

文章编号:1008-1542(2012)01-0032-04

东北铁线莲总多酚的超声提取工艺研究

王晓林, 钟方丽, 孙 威, 王慧竹

(吉林化工学院化学与制药工程学院, 吉林吉林 132022)

摘 要:探索超声波辅助提取东北铁线莲总多酚的最佳工艺条件。以东北铁线莲总多酚的提取率作为评价指标,选择乙醇体积分数、提取时间、料液比、提取次数为考察因素,采用正交试验法确定了东北铁线莲中总多酚的最佳工艺,采用分光光度法对提取液中总多酚的含量进行了测定,检测波长为 766 nm。结果表明:最佳提取工艺条件中乙醇浓度为 55%(体积分数),提取时间为 35 min,料液比(质量比)为 1 : 30,提取次数为 3 次。没食子酸在质量浓度为 1.116~11.160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时呈现良好的线性关系。该提取方法操作简单,结果比较可靠,适用于东北铁线莲总多酚的提取。

关键词:东北铁线莲;总多酚;超声提取;正交试验法;没食子酸

中图分类号:R282.71 文献标志码:A

Study on extraction technology of total polyphenols in *Clematis Manshurica Rupr.*

WANG Xiao-lin, ZHONG Fang-li, SUN Wei, WANG Hui-zhu

(School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin Jilin 132022, China)

Abstract: This paper is to establish the optimum extraction technology of total polyphenols (TP) in *Clematis manshurica Rupr.* by ultrasonic extraction method. By using the extraction efficiency of TP in *Clematis manshurica Rupr.* as evaluating indicator, some important factors, such as the concentration of ethanol, the extracting time, the ratio between raw material and solvent and the extracting times, are optimized by orthogonal experimental design. The content of TP in *Clematis manshurica Rupr.* is determined by spectrum photometric method at detection wavelength of 766 nm. The optimum extraction condition of TP in *Clematis manshurica Rupr.* with ultrasonic method are obtained as follows: the concentration of ethanol, the extracting time is 35 min, the ratio of raw material to solvent is 1 : 30, and the extraction times is 3 times is 55%. The concentration of gallic acid and its absorption value shows a good linear relationship at the range of 1.116~11.160 $\mu\text{g}/\text{mL}$. It is concluded that the ultrasonic extraction method obtained in the paper is easy to operate and reliable, so it could be used for extracting TP in *Clematis manshurica Rupr.*

Key words: *Clematis Manshurica Rupr.*; total polyphenols (TP); ultrasonic extraction; orthogonal experimental design; gallic acid

东北铁线莲(*Clematis Manshurica Rupr.*)是毛茛科铁线莲,属多年生蔓生草本植物,别名辣蓼铁线莲、山辣椒秧子,其干燥根及根茎入药,药材名为威灵仙,广泛分布于中国东北三省^[1-2]。威灵仙为传统常用中药之一,化学成分复杂,药理作用广泛,具有降压、降糖、降血清胆固醇、利尿、抗菌、抑菌、镇痛、抗炎、解痉、抗肿瘤、利胆等作用^[3-5],常用于风寒湿痹、关节不利、四肢麻木、扁桃体炎及食道癌等疾病的治疗^[6-7]。植物多酚

收稿日期:2011-08-31;修回日期:2011-11-16;责任编辑:张士莹

作者简介:王晓林(1969-),男,山东五莲人,副教授,硕士,主要从事天然产物有效成分的提取及纯化工艺方面的研究。

通讯作者:钟方丽教授。E-mail:fanglizhong@sina.com

具有较强的抗氧化作用以及明显的抑菌、抗癌、抗老化和抑制胆固醇升高等功效。超声波辅助提取是一种新的萃取技术,具有提取时间短、提取效率高、能耗低等优点,被广泛应用于天然香料、植物酶、中草药活性成分等的提取^[8]。笔者以东北铁线莲总多酚的提取率为评价指标,采用单因素、正交试验法优化了超声辅助提取东北铁线莲总多酚的工艺条件,为进一步利用和研究东北铁线莲提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JBT/C-YCL 型超声波药品处理机(山东济宁金百特电子有限责任公司提供);R-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂提供);W5-100SP 型恒温水浴锅(上海申生科技有限公司提供);BS-600L 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司提供);752N 型三用紫外分析仪(上海精密科学仪器有限公司提供);RT-08 型多功能粉碎机(台湾荣聪精密科技有限公司提供)。

1.2 材料

没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所提供,供含量测定用);东北铁线莲(安徽省亳州市华申药业有限公司提供);东北铁线莲的干燥根(经吉林化工学院化学与制药工程学院药学系薛健飞博士鉴定为毛茛科铁线莲属);无水碳酸钠,钨酸钠,钼酸钠,硫酸锂,乙醇等,所用试剂均为分析纯;水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 总多酚含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备

精密称取没食子酸对照品 2.79 mg,置于 50 mL 棕色容量瓶中,加蒸馏水溶解,并定容至刻度,即得没食子酸对照品溶液(1 mL 溶液中含没食子酸 0.055 8 mg)。

2.1.2 供试品溶液的制备

取干燥后的东北铁线莲粉末 2.5 g,称定,置于锥形瓶中,加 50%(体积分数)乙醇适量,超声提取 2 次,超声温度为 40 °C。过滤,合并滤液,浓缩,冷却,定容至 50 mL 的容量瓶中,摇匀。吸取 1.0 mL,置于 50 mL 容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,作为供试品溶液。

2.1.3 Folin-Cioealtea 试剂(磷钼钨酸试液)的制备

在圆底烧瓶中加入钨酸钠 50 g,钼酸钠 12.5 g,蒸馏水 350 mL,浓磷酸 25 mL,浓盐酸 50 mL,充分混匀,水浴回流 10 h。再加入硫酸锂 75 g,蒸馏水 25 mL,溴水数滴,开口继续沸腾 15 min,使溴水挥发完全为止。冷却,过滤,定容至 500 mL 棕色容量瓶中。将此溶液置于冰箱中保存,使用时加入 1 倍体积的蒸馏水。

2.1.4 检测波长的选择

取供试品溶液及对照品溶液各 5 mL,放入 50 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,再吸取此溶液 5 mL,置于 25 mL 容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度。取该溶液 1.0 mL,置于 10 mL 的容量瓶中,加 4 mL 蒸馏水,再加入磷钼钨酸试液 1.0 mL,用 29%(质量分数)的碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀,放置 30 min。以相应的试剂为空白,在波长 400~800 nm 范围内进行扫描,结果发现二者最大波长均为 766 nm,故确定检测波长为 766 nm。

2.1.5 分析方法

精确量取 1.0 mL 样品溶液,放入 10 mL 容量瓶中,加 4 mL 蒸馏水,再加入磷钼钨酸试液 1.0 mL,用 29%(质量分数)碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀,放置 30 min。按照分光光度法,在 766 nm 波长处测定其吸光度^[9]。

2.1.6 线性关系考察

精确吸取没食子酸对照品溶液 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,放入 25 mL 容量瓶中,加适量蒸馏水,再分别加入磷钼钨酸试液 1.0 mL,用 29%(质量分数)碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀。以相应的试剂为空白,在 766 nm 波长下测定吸光度,以吸光度 A 为纵坐标,没食子酸质量浓度 ρ 为横坐标绘制标准曲线,求得回归方程为 $A=0.086 28\rho+0.029 19$, $R=0.999 5$ 。

2.1.7 精密度实验

取标准曲线项下质量浓度为 0.004 64 mg/mL 的对照品溶液,按“2.1.5”所述方法,连续测定 5 次吸光度,得知 RSD 值为 0.13% ($n=5$),结果表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性实验

取供试品溶液,分别于配制后的 0,30,60,120,180,240 min,按“2.1.5”所述方法测定吸光度。结果表明,供试品溶液在 30 min 内稳定,然后稳定性下降,但在 60~180 min 时吸光度值比较稳定,所以供试品溶液配制完成后应尽快进行吸光度的测定。

2.1.9 重现性实验

取同一批号的药材粉末 5 份,按“2.1.2”所述方法制备,按“2.1.5”所述方法进行测定,得知 RSD 值为 1.65% ($n=5$),结果表明该方法重现性良好。

2.1.10 加样回收率实验

精密称取已知质量分数(5.56%)的样品各 0.5 g,共 5 份,精密加入没食子酸对照品 27.6 mg,按“2.1.2”所述方法制备,按“2.1.5”所述方法进行测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率测定结果

Tab. 1 Experimental results of recovery test

编号	取样量/g	样品质量/mg	对照品加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD 值/%
1	0.500 2	27.81	27.60	55.03	98.63		
2	0.500 8	27.84	27.60	54.74	97.48		
3	0.499 6	27.78	27.60	55.32	99.78	98.72	0.85
4	0.500 4	27.82	27.60	55.03	98.60		
5	0.500 4	27.82	27.60	55.17	99.10		

2.2 正交试验优选东北铁线莲总多酚超声辅助提取工艺

2.2.1 因素及水平考察

通过单因素探索试验,分别对料液比(质量比)(1:10,1:20,1:30,1:40,1:50),提取时间(10,20,30,40,60 min),提取次数(1,2,3,4,5),乙醇体积分数(30%,50%,60%,75%,90%)等因素和水平进行了探索。以东北铁线莲总多酚的提取率作为评价指标,确定较好的提取因素与水平如下:料液比为 1:20,提取时间为 30 min,提取次数为 3 次,乙醇体积分数为 50%。单因素探索结果可作为确定正交试验因素与水平数的重要依据。根据单因素探索性试验结果,选择提取次数、料液比、提取时间和乙醇体积分数 4 个因素,每个因素选择 3 个水平,设定因素水平表,见表 2。

表 2 因素及水平表

Tab. 2 Table of factors and levels

水平因素	A	B	C	D
	料液比(质量比)	提取次数	提取时间/min	乙醇体积分数/%
1	1:20	1	25	45
2	1:25	2	30	50
3	1:30	3	35	55

2.2.2 提取方法

取东北铁线莲粉末 2.5 g,按 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计方案进行试验,加入一定体积分数的乙醇进行提取,合并提取液,过滤。将滤液浓缩至 50 mL,按“2.1.2”所述方法制备供试品溶液,按“2.1.5”所述方法测定提取液中总多酚的含量,进而得出提取的总多酚的质量和总多酚提取率,总多酚提取率=总多酚质量/东北铁线莲药粉质量 $\times 100\%$ 。正交试验结果见表 3。

表 3 正交试验结果

Tab. 3 Results of orthogonal experiments

序号	A	B	C	D	总多酚提取率/%
	料液比	提取次数	提取时间	乙醇体积分数	
1	1	1	1	1	2.87
2	1	2	2	2	4.21
3	1	3	3	3	5.32
4	2	1	2	3	4.47
5	2	2	3	1	4.44
6	2	3	1	2	4.28
7	3	1	3	2	4.12
8	3	2	1	3	4.40
9	3	3	2	1	5.05
K_{1j}	4.13	3.82	3.85	4.12	
K_{2j}	4.40	4.35	4.58	4.20	
K_{3j}	4.52	4.88	4.63	4.73	
R	0.39	1.06	0.78	0.61	
优水平	A_3	B_3	C_3	D_3	

以东北铁线莲总多酚的提取率为指标,根据正交试验结果,由表 3 可知适宜的实验条件为 $A_3B_3C_3D_3$ 。因为所有的因素水平均为最高点,故不能确定所得实验条件是否为最佳条件,通过补充实验进行验证。由于单因素实验结果已表明提取 3 次已将东北铁线莲中总多酚提取完全,所以提取次数固定为 3 次,由于其他条件均为最高点,故每个因素均进行第 4 水平实验,即乙醇体积分数为 60%,其他 3 个因素都用最佳实验条件;提取时间为 40 min,其他 3 个因素都用最佳实验条件;溶剂用量为 35 倍,其他 3 个因素都用最佳实验条件。实验结果见表 4。

表 4 补充实验结果

Tab. 4 Results of supplementary experiments

试验号	料液比(质量比)	提取次数/次	提取时间/min	乙醇体积分数/%	吸光度	总多酚提取率/%
1	1:30	3	35	55	0.508	5.55
2	1:35	3	35	55	0.508	5.56
3	1:30	3	40	55	0.496	5.41
4	1:30	3	35	60	0.438	4.74

结果表明,第 4 水平实验并未明显提高东北铁线莲中总多酚的提取率。所以确定东北铁线莲中总多酚的最佳提取条件如下:料液比(质量比)为 1:30,提取时间为 35 min,提取次数为 3 次,乙醇体积分数为 55%。

2.2.3 工艺验证性实验

为了验证实验所得的最佳工艺条件的稳定性,按优化工艺条件进行 3 次验证性实验,然后各取 30 mL 提取液,倒入称重后的蒸发皿中水浴蒸干,基本蒸干后放入电热鼓风干燥箱中干燥,待其干燥至恒重后称重,由差值得到浸膏质量,计算干浸膏总多酚的含量,结果见表 5。实验结果表明:东北铁线莲中总多酚的提取率分别为 5.55%,5.56%,5.33%,平均提取率为 5.48%,干浸膏中总多酚的质量分数分别为 23.48%,23.49%,22.53%,平均质量分数为 23.17%。这表明优化的工艺条件重现性高,稳定可靠。

3 讨 论

3.1 料液比、提取时间、乙醇体积分数的选择

单因素实验中料液比(质量比)分别设定为 1:10,1:20,1:30,1:40,1:50,提取时间分别设定为 5,

(下转第 88 页)

- [8] 王月, 郭凤, 林英. Micro-Tom 番茄离体再生条件的选择[J]. 北方园艺(Northern Horticulture), 2010(18):139-141.
- [9] 乔永旭. 番茄再生体系的建立[J]. 北方园艺(Northern Horticulture), 2010(17):174-176.
- [10] 毕建水, 李翠翠, 徐丽丽. 培养基和继代时间对番茄叶片愈伤组织诱导和芽分化的影响[J]. 安徽农学通报(Anhui Agricultural Science Bulletin), 2008, 14(13): 41-42.
- [11] 蒋素华, 顾东亚, 崔波, 等. 番茄真叶愈伤组织诱导及植株再生研究[J]. 北方园艺(Northern Horticulture), 2009(10): 113-114.
- [12] 张艳芳, 霍秀文, 苏彩霞, 等. 番茄遗传转化体系的建立[J]. 农业生物技术学报(Journal of Agricultural Biotechnology), 2008, 24(3): 58-61.

(上接第 35 页)

10, 20, 30, 40, 60 min, 乙醇体积分数分别设定为 30%, 50%, 60%, 75%, 90%。结果表明: 料液比(质量比)为(1:20)~(1:40)时, 总多酚提取率较高且比较稳定; 提取率随提取时间的延长而增加, 在 30 min 时提取率最高; 乙醇体积分数为 50% 时提取率最高。所以在正交试验中选择料液比(质量比)为 1:20, 1:25, 1:30, 提取时间为 25, 30, 35 min, 乙醇体积分数为 45%, 50%, 55%, 进一步考察各因素对提取效果的影响。

表 5 验证性实验结果

Tab. 5 Experimental results of proof test

项 目	序 号			平均值
	1	2	3	
总多酚的提取率/%	5.55	5.56	5.33	5.48
w(总多酚)/%	23.48	23.49	22.53	23.17
干膏中总多酚质量/g	0.1387	0.1390	0.1332	0.1370

3.2 提取次数的选择

单因素实验中提取次数的考察按如下方案进行: 称取东北铁线莲药材粉末约 2.5 g, 量取 20 倍量 50% (体积分数) 的乙醇, 分别提取 1, 2, 3, 4, 5 次, 每次超声(40 °C) 30 min, 过滤。把每次的滤液定容至 50 mL 的容量瓶中, 按“2.1.2”所述方法制备供试品溶液, 按“2.1.5”所述方法测定提取液中总多酚的含量, 进而得出提取的总多酚质量和总多酚提取率。结果表明: 提取 3 次可以将东北铁线莲总多酚提取完全, 其中前 2 次即可提取总量的 89%。

4 结 语

通过正交试验法对东北铁线莲总多酚的超声辅助提取工艺条件进行了优化, 并按最佳工艺进行了验证试验。结果证明, 该工艺提取东北铁线莲总多酚路线简单、提取率高、操作容易控制、稳定性好, 为东北铁线莲总多酚提取的工业生产提供了合理依据。

参考文献:

- [1] 许世泉, 王英平, 邵财, 等. 东北铁线莲最佳采收期的研究[J]. 特产研究(Special Wild Economic Animal and Plant Research), 2007, 29(4): 25-26.
- [2] 朱有昌. 东北药用植物[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1989.
- [3] 方文贤. 实用临床抗衰老中药[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2002.
- [4] 章蕴毅. 威灵仙解痉抗炎镇痛[J]. 中成药(Traditional Chinese Medicine Patent Prescription), 2001, 23(11): 808-811.
- [5] 吴依娜, 贺文娟. 中药材威灵仙的化学成分和药理研究概述[J]. 中国医药导报(China Medical Herald), 2008(20): 27-28.
- [6] 徐小云, 王云霞, 李智勇. 威灵仙化学成分和药理作用研究进展[J]. 现代中医药(Modern Traditional Chinese Medicine), 2003, 15(4): 67-69.
- [7] 常敏毅. 抗癌良方[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1993.
- [8] 牛波, 邱海霞, 田景振, 等. 超声强化提取技术[J]. 山东中医杂志(Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine), 2000, 19(10): 629-630.
- [9] 唐前, 罗燕英, 唐玲, 等. 正交实验优选金花茶种子总多酚的最佳提取工艺[J]. 时珍国医国药(Lishizhen Medicine and Materia Medica Research), 2010, 21(4): 792-793.