

超声波辅助提取仙鹤草多酚工艺研究

林志奎^{1,2}, 王欢¹, 赵春天¹, 张传海², 李宝银²

(1. 武夷学院 生态与资源工程学院, 福建 武夷山 354300;

2. 武夷学院 福建省生态产业绿色技术重点实验室, 福建 武夷山 354300)

摘要:为探讨仙鹤草中总多酚的最佳提取工艺,以仙鹤草为材料,采用单因素试验和正交试验优选超声波辅助提取仙鹤草多酚的工艺条件.结果表明,用体积分数为60%甲醇溶液作提取剂,仙鹤草多酚的最佳提取工艺条件为提取温度35℃、料液比1:20(g/mL)、提取时间25 min、超声功率480 W.在此条件下,仙鹤草总多酚提取率为1.46%,加标平均回收率为96.69%.

关键词:仙鹤草;总多酚;超声提取;工艺

中图分类号:R284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1674-5639(2016)03-0066-04

DOI:10.14091/j.cnki.kmxyxb.2016.03.014

Technique Study on Polyphenol Extraction from *Agrimoniae Herba* Assisted by Ultrasonic

LIN Zhi-luan^{1,2}, WANG Huan¹, ZHAO Chun-tian¹, ZHANG Chuan-hai², LI Bao-yin²

(1. College of Ecology and Resource Engineering, Wuyi University, Fujian Wuyishan 354300, China;

2. Key Laboratory of Ecological Industry Technology of Fujian Province, Fujian Wuyishan 354300, China)

Abstract: To study the best extraction technique of total polyphenols in *Agrimoniae herba* used as the material, single-factor and orthogonal tests are used and optimized the ultrasonic assistance method for the extraction process. Results show that the carbinol solution with 60% volume fraction as extracting solution, the optimal extraction technique condition is the temperature 35℃, solid-liquid ratio 1:20 (g/mL), extraction power 480 W, extracting time 25 min. Under the condition, the yield of the polysaccharides of *Agrimoniae herba* was 1.46% and plus the average recovery 96.69%.

Key words: *Agrimoniae herba*; total polyphenol; ultrasonic extraction; technique

仙鹤草,又名龙牙草,蔷薇科植物,多年生草本.在我国大部分地区均有分布.仙鹤草全草供药用,现代药理和临床实验表明,仙鹤草素能增加心脏收缩振幅,其多酚可使离体兔肠的张力及收缩幅度降低,然后使肠运动停止于松弛状态.具有较强的降血糖、抗肿瘤、抑菌和抗病毒活性^[1],是一种重要的具有开发前景的天然有机抗氧化剂^[2-4].有关仙鹤草多酚的研究已有诸多报道^[5-10],但关于仙鹤草中总多酚超声提取工艺的研究相关报道则比较少.

因此,本文拟以仙鹤草总多酚提取率为评价指标,通过单因素试验和正交试验优选超声波辅助提

取仙鹤草多酚的工艺条件^[11-14],探讨仙鹤草中多酚类物质的最佳提取工艺参数,为进一步利用和研究仙鹤草提供实验数据.

1 材料及仪器

1.1 材料

取仙鹤草的地上部位(产地为江西省樟树市),粉碎过60目筛.经过张传海教授鉴定为仙鹤草(*Agrimoniae herba*),龙牙草属,蔷薇科.

1.2 试剂

取对照品为焦性没食子酸.

收稿日期:2016-01-28

基金项目:福建省大学生创新创业训练计划资助项目(201310397027);天然产物研究与创新利用技术平台建设资助项目(YJ201401);闽北林下中药材生态种植和产业化关键技术资助项目;闽北特色药用植物资源保护与创新利用平台建设资助项目(N2014Z01).

作者简介:林志奎(1981—),男,福建福州人,实验师,硕士,主要从事天然产物开发研究.

溶液的配制.准确称取 25.00 mg 焦性没食子酸粉末,将所称取的焦性没食子酸粉末用去离子水溶解,并移至 250 mL 容量瓶中,然后再将其稀释至刻度线,摇匀.此溶液质量浓度为 100 μg/mL.

酒石酸亚铁溶液.准确称取实验所需酒石酸钠 0.366 3 g、硫酸亚铁 0.100 0 g 混合并用去离子水溶解,移至 100 mL 容量瓶中,然后再将其稀释至刻度,摇匀.

磷酸氢二钠溶液.准确称取磷酸氢二钠 4.545 1 g,将所称取的磷酸氢二钠用去离子水溶解,并移至 500 mL 的容量瓶中,然后再将其加水稀释至刻度线,摇匀.即得 A 液.

磷酸二氢钾.准确称取磷酸二氢钾 5.941 0 g,将所称取的磷酸二氢钾用去离子进行水溶解,并移至 500 mL 的容量瓶中,然后再将其加水稀释至刻度线,摇匀.即得 B 液.

缓冲溶液.取 A 液 85.00 mL,B 液 15.00 mL 混合置于 100 mL 的容量瓶中,用去离子水定容,即配成 pH = 7.5 的磷酸盐缓冲液.

1.3 仪器

紫外-可见分光光度计(日本岛津 UV-2500);数控超声波清洗器(昆山舒美 KQ-600KDE);万分之一天平(北京赛多利斯 CPA224S);循环水式真空泵(河南予华 SHZ-DIII).

2 实验方法

2.1 标准曲线的绘制

准确移取 0.00,1.00,2.00,3.00,4.00,5.00 mL 的 100 μg/mL 焦性没食子酸溶液于 10 mL 的容量瓶中,分别往 6 个容量瓶中加入 2 mL 酒石酸亚铁溶液,用配制好的磷酸盐缓冲溶液冲稀至刻度,摇匀,用紫外-可见分光光度计于 545 nm 的波长处测定吸光度 A.以吸光度值为纵坐标,焦性没食子酸质量浓度为横坐标,绘制标准曲线.

2.2 样品的提取与定量测定

称取一定量的仙鹤草粉末,在设定条件下提取、抽滤,得滤液,并置于 50 mL 容量瓶中定容.移取上述溶液 1.00 mL 置于 10 mL 容量瓶内,加 2.00 mL 酒石酸亚铁显色剂,磷酸盐缓冲液标定至刻度,比色法测定样品的吸光度值,通过回归方程,求出提取液中多酚类物质的含量,同时平行实验 3 次.

按下式计算总多酚提取率:

总多酚提取率 = $\frac{C \times 10 \times 50}{M} \times 100\%$,

其中 C 为提取液多酚质量浓度,单位 μg/mL;M 为仙鹤草粉末样品质量,单位 g.

2.3 样品加标回收率的测定

准确移取标准焦性没食子酸溶液母液 2.0 mL,加入到含有 1.000 0 g 仙鹤草的 50 mL 锥形瓶中.在设定提取条件下同步提取、平行测定 6 次,计算样品加标回收率.

2.4 单因素试验

2.4.1 料液比的选择

称取 1.000 0 g 仙鹤草粉末 5 份,分别放于 50 mL 锥形瓶中,在提取温度 45 ℃、提取时间 25 min、超声功率 480 W,按料液比分别为 1:15,1:20,1:25,1:30,1:35 进行实验,提取 1 次,抽滤,定容后,进行比色,计算仙鹤草多酚的提取率.

2.4.2 超声提取功率的选择

准确称取 1.000 0 g 仙鹤草粉末 5 份,分别放于 50 mL 锥形瓶中,在提取温度 45 ℃、提取时间 25 min,料液比 1:20,按超声功率分别为 360,420,480,540,600 W 进行实验,提取 1 次,抽滤,定容后,进行比色,计算仙鹤草多酚的提取率.

2.4.3 提取时间的选择

准确称取 1.000 0 g 仙鹤草粉末 5 份,分别放于 50 mL 锥形瓶中,在提取温度 45 ℃、料液比 1:20、超声功率 360 W,按提取时间分别为 20,25,30,35,40 min 进行实验,提取 1 次,抽滤,定容后,进行比色,计算仙鹤草多酚的提取率.

2.4.4 提取温度的选择

准确称取 1.000 0 g 仙鹤草粉末 5 份,分别放于 50 mL 锥形瓶中,在料液比 1:20、超声功率 480 W、提取时间 25 min,按提取温度分别为 30,35,40,45,50 ℃进行实验,提取 1 次,抽滤,定容后,进行比色,计算仙鹤草多酚的提取率.

2.5 正交试验

在单因素试验基础上,采用三水平四因素 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,结果见下表 1.

表 1 正交试验因素水平表

水平	A(温度) /℃	B(料液比) /(g·mL ⁻¹)	C(提取时间) /min	D(超声功率) /W
1	35	1:15	20	420
2	40	1:20	25	480
3	45	1:25	30	540

3 结果与分析

3.1 标准曲线的建立

以吸光度值(A_{545})为纵坐标 Y , 焦性没食子酸质量浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标 X , 绘制标准曲线进行表示. 焦性没食子酸在质量浓度为 $0 \sim 50 \mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系, $Y = 0.019X - 0.007$, $r = 0.9996$, 如图 1 所示.

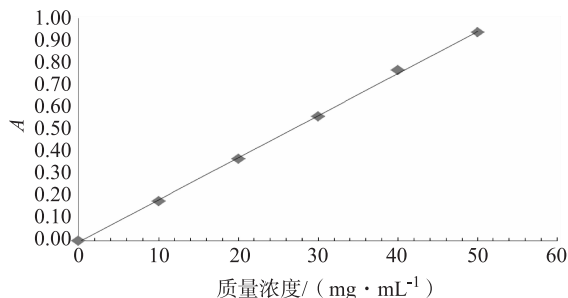


图1 标准曲线

3.2 单因素试验

3.2.1 料液比对多酚提取率的影响

如下图 2 所示, 仙鹤草多酚提取率随着料液比的增加而增加, 当料液比大于 $1:20$ 后, 多酚提取率增幅很小, 甚至有减小的趋势, 且过多溶剂对仙鹤草中其他物质的溶解度增大, 对实验测定会造成一定影响. 所以料液比选择为 $1:20$ 时能获得较好的效果.

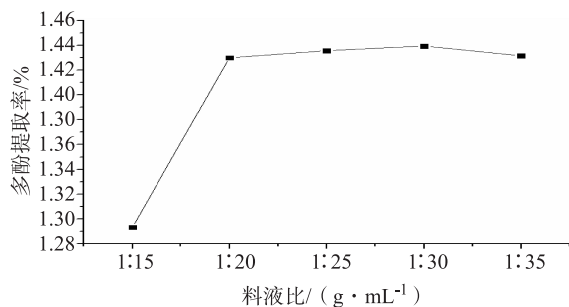


图2 不同料液比对多酚提取率的影响

3.2.2 超声提取功率对多酚提取率的影响

如下图 3 所示, 仙鹤草多酚提取率随着超声功率的增大而增加, 但大于 480 W 后, 多酚提取率略有减少, 540 W 后尤为显著, 其原因可能是多酚的分子结构不稳定, 在高功率超声条件下会发生分解, 且分解速率随着功率的增大而加剧. 所以超声提取功率选择为 480 W 时能获得较好的效果.

3.2.3 提取时间对多酚提取率的影响

由下图 4 可以看出, 仙鹤草多酚提取率随着浸提时间的延长而逐渐增大, 但超过 25 min 后, 多酚

提取率增幅则逐渐减小, 且有减少趋势. 其原因可能是, 当浸泡时间超过 30 min 后, 会使得一些醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分溶出量增加, 这些成分与多酚类化合物竞争同一甲醇-水分子结合. 此外由于时间过长, 在一定温度下多酚的分子结构被破坏, 从而导致多酚提取率下降. 所以浸提时间选择为 30 min 时提取效果较好.

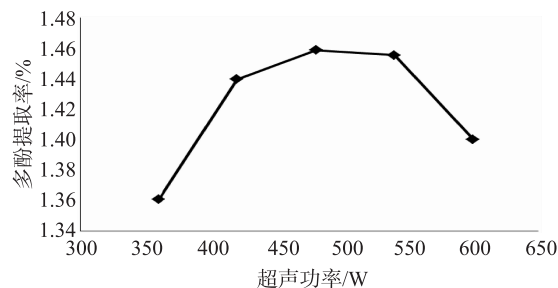


图3 不同超声功率对多酚提取率的影响

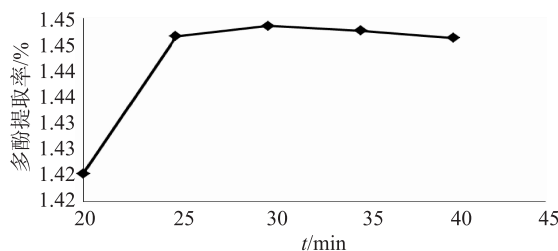


图4 不同提取时间对多酚提取率的影响

3.2.4 提取温度对多酚提取率的影响

如下图 5 所示, 仙鹤草多酚提取率随温度升高而有所增大, 但高于 40°C 时, 其提取率则会减小. 原因是随着温度的升高, 提取液中分子运动速度加快, 于是有助于多酚的渗出. 但要注意, 倘若温度过高, 则会破坏其分子结构, 从而影响到提取率^[14]. 所以选择提取温度为 40°C , 其提取效果较好.

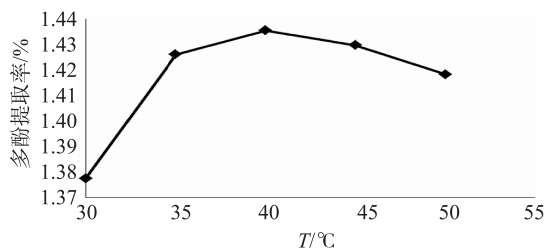


图5 不同温度对多酚提取率的影响

3.3 正交试验

根据单因素试验结果, 拟定 3 水平 4 因素, 按 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表进行仙鹤草中总多酚提取的正交试验, 见下页表 2.

由下页表 3 可知, 各因素对仙鹤草中总多酚的影响依次为: B(料液比) > D(超声功率) > C(提取时

间) $>A$ (提取温度).各因素的最佳水平为 $A_1B_2C_2D_2$,即提取温度为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、料液比 $1:20$ 、提取时间 25 min 、超声功率 480 W .按上述组合做平行实验 3 次,所得仙鹤草多酚平均提取率为 1.46% .

表 2 正交试验结果与分析

项目	A	B	C	D	多酚提取率/%
1	1	1	1	1	1.393
2	1	2	2	2	1.456
3	1	3	3	3	1.452
4	2	1	2	3	1.423
5	2	2	3	1	1.452
6	2	3	1	2	1.450
7	3	1	3	2	1.442
8	3	2	1	1	1.448
9	3	3	2	2	1.424
均值 1	1.434	1.419	1.431	1.423	—
均值 2	1.442	1.452	1.434	1.450	—
均值 3	1.438	1.442	1.449	1.441	—
极差	0.008	0.033	0.018	0.027	—

表 3 实验结果方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
温度	0.001	2	0.571	4.460	1
料液比	0.002	2	1.143	4.460	2
提取时间	0.002	2	1.143	4.460	1
超声功率	0.002	2	1.143	4.460	2
误差	0.001	—	—	—	—
总和	0.008	8	—	—	—

3.4 验证实验

称取仙鹤草粉末 1.0000 g 6 份,按照正交试验所得的最佳条件 $A_1B_2C_2D_2$ 的提取工艺进行仙鹤草多酚的提取,并测定多酚质量分数.平行提取 6 次,结果如表 4 所示.

表 4 仙鹤草多酚提取率

次数	1	2	3	4	5	6
多酚提取率/%	1.448	1.416	1.460	1.456	1.440	1.451
平均值/%	1.445					
RSD /%	1.160					

3.5 样品标准加标回收率

精确移取 1.00 mL 仙鹤草多酚样品 7 份,其中 1 份为对照, 6 份分别再准确移取质量浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 标准样品 2.00 mL ,加 2.00 mL 酒石酸亚铁显色剂,用磷酸盐缓冲液定容至 10.00 mL ,在上述最佳条件 $A_1B_2C_2D_2$ 下进行测定.其样品加标平均回收率 $RSD=96.69\%$.如表 5 所示.

4 结论

实验以仙鹤草为材料,以体积分数为 60% 甲醇

溶液作溶剂提取仙鹤草多酚,考察了各因素对多酚提取率的影响,通过单因素试验和正交试验确定仙鹤草多酚类物质的最佳提取工艺参数为:提取温度 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、料液比 $1:20$ 、提取时间 25 min 、超声功率 480 W .在此条件下,仙鹤草总多酚平均提取率为 1.46% ,加标平均回收率为 96.69% .

表 5 回收率的测定结果

序号	已知量/ μg	加标量/ μg	测定量/ μg	实际量/ μg	RSD /%
1	14.56	20.00	34.56	19.36	93.52
2	14.56	20.00	34.56	19.33	96.63
3	14.56	20.00	34.56	18.46	92.30
4	14.56	20.00	34.56	19.57	97.85
5	14.56	20.00	34.56	19.95	99.75
6	14.56	20.00	34.56	20.12	100.06

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:94.

[2] 金在久. 仙鹤草的化学成分及临床研究进展[J]. 华西药 学杂志,2006,21(5):468-471.

[3] 赵莹,赵春芳,刘金平,等. 仙鹤草化学成分及其生物活 性的研究[J]. 特产研究,2007,29(2):57-61.

[4] 赵莹,刘金平,李平亚. 仙鹤草化学成分及药理研究进展 [J]. 特产研究,2001,23(1):50-53.

[5] 石碧,狄莹. 植物多酚[M]. 北京:科学出版社,2000:30.

[6] 林志銓,陈培珍,王燕萍,等. 桂花叶多糖提取工艺的优 化[J]. 湖北农业科学,2012,51(5):986-988.

[7] 杜彬,王同坤,侯文龙,等. 板栗花中总多酚提取工艺优 化[J]. 食品科学,2011,32(16):121-126.

[8] SPIGNO G, DE FAVERI D M. Microwave-assisted extraction of teaphenols: a phenomenological study[J]. Journal of Food Engineering,2009,93(2):210-217.

[9] 尹志娜. 植物多酚分离提取方法和生物功能研究进展 [J]. 生命科学仪器,2010(8):43-49.

[10] 盛华刚. 正交实验法优选仙鹤草的提取工艺[J]. 食品 与药品,2012,14(5):165-167.

[11] 房祥军,郜海燕,陈杭君. 正交实验法优化山核桃仁中 总多酚的提取工艺参数研究[J]. 中国食品学报,2009, 9(1):153-157.

[12] 牛波,邱海霞,田景振,等. 超声强化提取技术[J]. 山东 中医杂志,2000,19(10):629-630.

[13] 谷勋刚. 超声波辅助浸提新技术及其分析应用研究 [D]. 合肥:中国科学技术大学,2007.

[14] 陈素艳,邓清莲. 超声波法从茶叶中浸提茶多酚[J]. 渤 海大学学报(自然科学版),2005,26(4):316-319.