

正交设计法优选忍冬藤中绿原酸提取工艺

毛莹 李东霞 夏春丽

(大连大学医学院, 大连, 116622)

摘要 目的:对忍冬藤中绿原酸的提取工艺进行研究。方法:采用正交设计法设计忍冬藤中绿原酸的微波提取工艺和超声波提取工艺,采用高效液相法测定各提取工艺下的绿原酸含量,并将两种提取方法得到的结果进行比较。结果:微波提取法的最佳提取工艺为:微波时间为 60 s,乙醇浓度为 50%,料液比为 1:15,绿原酸含量为 0.357%。超声波法最佳提取工艺为:提取功率为 50 Hz,甲醇浓度为 50%,料液比为 1:20,绿原酸含量为 0.321%。以绿原酸含量为指标,微波提取法优于超声波提取法。结论:忍冬藤中绿原酸的最佳提取方法为微波提取法,此方法时间短,耗能低,提取率优于超声波提取法,可用于忍冬藤中绿原酸的提取。

关键词 忍冬藤;绿原酸;正交设计;提取方法;含量测定

Optimization of Extraction Process of Chlorogenic Acid in *Lonicerae japonicae* Caulis by Orthogonal Design

Mao Ying, Li Dongxia, Xia Chunli

(Medical College, Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract Objective: To study the extraction methods for chlorogenic acid in *Lonicerae japonicae* Caulis. **Methods:** The microwave extraction and ultrasonic extraction of chlorogenic acid in *Lonicerae japonicae* Caulis were set based on orthogonal design. The chlorogenic acid contents of different extraction techniques were detected by HPLC. The results of the two extraction methods were compared. **Results:** The results show that the chlorogenic acid was highest, up to 0.357%, when microwave time was set at 60s with 50% ethanol concentration and solid-liquid ratio of 1:15 by microwave extraction. The chlorogenic acid was highest when methanol concentration, up to 0.321%, was set at 50%, ultrasonic power 50W and solid-liquid ratio 1:20 by ultrasonic extraction. By taking chlorogenic acid content as an indicator, microwave extraction method was better than ultrasonic extraction. **Conclusion:** According to the results, the best extraction method for Chlorogenic acid in *Lonicerae japonicae* Caulis was microwave extraction with less time cost and low energy consumption and the extraction rate is better than that of the ultrasonic extraction. It can be applied in the extraction of chlorogenic acid in *Lonicerae japonicae* Caulis.

Key Words *Lonicerae japonicae* Caulis; Chlorogenic acid; Orthogonal design; Extraction methods; Determination

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.07.049

忍冬藤为忍冬科植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb.)的干燥茎枝,具有清热解毒、疏风通络之功效。绿原酸是忍冬藤的主要有效成分之一^[1-2],现代研究表明忍冬藤与金银花具有相近的化学成分和药理活性^[3],均可做为临床常用清热解毒药,而且还作为提取绿原酸的工业原料,用量较大,价格较高,货源较紧。因此从忍冬藤中提取绿原酸应用于临床和市场迫在眉睫。目前对忍冬藤的研究报道主要集中在化学成分、药理作用等方面,对其有效成分提取方法的系统性研究较少,这直接影响到忍冬藤的开发与利用。因此,本文根据忍冬藤中绿原酸提取方法的一些前期研究,以绿原酸含量为指标,采用正交设计法对忍冬藤中绿原酸的微波和超声提取工艺进行研究,旨在为更好的开发利用忍冬藤打下基础。

1 材料

忍冬藤(采自大连大学药植园),经大连大学医学院中药研究所鉴定为忍冬科植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb.)的干燥茎枝;绿原酸对照品(批号:110753-201213),购自中国药品生物制品检定所。

HITACHI L2000 型高效液相色谱仪(HITACHI L-2013 送液泵, HITACHI UV-detector 2-2400 检测器);甲醇(Tedia.),乙腈(Tedia.)为色谱纯,其他试剂为分析纯。

2 方法

2.1 HPLC 色谱条件 色谱柱: Hypersil Gold 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流速:1.0 mL/min;检测波长:327 nm;流动相:乙腈-0.4% 磷酸溶液(11:89)。

基金项目:辽宁省大连市科技计划项目(编号:2008E11SF171)

作者简介:毛莹(1982.01—),女,博士研究生,研究方向:中药鉴定方法学、中药药效组分及药效组分质量评价体系研究, E-mail:maoyingying2004@sina.com

2.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 2.6 mg,用 50% 甲醇定容于 50 mL 的容量瓶中,摇匀,置冰箱内保存备用。

2.3 微波提取试验^[4-8] 取忍冬藤粉末(过三号筛)各 1 g 精密称定,按实验设计(见表 1)进行微波提取,得到 9 组提取液,冷却后过滤,取续滤液 5 mL 置 25 mL 容量瓶中,用乙醇定容至刻度,摇匀,静止,上清液用 0.45 μm 滤膜滤过即可。

2.4 超声波提取试验^[9-12] 取忍冬藤粉末(过三号筛)各 1 g 精密称定,按实验设计(见表 2)进行超声波提取,得到 9 组提取液,冷却后过滤,取续滤液 5 mL 置 25 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,静止,上清液用 0.45 μm 滤膜滤过即可。

表 1 微波法正交试验因素水平表

水平	因素		
	A 微波时间(s)	B 乙醇浓度(%)	C 料液比(g/mL)
1	60	30%	1:25
2	30	70%	1:20
3	90	50%	1:15

表 2 超声波法正交试验因素水平表

水平	因素		
	A 甲醇浓度(%)	B 超声功率(W)	C 料液比(g/mL)
1	40	50	1:15
2	50	80	1:20
3	60	100	1:25

2.5 线性关系考察 精密吸取绿原酸标准品溶液 3、5、10、15、20 μL,注入高效液相色谱仪,以乙腈-0.4% 磷酸溶液(11:89)为流动相,按上述色谱条件测定峰面积,以对照品的含量为横坐标,对照品峰面积积分值为纵坐标绘制标准曲线,计算回归方程:Y = 3E + 06X + 7276, R² = 0.9992 (n = 5),表明绿原酸在 0.15 ~ 1.04 μg 范围内呈线性关系。

2.6 精密度试验 在规定色谱条件下精密吸取同一浓度的对照品溶液 10 μL,连续进样 6 针,计算, RSD = 1.05%。

2.7 重现性试验 称取供试品 0.5 g,共 6 份,精密称定后,依法测定绿原酸含量, RSD = 1.12% (n = 6)。

2.8 稳定性试验 在规定色谱条件下,精密称取同一样品溶液 10 μL,于 0、2、4、8、12、24 h 进样,测定,计算含量, RSD = 1.32% (n = 6)结果表明绿原酸在避光条件下放置 24 h 基本稳定。

2.9 加样回收率试验 取已知含量的忍冬藤药材,加入一定量绿原酸标准品,按上述色谱条件测定,计

算回收率。测得平均回收率为 99.1%, RSD = 1.8% (n = 6)。

2.10 样品测定 以乙腈-0.4% 磷酸溶液(11:89)为流动相,按照上述色谱条件,测定不同提取方法提取的忍冬藤中绿原酸的含量。

2.11 统计学方法 采用 SPSS 11.5 统计软件对所得实验数据进行正交实验方差分析。

3 结果

3.1 微波提取法 从表 3 和表 4 中可以看出,各因素对绿原酸影响的顺序为 A > C > B。以绿原酸含量为指标得出的最佳工艺条件是 A1B3C3,即提取时间为 60 s,乙醇浓度为 50%,料液比为 1:15,绿原酸含量为 0.357%。

表 3 微波提取法 L₉(3³) 试验数据表

实验号	1(A)	2(B)	3(C)	绿原酸含量(%)
1	1	1	1	0.323
2	1	2	2	0.302
3	1	3	3	0.357
4	2	1	2	0.265
5	2	2	3	0.310
6	2	3	1	0.283
7	3	1	3	0.254
8	3	2	1	0.230
9	3	3	2	0.182
K1	0.981	0.843	0.816	
K2	0.858	0.822	0.840	
K3	0.666	0.843	0.852	
k1	0.327	0.281	0.272	
k2	0.286	0.274	0.280	
k3	0.222	0.281	0.284	
R	0.105	0.007	0.012	

表 4 微波提取法绿原酸含量方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	0.017	2	0.008	71.947	P < 0.05
B	8.889E-05	2	4.444E-05	0.378	P > 0.05
C	0.005	2	0.002	20.992	P < 0.05
随机误差	0.000	2	0.000		

注:在试验水平 α = 0.05(或 0.01)的情况下,分别检验各因素的显著性,如果 Fi > F_{0.05} (i = A, B, C),即认为该因素对试验指标有显著影响,反之没有显著影响。经查表得 F_{0.05} = 19。

3.2 超声波提取法 从表 5 和表 6 中可以看出,各因素对绿原酸影响的顺序为 A > C > B。以绿原酸含量为指标得出的最佳工艺条件是 A₂B₁C₂,即甲醇浓度为 50%,超声功率为 50W,料液比为 1:20,绿原酸含量为 0.321%。

3.3 不同提取工艺的对比分析 在上述正交实验的基础上,分别在微波提取法和超声提取法中筛选

出绿原酸含量最高的一组进行比较,得出最佳提取工艺为微波提取法提取时间为 60s,乙醇浓度为 50%,料液比为 1:15,绿原酸含量为 0.357%。

表 5 超声波提取法 $L_9(3^3)$ 试验数据表				
实验号	1(A)	2(B)	3(C)	绿原酸含量(%)
1	1	1	1	0.275
2	1	2	2	0.302
3	1	3	3	0.284
4	2	1	2	0.321
5	2	2	3	0.272
6	2	3	1	0.220
7	3	1	3	0.196
8	3	2	1	0.145
9	3	3	2	0.201
K1	0.813	0.792	0.639	
K2	0.861	0.720	0.825	
K3	0.543	0.705	0.753	
k1	0.271	0.264	0.213	
k2	0.287	0.240	0.275	
k3	0.181	0.235	0.251	
R	0.106	0.029	0.062	

表 6 超声波提取法绿原酸含量方差分析表					
因素	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	0.020	2	0.010	92.067	$P<0.05$
B	0.001	2	0.001	6.791	$P>0.05$
C	0.006	2	0.003	26.755	$P<0.05$
随机误差	0.000	2	0.000		

注:在试验水平 $\alpha=0.05$ (或 0.01) 的情况下,分别检验各因素的显著性,如果 $F_i > F_{0.05}$ ($i=A,B,C$),即认为该因素对试验指标有显著影响,反之没有显著影响。经查表得 $F_{0.05}=19$ 。

表 7 微波提取法与超声提取法提取工艺对比分析表		
提取方法	提取条件	绿原酸含量(%)
微波提取法	提取时间为 60s,乙醇浓度为 50%,料液比为 1:15。	0.375
超声提取法	提取功率为 50Hz,甲醇浓度为 50%,料液比为 1:20。	0.321

4 讨论

本实验在前期预试验及相关文献的基础上,进行了正交试验因素水平的设置,选择了最为影响微波提取法和超声波提取法工艺的主要条件,进行了正交试验,从实验结果来看,所选择的实验条件能够筛选出微波提取法和超声波提取法的最佳提取工艺,为后续实验提供方法和参考。

本实验中两种提取方法的最佳提取工艺在绿原酸含量上接近,但微波提取法具有热效率高、设备简

单、适用范围广、重现性好、节省试剂、污染小等特点,从提取溶剂上来讲,本实验采用乙醇作为绿原酸的微波提取溶剂,结果表明乙醇能够较完全的提取药材中的绿原酸成分,并且乙醇与甲醇相比,具有污染小,价格便宜等优点,甲醇比乙醇挥发快,毒性大,工业上大量提取不宜采用。同时,微波提取工艺可有效地克服传统煎煮提取方法中药材细粉易出现糊化、堵塞等问题,适宜于工业化大生产^[13-15]。所以本实验初步认为微波提取法可作为忍冬藤的最佳提取工艺,具体方法有待于进一步研究。

参考文献

[1] 齐乐辉,杨连荣,尹蕊,等. 忍冬藤成份分析及在抗菌消炎等方面的研究进展[J]. 黑龙江科技信息,2010(3):207.

[2] 李瑞国,王彩君. 忍冬不同器官绿原酸提取及抑菌作用[J]. 时珍国医国药,2012,23(5):1196-1197.

[3] 鲁思爱. 忍冬藤的化学成分及其药理应用研究进展[J]. 临沂大学学报,2012,34(3):132-134.

[4] 李克,王曙东,吴龙琴,等. 多因素正交试验法优化忍冬藤提取工艺研究[J]. 现代中药研究与实践,2013,27(2):39-41.

[5] 李克,吴龙琴,汤淏,等. RP-HPLC 法同时测定忍冬藤中绿原酸和咖啡酸含量[J]. 现代中药研究与实践,2013,27(1):17-19.

[6] 欧阳丽娜,李兰林,吴雪,等. 正交设计优选竹节参总皂苷微波提取工艺的研究[J]. 中草药,2010,41(10):1639-1642.

[7] 谢静,周文富,张茶妹. 微波辅助法提取马尾松树皮总黄酮的研究[J]. 化学与生物工程,2013,30(1):36-39.

[8] 王秀文,王颖莉,裴晓丽,等. 均匀设计法优选党参茯苓水溶性多糖的微波提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):24-27.

[9] 陈玲玲,朱德全,蔡月娥,等. 正交试验优化溪黄草中咖啡酸和迷迭香酸的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(12):12-15.

[10] 徐静静,艾训儒,李琴,等. 正交试验优选延龄草多糖提取工艺研究[J]. 中药材,2013,36(2):305-307.

[11] 黄嘉维,郝亚娟,彭求贤,等. 正交试验优化卜芥凝集素超声提取工艺研究[J]. 中药材,2016,39(4):842-845.

[12] 邓政东,程爱芳,郑延金. 猴头菇凝集素的提取工艺研究[J]. 北方园艺,2014(24):133-135.

[13] 席彩彩,张文芳,侯明月,等. 微波提取技术在中药有效成分提取中的应用[J]. 中国药业,2014,23(30):93-95.

[14] 曹洪斌,申明金,陈莲惠. 微波萃取在中药提取中的应用[J]. 广州化学,2013,38(1):72-76.

[15] 张晓静,龚婷,扶庆权,等. 响应面法优化微波辅助提取苹果皮中总黄酮的工艺研究[J]. 甘肃农业大学学报,2015,50(6):148-155.