

# 藜麦种子总黄酮提取和含量测定方法的比较

冯焕琴<sup>1,2</sup>, 徐雪凤<sup>1,2</sup>, 杨宏伟<sup>1,2</sup>, 沈宝云<sup>3</sup>, 胡静<sup>3</sup>, 李朝周<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>甘肃农业大学生命科学技术学院; <sup>2</sup>甘肃省作物遗传改良和种质创新重点实验室, 兰州 730070;

<sup>3</sup>甘肃条山农林科学研究所, 白银 730400

**摘要:** 利用响应面分析法比较了藜麦种子总黄酮含量提取的氯化铝显色法和硝酸铝显色法及其主要影响因素, 以期获得藜麦种子最佳的黄酮提取方案。在单因素实验基础上, 选取乙醇浓度、提取温度和提取时间为影响因素, 以藜麦种子总黄酮得率为响应值进行响应面分析。氯化铝显色法的最佳提取条件是在乙醇浓度为 71.97%, 提取温度为 62.45 °C 条件下提取 1.11 h, 此时藜麦黄酮得率为 5.322%, 误差为 7.68%; 硝酸铝显色法的最佳提取条件是在乙醇浓度为 84.43%, 提取温度为 61.13 °C 条件下提取 1.24 h 时, 此时藜麦黄酮得率为 8.799%, 误差为 1.24%。硝酸铝显色法误差小, 稳定性高, 所得总黄酮含量较高, 适合于藜麦种子总黄酮含量的提取测定。

**关键词:** 响应面法; 藜麦; 氯化铝显色法; 硝酸铝显色法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.004

## Comparison on the Extraction and Determination Method of Total Flavonoids in Quinoa Seed

FENG Huan-qin<sup>1,2</sup>, XU Xue-feng<sup>1,2</sup>, YANG Hong-wei<sup>1,2</sup>, SHEN Bao-yun<sup>3</sup>, HU Jing<sup>3</sup>, LI Chao-zhou<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Gansu Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement;

<sup>2</sup>College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

<sup>3</sup>Agricultural and Forestal Science Research Institution of Gansu Tiaoshan Group, Lanzhou 730400, China

**Abstract:** AlCl<sub>3</sub> colorimetry method and Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> colorimetry method of total flavonoids from quinoa were studied by response surface methodology, in order to obtain the best extraction method. Based on single factor experiments, take ethanol concentration, extraction temperature and extraction time as main variables. With the total flavonoids yield, the content determination was optimized by response surface analysis method. The best extraction process for AlCl<sub>3</sub> colorimetry method was to extract 1.1h in 62.45 °C water bath and 71.97% ethanol concentration, the yield of flavonoids was 5.322% while error was 7.68%. The best extraction process for Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> colorimetry method was to extract 1.24 h in 61.13 °C water bath and 84.43% ethanol concentration, the yield of flavonoids was 8.799% while error was 1.24%. Compared with AlCl<sub>3</sub> colorimetry method, Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> colorimetry method was efficient and stable for the determination of flavone in quinoa.

**Key words:** Response surface method; Quinoa; AlCl<sub>3</sub> colorimetry method; Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> colorimetry method

藜麦 (*Chenopodium quinoa* willd) 为藜属藜科双子叶植物<sup>[1]</sup>, 在南美洲地区的种植范围极广, 从北纬 20° 的哥伦比亚到南纬 40° 的智利, 从海平面到海拔 3800 m 的地区均有种植<sup>[2]</sup>。藜麦最初仅为玻利维亚和秘鲁这两个安第斯国家的粮食作物, 近 20 年以来逐步成为其主要出口的粮食<sup>[3]</sup>。在 19 世纪 70

年代中期, 藜麦特殊的营养特性被发现, 并受到越来越多消费者的喜爱<sup>[4]</sup>。藜麦具有很高的营养价值, 已被国家研究委员会和美国国家航空航天局 (NASA) 评估为一种极富营养特征的食物<sup>[5]</sup>。由于藜麦的营养价值在提供粮食和营养安全等方面的突出作用, 联合国大会宣布 2013 年为“国际藜麦年”<sup>[6]</sup>。

藜麦种子是谷物和假谷物中黄酮来源的最有效食物。Zhu 等<sup>[7]</sup>从藜麦种子中分离出 6 种黄酮类化合物。藜麦中黄酮类物质的含量约是大米的十倍,

收稿日期: 2016-05-23

接受日期: 2016-07-15

基金项目: 国家科技支撑计划 (2012BAD06B03); 甘肃省农牧厅项目 (GNSW-2012-21)

\* 通讯作者 E-mail: licz@gsau.edu.cn

与大豆总黄酮含量相当<sup>[8]</sup>。有研究表明,藜麦种子中含有大量类黄酮甙化合物,如山酚和槲皮素的低聚糖苷等<sup>[7-10]</sup>。类黄酮是蔬菜、水果和茶叶中典型的多酚类物质,能够通过抗氧化作用或对几种蛋白质的功能调节,预防退行性疾病,如冠心病<sup>[11]</sup>、动脉粥样硬化<sup>[12]</sup>、癌症<sup>[13]</sup>、糖尿病和阿尔茨海默病<sup>[14]</sup>。

黄酮类化合物普遍存在于植物中,至今已证实结构的化合物有 2000 多种。据文献报道,黄酮化合物中某些分子可与金属盐类反应生成有色金属络合物,这些络合物在光谱上能产生明显的变化,常用于测定黄酮类化合物含量的金属试剂有  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{AlCl}_3$  等<sup>[15]</sup>。陆敏佳<sup>[16]</sup>对藜麦叶片黄酮化合物进行了提取,采用三因素三水平正交试验设计对乙醇回流提取法的浸取时间、乙醇体积分数以及料液比进行了探究。董晶<sup>[17]</sup>等用超声提取法对藜麦总黄酮进行了提取,得出了最佳提取条件。但就藜麦黄酮含量测定显色剂选取方面尚未有研究,本文就黄酮氯化铝显色法和亚硝酸钠显色法进行了比较,利用响应面分析法得出最佳提取时间,为黄酮含量的提取和测定提供理论和技术支撑。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

藜麦种子:为加拿大 Salt spring seed company 提供的 *Kasala quinoa* 品种,在甘肃景泰条山集团引种收获的种子。芦丁对照品(上海源叶生物科技有限公司);乙醇为无水乙醇与去离子水配置;1%  $\text{AlCl}_3$  溶液,10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液,5%  $\text{NaNO}_2$  溶液,4%  $\text{NaOH}$  溶液,石油醚为分析纯。

### 1.2 仪器

HH-6 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);QE 万能粉碎机(浙江屹立工贸有限公司);SP-752

紫外可见分光光度计(上海楚度仪器设备有限公司);JJ200B 电子天平(北京尚德利衡电子衡器有限公司);TDZ4-WS 低速离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 对照品溶液配制

精密称取 19.7 mg 芦丁标准品,置于小烧杯中,加入少量 60% 乙醇使之完全溶解,将溶解液转入 100 mL 容量瓶中,再次在烧杯中加入 60% 乙醇,将杯中残留液体全部转入容量瓶,这样重复几次,最后用 60% 乙醇定容至 100 mL,即可得到 0.197 mg/mL 的标准储备液。

### 2.2 供试品溶液配制

取样品材料 1 g(粉末过 80 目筛),加入一定倍数相应浓度的乙醇溶液,在相应温度下提取一定时间后,4000 rpm 离心 5 min,将上清液移至 50 mL 容量瓶中,沉淀以同样倍数的提取液混匀,在同样的条件下进行二次提取,离心,将上清液并入上述容量瓶中。在提取工艺中改变相应的参数。在上述溶液中加入 15 mL 石油醚脱脂后,浓缩至无醇味,定容至 50 mL,待测。

### 2.3 法标准曲线的绘制及精密度实验<sup>[18,19]</sup>

#### 2.3.1 标准曲线制备

精密吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL “2.1”中所配置的芦丁标准液,分别置于 10 mL 具塞试管中,加入 4 mL 1%  $\text{AlCl}_3$  溶液,摇匀,静置 5 min,用 60% 乙醇定容,摇匀,放置 10 min 后在 415 nm 处测吸光值。以吸光值为横坐标,标准液浓度为纵坐标,绘制标准曲线。得线性回归方程: $y = 1.231x + 0.0455$ ,  $R^2 = 0.9907$ (图 1A)。

精密吸取 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL

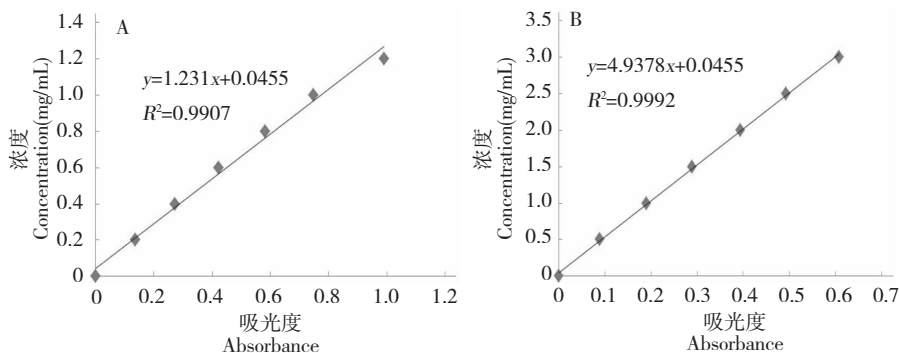


图 1 氯化铝显色法(A)和硝酸铝显色法(B)芦丁标准曲线

Fig. 1 The standard curve of rutin with  $\text{AlCl}_3$  colorimetry method(A) and  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  colorimetry method(B)

“2.1”中所配置的芦丁标准液,分别置于 10 mL 具塞试管中,加入 0.4 mL 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液,摇匀,静置 5 min 后再加入 0.4 mL 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液,摇匀,静置 5 min,加入 4 mL 4% NaOH 溶液,用 60% 乙醇定容,摇匀,15 min 后在 510 nm 处测吸光值。以吸光度为横坐标,标准液浓度为纵坐标绘制标准曲线。

得线性回归方程:  $y = 4.9378x + 0.0455$ ,  $R^2 = 0.9992$  (图 1B)。

### 2.3.2 精密度实验

取芦丁标准液(0.197 mg/mL),在 415 nm 处和 510 nm 处分别连续测定 6 次,其吸收度的 RSD 值为 0.25% 和 0.28%,表明精密度良好,结果见表 1。

表 1 精密度试验 ( $n=6$ )

Table 1 Precision test ( $n=6$ )

次数 Times		1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	RSD%
吸光度 Absorbance	氯化铝 AlCl <sub>3</sub>	0.297	0.298	0.298	0.298	0.297	0.299	0.298	0.25
	硝酸铝 Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.288	0.289	0.287	0.287	0.287	0.288	0.288	0.28

## 2.4 黄酮得率的计算公式

$$\text{黄酮得率}(\%) = \frac{C \times V_1 \times V_2}{V_3 \times W \times 1000} \times 100$$

其中, C 为根据回归方程计算得到的芦丁浓度, mg/mL; V<sub>1</sub> 为提取液体积, mL; V<sub>2</sub> 为稀释后的提取液体积, mL; V<sub>3</sub> 为待测液体积, mL; W 为藜麦种子质

量, g。

## 2.5 单因素实验

分别用不同显色方法研究不同提取温度、提取时间、乙醇浓度以及料液比对黄酮得率的影响,实验因素见表 2。

表 2 单因素实验设计

Table 2 Experimental design of single factor

提取条件 Condition	因素 Factor			
	乙醇浓度 Ethanol concentration	提取温度 Extraction temperature	提取时间 Extraction duration	料液比 Solid/liquid ratio
乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	50、60、70、80、90	60	1.0	1:10
提取温度 Extraction temperature (°C)	60	40、50、60、70、80	1.0	1:10
提取时间 Extraction time (h)	60	60	0.5、1.0、1.5、2.0、2.5	1:10
料液比 Solid/liquid ratio (g: mL)	60	60	1:10	1:5、1:10、1:15、1:20、1:25

## 2.6 响应面实验设计

在单因素实验的基础上,设计响应面实验,按照中心旋转组合实验设计原理,以乙醇浓度、提取温度和提取时间三因素为自变量,各自用 A、B、C 表示,响应面实验设计见表 3。

## 2.7 数据统计分析

本文采用 Microsoft Excel 2010 和 Design-Expert 响应面分析软件对数据进行处理、绘图和分析,采用 SPSS 17.0 统计分析软件对数据进行差异显著性检验。

## 3 结果与分析

### 3.1 氯化铝显色法

#### 3.1.1 单因素结果分析

乙醇浓度对黄酮得率的影响见图 2A,由图可知,随着乙醇浓度增加,藜麦黄酮得率呈上升趋势,在乙醇浓度达到 70% 时,黄酮得率显著增加,随后变化不明显,因而选取乙醇浓度 70% 较合适。由图 2B 表示不同提取温度对藜麦黄酮得率影响不同。随着温度升高,黄酮得率逐渐增加,在 60 °C 下影响

表3 不同显色法响应面设计因素水平表

Table 3 Response surface design factors with different colorimetry methods

显色法 Method	水平 Level	因素 Factor		
		A 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	B 提取温度 Extraction temperature(°C)	C 提取时间 Extraction time(h)
氯化铝 $\text{AlCl}_3$	-1	60	50	0.5
	0	70	60	1.0
	1	80	70	1.5
硝酸铝 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	-1	70	50	0.5
	0	80	60	1.0
	1	90	70	1.5

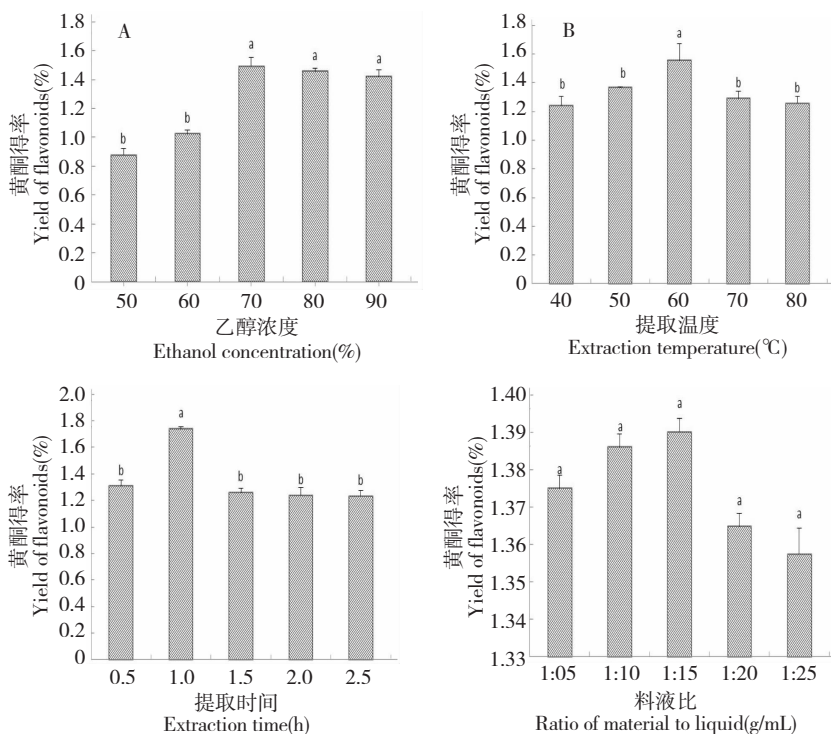


图2 各因素对黄酮得率的影响

Fig. 2 Effect of different factors on the yield of flavonoids

最为显著且达到最大值 1.56%, 温度继续上升并接近乙醇沸点时, 乙醇开始挥发, 黄酮得率有所下降, 因而单因素确定提取温度为 50 ~ 70 °C。随着提取时间增加, 黄酮得率刚开始显著增加并在提取时间为 1.0 h 时达到最大值 1.74%, 随后继续增加提取时间黄酮得率反而下降。因此可将提取时间确定在 0.5 ~ 1.0 h (图 2C)。不同料液比对藜麦黄酮得率的影响见图 2D, 由图可知, 随着料液比的增加, 藜麦黄酮得率呈上升趋势, 到料液比达到 1:15 时, 黄酮得率达到最大值, 随后继续增加料液比, 黄酮得率开

始下降。鉴于料液比对黄酮得率的影响并不显著, 因而确定料液比为 1:15。

### 3.1.2 响应面方法和结果分析

以黄酮得率为响应值, 用 Design-Expert 8.0.5.0 软件以乙醇浓度、提取温度及提取时间为因素设计三因素三水平实验, 响应面分析总共 20 个试验点, 各个试验点随机进行, 重复三次。通过分析表 4 数据, 可建立如下二次回归方程:  $Y = 5.23 + 0.35A + 0.32B + 0.22C - 0.01AB - 0.2AC + 0.2BC - 0.73A^2 - 0.75B^2 - 0.47C^2$ 。

表 4 响应面分析方案及结果

Table 4 Design and result of response surface analysis

实验号 No.	A	B	C	Y 黄酮得率 Yield of flavonoid(%)
1	1	1	1	4.15
2	-1	-1	1	2.54
3	-1	-1	-1	2.03
4	1	-1	1	3.17
5	1	-1	-1	3.15
6	0	0	1.68	4.26
7	-1	1	-1	2.57
8	0	0	0	5.19
9	1	1	-1	3.67
10	0	0	0	5.34
11	-1.682	0	0	2.98
12	0	0	0	5.37
13	0	0	-1.68	4.02
14	0	-1.682	0	2.97
15	0	0	0	4.81
16	-1	1	1	3.88
17	0	0	0	5.31
18	0	1.682	0	3.71
19	0	0	0	5.26
20	1.682	0	0	3.82

回归模型系数显著性检验结果见表 5,从中可以看出,回归模型  $P < 0.0001$ ,达到极显著水平,失拟项为 0.0796,故而回归方程和实际情况较为吻合,可信度较高,可用于藜麦种子黄酮提取工艺实验的预测。乙醇浓度 A,提取温度 B 及提取时间 C 对黄酮得率影响均显著,平方项乙醇浓度  $A^2$ 、提取温

度  $B^2$  对黄酮得率影响极显著,其他项对黄酮得率不显著。由 F 值可以看出,各因素对藜麦种子黄酮得率的影响大小为:  $B > A > C$ ,即提取温度  $>$  乙醇浓度  $>$  提取时间,提取温度的影响最大,提取时间的影响最小。

表 5 回归模型系数及显著性检验结果

Table 5 Regression coefficients and significant test for quadratic polynomial model equation

方差来源 Origin	偏差平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方差 Mean square	F 值	P
模型 Model	19.72	9	2.19	20.64	$< 0.0001$
A	1.50	1	1.50	14.17	0.0037
B	1.57	1	1.57	14.75	0.0033
C	0.54	1	0.54	5.12	0.0472
AB	0.018	1	0.018	0.17	0.6888
AC	0.22	1	0.22	2.05	0.1826
BC	0.20	1	0.20	1.87	0.2016

方差来源 Origin	偏差平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方差 Mean square	F 值	P
A <sup>2</sup>	7.52	1	7.52	70.80	<0.0001
B <sup>2</sup>	7.97	1	7.97	75.02	<0.0001
C <sup>2</sup>	3.06	1	3.06	28.85	0.0003
残差 Error	1.06	10	0.11		
纯误差 Pure error	0.22	5	0.043		
失拟项 Lack of fit	0.85	5	0.17	3.93	0.0796
总和 Sum	20.79	19			

注:  $P < 0.001$  代表极显著;  $P < 0.05$  代表显著。

Note:  $P < 0.001$  indicated extremely significant difference;  $P < 0.05$  indicated significant difference.

图3 响应面表示各个因素即乙醇浓度、提取温度和提取时间对藜麦黄酮得率的影响分析。黄酮得率随着乙醇浓度的增大、提取温度的提高和提取时间的延长呈现先上升后下降的趋势,且图像曲线走势平缓,两两相互呈现的等高线图形趋于圆形,表明乙醇浓度、提取温度及提取时间的交互作用不显著。由图可知,响应面有最高点,进一步通过 Design-Ex-

pert 8.0.5.0 软件分析可知,当乙醇浓度为 71.97%,提取温度为 62.45 °C,提取时间为 1.11 h 时,藜麦种子黄酮得率达到最大值 5.322%。根据单因素实验得出最优条件乙醇浓度 70%,提取温度 60 °C,提取时间 1.0 h 时,藜麦种子黄酮平均得率为 5.213%,与模型方程预测值的误差为 7.68%,说明得到的提取条件可用。

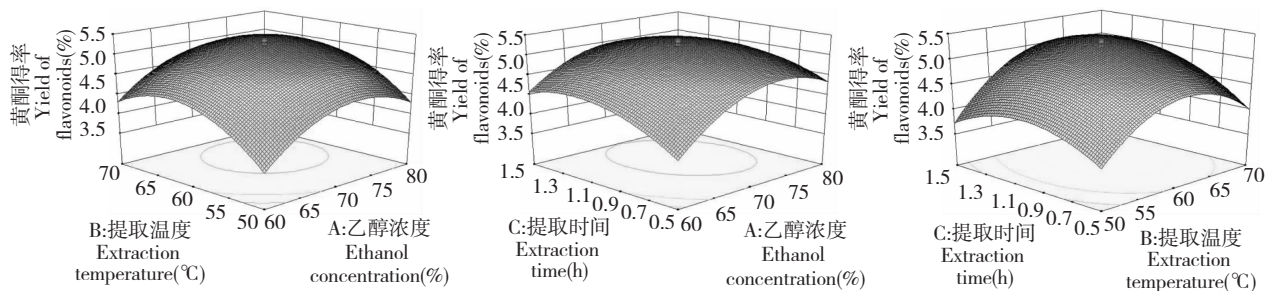


图3 各因素交互影响藜麦种子黄酮得率的响应面图

Fig. 3 Response surface for the effect of crossinteraction among factors on the yield of flavonoids from *C. quinoa* seed

## 3.2 硝酸铝显色法

### 3.2.1 单因素结果分析

由图4A可知,不同乙醇浓度对藜麦黄酮得率的影响不同,刚开始乙醇浓度较低,使得黄酮提取不完全,随着乙醇浓度的增加,原料中更多的黄酮转移到提取液中,黄酮得率增加,当乙醇浓度为80%时黄酮得率增加显著并达到最大值8.91%,继续增加乙醇浓度,渗透压增加使得黄酮得率减小,因而确定乙醇浓度范围为70%~90%。不同温度对藜麦黄酮得率的影响见图4B,当温度为40 °C时,提取液流动较小,与提取材料接触的不完全,因而黄酮得率较小,温度升高,流动性变大,黄酮得率开始增大,当温度升到60 °C时,黄酮得率显著增加并且达到最大值2.13%,继续增加提取温度,提取液开始挥发,黄酮得率下降。因此可确定提取温度范围为50~70 °C。

由图4C可知,当提取时间为1.0 h时,黄酮得率达到最大值2.13%,继续增加提取时间,提取液有所挥发使得黄酮得率显著下降。因而确定提取时间范围为0.5~1.0 h。图4D表示随着溶剂量增加,提取材料与提取液的接触面积增加,黄酮得率也增加,当料液比达到1:10时,黄酮得率显著增加,在料液比达到1:15时,黄酮得率达到最大值2.2%,继续增加料液比,黄酮得率基本保持不变,料液比的增加对黄酮得率影响不大。因而确定料液比为1:15为宜。

### 3.2.2 响应面结果分析

以黄酮得率为响应值,用 Design-Expert 8.0.5.0 软件以乙醇浓度、提取温度及提取时间为因素设计三因素三水平实验,响应面分析总共20个试验点,各个试验点随机进行,重复三次。通过分析表6数

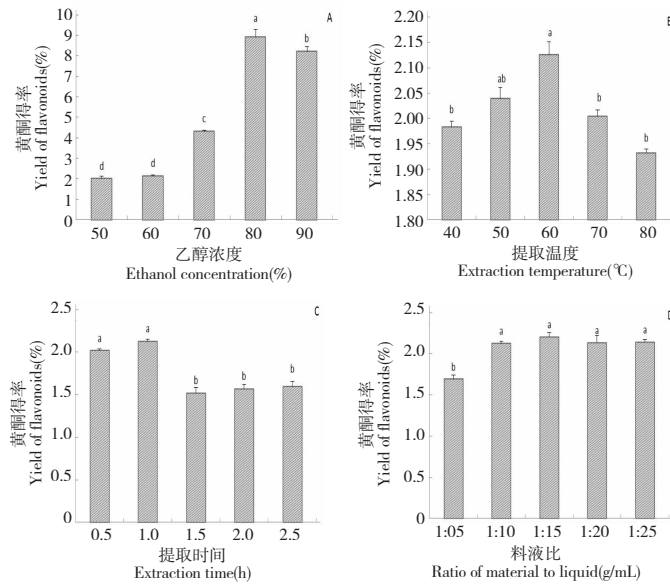


图4 各因素对黄酮得率的影响

Fig. 4 Effect of different factors on the yield of flavonoids

据,可建立如下二次回归方程: $Y = 8.62 + 0.33A + 0.99B^2 - 0.62C^2 - 0.25B + 0.37C + 0.15AB + 0.53AC - 0.19BC - 0.68A^2 -$

表6 响应面分析方案及结果

Table 6 Design and result of response surface analysis

实验号 No.	A	B	C	Y 黄酮得率 Yield of flavonoids (%)
1	0	0	1.680	7.53
2	0	0	0	8.79
3	1.682	0	0	7.57
4	0	0	0	8.41
5	0	0	0	8.73
6	-1	1	-1	6.64
7	0	0	-1	8.74
8	0	0	0	9.05
9	0	1.682	0	6.53
10	-1	-1	1	6.34
11	-1	1	1	5.61
12	0	0	-1.680	6.24
13	0	0	0	8.02
14	1	-1	-1	5.32
15	-1.682	0	0	5.83
16	1	1	-1	5.97
17	1	1	1	7.68
18	0	-1.682	0	5.14
19	1	-1	1	7.2
20	-1	-1	-1	5.98



回归模型系数显著性检验结果见表 7,从图中可以看出,回归模型  $P < 0.0001$ ,达到极显著水平,失拟项为 0.4185,相关系数  $R^2 = 0.9533$ ,表明拟合程度好,可信度较高,可用于藜麦种子黄酮提取工艺实验的预测。表 7 中乙醇浓度 A,提取温度 B,提取时间 C 及 AC 交互作用和平方项提取时间  $C^2$  对黄

酮得率影响均显著,平方项乙醇浓度  $A^2$ 、提取温度  $B^2$  对黄酮得率影响达到极显著,其他项对黄酮得率不显著。由 F 值可以看出,各因素对藜麦种子黄酮得率的影响大小为:  $C > A > B$ ,即提取时间  $>$  乙醇浓度  $>$  提取温度,提取时间的影响最大,提取温度的影响最小。

表 7 回归模型系数及显著性检验结果

Table 7 Regression coefficients and significant test for quadratic polynomial model equation

方差来源 Origin	偏差平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方差 Mean square	F 值	P
模型 Model	29.1	9	3.23	22.67	<0.0001
A	1.50	1	1.50	10.52	0.0088
B	0.85	1	0.85	5.93	0.0352
C	1.90	1	1.90	13.30	0.0045
AB	0.18	1	0.08	1.26	0.2875
AC	2.27	1	2.27	15.91	0.0026
BC	0.30	1	0.30	2.13	0.1749
$A^2$	6.66	1	6.66	46.71	<0.0001
$B^2$	14.00	1	14.00	98.18	<0.0001
$C^2$	5.54	1	5.45	38.19	0.0001
残差 Error	1.43	10	0.14		
纯误差 Pure error	0.64	5	0.13		
失拟项 Lack of fit	0.78	5	0.16	1.21	0.4185
总和 Sum	30.52	19			

注:  $P < 0.001$  代表极显著;  $P < 0.05$  代表显著。

Note:  $P < 0.001$  indicated extremely significant difference;  $P < 0.05$  indicated significant difference.

图 5 响应面表示各个因素即乙醇浓度、提取温度和提取时间对藜麦黄酮得率的影响分析。黄酮得率随着乙醇浓度的增大和提取温度的提高呈现先上升后下降的趋势,且图像曲线走势平缓,等高线图趋于圆形,表明乙醇浓度和提取温度的交互作用不显著。黄酮得率随乙醇浓度和提取时间的提高也呈现先上升后下降的趋势,乙醇浓度和提取时间等高线形状趋向椭圆形状,表明其交互作用显著。由图

5 可知,响应面存在极值,进一步通过 Design-Expert 8.0.5.0 软件分析可知,当乙醇浓度为 84.43%,提取温度为 61.13 °C,提取时间为 1.24 h 时,藜麦种子黄酮得率达到最大值 8.799%。根据单因素实验得出最优条件乙醇浓度 80%,提取温度 60 °C,提取时间 1.0 h 时,藜麦种子黄酮平均得率为 8.623%,与模型方程预测值的误差为 1.24%,说明得到的提取条件可用。

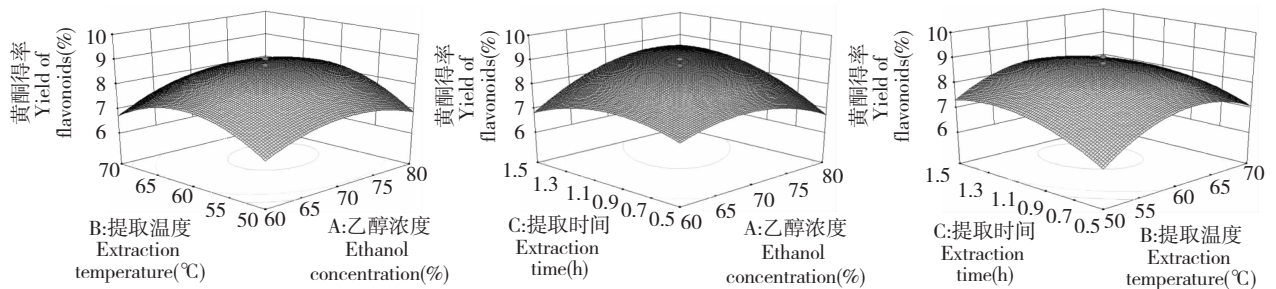


图 5 各因素交互影响藜麦种子黄酮得率的响应面图

Fig. 5 Response surface for the effect of crossinteraction among factors on the yield of flavonoids from *Chenopodium quinoa* seed



### 3.3 重复性试验

分别精密称取同一供试品 1.0 g, 平行 5 份, 按

2.3.1 中不同显色方法显色, 测吸光度, 计算黄酮得

率, 结果 RSD 为 0.65% 和 0.49%, 表明氯化铝显色法和硝酸铝显色法重复性较好。结果见表 8。

表 8 重复性实验

Table 8 Repeated experiments

次数 Times		1	2	3	4	5	$\bar{x}$	RSD%
黄酮得率 Yield flavonoid	氯化铝 $\text{AlCl}_3$	1.95	1.96	1.96	1.98	1.98	1.97	0.65
	硝酸铝 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	6.27	6.28	6.20	6.26	6.24	6.25	0.49

### 3.4 稳定性试验

取同一供试品溶液, 按照 2.3.1 中不同显色方法显色, 于 415 nm 和 510 nm 处分别在 0、5、10、15、

20min 时测其吸光度, 得 RSD 分别为 0.42% 和 0.58%, 表明供试品溶液在 20 min 内稳定性良好。结果见表 9。

表 9 稳定性实验

Table 9 Stability test

时间 Time (min)		0	5	10	15	20	$\bar{x}$	RSD (%)
吸光度 Absorbance	氯化铝 $\text{AlCl}_3$	0.243	0.244	0.243	0.242	0.245	0.243	0.42
	硝酸铝 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	0.635	0.638	0.636	0.629	0.631	0.634	0.58

## 4 讨论

黄酮类化合物泛指两个苯环通过中央三碳链相互联结而成的一系列化合物, 当前黄酮因其独特的保健功能越来越受到人们的重视<sup>[20]</sup>。联合国组织认为, 藜麦是唯一的单体植物即可满足人体基本营养需求的食物<sup>[21]</sup>。藜麦含有丰富的类黄酮物质, 藜麦黄酮具有抗菌<sup>[22]</sup>、抗癌及防癌<sup>[23]</sup>等作用, 受到广泛的关注。目前测定黄酮化合物的方法有多种, 主要有高效液相色谱法<sup>[24]</sup>、化学发光分析方法<sup>[25]</sup>、分光光度法<sup>[26]</sup>等, 其中紫外分光光度法简单快速, 灵敏高效, 而且标准品易得, 结果可靠, 在黄酮测定中广泛使用。

本实验在单因素实验的基础上利用 Design-Expert 8.0.5.0 软件中心旋转组合进行响应面实验设计, 以黄酮得率为指标比较了藜麦种子总黄酮提取及含量测定的方法, 分别用氯化铝和硝酸铝两种不同的显色剂对总黄酮含量进行了测定, 实验数据表明, 当乙醇浓度为 71.97%, 提取温度为 62.45 °C, 提取时间为 1.11 h 时, 用氯化铝显色法测得藜麦种子黄酮得率最大值为 5.322%, 重复性 0.65%, 稳定性 0.42%, 误差 7.68%。当乙醇浓度为 84.43%, 提取温度为 61.13 °C, 提取时间为 1.24 h 时, 用硝酸

铝显色法测得藜麦种子黄酮得率最大值为 8.799%, 重复性 0.49%, 稳定性 0.58%, 误差 1.24%。由此可见, 硝酸铝显色法误差小, 较稳定, 这与何书美<sup>[27]</sup>对茶叶中总黄酮含量测定方法研究相吻合。

本实验研究表明, 硝酸铝显色法具有快速简单, 适用性广, 精密度较高等特点, 和氯化铝显色法相比有明显优势, 适合于藜麦种子总黄酮含量的测定, 这为藜麦黄酮含量的测定及利用提供理论指导。

### 参考文献

- 1 Ferreira DS, Pallone JAL, Poppi RJ. Direct analysis of the main chemical constituents in *Chenopodium quinoa* grain using Fourier transform near-infrared spectroscopy. *Food Control*, 2015, 48: 91-95.
- 2 Risi J, Galwey NW. The pattern of genetic diversity in the Andean grain crop *quinoa* (*Chenopodium quinoa* Willd). *Multivariate methods. Euphytica*, 1989, 41: 135-145.
- 3 Bhargava A (阿图尔·博汗格瓦), Srivastava S (希皮尔·斯利瓦斯塔瓦). *Quinoa: Botany, Production and Uses*. Beijing: Science Press, 2014. 5.
- 4 Maughan PJ, Bonicchio A, Coleman CE, et al. *Quinoa* (*Chenopodium quinoa* Willd). In: Kole, C. (ed.) *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 3 Pulses*,

- Sugar and Tuber Crops*. Springer, Berlin, Germany, 2007: 147-158.
- 5 Schlick G, Bubenbeim DL. Quinoa: Candidate crop for NASA, S controlled ecological life support systems. In: J. Janick (ed.) *Progress in new crop*. ASHS press, Arlington, Virginia, 1996. 632-640.
  - 6 Wang CJ(王晨静), Zhao XW(赵习武), Lu GQ(陆国权), et al. A review of characteristics and utilization of *Chenopodium quinoa*. *J Zhejiang A & F Univ*(浙江农林大学学报), 2014, 31:296-301.
  - 7 Zhu NQ, Sheng SQ, Li DJ, et al. Antioxidative flavonoid glycosides from quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J Food Lipids*, 2001, 8(1):37-44.
  - 8 Dong SB(董施斌), Ning YP(宁亚萍), Yang Z(杨喆), et al. Study on extraction process of quinoa total flavonoids and purification process of macroporous resin. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2015, 36:272-278.
  - 9 Dini I, Teore GC, Dini A. Phenolic constituents of Kancolla seeds. *Food Chem*, 2004, 84:163-168.
  - 10 Hirose Y, Fujita T, Ishii T, et al. Antioxidative properties and flavonoid composition of *Chenopodium quinoa* seeds cultivated in Japan. *Food Chem*, 2010, 119:1300-1306.
  - 11 Art ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81:317.
  - 12 Kurosawa T, Itoh F, Nozaki A, et al. Suppressive effects of cacao liquor polyphenols (CLP) on LDL oxidation and the development of *Atherosclerosis* in Kurosawa and Kusanagi-phypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, 2005, 179:237-246.
  - 13 Rice-Evans CA, Packer L. *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York. 1998.
  - 14 Youdim KA, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Flavonoids and brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radical Biol Med*, 2004, 37:1683-1693.
  - 15 Ma TT(马陶陶), Zhang QL(张群林), Li J(李俊). Determination of total flavonoids in traditional Chinese medicine. *Anhui Med Pharm J*(安徽医科大学药学院), 2007, 11:1030-1032.
  - 16 Lu MJ(陆敏佳), Jiang YR(蒋玉蓉), Chen GL(陈国林), et al. Flavonoid extraction and flavonoid content with genotypic variation from *Chenopodium quinoa* leaves. *J Zhejiang A & F Univ*(浙江农林大学学报), 2014, 31:534-540.
  - 17 Dong J(董晶), Zhang Y(张焱), Cao ZR(曹赵茹), et al. Ultrasonic extraction and antioxidant activity of total flavonoids of *Quinoa*. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学), 2015, 43:267-269.
  - 18 Wang Y(王勇), Zhao HY(赵海燕), Feng L(封琳), et al. Comparison and evaluation of methods for licorice flavonoids content determination. *J Anhui Agric*(安徽农业科技), 2009, 37:13593-13595.
  - 19 Zheng YY(郑媛媛), Li C(李辰), Feng SL(封士兰), et al. Study on the content determination of total flavonoids in *Olea europaeal* leaves. *Spectrosc Spectral Anal*(光谱学与光谱分析), 2011, 31:547-549.
  - 20 Lu GQ(陆国权), Ren Y(任韵), Tang ZH(唐忠厚), et al. Flavonoid extraction and flavonoid content genotypic variation in sweet potato storage roots. *J Zhejiang Univ*(浙江大学学报:农业与生命科学版), 2005, 31:541-544.
  - 21 Weight KH, Pike OA, Farrbanks DJ, et al. Composition of *Atriplex hortensis*, sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. *J Food Sci*, 2002, 67:1383-1385.
  - 22 Wang Y(王岩), Xie YY(谢媛媛), Sun JH(孙嘉鸿). Quantitative determination of the total flavonoids and organic acids of *Crysanthemum morifolium* extract. *J Senyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2011, 28:124-129.
  - 23 Wu SP(吴素萍), Ge ZJ(葛志军). The biological function research advancement of soy isoflavones. *Jiangxi Sci*(江西科学), 2007, 25:651-655.
  - 24 Li LG(李利改), Xi WP(席万鹏), Zhang YM(张元梅), et al. A study of the flavonoids in different tissues of the basic citrus types native to China. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), 2013, 46:4753-4762.
  - 25 Li Y(刘焱), Gao ZX(高智席), Huang C(黄成). Research progress on medicinal and edible homogeny wilding *Rosa laevigata* Mickx. *J Anhui Agric*(安徽农业科学), 2008, 36:9128-9129.
  - 26 Zhang WL(张文莉), Gao M(高敏), Shi SL(石森林). Determination of flavonoids of *Hawthorn* leaves extract by spectrophotometry. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2011, 29:1148-1151.
  - 27 He SM(何书美), Liu JL(刘敬兰). Study on the determination method of flavone content in tea. *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2007, 35:1365-1368.