

司超,姚晓芹,贺学礼,等.菊花中绿原酸超声提取工艺与测定方法研究[J].江苏农业科学,2015,43(4):264-266.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.096

菊花中绿原酸超声提取工艺与测定方法研究

司超,姚晓芹,贺学礼,楚建周

(河北大学生命科学学院,河北保定 071002)

摘要:采用正交试验,考察提取显色条件对药用菊花中绿原酸提取与测定的影响。结果表明,菊花中绿原酸提取测定最优方法为用 80% 甲醇作提取剂,超声提取 30 min,加 0.02 mol/L FeCl_3 0.5 mL 进行显色反应,静置 30 min 后在分光光度计 755 nm 波长下测定吸光度,该方法简单、准确、灵敏、重复性强,可用于菊花中绿原酸的提取测定。

关键词:菊花;绿原酸;超声提取;分光光度法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0264-03

菊花为多年生菊科草本植物,以头状花序入药,是我国传统中药,主要功效有散风清热、平肝明目、解毒、降压等,主治风热感冒、头痛眩晕、目赤肿痛、明目昏花等症^[1]。绿原酸是菊花主要的活性成分,它是植物体在有氧呼吸过程中合成的一种苯丙素类物质,具有清除自由基、抗菌消炎、抗病毒、降糖、降脂、保肝利胆等多种功效^[2-3]。目前,提取药用植物中绿原酸采用的方法主要有超高压提取法、热回流法、溶剂浸提法、酶解法、微波辅助萃取法、超声提取法等^[4-7]。绿原酸含量测定方法主要有高效液相色谱法、高效毛细管电泳法、紫外分光光度法等^[8-10]。有学者利用可见分光光度法测定绿原酸含量,该方法主要是利用绿原酸能与 FeCl_3 进行特殊的显色反应来测定植物中绿原酸含量,具有原理简单、仪器常见、成本低等优点^[11]。笔者在前人研究的基础上对超声提取、显色条件进行深入研究,进一步完善采用可见分光光度法快速测定植物中绿原酸含量的方法。

收稿日期:2014-05-09

基金项目:国家自然科学基金(编号:31300321);河北省自然科学基金(编号:C2012201080);河北大学大学生科技创新项目(编号:2013080)。

作者简介:司超(1985—),女,山东滕州人,硕士研究生,主要从事药用植物次生代谢研究。E-mail:sisi19851204@163.com。

通信作者:姚晓芹,博士,副教授,主要从事药用植物次生代谢、植物逆境生理研究。E-mail:yaoxiaoxiao301@126.com。

差异明显,得率变幅较大,容重变幅较小,酥脆度、综合品质等感官指标表现较好。四粒红、花育 19 可以作为真空油炸花生加工的专用品种。

参考文献:

- [1]王丽,王强,刘红芝,等.花生加工特性与品质评价研究进展[J].中国粮油学报,2011,26(10):122-128.
- [2]万书波.花生品质学[M].北京:中国农业科学技术出版社,2005.
- [3]张炳文,郝征红,杜红霞.低温真空油炸技术综述[J].粮油食品科技,1997(5):12-13.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

主要仪器:722 型可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),240W PS-40A 型数控超声波清洗器(深圳市康洁洗净电器有限公司)。主要试剂:标准绿原酸(纯度 95%,阿拉丁试剂上海有限公司)、 FeCl_3 溶液、甲醇、乙醇。笔者所在实验室种植的怀菊,将菊花头状花序在 105℃ 下杀青 30 min,55~60℃ 下烘干至恒质量,粉碎、过筛,混匀备用。

1.2 超声波提取条件优化

1.2.1 提取溶剂 用 60% 甲醇、60% 乙醇进行提取溶剂试验,比较不同提取剂对绿原酸提取效果的影响。取 0.3 g 干样,分别加入 15 mL 60% 甲醇、15 mL 60% 乙醇溶液,超声提取 30 min,过滤后用提取溶剂定容至 25 mL 刻度管内;取 1 mL 上述溶液加 4 mL 提取溶剂,置于 10 mL 刻度管中,加 0.5 mL 0.02 mol/L FeCl_3 溶液(分别用 60% 甲醇、60% 乙醇配制)振荡摇匀后静置 60 min,用 722 型分光光度计于 755 nm 波长下进行比色,确定最佳提取溶剂。

1.2.2 提取容器 选择等容积的烧杯、锥形瓶、塑料瓶、试管进行试验,提取溶剂为 60% 甲醇溶液,提取方法、测定步骤同“1.2.1”节,比较提取容器对绿原酸提取效果的影响。

1.2.3 浸泡时间 用甲醇提取液分别浸泡样品 0、3、6、12、18、24 h 后进行超声提取,测定方法同“1.2.1”节,比较浸泡时间对绿原酸提取效果的影响。

- [4]刘春梅,李艳东,王宗礼.果蔬脆片真空低温油炸技术及设备应用研究[J].农机化研究,2010,32(9):209-211,226.
- [5]钮福祥,张爱君,朱磊,等.真空低温油炸甘薯脆片的研制[J].江苏农业科学,2004(2):82-84.
- [6]赵凤敏,杨延辰,王远,等.真空油炸马铃薯片加工工艺的研究[J].农产品加工·学刊,2005(12):33-34,37.
- [7]钮福祥,徐飞,孙健,等.真空低温油炸对果蔬营养成分的影响[J].中国食物与营养,2011,17(10):65-67.
- [8]周汉林.果蔬脆片和连续真空油炸设备[J].广东农机,1996(1):23-24.
- [9]张俊艳.真空油炸技术在食品加工中的应用[J].食品研究与开发,2013,34(10):129-132.

1.2.4 提取时间 用甲醇提取液分别超声提取样品 10、20、30、40、50、60 min,测定方法同“1.2.1”节,比较超声提取时间对绿原酸提取效果的影响。

1.2.5 提取次数 用甲醇提取液分别经超声波提取样品 1、2、3、4 次,每次时间 10 min,每次加入最佳提取溶剂 5 mL,提取完成后合并每次的提取液,过滤并定容,测定方法同“1.2.1”节,比较提取次数对绿原酸提取效果的影响。

1.2.6 提取溶剂浓度 分别用 20%、40%、60%、80%、100% 甲醇溶液提取样品,其他条件为已选出的最佳条件,测定方法同“1.2.1”节方法,比较不同浓度甲醇提取液对绿原酸提取效果的影响。

1.3 显色条件优化

配制 0.01、0.02、0.03 mol/L FeCl₃ - 甲醇显色溶液,显色时分别在样品液中加入 0.5、1.0 mL 进行试验,提取条件采用“1.2”节的优化条件。

1.4 正交试验

在提取、显色条件优化试验结果基础上设计正交试验,选出最优水平组合。选取对测定结果影响较大的 2 个因素,即提取剂浓度、显色剂用量进行正交试验。

1.5 标准溶液的配制

准确称取绿原酸对照品 10 mg,加入最佳提取溶剂溶解并定容至 50 mL,制成 200 μg/mL 标准液。在 7 个 10 mL 刻度管内分别加入 0、1、2、3、4、5、6 mL 标准贮备液,用 80% 甲醇稀释至标线,分别制成 0、20、40、60、80、100、120 μg/mL 标准液。按“1.3”节优化结果进行显色、测定。

2 结果与分析

2.1 超声波提取条件优化

2.1.1 提取溶剂对绿原酸提取效果的影响 绿原酸是由咖啡酸与奎尼酸形成的酯,分子结构中有酯键、不饱和双键、多元酚 3 个不稳定部分,可以利用甲醇、丙酮、乙醇等极性溶剂从植物中提取出来。笔者分别以甲醇、乙醇为提取溶剂进行试验,试验过程中发现,以乙醇为提取剂在显示过程中容易出现沉淀,因此下面其他优化试验都用甲醇作为提取溶剂。

2.1.2 提取容器对绿原酸提取效果的影响 由表 1 可知,试管提取效果最佳,另外,利用试管作为提取容器操作更方便。因此,本试验选用试管作为提取容器。

表 1 不同容器对绿原酸提取效果的影响	
容器	<i>D</i> _{755nm}
烧杯	0.188 ± 0.005b
锥形瓶	0.181 ± 0.007ab
塑料瓶	0.189 ± 0.009ab
试管	0.211 ± 0.004a

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著(*P* < 0.05)。下表同。

2.1.3 样品浸泡时间、提取时间、提取次数对绿原酸提取效果的影响 由表 2 至表 4 可知,浸泡时间、提取时间、提取次数 3 个因素对绿原酸提取没有显著影响,因此选择不浸泡,超声提取 1 次,提取时间为 30 min。

2.1.4 提取溶剂浓度对绿原酸提取效果的影响 由表 5 可知,甲醇浓度对菊花中绿原酸的提取效果有显著影响。提取

表 2 浸泡时间对绿原酸提取效果的影响	
浸泡时间(h)	<i>D</i> _{755 nm}
24	0.157 ± 0.009b
18	0.162 ± 0.004ab
12	0.166 ± 0.002ab
6	0.168 ± 0.003ab
3	0.167 ± 0.003ab
0	0.178 ± 0.003a

表 3 提取时间对绿原酸提取效果的影响	
提取时间(min)	<i>D</i> _{755 nm}
60	0.213 ± 0.002a
50	0.192 ± 0.011a
40	0.195 ± 0.008a
30	0.202 ± 0.003a
20	0.184 ± 0.010a
10	0.205 ± 0.006a

表 4 提取次数对绿原酸提取效果的影响	
提取次数(次)	<i>D</i> _{755 nm}
4	0.189 ± 0.002a
3	0.183 ± 0.002a
2	0.163 ± 0.004b
1	0.160 ± 0.007b

液吸光度随甲醇浓度的增加而增大。当甲醇浓度 ≤ 60% 时,提取液吸光度随着浓度的增加变化比较剧烈,当甲醇浓度 > 60% 时,提取液吸光度变化比较平缓,并且 80%、100% 甲醇处理对绿原酸的提取效果差异不显著。

表 5 提取溶剂浓度对绿原酸提取效果的影响	
甲醇浓度(%)	<i>D</i> _{755 nm}
20	0.028 ± 0.003d
40	0.078 ± 0.006c
60	0.195 ± 0.004b
80	0.218 ± 0.000a
100	0.222 ± 0.003a

2.2 显色条件优化

表 6 表明,当显色剂浓度为 0.01 mol/L、用量为 0.5 mL 时,样品产生沉淀,这可能是因为 FeCl₃ 含量不足;当显色剂浓度为 0.02 mol/L、用量为 0.5 mL 时,吸光度最大;当显色剂浓度为 0.03 mol/L 时,吸光度显著降低。

表 6 显色剂浓度及用量对绿原酸提取效果的影响		
显色剂浓度(mol/L)	显色剂用量(mL)	<i>D</i> _{755 nm}
0.01	0.5	0(沉淀)
	1.0	0.165 ± 0.004b
0.02	0.5	0.182 ± 0.004a
	1.0	0.101 ± 0.002d
0.03	0.5	0.136 ± 0.003c
	1.0	0.077 ± 0.001e

2.3 正交试验结果

选取对绿原酸提取、显色影响明显的因子进行正交试验。以提取剂浓度、0.02 mol/L 显色剂 FeCl₃ 的用量为考察因素,

设计正交试验(表 7、表 8)。由此可知,最优水平组合为 A₂B₂,即甲醇浓度 80%,显色剂用量 0.5 mL。

表 7 正交试验因素水平

水平	因素	
	A:提取剂浓度(%)	B:显色剂用量(mL)
1	60	0.25
2	80	0.50
3	100	0.75
4		1.00

表 8 正交试验结果与极差分析

序号	因素水平		吸光度
	A:提取剂浓度	B:显色剂用量	
1	1	1	0(沉淀)
2	1	2	0.206 ± 0.001d
3	1	3	0.170 ± 0.002e
4	1	4	0.154 ± 0.002f
5	2	1	0.269 ± 0.004a
6	2	2	0.239 ± 0.003b
7	2	3	0.224 ± 0.002c
8	2	4	0.217 ± 0.003c
9	3	1	0.240 ± 0.004b
10	3	2	0.239 ± 0.003b
11	3	3	0.240 ± 0.004b
12	3	4	0.237 ± 0.005b
k ₁	0.177	0.127	
k ₂	0.316	0.171	
k ₃	0.319	0.159	
k ₄		0.152	
极差 R	0.142	0.044	

2.4 标准曲线

取不同浓度标准液 5 mL,加入显色剂 FeCl₃ - 甲醇溶液 0.25 mL 充分振荡,静置 30 min 后于波长 755 nm 下比色,以 80% 甲醇加显色剂作参比调零。以吸光度为纵坐标、相对应的绿原酸浓度为横坐标绘制标准曲线,回归方程为 $y = 0.0023x - 0.0104$, $r^2 = 0.9959$ (图 1)。

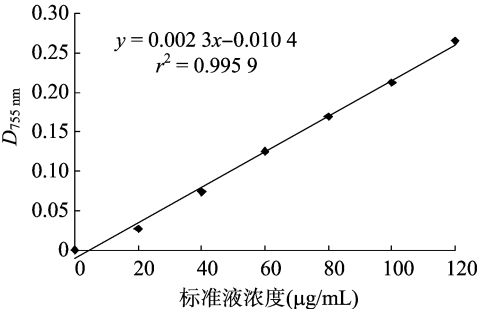


图1 标准液浓度-吸光度曲线

2.5 加标回收率

称取菊花干样粉末 6 份,每份 0.3 g,按正交试验筛选出的最优条件进行提取,取 6 支试管,分别加入提取液 0.5 mL、

60 μg/mL 标液 0.5 mL,定容至 5 mL,加 0.25 mL 显色剂进行显色,利用分光光度分析加标率直接计算数学模型^[12],得出平均回收率为 100.83%。

2.6 精密度

对 120 μg/mL 标准溶液连续测定 20 次,测得样品中绿原酸吸光度 RSD 值为 0.22%,符合相关规定,表明试验精密度很好。

2.7 重复性

称取 5 份样品,每份 0.3 g,按照优化条件进行提取测定。经计算 RSD 值为 1.10%,表明试验重复性符合有关规定。

3 结论

与常规提取方法相比,超声波提取法具有操作简单、溶剂用量少、提取时间短、对环境污染小、被提取活性物质不易被破坏、提取率较高等优点^[13]。酚类物质与 FeCl₃ 发生显色反应,能够用来检验酚羟基的存在,并对绿原酸进行简单快速的定量分析^[14]。本试验综合考虑了与测定相关的提取及显色因子,结果表明,菊花中绿原酸提取测定最优方法为用 80% 甲醇作提取剂,超声提取 30 min,加 0.02 mol/L FeCl₃ 0.5 mL 进行显色反应,静置 30 min 后,在可见分光光度计 755 nm 波长下测定吸光度。本方法成本低、简便易操作、精密度好、重复性强,可用于菊花中绿原酸的提取测定。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.

[2] 李永霞. 湖北产不同品种菊花中绿原酸的含量测定[J]. 湖北中医杂志,2006,28(2):48-49.

[3] 陈绍华,王亚琴,罗立新. 天然产物绿原酸的研究进展[J]. 食品科技,2008,33(2):195-199.

[4] 秦霞,靳学远,刘红. 菊花中绿原酸的超高压提取工艺研究[J]. 湖北农业科学,2010,49(9):2215-2217.

[5] 符玲,毕跃峰,田新慧,等. 野菊花中绿原酸的不同提取工艺比较[J]. 郑州大学学报:医学版,2010,45(3):499-501.

[6] 李跃中,纵伟,董海丽. 超声辅助提取菊花中绿原酸的工艺研究[J]. 安徽农学通报,2008,14(9):194,56.

[7] 凌仁怡,王娟,沈平嫒. 野菊花中绿原酸的微波辅助萃取研究[J]. 中草药,2008,39(1):60-62.

[8] 刘放,陈冰冰,吴小平. HPLC 法测定菊花中绿原酸的含量[J]. 西北药学杂志,2010,25(5):350-352.

[9] 乌兰,张泽生. 金银花中绿原酸的提取及检测[J]. 食品科学,2005,26(6):130-134.

[10] 易昌华,贺建华. 紫外分光光度法测定中草药提取物中绿原酸的含量[J]. 兽药与饲料添加剂,2004,9(1):24-25.

[11] 徐寿昌. 有机化学[M]. 北京:高等教育出版社,1982.

[12] 黄彩海,李合义,王彩金. 分光光度分析加标回收率直接计算的数学模型研究[J]. 中国环境监测,1999,15(1):46-47.

[13] 童保云,马文. 超声提取烟草中绿原酸的工艺研究[J]. 安徽化工,2009,35(5):18-20.

[14] 张秋芳,刘波,史怀,等. 金银花中绿原酸的快速测定方法[J]. 福建医科大学学报,2006,40(4):398-401.