

# 微波加热对以槲皮素为甙元的黄酮甙的 稳定性的影响

黄建林, 张展霞

(中山大学 化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

**摘要:** 以乙醇为溶剂, 分别采取微波和回流加热萃取法从番石榴叶中萃取槲皮素, 高效液相色谱法测定槲皮素的萃取收率。对回流萃取液进行微波加热, 槲皮素收率随微波加热温度的增加而显著增加。分别测定了温度为 100、110、120 的微波萃取动力学曲线以及 60、70 和 78 的回流加热萃取动力学曲线, 计算结果显示, 微波萃取和回流加热萃取均符合一级动力学方程, 微波萃取槲皮素的活化能是回流加热萃取活化能的 2 倍多, 平均表观速率常数是回流加热萃取的 125 倍。计算得到的活化能数据和实验结果均显示微波加热产生的高温可导致以槲皮素为甙元的黄酮甙发生分解。

**关键词:** 微波加热; 槲皮素糖甙; 稳定性; 高效液相色谱; 萃取动力学; 活化能

**中图分类号:** O643.1; O657.72; O658.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2005)02-0015-04

## Influence of Microwave Heating on the Stability of Quercetin Glycosides

HUANG Jian-lin, ZHANG Zhan-xia

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** Quercetin in guava leaves was extracted with ethanol under microwave and reflux heating, respectively. Quercetin yields were determined by high-performance liquid chromatography. The yields of quercetin obtained by heating the reflux heating extracts using microwave increased significantly with the increase of temperatures. Kinetics curves of microwave extraction at 100, 110 and 120 and reflux heating extraction at 60, 70 and 78 were determined, respectively. The results showed that the reaction order number of both microwave-assisted extraction (MAE) and reflux heating extraction (RHE) was one. The activation energy of MAE was more than 2 times that of RHE. The average apparent rate constant of MAE was 125 times that of RHE. Both the data of calculated activation energy and the results of experiments indicated that quercetin glycosides degraded under the high temperature caused by microwave irradiation.

**Key words:** Microwave heating; Quercetin glycosides; Stability; HPLC; Extraction kinetics; Activation energy

微波辅助萃取 (MAE) 是利用微波的加热效应而建立起来的新的分析样品预处理技术。微波辐射含极性溶剂或含盐、强酸、强碱的介质时, 偶极子转动和离子传导将微波能转换为热能而使介质整体加热, 温度迅速升高, 在密闭的体系中, 温度可升高至极性溶剂大气压下的沸点之上。微波加热导致的高温使溶剂的粘度下降、扩散系数增加, 加快了溶剂的扩散和渗透过程。高温也使溶剂的溶解能力加强, 更易克服基体与欲萃取成分之间的分子作用力, 加速溶质的溶出过程。因此, 与传统的室温浸提、索氏抽提和加热回流等萃取方法相比, 微波辅助萃取过程的速度大为增加。近几年来, MAE 技术在植物药用成分萃取方面的应用研究发展迅速, 研究人员采用 MAE 技术萃取了挥发油、黄酮、蒽醌、生物碱、皂甙、酚酸、多糖等多种不同性质的药用成分<sup>[1-7]</sup>。然而, 根据文献报道, 研究主要集中在微波萃取参数, 如微波输出功率、压力、萃取溶剂、样品颗粒度和萃取时间的优化上, 只有极少数文献涉及到微波辐射对药用成分分子结构的影响<sup>[8]</sup>。

番石榴叶是传统的中药, 民间常用番石榴叶及其萃取物治疗肠胃炎、痢疾、糖尿病等疾病<sup>[9,10]</sup>。以槲皮素为甙元的黄酮甙 (槲皮素糖甙) 是番石榴叶中的重要药用成分<sup>[11]</sup>。本文从理论和实验两方面研究了微波加热对槲皮素糖甙的稳定性的影响, 计算得到的活化能数据和实验结果均显示微波加热产生的高温可导致槲皮素糖甙发生分解。

收稿日期: 2004-04-18; 修回日期: 2004-12-30

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (G2000026302)

作者简介: 黄建林 (1961-), 女, 湖北武汉人, 博士研究生; 张展霞, 联系人, Tel: 020-84035186; E-mail: ceszxx@zsu.edu.cn

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

MARS-X 微波加速溶剂萃取仪 (CEM, 美国), 微波辐射功率的可调范围为 0~1 200 W, 最高温度可达 200 °C; LC-VP 高效液相色谱仪 (岛津, 日本)。200 mm × 4.6 mm × 5 μm C<sub>18</sub> 反相液相色谱柱 (北京迪马公司)。

槲皮素 (ACROS, 美国), 色谱纯乙腈 (Merck, 德国), 分析纯乙醇 (广州化学试剂厂), 纯净水 (怡宝, 广州)。

### 1.2 样品制备

1.2.1 微波萃取 (MAE) 称取 0.500 0 g 干燥的番石榴叶置于微波萃取罐中, 加 20 mL 乙醇后将密闭的萃取罐置于微波炉内, 将微波辐射的初始功率调至 600 W, 使萃取罐的温度迅速上升至预设的温度并加热一定时间。待萃取罐冷却后, 过滤, 残渣用萃取溶剂清洗 2~3 次, 合并滤液和洗涤液, 用萃取溶剂定容至 25 mL。每一条件平行萃取 3 份试样。

1.2.2 回流加热萃取 (RHE) 称取 0.500 0 g 干燥的番石榴叶置于 100 mL 烧瓶中, 加入 20 mL 乙醇, 分别在 60、70 和 78 °C 回流加热一定时间, 冷却后, 过滤, 残渣用萃取溶剂清洗 2~3 次, 合并滤液和洗涤液, 用萃取溶剂定容至 25 mL。每一条件平行萃取 3 份试样。

### 1.3 HPLC 分析

取 10 μL 番石榴叶萃取液或标准样品溶液注入液相色谱仪。流动相由 0.2% (v/v) 磷酸水溶液 (溶剂 A) 和乙腈 (溶剂 B) 组成。梯度洗脱程序: 0 min, 70% (v/v) A - 30% (v/v) B; 8 min, 40% (v/v) A - 60% (v/v) B。流动相流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>。采用外标法定量, 检测波长为 254 nm。

### 1.4 计算槲皮素收率

槲皮素的收率 (mg · g<sup>-1</sup>) 为提取物中槲皮素的质量 (mg) 与干燥的番石榴叶质量 (g) 之比。

## 2 结果与讨论

### 2.1 加热条件对槲皮素收率的影响

以乙醇为溶剂, 分别采取微波和回流加热萃取法从番石榴叶中萃取槲皮素, MAE 温度为 120 °C, RHE 在乙醇的沸点, 即 78 °C 进行。表 1 中的数据显示, MAE 的萃取速率远远大于 RHE 的萃取速率。微波萃取 5 min, 槲皮素收率即达到最大值。回流加热萃取要获得与最大的微波萃取收率相当的收率, 所花费的时间为 12 h, 是微波萃取时间的 144 倍。

### 2.2 萃取动力学曲线

为了阐明产生上述巨大差异的原因, 分别测定了温度为 373、383、393 K 的微波萃取动力学曲线以及 333、343 和 351 K 的回流加热萃取动力学曲线。参照文献 [12] 中的方法确定微波萃取和回流加热萃取的反应级数。

将等温动力学方程 (1) 积分, 得到 (2) 和 (3),

$$dC/dt = K(C_{\max} - C)^n \quad (1)$$

$$[C_{\max}^{1-n} - (C_{\max} - C)^{1-n}] / (1-n) = Kt + a \quad (n \neq 1) \quad (2)$$

$$\ln [C_{\max} / (C_{\max} - C)] = Kt + a \quad (n = 1) \quad (3)$$

式中  $C_{\max}$  为一定温度下的最大萃取收率,  $C$  为萃取时间  $t$  时的收率,  $K$  为萃取表观速率常数,  $t$  为萃取时间,  $a$  为积分常数,  $n$  为萃取反应级数。

当反应级数为 1 时, (3) 式的左边项与  $t$  成线性关系,  $\ln [C_{\max} / (C_{\max} - C)] - t$  曲线为直线, 当反应级数不为 1 时, (2) 式的左边项与  $t$  成线性关系,  $[C_{\max}^{1-n} - (C_{\max} - C)^{1-n}] / (1-n) - t$  曲线为直线。将  $n$  分

表 1 MAE 和 RHE 萃取的槲皮素收率

Table 1 The yields of quercetin obtained using MAE and RHE

MAE		RHE	
Time <i>t</i> / min	Quercetin yield (mg · g <sup>-1</sup> )	Time <i>t</i> / h	Quercetin yield (mg · g <sup>-1</sup> )
1	0.72	0.33	0.17
3	1.48	1	0.32
5	1.85	3	0.77
7	1.84	5	1.17
10	1.86	7	1.36
		10	1.57
		12	1.75
		15	1.74

别设为 1、0.5 和 2, 绘制  $\ln[C_{\max}/(C_{\max}-C)]-t$  曲线或  $[C_{\max}^{1-n}-(C_{\max}-C)^{1-n}]/(1-n)-t$  曲线, 图 1 显示, MAE 符合一级动力学方程, 即  $n=1$ 。RHE 条件下的萃取动力学曲线(图略)与 MAE 的相似, 即 RHE 也符合一级动力学方程。

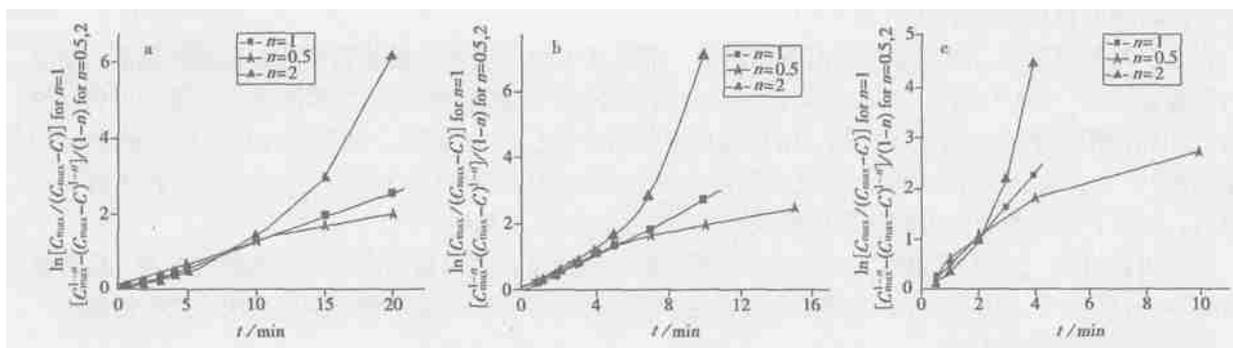


图 1 微波萃取(MAE)条件下萃取反应级数测定曲线

Fig. 1 The curves of reaction order under MAE conditions

a. 373 K; b. 383 K; c. 393 K

根据(3)式, 线性拟合的斜率, 即为萃取表观速率常数。回流加热和微波萃取的表观速率常数列于表 2。

表 2 MAE 和 RHE 的萃取表观速率常数

Table 2 The apparent rate constant of MAE and RHE

MAE			RHE		
Temperature $T/ K$	$K/ s^{-1}$	$\ln K$	Temperature $T/ K$	$K/ s^{-1}$	$\ln K$
373	$2.13 \times 10^{-3}$	- 6.15	333	$2.61 \times 10^{-5}$	- 10.55
383	$4.43 \times 10^{-3}$	- 5.42	343	$3.87 \times 10^{-5}$	- 10.16
393	$9.40 \times 10^{-3}$	- 4.67	351	$6.26 \times 10^{-5}$	- 9.68

### 2.3 活化能

根据 Arrhenius 方程, 速率常数  $K$  可表达如下,

$$K = A \exp(-E_a/RT) \quad (4)$$

或

$$\ln K = \ln A - E_a/RT \quad (5)$$

式中  $A$  为指前因子, 当温度在小范围内变化时,  $A$  变化很小, 可视为常数;  $E_a$  为活化能, 表示反应必须的最低能量,  $e^{-E_a/RT}$  表示可以被萃取的分子分数;  $R$  为气体常数,  $T$  为温度(K)。根据(5)式和表 2 中的数据, 分别将微波和回流加热萃取的  $\ln K$  与相应的  $1/T$  进行线性拟合, 得到拟合方程

$$\ln K = -10884/T + 27.097 \quad (6)$$

和

$$\ln K = -5147/T + 4.874 \quad (7)$$

结合(5)和(6)或(7)式, 计算得到 MAE 槲皮素的活化能为  $90.49 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , RHE 的活化能为  $42.79 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

### 2.4 微波加热不同温度所得的槲皮素收率的解释

一般来说, 在用 MAE 萃取化合物的过程中, 化合物没有发生变化时, 其计算出的活化能和 RHE 萃取的活化能应该相接近。李核等在用 MAE 萃取虎杖中白藜芦醇时计算出其活化能与用 RHE 萃取的活化能很接近, 分别为  $30.06$ 、 $29.90 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。说明了白藜芦醇在 MAE 萃取过程中不存在化学反应<sup>[13]</sup>。从上面计算结果及表 2 可见, MAE 的活化能是 RHE 的 2 倍多, 平均表观速率常数是 RHE 的 125 倍。这提示了 MAE 萃取或长时间的回流加热萃取过程中槲皮素糖甙可能发生了分解, 而导致槲皮素萃取收率的增加。

为了证实这一推测,进行了两组实验,其一是先用乙醇在 78 ℃ 回流加热萃取番石榴叶 20 min,然后将乙醇萃取液置于微波萃取仪内分别在 90、100、110 和 120 ℃ 再加热 5 min;另一组是直接微波加热番石榴叶 5 min,溶剂仍为乙醇,加热温度分别为 90、100、110 和 120 ℃ (在 78 ℃,微波加热 20 min)。两种方法得到的槲皮素收率列于表 3。

表 3 中的数据显示,微波加热回流萃取液后,萃取液中的槲皮素含量显著增加,且温度越高,槲皮素的含量也越高,120 ℃ 加热 5 min 后的槲皮素含量已经达到乙醇回流(78 ℃)萃取液中含量的 9 倍,说明微波加热使槲皮素糖甙发生了分解,增加温度可促进分解反应的进行。番石榴叶中黄酮甙的甙元均是槲皮素<sup>[14]</sup>。葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖和鼠李糖分别与槲皮素的 3-OH 连接生成氧甙,其甙键为缩醛结构,高温下在乙醇中发生醇解反应使甙键断裂,生成槲皮素和糖。

值得注意的是,在 78 ℃ 加热 20 min 时,微波萃取的槲皮素收率只是略高于回流加热的收率,后者是前者的 94% (见表 3),说明不存在非热的微波效应,微波辐射导致的高温是使分解反应快速进行的原因。

采取加标回收实验检验了槲皮素在微波辐射条件下的稳定性。120 ℃ 微波加热 5 min,在乙醇中槲皮素的回收率为 97.2%。回收率数据说明槲皮素在微波辐射的作用下未发生分解,也未与溶剂或萃取物中的其它成分发生反应。

表 3 微波加热不同温度所得的槲皮素收率(mg · g<sup>-1</sup>)

Temperature /t/	Heating the RHE solutions under microwave (微波加热回流萃取液)	Heating the guava leaves under microwave (微波直接加热番石榴叶)
78	0.17*	0.18**
90	0.61	0.39
100	0.87	0.80
110	1.10	1.38
120	1.54	1.85

\* reflux heating 20 min, \*\* microwave heating 20 min

### 3 结 论

短时间的高温微波辐射和长时间的低温加热均会使槲皮素糖甙发生部分分解,槲皮素在高温微波辐射作用下则不会发生分解。用 MAE 技术从植物中萃取药用成分时应对萃取温度加以控制,以避免微波加热产生的高温分解热稳定性差的化合物。

#### 参考文献:

- [1] LIU Zhiyong, CUI Lin, LU Jianjiang. [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research(刘志勇,崔林,鲁建江. [J]. 时珍国医国药), 2002, 13(1): 3-4.
- [2] LU Jianjiang, WANG Li, LIU Zhiyong, et al. [J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology(鲁建江,王莉,刘志勇,等. [J]. 中医药学报), 2002, 30(1): 34-36.
- [3] PAN X, NIU G, LIU H. [J]. Biochemical Engineering Journal, 2002, 12(1): 71-77.
- [4] DENG Yuanhui, YANG Liu, ZHOU Bei, et al. [J]. Journal of Mathematical Medicine(邓远辉,杨柳,周蓓,等. [J]. 数理医药学杂志), 2002, 15(1): 88-89.
- [5] PAN X, LIU H, JIA G, et al. [J]. Biochemical Engineering Journal, 2000, 5(3): 173-177.
- [6] GUO Zhenku, JIN Qinhan, FAN Guoqiang, et al. [J]. China Journal of Chinese Materia Medica(郭振库,金钦汉,范国强,等. [J]. 中国中药杂志), 2002, 27(3): 189-192.
- [7] LI Yan, SUN Ping, GU Chengzhi, et al. [J]. Journal of Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine(李艳,孙萍,顾承志,等. [J]. 江西中医学院学报), 2002, 14(1): 40-41.
- [8] GUO Z K, JIN Q H, FAN G Q, et al. [J]. Anal Chim Acta, 2001, 436(1): 41-47.
- [9] National Compiles of Chinese Traditional and Herbal Drugs[M]. Beijing: People's Medical Publishing House(全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社), 1975. 856.
- [10] HUANG Mengxian, ZHANG Ling. [J]. Journal of Guangxi Medical University(黄梦娴,张玲. [J]. 广西医科大学学报), 2001, 18(2): 173-175.
- [11] XIONG Manqi, ZHU Zhangzhi. [J]. New Chinese Materia Medica and Clinical Pharmacology(熊曼琪,朱章志. [J]. 中药新药与临床药理), 1994, 5(4): 47-50.
- [12] FU Xiancai, SHEN Wenxia, YAO Tianyang. Physical Chemistry[M]. Beijing: Higher Education Press(傅献彩,沈文霞,姚天扬. 物理化学[M]. 北京:高等教育出版社), 1990. 726-756.
- [13] LI He, ZHANG Zhanxia. [J]. Journal of Instrumental Analysis(李核,张展霞. [J]. 分析测试学报), 2004, 23(5): 12-16.
- [14] LOZOYA X, MARIANA M, MAMDOUH A, et al. [J]. Archives of Medical Research, 1994, 25(1): 11-15.