \times 100$$

1.4.3 不同浓度下不同物质的抗氧化能力的测定

在预先加入了 3.9ml DPPH 溶液的试管中分别加入 0.1ml 浓度梯度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1mg/ml 的 VC 标准溶液、芦丁标准溶液、苦荞黄酮溶液、苦荞壳浸提液、苦荞籽提取液,其余步骤同 1.4.2,计算其清除率。

1.4.4 不同 pH 值条件下各物质的抗氧化能力的测定

将苦荞黄酮溶液、苦荞壳浸提液、苦荞籽提取液、抗坏血酸、芦丁标准样液的 pH 值分别调至 3、4、5、6、7、8 六个梯度,再按 1.4.2 的方法进行测定,计算其清除率。

2 结果与分析

2.1 苦荞黄酮的最佳提取条件

表2 苦荞黄酮提取的L₉(3⁴)正交试验结果

Table 2 Results of L₉(3⁴) orthogonal test on flavonoids extraction from tartary buckwheat

试验号	A	B	C	D	黄酮得率(%)
1	1(3)	1(60)	1(1:15)	1(60)	2.628
2	1	2(70)	2(1:20)	2(70)	2.539
3	1	3(80)	3(1:25)	3(70)	2.580
4	2(4)	1	2	1	2.502
5	2	2	1	2	2.721
6	2	3	3	3	2.483
7	3(5)	3	3	1	2.528
8	3	2	2	2	2.590
9	3	1	1	3	2.676
T ₁	7.747	7.806	8.025	7.628	
T ₂	7.706	7.850	7.632	7.850	
T ₃	7.794	7.591	7.759	7.739	
X ₁	2.582	2.602	2.675	2.553	
X ₂	2.569	2.617	2.544	2.617	
X ₃	2.598	2.530	2.530	2.579	
R	0.016	0.087	0.145	0.064	
较好水平	A ₃	B ₂	C ₁	D ₂	

由表2可以看出,四种考察因素对苦荞中黄酮类化合物提取效果影响程度不同,其影响的主次顺序依次为液料比>乙醇浓度>浸提温度>浸提时间,最佳的提取条件为A₃B₂C₁D₂,即料液比1:15、乙醇浓度70%、浸提温度70℃、提取时间5h。

2.2 苦荞黄酮的提取

2.2.1 苦荞粉黄酮提取

通过1.3.4提取工艺,按照最佳提取条件提取得到的苦荞黄酮及经过纯化后的纯度如表3,提取率为61.84%。

表3 苦荞黄酮的纯度表

Table 3 Purification results of flavonoids extract from tartary buckwheat

黄酮样品	吸光度	纯度(%)
苦荞粗黄酮	0.469	52.90
苦荞黄酮	0.644	72.32

本提取工艺设备要求简单、投资少、提取率较高、提取溶剂可以循环利用,适合于工业化生产。能快速大量的生产出纯度相对较高的黄酮,是一条较好的提取生产路线。

2.2.2 苦荞黄酮、苦荞粉、苦荞籽、苦荞壳成分测定

表4 苦荞黄酮、苦荞粉、苦荞籽、苦荞壳成分

Table 4 Ingredients of flavonoids extract of tartary buckwheat, tartary buckwheat powder and tartary buckwheat hull

样品	黄酮(%)	蛋白质(%)	氨基酸(%)	总糖(%)	脂肪(%)	灰分(%)	水分(%)
苦荞黄酮	72.32	4.48	1.14	9.64	6.00	1.46	4.80
苦荞粉	2.46	13.05	0.285	24.1	2.402	7.45	13.4
苦荞壳	0.723	1.6	0.076	4.3	0.03	12.6	6.47
苦荞籽	2.03	11.4	0.126	28.3	2.3	1.89	11.9

由表4可以看出,所提取的黄酮不仅纯度相对较高,而且营养也十分丰富,可以加工成很多保健食品,也可以作为保健食品的配料。在苦荞粉、苦荞籽、苦荞壳中,苦荞粉黄酮含量较高,苦荞籽次之,苦荞壳含量最低,在工业化提取分离黄酮时,可以直接选用苦荞籽来作为原料,不仅可以节省脱壳的工序,而且可以节省时间和成本。

2.3 苦荞黄酮抗氧化性能

2.3.1 苦荞黄酮、荞籽醇提液、荞壳醇提液的对DPPH·的清除能力比较

根据1.4.2的测定方法进行DPPH·的清除能力的测定。依据DPPH·在可见光区最大吸收峰波长为517nm,其乙醇溶液呈深紫色,当具有生物活性的物质存在时,由于与其单电子配对而使其吸收逐渐消失,其褪色程度与接受的电子数成定量关系,因此可用分光光度法进行定量分析来检测自由基的清除情况,从而评价某种物质的抗氧化能力。其能力用清除率表示,清除率越大,抗氧化能力越强^[13-14]。苦荞黄酮及荞籽醇提物、荞壳醇提物对DPPH·的清除能力见图1。

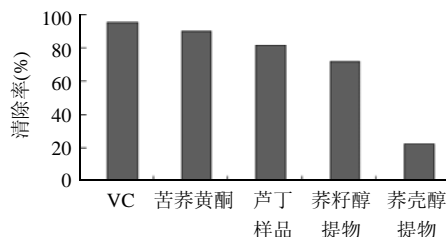


图1 VC、苦荞黄酮、荞籽醇提物、荞壳醇提物的对DPPH·的清除能力比较

Fig.1 Comparison among scavenging capacities of flavonoids of tartary buckwheat, ethanol extract of tartary buckwheat powder and ethanol extract of tartary buckwheat hull to DPPH· free radical

从图1可看出,所提取的苦荞黄酮对DPPH·的清除能力较强,仅次于VC,强于芦丁和苦荞籽醇提物,远大于苦荞壳醇提取物。从对DPPH·的清除能力可以看出,苦荞黄酮的主要成分为芦丁,这与文献中的报道一致,所提取的苦荞黄酮中,除含有芦丁外,可能还含有少量其他的抗氧化活性较高的黄酮类物质,使得苦荞黄酮的清除DPPH·的能力稍大于芦丁。

2.3.2 不同浓度苦荞黄酮、荞籽醇提物、荞壳醇提物的对 DPPH· 的清除能力比较

根据 1.4.2 的方法进行了苦荞黄酮、荞籽醇提物、荞壳醇提物对 DPPH· 的清除能力的测定,清除率随浓度变化而变化的情况如图 2 所示。

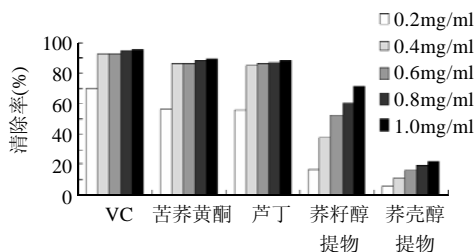


图2 不同浓度 VC、苦荞黄酮、荞籽醇提物、荞壳醇提物对 DPPH· 的清除能力比较

Fig.2 Comparison among scavenging capacities of VC, flavonoids of tartary buckwheat ethanol extract of tartary buckwheat powder and ethanol extract of tartary buckwheat hull for DPPH· at different concentration

由图 2 可以看出,随着样液浓度的增加,VC、芦丁、苦荞黄酮、荞籽醇提物、荞壳醇提物对 DPPH· 自由基的清除能力增加。荞籽醇提物、荞壳醇提物的提取液由于黄酮含量低,对自由基的清除能力较弱,使得对 DPPH· 的清除能力随着浓度增加而增加得较为明显。而提取的苦荞黄酮和 VC、芦丁标样相同,纯度较高,清除 DPPH· 的能力较强,使得在浓度增加到 0.4mg/ml 时,即达到最大清除率 90% 以上时再继续增加浓度, DPPH· 清除效果增加不明显。

2.3.3 不同 pH 值条件下各抗氧化剂对自由基的清除率

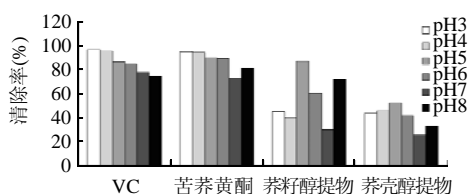


图3 不同 pH 值条件下 VC、苦荞黄酮、荞籽醇提物、荞壳醇提物液对 DPPH· 的清除能力比较

Fig.3 Comparison among scavenging capacities of VC flavonoids of tartary buckwheat, ethanol extract of tartary buckwheat powder and ethanol extract of tartary buckwheat hull to DPPH· at different pH values

由图 3 可以看出,VC 标准品清除 DPPH· 的能力随着 pH 值的升高而降低,而苦荞黄酮随着 pH 值降低清除 DPPH· 的能力缓慢降低而后升高,在 pH 值中性时最低,但在酸性或者碱性时的抗氧化能力均大于或接近于 VC。而荞籽醇提物、荞壳醇提物随着 pH 值的变化清除 DPPH· 的能力变化规律相同,但由于黄酮含量低、成分较为复杂,其变化很不规律。但都是 pH 值

在中性时,清除 DPPH· 的能力达到最低。这可能是由于苦荞黄酮的成分主要是芦丁,芦丁属于黄酮苷类物质,在不同 pH 值条件下水解程度、溶解性不同所致。

3 结论

通过正交试验得出乙醇热浸提法提取黄酮的最佳条件为:料液比 1:15,乙醇浓度 70%,浸提温度 70℃,提取时间 5h,黄酮得率 2.721%。提取得到的苦荞粗黄酮纯度为 52.90%,纯化后纯度达到 72.32%。

从 VC 标准样、芦丁标准样、黄酮、荞壳醇提物、荞籽醇提物对 DPPH· 清除能力看,苦荞黄酮的抗氧化能力仅次于 VC,大于芦丁与荞籽醇提物,远大于荞壳醇提物。抗氧化能力随着浓度的增大而增强,在浓度达到 0.4mg/ml 即接近最大抗氧化效果。pH 值不同时,抗氧化能力不同,酸性抗氧化能力较强,pH 值为 7 时最弱。

4 讨论

苦荞是具有保健作用的植物,但就其含有生物活性物质黄酮及清除自由基的抗氧化活性来看,苦荞粉和苦荞籽粉的生物学价值显著大于苦荞壳。而从相同浓度的抗氧化活性物质清除自由基及不同浓度清除自由基的变化规律来看,苦荞黄酮清除自由基的能力及变化规律和芦丁基本相同,从而可以推测苦荞黄酮中含有的主要是芦丁。但除芦丁外,还可能含有少量活性较强的黄酮类物质,对此还有待于进一步研究。在不同 pH 值的条件下,苦荞黄酮在酸性时的清除自由基的能力较大,甚至大于 VC,因此建议在开发保健品时,尽可能在酸性条件下使用。

参考文献:

- [1] 郎桂常. 苦荞麦营养价值及其开发应用[J]. 中国粮油学报, 1996, 11(3): 9-14.
- [2] 祁学忠, 吉锁兴, 王晓燕, 等. 苦荞黄酮及其降血糖作用的研究[J]. 科技情报开发与经济, 2003, 13(8): 111-112.
- [3] CROFT K D. The chemical and biological effects of flavonoids and phenolic acid[J]. Ann N Y Acad Sci, 1998, 854: 435-442.
- [4] 韩淑英, 吕华, 朱丽莎, 等. 荞麦种子总黄酮降血脂、血糖及抗脂质过氧化作用的研究[J]. 中国药理通报, 2001, 17(6): 694-696.
- [5] 欧阳平, 张高勇. 类黄酮提取的基本原理. 影响因素和传统方法[J]. 中国食品添加剂, 2003(5): 54-57.
- [6] 徐宝才, 丁霄霖. 苦荞黄酮的测定方法[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(3): 99-100.
- [7] 欧阳平, 张高勇, 康保安, 等. 物料预处理对苦荞麦中总黄酮提取的影响[J]. 粮油加工与食品机械, 2003, 12: 32-33.
- [8] 李建武, 余瑞元, 袁明秀, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [9] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [10] 徐昆龙, 肖蓉. 实用动物性食品卫生检验技术[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2002.
- [11] 李丹, 肖刚, 丁霄霖. 苦荞黄酮抗氧化作用的研究[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(1): 44-47.
- [12] 李春阳, 许时婴, 王璋. DPPH 法测定葡萄籽原花青素清除自由基的能力[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(2): 102-107.
- [13] 郑德勇, 安鑫南. 竹叶提取物清除 DPPH 自由基的测定方法[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2005, 34(1): 59-62.
- [14] 许中鸿, 杭瑚. 二苯基苦味肼基自由基分光光度测定法及其应用的初步研究[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(6): 474-477.