

潘永芳,郑国栋,张清峰. 超声法提取菝葜中绿原酸的工艺研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):259-261.

超声法提取菝葜中绿原酸的工艺研究

潘永芳, 郑国栋, 张清峰

(江西农业大学江西省天然产物与功能食品重点实验室,江西南昌 330045)

摘要:用超声波法提取菝葜中的绿原酸,考察乙醇浓度、料液比、超声功率、超声时间 4 个因素对绿原酸得率的影响,通过单因素试验和正交试验确定了提取的最佳工艺条件。 $L_9(3^4)$ 正交试验结果表明,各因素对菝葜中绿原酸得率的影响大小顺序为乙醇浓度 > 超声功率 > 超声时间 > 料液比;绿原酸提取的最佳工艺为乙醇浓度 50%,料液比 1 g : 30 mL,超声功率 135 W,超声时间 35 min,绿原酸的得率高达 1.324%。

关键词:菝葜;绿原酸;超声提取;正交设计

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0259-03

菝葜是百合科菝葜属植物菝葜的根茎,别称王瓜草、金刚藤、金刚树,主要分布于热带地区,在我国主要分布于长江以南各省区^[1]。菝葜根、茎、叶均可入药,长期以来被广泛用于治疗筋骨酸痛、小便淋漓、带下量多、疮痍痈肿等症^[2],具有抗炎、抗风湿、抗肿瘤、降血糖、预防动脉粥样硬化等作用^[3-4]。随着检测和提取方法的迅速发展,国内外已从菝葜中得到了多种类型的化学物质,主要以甾体皂苷类、氨基酸、芪类、黄酮类,其中黄酮类主要是以黄酮、二氢黄酮、黄酮醇为主^[5-7]。

绿原酸是一种多酚类化合物,异名咖啡鞣酸,是植物在有氧呼吸过程中产生的丙素类化合物^[8]。绿原酸具有多种生物活性,包括降血压、抗肿瘤、抗菌以及抗氧化作用等^[9]。最近,我们在研究菝葜提取物的抗氧化和细胞增殖的影响时,发现菝葜中含有较高的绿原酸^[10]。然而,菝葜中绿原酸含量及其提取工艺的研究还未见报道。本试验研究超声波法提取菝

葜中绿原酸的工艺,用紫外分光光度法进行测定,并运用正交试验对相关工艺参数进行优化,以确定最佳的提取条件,为今后进一步提取分离纯化菝葜中绿原酸提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

KQ3200DA 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司提供;电子天平,上海精密科学仪器有限公司提供;电热恒温干燥箱,宁波机电工业研究设计院;UV752 紫外可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司。

1.2 试剂与材料

菝葜购自福建宁化,粉碎后过 40 目筛,得到菝葜粉末。绿原酸标准品,中国药品生物制品检定所。无水乙醇,天津永大化学试剂有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 绿原酸标准曲线的绘制 称取绿原酸标品 1.4 mg,用 60% 的乙醇溶解定容到 10 mL 的容量瓶中配成 140 $\mu\text{g/mL}$ 的绿原酸标准溶液,分别吸取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 的标准溶液到 10 mL 的容量瓶中,定容到刻度,用紫外分光光度计在 328 nm^[11] 处测定吸光度,再以吸光度 D 值为纵坐标,以绿原酸浓度为横坐标绘制标准曲线(图 1),得回归方程: $y = 0.0599x + 0.0004$, $r^2 = 0.9997$ 。

收稿日期:2012-11-09

作者简介:潘永芳(1990—),女,江西万年人,硕士研究生,研究方向为天然产物的分离提取。E-mail: qinfengp@163.com。

通信作者:郑国栋,博士,副教授,研究方向为天然产物的分离提取和功能食品等。Tel: (0791) 83813420; E-mail: zrs150716@yahoo.com.cn。

[3] 殷建忠,周玲仙,王琦. 云南产 11 种野生食用鲜花营养成分分析评价[J]. 食品研究与开发,2010,31(3):163-165.

[4] 姚小敏,覃成箭,羊金梅,等. 茶叶中总黄酮的提取、鉴别及其含量测定[J]. 右江民族医学院学报,2005(6):779-781.

[5] 陈丛瑾,黄克瀛,李德良,等. 植物中黄酮类化合物的提取方法研究概况[J]. 生物质化学工程,2007,41(3):42-46.

[6] 查慧颖,石玉平,任世霞. 软儿梨果肉中黄酮类化合物的提取及含量测定[J]. 北方园艺,2012(10):42-44.

[7] 赵文亚. 红枣皮渣中总黄酮提取工艺的研究[J]. 中国食品添加剂,2011(3):82-85.

[8] 张丕德,龙晓英. 正交设计与数据分析在药学研究中的应用(I)[J]. 广东药学院学报,2009,25(5):546-551.

[9] Ganugapati J, Baldwa A, Lalani S. Molecular docking studies of banana flower flavonoids as insulin receptor tyrosine kinase activators

as a cure for diabetes mellitus[J]. Bioinformation, 2012, 8(5): 216-220.

[10] Coutinho M A, Muzitano M F, Cruz E A, et al. Flowers from *Kalanchoe pinnata* are a rich source of T cell - suppressive flavonoids[J]. Natural product communications, 2012, 7(2): 175-178.

[11] Zhou C H, Sun C D, Chen K S, et al. Flavonoids, phenolics, and antioxidant capacity in the flower of *Eriobotrya japonica* Lindl[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 12(5): 2935-2945.

[12] Grassi D, Aggio A, Onori L, et al. Tea, flavonoids, and nitric oxide-mediated vascular reactivity[J]. The Journal of nutrition, 2008, 138(8): 1554S-1560S.

[13] 曹纬国,刘志勤,邵云,等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报,2003,23(12):2241-2247.

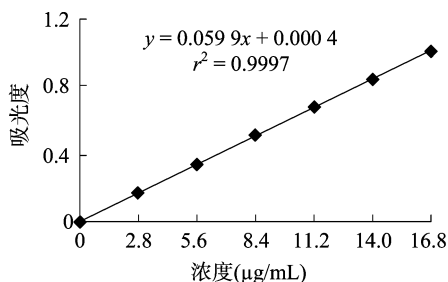


图1 绿原酸标准曲线

1.3.2 菝葜中绿原酸的提取^[12] 称取 1 g 的菝葜粉末,按一定的料液比加入乙醇溶液,摇匀,使粉末浸湿后,按照一定的超声时间和功率进行超声提取,提取液摇匀后过滤,取 0.2 mL 滤液到 10 mL 的容量瓶中,定容到刻度,在 328 nm 处测吸光度,计算得率。

1.3.3 单因素试验 按照“1.3.2”项中菝葜中绿原酸的提取方法,选取乙醇浓度、料液比、超声功率、超声时间 4 个可能影响提取效果的因素做单因素试验。以绿原酸提取率为考察指标,确定各因素的合适范围。在考察某一因素对菝葜绿原酸得率的影响时,固定其他因素及水平,每次试验做 3 个平行。

1.3.4 正交试验 在单因素试验的基础上,确定乙醇浓度、料液比、超声功率、超声时间 4 个因素进行正交试验,以绿原酸的得率为考察指标,确定提取菝葜中绿原酸的最佳工艺条件,每次试验做 2 个平行,进行有重复试验的正交分析。

1.3.5 提取工艺的验证 为进一步考察最佳工艺的稳定性 and 合理性,按最佳的工艺条件进行重复性试验 3 次,分别测定菝葜绿原酸的得率。

1.4 数据处理

单因素试验中均取 3 次平行试验的平均值进行分析作图;正交试验的数据用 SPSS 17.0 软件分析处理。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇浓度对绿原酸得率的影响 从图 2 中可以看出,不同的乙醇体积分数提取时绿原酸的得率不同,乙醇浓度在 50% 以下时,绿原酸的得率随体积分数的增大明显升高,在 50% 以上时随体积分数的增加而减小。这是由于溶剂不同的介电性能及极性而造成的。50% 体积分数的乙醇对菝葜绿原酸的溶出性能在所试验范围内是最好的^[13]。

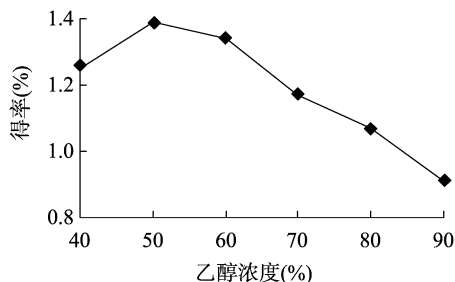


图2 乙醇浓度对绿原酸得率的影响

2.1.2 料液比对绿原酸得率的影响 由图 3 可知,绿原酸得

率随提取溶剂所占比例增大而提高,特别是料液比在 1 g : 15 mL 到 1 g : 30 mL 范围内时,溶剂比例增加对绿原酸得率的影响更显著。在使用溶剂提取的方法中,较高比例的料液比对于有固体基质的提取更有效,但考虑到节约能源等,因此一般不能仅依据产品得率来选择料液比,因此选择 1 g : 30 mL 为适宜。

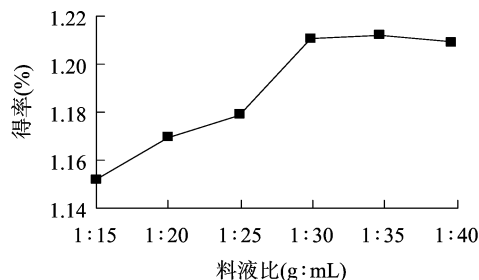


图3 料液比对绿原酸得率的影响

2.1.3 超声功率对绿原酸得率的影响 从图 4 可以看出,在 75 ~ 120 W 范围内,绿原酸的得率随超声功率的增加而增大,当超声功率大于 120 W 时,绿原酸得率有所下降。超声功率的增大,加强了胞内物质的释放、扩散及溶解,从而提高了绿原酸得率,但是随着超声功率的进一步增大,会对绿原酸造成一定的破坏,以致绿原酸的得率降低,因此,最佳的超声功率应该是 120 W。

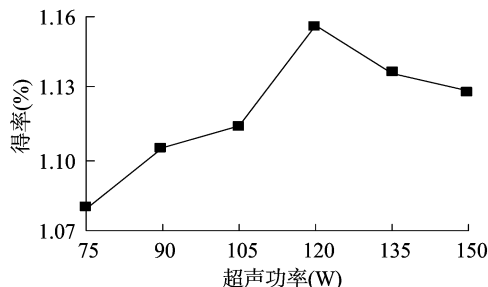


图4 超声功率对绿原酸得率的影响

2.1.4 超声时间对绿原酸提取率的影响 从图 5 可以看出,在提取开始的 35 min 内,绿原酸的得率随提取时间的延长而增加,而当提取时间为 40 min 时,绿原酸的得率反而有所下降。结果表明,提取了 35 min 后再延长时间也不能提高得率,反而会使得率下降,可能是由于绿原酸超声时间过长会发生部分分解。因此,选择超声时间 35 min 为适宜。

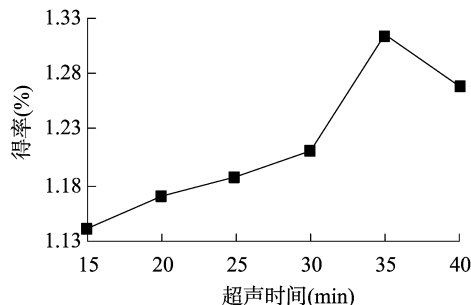


图5 超声时间对绿原酸得率的影响

2.2 正交试验

试验中,由于各因素之间相互交叉影响,因此要全面考虑

超声提取法的工艺参数。根据单因素试验的结果及有关资料,确定以乙醇浓度(A)、料液比(B)、超声功率(C)、超声时间(D)4 个因素进行正交试验设计,见表 1。正交试验和方差分析及显著性检验结果见表 2 和表 3,表明乙醇浓度、料液比、超声功率、超声时间 4 个因素对绿原酸的得率均有显著的影响。从表 2 中可以看出 4 个因素对绿原酸得率影响大小依次为:乙醇浓度>超声功率>超声时间>料液比,提取菝葜中绿原酸的最佳工艺条件为 A₂B₂C₂D₂,即 50% 乙醇,料液比 1 g : 30 mL,超声功率 135 W,超声时间 35 min。

表 1 菝葜绿原酸提取工艺正交试验因素与水平

水平	因素			
	A (%)	B (g : mL)	C (W)	D (min)
1	40	1 : 25	120	30
2	50	1 : 30	135	35
3	60	1 : 35	150	40

表 2 菝葜绿原酸提取工艺正交试验结果

试验号	因素水平				得率 (%)	
	A	B	C	D	重复 I	重复 II
1	1	1	1	1	1.204	1.197
2	1	2	2	2	1.321	1.301
3	1	3	3	3	1.229	1.247
4	2	1	2	3	1.264	1.272
5	2	2	3	1	1.290	1.281
6	2	3	1	2	1.263	1.255
7	3	1	3	2	1.238	1.249
8	3	2	1	3	1.206	1.205
9	3	3	2	1	1.210	1.208
k ₁	1.250	1.237	1.222	1.232		
k ₂	1.271	1.267	1.263	1.271		
k ₃	1.219	1.235	1.256	1.237		
R	0.052	0.032	0.041	0.039		
最优水平	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂		

表 3 正交试验的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
乙醇浓度	0.008	2	0.004	67.214	<0.01
料液比	0.004	2	0.002	32.500	<0.01
超声功率	0.006	2	0.003	48.758	<0.01
超声时间	0.005	2	0.003	46.214	<0.01
误差	0.001	9			

采用上述最佳提取工艺条件进行 6 次重复试验,菝葜中绿原酸提取率分别为 1.334%、1.344%、1.274%、1.327%、

1.335%、1.329%,绿原酸提取率的均值为 1.324%,相对标准偏差(RSD)为 1.738%。由此可见,经过正交试验筛选出来的菝葜绿原酸超声波辅助提取的工艺条件合理可行,稳定可靠,具有较好的可操作性和重现性。

3 结论

以菝葜为原料、乙醇为提取剂,通过单因素试验和正交试验,超声波法提取菝葜中绿原酸的最佳工艺条件是:乙醇浓度 50%,料液比 1 g : 30 mL,超声功率 135 W,超声时间 35 min,在此条件下进行提取,绿原酸得率为 1.324%。本试验优化了菝葜中绿原酸的提取工艺,测定了其含量,为以后进一步提取分离纯化绿原酸提供了数据和理论依据。

参考文献:

[1] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志:第 15 卷[M]. 北京:科学出版社,1948:181-189.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2005,216.

[3] Jiang J Y, Wu F H, Lu J F, et al. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract from *Rhizome Smilacis Glabiae*[J]. *Pharmacol Rea*, 1997,36(4):309..

[4] Li Y L, Gan G P, Zhang H Z, et al. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome *in vitro* anticancer effects on human cancer cell lines[J]. *J Ethnopharmacol*,2007,113(1):115.

[5] 赵钟祥,冯育林,阮金兰,等. 菝葜化学成分及其抗氧化活性的研究[J]. *中草药*,2008,39(7):975-977.

[6] 许 婧,李 铤,张 鹏,等. 金刚藤的黄酮类化学成分[J]. *沈阳药科大学学报*,2004,21(6):424-425,433.

[7] 熊 跃,果德安,黄慧莲. 菝葜化学成分研究[J]. *中国现代中药*,2008,10(12):20-22.

[8] 高锦明,张鞍灵,张康健. 绿原酸分布、提取与生物活性研究综述[J]. *西北林学院学报*,1997,14(2):73-82.

[9] 杜延兵,裘爱泳. 绿原酸生物活性、资源及其提取纯化[J]. *现代食品科技*,2006,22(2):250.

[10] Zhang Q F, Gu Y X o, Shangguan X, et al. Antioxidant and anti-proliferative activity of *Rhizome Smilacis Chinae* extracts and main constituents[J]. *Food Chem*,2012,133(1):140-145.

[11] 刘丹赤,杨建华,李 鹏. 牛蒡叶中绿原酸提取工艺的研究[J]. *江苏农业科学*,2009(4):305-306.

[12] 祝明思,陈 磊,张公亮,等. 牛蒡叶中绿原酸超声波法提取工艺研究[J]. *安徽农业科学*,2011,39(1):134-136.

[13] 何荣海,翟庆娇,仲恰实,等. 微波辅助回流提取葵花籽粕绿原酸的研究[J]. *中国粮油学报*,2012,27(9):107-111.