

武功山紫红米总黄酮提取方法的优化

张伦宁*, 刘 珂, 黄 潮, 谢清萍

(萍乡市食品药品检验所, 萍乡 337000)

摘 要: 目的 确定武功山紫红米黄酮提取的最佳方法并测定其含量。**方法** 通过单因素试验考察了过筛程度、乙醇浓度、回流提取时间及次数等条件对武功山紫红米黄酮提取工艺的影响。用芦丁作标准品, 以 $\text{NaNO}_2\text{-AL}(\text{NO}_3)_3$ 为显色剂, 于 510 nm 处测定紫红米中总黄酮的含量。**结果** 武功山紫红米黄酮的最佳提取工艺为: 过 0.355 mm 筛, 50%乙醇、提取 2 h 重复 3 次, 此条件下测得武功山紫红米黄酮含量为 6.162 mg/g。

结论 该方法操作简便、准确性好, 适用于武功山紫红米黄酮的测定。

关键词: 武功山紫红米; 总黄酮; 提取

Optimization of extraction method of total flavonoids from purple red rice from Wugong mountain

ZHANG Lun-Ning*, LIU Ke, HUANG Chao, XIE Qing-Ping

(Pingxiang Municipal Food and Drug Inspection Institute, Pingxiang 337000, China)

ABSTRACT: Objective To obtain the best extraction method of flavonoids from purple red rice from Wugong mountain and determine the content. **Methods** The effects of 4 crucial parameters including screening degree, ethanol concentration, reflux extraction time and times, on extraction efficiency were examined. Using rutin as standard and $\text{NaNO}_2\text{-AL}(\text{NO}_3)_3$ as color reagent, the content of total flavonoids in purple red rice was determined at 510 nm. **Results** The optimum extraction technology of flavonoids from purple red rice from Wugong mountain was as follows: passing 0.355 mm screen, 50% ethanol, extraction for 2 h and 3 times. Under these conditions, the content of flavonoids in purple red rice from Wugong mountain was 6.162 mg/g. **Conclusion** This method is simple and accurate, which is suitable for the determination of the total flavonoids in purple red rice from Wugong mountain.

KEY WORDS: purple red rice from Wugong mountain; total flavonoids; extraction

1 引 言

黄酮类化合物是自然界中存在的天然酚类物质, 属植物次级代谢产物^[1]。广泛存在于高等植物的根、茎、叶、花、果实等。研究表明, 植物中提取的黄酮类化合物, 具有抗心脑血管疾病、抗氧化、抗衰老、镇痛、抗炎、抗肿瘤、抗病毒等多种功效^[2]。黄酮类化合物安全性好、毒性

小, 在医药、食品加工等方面已被广泛应用^[3]。目前的黄酮提取方法主要有溶剂提取法、超声波萃取法等 7 种方法^[4,5], 含量测定方法主要有紫外-可见分光光度法和高效液相色谱法^[6]。

有色大米作为天然的功能性食品, 其营养成分远高于普通精白米, 其价格也是普通精白米的几倍^[7]。红米色素属于天然色素^[8], 主要成分为花青素, 属类黄酮类化合

基金项目: 江西省食品药品监督管理局科研项目(2016SP12)

Fund: Supported by the Jiangxi Provincial Food and Drug Administration Research Project (2016SP12)

***通讯作者:** 张伦宁, 硕士, 工程师, 主要研究方向为功能食品与营养保健。E-mail: 86217634@qq.com

***Corresponding author:** ZHANG Lun-Ning, Master, Engineer, Pingxiang Municipal Food and Drug Inspection Institute, Pingxiang 337000, China. E-mail: 86217634@qq.com

物^[9]。武功山紫红米是一种优质有色杂交稻组合,是营养价值非常高的绿色食品,具有高铁、高锌、高钙、高铜、高钾、高镁和高维生素含量的“七高”特点,因而被称为“功能型”营养保健米特种稻,是萍乡地区特有的有色大米^[10]。紫红米作为天然有色大米,具有很高的研究价值,目前未见关于武功山紫红米的天然功效性成份研究,本研究通过对其所含总黄酮含量进行测定,以期对武功山紫红米深度开发利用及市场推广提供理论基础。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); DK-98-IIA 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); CP225D 十万分之一天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); JM-6002 电子天平(诸暨市超泽衡器设备有限公司)。

紫红米(萍乡市一村食品有限公司提供); 3 种普通大米均购于超市。

芦丁标准品(批号: 100080-201409, 中国食品药品检定研究所); 无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠(分析纯, 西陇科学股份(广东省汕头市)有限公司)。

2.2 黄酮含量测定方法

测定步骤: 参考文献^[11,12]的黄酮含量测定方法, 取 10 mL 比色管, 加入 2 mL 试液, 先加 0.3 mL 5% NaNO_2 溶液, 摇匀, 静置 4 min; 然后加入 0.3 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 摇匀, 静置 4 min; 最后加入 1 mol/L NaOH 溶液 4.0 mL, 用 50%乙醇定容, 摇匀, 放置 10 min, 于 510 nm 处测定吸光度值。

样品的制备: 取粉碎均匀的试样 10.00 g, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入乙醇溶液 40 mL, 摇匀后置于 80 °C 水浴回流, 过滤, 收集滤液, 用乙醇溶液定容至 100 mL, 即为紫红米总黄酮提取液。

标准曲线的建立: 精密称取芦丁 11.48 mg, 用甲醇溶解后定容至 10 mL, 即得到 1.148 mg/mL 芦丁标准溶液, 取芦丁标准溶液 0、0.04、0.08、0.2、0.4、0.6 mL 分别置于 10 mL 刻度磨口比色管中, 按前述测定步骤进行, 以浓度-吸光度值, 建立标准曲线, 根据标准曲线计算样品中的黄酮含量(mg/g)。

2.3 各因素对黄酮提取的影响

2.3.1 过筛程度分析

称取未过筛、过 0.85~0.9 mm 筛、过 0.355~0.85 mm 筛、过 0.355 mm 筛的紫红米试样, 分别置于 4 个 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 70%乙醇溶液 40 mL, 摇匀后置于 80 °C 水浴回流 2 h, 提取 1 次, 过滤, 取滤液, 定容至 100 mL。

按试验方法 2.2 进行操作, 计算黄酮含量。

2.3.2 不同回流提取时间及次数

称取符合 2.3.1 结果中的最适过筛程度的紫红米试样, 分别置于 9 个 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 70%乙醇溶液 40 mL, 摇匀后置于 80 °C 水浴分别回流 1 h 1 次、1 h 2 次、1 h 3 次; 2 h 1 次、2 h 2 次、2 h 3 次; 3 h 1 次、3 h 2 次、3 h 3 次, 过滤, 合并滤液, 定容至 100 mL (3 h 3 次的提取液经减压浓缩部分后再定容)。按试验方法 2.2 进行操作, 计算黄酮含量。

2.3.3 不同浓度乙醇提取

称取过 2.3.1 结果中的过筛条件紫红米试样, 分别置于 4 个 250 mL 圆底烧瓶中, 分别加入 50%、60%、70%、80%乙醇溶液 40 mL, 摇匀后置于 80 °C 水浴, 按 2.3.2 中最适回流时间和次数进行, 过滤, 合并滤液, 定容至 100 mL。按试验方法 2.2 进行操作, 计算黄酮含量。

2.4 紫红米与普通大米样品中黄酮含量的测定

称取过 2.3.1 结果中的过筛条件紫红米试样及 3 种普通大米试样, 分别置于 4 个 250 mL 圆底烧瓶中, 按 2.3.2 和 2.3.3 最适条件, 摇匀后置于 80 °C 水浴回流提取, 过滤, 合并滤液, 定容至 100 mL, 即为紫红米总黄酮提取液。按试验方法 2.2 进行操作, 计算黄酮含量。

3 结果与分析

3.1 标准曲线

按 2.2 中方法建立芦丁标准曲线, 如图 1 所示。结果表明: 当芦丁在 0~0.689 mg/10 mL 浓度范围时, 与吸光度值的线性关系良好, 线性回归方程为 $Y=1.2401X+0.0022$, $r^2=0.9993$ 。

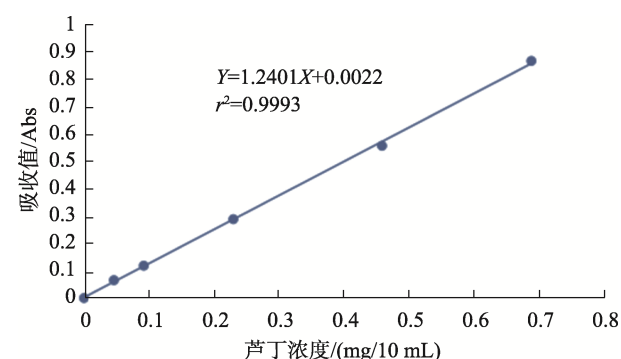


图 1 芦丁标准曲线

Fig.1 The standard curve of rutin

3.2 过筛程度分析

由表 1 中可知, 随着过筛程度的提升, 从样品中提取黄酮的效率越来越高, 当样品过 0.355 mm 筛时, 能得到最好的提取效果。应该是样品与溶剂接触面积的不同导致不

同的结果, 随着样品过更小孔径的筛, 样品的比表面积增大, 与溶剂接触面积就增加, 利于有效成分的提取与溶出, 从而提取效果越好。与倪力军等^[13]的研究结果一致。

表 1 不同过筛程度对黄酮含量的影响					
Table 1 Effects of different screening degree on flavonoids content					
编号	过筛直径/mm	提取溶剂	回流时间/h	回流次数/次	总黄酮含量/(mg/g)
1	未过筛	70%乙醇	2	2	0.309
2	0.85~0.9	70%乙醇	2	2	0.492
3	0.355~0.85	70%乙醇	2	2	0.567
4	<0.355	70%乙醇	2	2	2.126

3.3 不同回流提取时间及次数

从表 2 可看出, 黄酮含量的高低与提取次数和提取时间均呈正相关, 随着提取时间和提取次数的增加, 提取出的黄酮含量均有所增加; 当提取次数从 2 次增加至 3 次时, 提取效果增加的趋势降缓, 从节约能源的角度考虑, 选择重复提取 3 次不再增加。所以, 本研究选择提取时间为 2 h, 次数为 3 作为最佳提取条件。

表 2 不同回流提取时间、次数对黄酮含量的影响					
Table 2 Effects of different reflux extraction time and times on flavonoids content					
编号	过筛直径/mm	提取溶剂	回流时间/h	回流次数/次	总黄酮含量/(mg/g)
1	<0.355	70%乙醇	1	1	1.604
2	<0.355	70%乙醇	1	2	2.123
3	<0.355	70%乙醇	1	3	2.134
4	<0.355	70%乙醇	2	1	1.675
5	<0.355	70%乙醇	2	2	2.134
6	<0.355	70%乙醇	2	3	2.330
7	<0.355	70%乙醇	3	1	1.904
8	<0.355	70%乙醇	3	2	2.134
9	<0.355	70%乙醇	3	3	2.281

3.4 不同浓度乙醇提取

当过筛程度、回流时间和回流次数一致时, 样品中提取出的黄酮含量随着乙醇浓度的升高而降低, 当乙醇浓度为 50%时得到的提取效率最好(见表 3)。与王磊等^[14]的结果: 单因素试验中提取溶剂为 50%乙醇时黑米中黄酮提取率最高是一致的。

综上所述, 当紫红米样品过筛程度为<0.355 mm, 提取时间为 2 h, 提取次数为 3 次, 且乙醇浓度为 50%时黄酮提取效果最好。

表 3 不同乙醇浓度对提取样品中黄酮含量的影响					
Table 3 Effects of different ethanol concentrations on flavonoids content					
编号	过筛直径/mm	提取溶剂	回流时间/h	回流次数/次	总黄酮含量/(mg/g)
1	<0.355	40%乙醇	2	3	5.673
2	<0.355	50%乙醇	2	3	6.162
3	<0.355	60%乙醇	2	3	5.480
4	<0.355	70%乙醇	2	3	4.525
5	<0.355	80%乙醇	2	3	4.339

3.5 紫红米与普通大米比较

按照上述优化的提取条件, 对紫红米和 3 个普通大米中的黄酮含量进行测定, 结果见表 4。紫红米中检出了黄酮, 含量为 6.162 mg/g, 而在 3 个普通大米样品中均未检出黄酮, 这个结果与侯锐骁等^[15]所测的 5 种普通大米中总黄酮含量为 0.1948~0.3222 mg/g 有较大差异, 作者认为这可能与其所选方法检测黄酮的专属性不强有关, 以黄酮类物质的紫外最大吸收波长 283 nm 处直接测定样品提取液的吸光度值来判定黄酮含量存在较大误差。

表 4 紫红米和普通大米中黄酮含量比较					
Table 4 Comparison of flavonoids content between purple red rice and common rice					
编号	过筛直径/mm	提取溶剂	回流时间/h	回流次数/次	总黄酮含量/(mg/g)
紫红米	<0.355	50%乙醇	2	3	6.162
大米 1 号	<0.355	50%乙醇	2	3	未检出
大米 2 号	<0.355	50%乙醇	2	3	未检出
大米 3 号	<0.355	50%乙醇	2	3	未检出

4 结论与讨论

本研究得出武功山紫红米中黄酮提取的较优条件为: 原料粉碎过 0.355 mm 筛, 料液比 1:4(g:mL), 50%乙醇为提取溶剂, 80 °C回流提取 2 h, 重复 3 次。该提取条件下, 测得武功山紫红米中的总黄酮含量为 6.162 mg/g。以此条件提取 3 个普通大米样品中的黄酮, 均未检出。王磊等^[12]的报道结果显示黑米中的黄酮提取率为 1.26%, 杨志刚等^[16]报道黑米中的黄酮提取率为 1.415%, 与本研究的黄酮得率差异差大, 认为与选用的方法和材料不同有关。相比起普通大米, 武功山紫红米可作为一种优质功能性食品的选择。

参考文献

[1] 付桂明, 万茜, 周建斌. 杜仲叶醇提液中黄酮测定方法的比较研究[J].

- 中国食品学报, 2006, 6(1): 224–229.
- Fu GM, Wan Y, Zhou JB. Comparative study on the determination of flavonoids in ethanol extract of *Eucommia ulmoides* leaves [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2006, 6(1): 224–229.
- [2] 张蓓蓓. 植物黄酮类化合物的研究[J]. 科技视界, 2018, 23: 155–157.
- Zhang BB. Studies on plant flavonoids [J]. Sci Technol Vision, 2018, 23: 155–157.
- [3] 杨光. 浅析天然色素活性研究及应用[J]. 中国现代医药杂志, 2007, 9(2): 141–142.
- Yang G. Study on the activity of natural pigment and its application [J]. Mod Med J China, 2007, 9(2): 141–142.
- [4] 倪帆呈, 周炎花, 张艳丽, 等. 茶叶黄酮提取和纯化工艺研究进展[J]. 饮料工业, 2018, 21(3): 59–62.
- Ni FC, Zhou YH, Zhang YL, *et al.* Progress in extraction and purification of flavonoids from tea [J]. Bev Ind, 2018, 21(3): 59–62.
- [5] Li H, Luo SL, Su JC, *et al.* Optimization of extraction conditions for flavonoid composition and antioxidant activity of radix scutellariae [J]. Anal Lett, 2015, (48): 1234–1244.
- [6] 刘倩佟, 刘洁, 吴玖萱, 等. 紫外分光光度法和高效液相色谱法测定合欢花总黄酮含量的比较研究[J]. 中医药信息, 2015, 32(2): 54–57.
- Liu QT, Liu J, Wu MX, *et al.* Comparative study on determination of total flavonoids in acacia flowers by UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography [J]. Inf Tradit Chin Med, 2015, 32(2): 54–57.
- [7] 孙志栋, 张方钢, 林波, 等. 有色米营养成分、功能性作用及遗传特性[J]. 食品工业, 2014, 35(2): 224–225.
- Sun ZD, Zhang FG, Lin B, *et al.* Nutritional composition, functional function and genetic characteristics of colored rice [J]. Food Ind, 2014, 35(2): 224–225.
- [8] 张伦宁, 刘婷, 文江花, 等. 武功山紫红米色素提取工艺[J]. 食品安全导刊, 2019, 230: 125–126.
- Zhang LN, Liu T, Wen JH, *et al.* Extraction technology of purple red rice pigment from Wugong mountain [J]. China Food Saf Magaz, 2019, 230: 125–126.
- [9] 薛博, 李新华, 韩韬, 等. 红米色素的提取及稳定性研究[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(7): 10–13.
- Xue B, Li XH, Han T, *et al.* Study on extraction and stability of red rice pigment [J]. Cereals Oils, 2016, 29(7): 10–13.
- [10] 刘建萍, 朱福文, 周芳, 等. 功能稻天丰优紫红的开发应用及绿色生产技术[J]. 中国稻米, 2014, 20(3): 83–85.
- Liu JP, Zhu FW, Zhou F, *et al.* Development and application of functional rice and high-quality purple red and green production technology [J]. China Rice, 2014, 20(3): 83–85.
- [11] 柴建新, 万茜, 付桂明, 等. 杜仲叶总黄酮含量测定方法优化[J]. 中国食品学报, 2013, 13(4): 225–230.
- Chai JX, Wan Y, Fu GM, *et al.* Optimization of determination method of total flavonoids in *Eucommia ulmoides* leaves [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2013, 13(4): 225–230.
- [12] 王磊, 王红梅, 刘长姣, 等. 酶法提取黑米中黄酮及抑菌性检测[J]. 中国食品添加剂, 2017, 12: 79–85.
- Wang L, Wang HM, Liu CJ, *et al.* Extraction of flavonoids from black rice by enzymatic method and detection of its bacteriostatic activity [J]. China Food Addit, 2017, 12: 79–85.
- [13] 倪力军, 盖群, 陈露, 等. 不同粒径马钱子粉中马钱子碱、土的宁的含量分析与比较[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2012, 38(2): 195–199.
- Ni LJ, Gai Q, Chen L, *et al.* Analysis and comparison of the contents of brucine and strychnine in different particle sizes of brucine powder [J]. J East China Univ Sci Technol, 2012, 38(2): 195–199.
- [14] 王磊, 韦雅玲, 刘长姣. 超声波辅助醇提黑米中黄酮的工艺优化[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(4): 24–28.
- Wang L, Wei YL, Liu CJ. Optimization of ultrasonic assisted ethanol extraction of flavonoids from black rice [J]. Cereals Oils, 2018, 31(4): 24–28.
- [15] 侯锐骁, 吴稀林, 张路玮, 等. 大米中黄酮和脂肪酸成分及抗氧化性能的分析[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 451–454.
- Hou RX, Wu XL, Zhang LY, *et al.* Analysis of flavonoids and fatty acids and their antioxidant activities in rice [J]. Food Sci, 2008, 29(9): 451–454.
- [16] 杨志刚, 张燕萍, 杨海定. 超声波辅助提取常熟黑米类黄酮及其抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2013, 18: 118–122.
- Yang ZG, Zhang YP, Yang HD. Ultrasonic assisted extraction of flavonoids from Changshu black rice and analysis of its antioxidant activity [J]. Food Sci, 2013, 18: 118–122.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



张伦宁, 硕士, 工程师, 主要研究方向为功能食品与营养保健。
E-mail: 86217634@qq.com