

均匀设计法优选葱白总黄酮提取工艺

石雪萍¹, 张卫明¹, 钱近春², 张宇思²

(1.南京野生植物综合利用研究院, 江苏南京 210042;

2.南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210046)

摘 要: 优选了葱白黄酮的最佳提取工艺。以芦丁为对照, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 为显色剂, 紫外分光光度法在波长 510nm 处测定总黄酮的含量。以总黄酮含量为指标, 应用均匀设计实验, 优化葱白黄酮的最佳提取工艺。结果表明, 葱白黄酮的最佳提取工艺为: 95% 乙醇, 料液比 1:30, 75℃ 下提取 5h。

关键词: 葱白, 黄酮, 提取, 均匀设计

Optimization of the extracting method of total flavonoids from welsh-onion stalk through uniform design

SHI Xue-ping¹, ZHANG Wei-ming¹, QIAN Jin-chun², ZHANG Yu-si²

(1.Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plant, Nanjing 210042, China;

2.Life Science and Technology of Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: The optimal extraction procedure was screened by uniform design. Through rutin as standard and $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ as reagent, the content of the total flavonoids was determined by UV spectroscopy at 510nm. According to the content of the total flavonoids, the optimal extraction method was confirmed through uniform design. The results showed that: the optimal extraction condition was as follows: 95% alcohol, 30 times volume of the weight of the dried material, refluxing 5h at 75℃.

Key words: welsh-onion stalk; flavonoids; extraction; uniform design

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)02-0187-03

葱白为百合科植物葱 (*Allium fistulosum* L.) 的鳞茎, 主要功效为发表、通阳、解毒; 葱白还具有发汗解热的功效, 可健胃、利尿、祛痰, 对痢疾杆菌、葡萄球菌及皮肤真菌也有一定的抑制作用^[1~3]。葱白是传统的药用部分, 含有许多生理功能成分^[4,5], 近年来在医药和保健品行业具有新的用途。均匀设计 (Uniform Design) 是一种实验设计方法, 也称为均匀设计实验法 (Uniform Design Experimentation) 或空间填充设计。通过均匀设计, 实验次数将大大减少。它可以自动将各实验因素分类为重要与次要, 并将因素按重要性排序。可以通过电脑对结果与因素条件进行界定与预报, 进而控制各因素^[6,7]。本实验利用兴化兴野食品有限公司的叶用葱加工下脚料-葱白作为原料, 采用均匀设计法优化葱白黄酮的提取工艺, 得到黄酮提取的最佳工艺, 为葱白的深加工提供了理论依据, 也有利于葱资源的进一步开发。

1 材料与方法

收稿日期: 2008-06-05

作者简介: 石雪萍 (1974-), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 食品功能性成分研究与开发。

基金项目: 国家“十一五”支撑计划课题 (2006BAD06B02); 农业科技成果转化资金项目 (2007GB24420251)。

1.1 材料与仪器

葱白 兴化兴野食品有限公司, 香葱加工下脚料; 芦丁 中国药品生物制品检定所; 硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠等 均为分析纯。

电热鼓风干燥箱 南京第一医疗器械厂; 数显恒温水浴锅 金坛市江南仪器厂; 循环水多用真空泵 SHB-3A 河南省太康科教器材厂; 旋转蒸发器 RE-52AA 上海亚荣生化仪器厂; T6 紫外/可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; 高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原料处理 取干燥葱白约 200g, 用粉碎机将其粉碎后待用, 保证实验时所用葱白粉的颗粒大小相同。

1.2.2 校正曲线的绘制

1.2.2.1 溶液制备 称取芦丁标样 5.0mg 于 25mL 容量瓶中, 用无水乙醇定容, 即得 0.2mg/mL 的芦丁标准溶液。准确称取 44g 九水合硝酸铝于烧杯中, 用少量水溶解后转移至 259mL 容量瓶中, 用纯净水定容, 配成 10% 的溶液待用。分别配制 5% 的亚硝酸钠和 10% 的氢氧化钠溶液于试剂瓶中, 待用。

1.2.2.2 校正曲线绘制 分别准确吸取 0.2% 的芦丁溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mL 于 7 支干净试管

表3 均匀设计方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	显著性
回归	0.217	4	0.0541	置信限为 $\alpha = 0.05$, 检验值 $F_1 = 446.9$, 临界值 $F_{(0.05, 4, 5)} = 5.192$
剩余	0.000606	5	0.000121	
总计	0.217	9		
复相关系数 $R = 0.9986$		剩余标准差 $S = 0.0110$		

中,各管均加 5% 亚硝酸钠溶液 1.0mL,混匀,放置 6min;加 10% 硝酸铝溶液 1.0mL,摇匀,放置 6min;加 10% 氢氧化钠试液 10mL,再加无水乙醇补齐至 18mL,摇匀,放置 15min。显色稳定后,取第 7 管在 T6 紫外/可见分光光度计上全波长进行紫外扫描,得出紫外扫描图,确定最大吸收波长为 510nm。在波长 510nm 处以第一管为空白测定吸光度。以吸光度 A 为纵坐标,浓度 C 为横坐标,绘制校正曲线,得芦丁浓度(C)与吸光度(A)的关系曲线。

1.2.3 葱白黄酮提取均匀实验设计 影响葱白黄酮提取的主要因素有提取温度、提取时间、固液比和乙醇浓度等。实验因素较多,而且实验过程中每一个因素变化区间较大,因素之间又相互关联,因此,在本实验中选择了均匀设计法安排实验方案。均匀设计(Uniform Design,简称 UD)是方开泰将数论和多元统计相结合创造的一种适用于多因素多水平的实验方法,具有实验次数少、均匀分散、实验数据用计算机处理和方便、迅速、准确的特点。在实验中选择 4 个因素作为影响葱白黄酮提取的因素,选用的均匀设计表为 $U_{10}^*(10^8)$,各因素取值范围如表 1 所示。

表1 均匀设计各因素取值表

因素	初值	终值	分段值
X_1 提取温度(℃)	30	75	5
X_2 提取时间(h)	0.5	5	0.5
X_3 液固比(倍)	5	50	5
X_4 乙醇浓度(%)	50	95	5

1.2.4 葱白黄酮提取率的测定 分别称取 10.0g 葱白粉于锥形瓶中,按均匀设计软件的设计值进行实验,抽滤去渣,得黄酮提取液,测量提取液体积(V),分别取 2.0mL 提取液于 10 支干净试管中,另取 2.0mL 无水乙醇于一支试管中,各管均加 5% 亚硝酸钠溶液 1.0mL,混匀,放置 6min;加 10% 硝酸铝溶液 1.0mL,摇匀,放置 6min;加 10% 氢氧化钠试液 10mL,摇匀,放置 15min。显色稳定后,分光光度法在波长 510nm 处以无水乙醇管为空白测定吸光度,并从校正曲线上读取相应的浓度(mol/L),根据浓度计算葱白黄酮提取率。黄酮提取率的计算公式如下:

$$\text{黄酮提取率}(\%) = \frac{\text{提取液中的黄酮总量}(\text{g})}{\text{葱白原料量}(\text{g})} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 芦丁的校正曲线

芦丁浓度(C)与吸光度(A)的关系曲线回归方程式为 $A = -0.01184 + 0.00998C$,相关系数 $R^2 = 0.9995$ 。本检测方法中芦丁浓度与吸光度有良好的相关性,校正曲线如图 1 所示。

2.2 均匀设计实验葱白黄酮提取率的测定结果

葱白黄酮提取率结果见表 2。

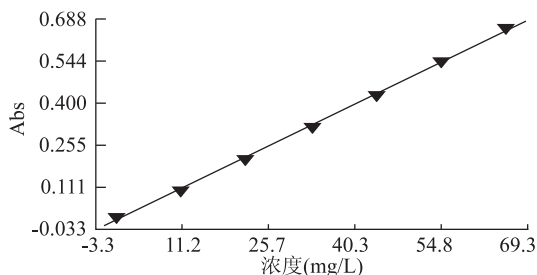


图1 黄酮测定校正曲线

表2 均匀设计实验

实验号	提取温度(℃)	提取时间(h)	料液比	乙醇浓度(%)	黄酮提取率(%)
1	1	3	4	5	0.466
2	2	6	8	10	0.817
3	3	9	1	4	0.564
4	4	1	5	9	0.610
5	5	4	9	3	0.672
6	6	7	2	8	0.739
7	7	10	6	2	0.795
8	8	2	10	7	0.858
9	9	5	3	1	0.586
10	10	8	7	6	0.971

2.3 均匀设计结果

回归分析采用后退法,显著性水平 $\alpha = 0.05$,拟建立回归方程:

$$\text{葱白黄酮提取率 } Y = -0.350 + 0.00568X_1 + 0.0579X_2 + 0.00575X_3 + 0.00571X_4$$

均匀设计方差分析表如表 3 所示。由表 3 分析可知,在 $\alpha = 0.05$ 时,检验值 $F_1 = 446.9$,临界值 $F_{(0.05, 4, 5)} = 5.192$, $F_1 > F_{(0.05, 4, 5)}$,故认为该回归方程在 $\alpha = 0.05$ 水平上是可信的,其结果有意义。

2.4 实验条件优化结果

实验优化方法:网格尝试法,优化结果见表 4。优化的实验条件为:温度 75℃,乙醇溶液 95%,提取 5h,料液比 1:30。预期葱白黄酮提取率最大值为 $1.22\% \pm 0.0283\%$,实际实验结果为 1.187%,其理论优化值与实际操作结果比较接近,所以实验结果是可信的。

表4 优化的实验条件

因素	最优条件	预期指标最大值(%)
X_1	75.00	1.22 ± 0.0283
X_2	5.000	
X_3	30.00	
X_4	95.00	

3 结论

均匀设计法优化黄酮提取工艺得到的最佳条件为:95%乙醇,30 倍量乙醇的量,75℃下提取 5h。

(下转第 192 页)

混合环糊精制备包合物可以克服上述不足,适量水中研磨,混合环糊精既具有利于包合的较好的流动性,又有一定的 β -CD 固体共存使番茄红素油脂得以分散均匀,从而能够加快包合的进行,比单一环糊精更容易制备产物,强的包合能力和制备难度的降低,使低比例环糊精的固体包合物制备成为可能。实验证明,以 K_a 值最大的20% HP- β -CD 混合环糊精制备包合物效果最好。

3.3 产品性能

在保证番茄红素稳定性和溶解度的前提下,混合环糊精包合物使包合物的环糊精降低到合适的比例,固体产物的制剂性能得到极大的改善,获得了单一环糊精无法达到的技术效果。

产品中番茄红素溶解度随 HP- β -CD 含量的增加而增大,图1表明,溶解度的增加有两个平台,20%和80% HP- β -CD 的混合环糊精增溶作用强,其增溶幅度大于简单的加和(直线上方),50% HP- β -CD 的则略小于简单的加和(直线下方),说明1:1的混合环糊精增溶作用不强;另外,随 HP- β -CD 比例增至50%以上,其产物吸湿性明显增强,固体化难度亦明显增大。反之, β -CD 含量的增加,产物易于干燥且产品流动性变好,但溶解度降低,产品溶出分散性能下降,因此,保持一定比例 HP- β -CD 十分重要。

以20% HP- β -CD 的混合环糊精制备的包合物,不仅达到了降低环糊精比例和保持较好的增溶效果,而且能够有效地改善产品吸湿的特性,从而显著增加番茄红素的稳定性。番茄红素包合片和胶囊剂3个月的功效实验,效果差异明显,服用包合片者,黄褐斑症状明显减轻,且见效较快,总体效果优于胶囊剂;而胶囊剂使用者的效果较差,而且见效缓慢。结果说明,包合片产品溶解性强、溶出分散性能好,对增强番茄红素的体内吸收是有利的。

3.4 性价比

目前 HP- β -CD 价格约为 β -CD 的40倍,单一 HP- β -CD 包合番茄红素成本较高,且吸湿性强,制备固体制剂相对难度大,稳定性难以保证。另外,单一的 β -CD 与番茄红素包合能力较弱,难以制备包合物,且制备过程中存在有机溶剂残留。利用混合环糊精制备包合片,在保证稳定性和溶出度的前提

下,能够大幅降低成本,HP- β -CD 含量20%的混合环糊精有最大的包合常数,适当高的溶解度,表现出最高的性价比。

本文运用 HP- β -CD 含量较少的混合环糊精包合番茄红素,研制出性能优良且性价比高的新型包合片产品,克服了目前采用单一环糊精包合技术应用于番茄红素固体制剂产品的困难,解决了番茄红素水溶性和稳定性差及不易保存的问题,改善了口服效果,降低了生产成本,具有技术可行性和经济实用性。

参考文献:

- [1] Ribaya - Mercado J D, Garmyn M, Gilchrest B A. Skin lycopene is destroyed preferentially over β - carotene during ultraviolet irradiation in humans [J]. Journal of Nutrition, 1995, 125: 1854~1859.
- [2] 吴翠栓,艾秀丽,等. 番茄红素及其保健功能的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(22): 1849~1852.
- [3] 齐继成. 番茄红素开发应用进展[J]. 中国医药技术与市场, 2007, 7(3): 41~42.
- [4] 王罗新,吕军,杜宗良,等. 番茄红素与 β -环糊精包结物的紫外-可见吸收光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(2): 183~186.
- [5] 杨坤,丁霄霖. 番茄红素水溶性包合物的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2005(5): 98~101.
- [6] 王亚娜,陆亚鹏,任勇,等. 环糊精及衍生物/药物包合常数的测定方法及其应用[J]. 药学进展, 2004, 28(1): 23~28.
- [7] 金小江,周建平. 环糊精包合特性及包合常数的测定和预测[J]. 药学进展, 2005, 29(11): 491~495.
- [8] 马坤芳,任勇,王宣,冒麟. 银翘挥发油/ β -环糊精包合常数的测定研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(8): 739~742.
- [9] 中华人民共和国国家标准(GB/T 14215-93).
- [10] 孙传庆,胡小明,朱金玲,等. 番茄红素的微胶囊化研究和稳定性实验[J]. 食品科技, 2007(2): 166~170.
- [11] 中华人民共和国卫生部药典委员. 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京:化学工业出版社, 2005.71(附录).
- [12] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京:化学工业出版社, 2005.73(附录).
- [13] 徐新军. 浅谈自身对照法计算溶出度[J]. 华西药学报, 2001, 16(3): 221~223.

告[J]. 西北药学报, 1994, 9(2): 70~72.

[5] 冯怀林,刘扬烈. 葱白同蜂蜜配伍的实验研究[J]. 中医药研究, 1997, 13(5): 50~51.

[6] 方开泰. 均匀设计:数论方法在实验设计的应用[J]. 应用数学学报, 1980, 3(4): 363~372.

[7] 方开泰,马长兴. 正交与均匀实验设计[M]. 科学出版社, 2001.

(上接第188页)

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科技出版社, 1977.
- [2] 李时珍. 本草纲目[M]. 重庆:重庆出版社, 2006.
- [3] 张卫明,肖正春. 中国辛香料植物资源开发与利用[M]. 东南大学出版社, 2007.
- [4] 邹丽容,李雪艳,徐刚. 葱白汁对小鼠壮阳的药理实验报