

文章编号:1673-1689(2008)06-0069-04

超高压技术高效提取杜仲叶绿原酸

田 龙

(南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473061)

摘 要: 对杜仲叶绿原酸的提取工艺方法进行了研究。建立了杜仲叶绿原酸超高压提取法,以分光光度法为检测手段,以绿原酸的提取率为参数并将超高压提取法在提取时间、提取剂用量和提取率等方面与索氏回流和浸泡提取方法上方面进行了比较。

关键词: 超高压提取; 杜仲; 绿原酸

中图分类号: TS 201.2

文献标识码: A

Study of on the Effective Extracting Chlorogenic Acid from *Eucommia ulmoides* by Ultrahigh-Pressure Extraction

TIAN Long

(School of Life Science and Technology, Nanyang Normal College, Nanyang 473061, China)

Abstract: In this manuscript, the extraction and separation methods of chlorogenic acid from *Eucommia* by ultrahigh-pressure extraction were studied. The influence of extraction variables on extraction efficiency of chlorogenic acid was investigated. Compared with the conventional extraction method, the extraction time is shorter. The ultrahigh-pressure extraction were shown to be more efficient in the extraction of chlorogenic acid from Flos Lonicerae.

Key words: Ultrahigh-pressure extraction; eucommia; chlorogenic acid

杜仲(*Eucommia ulmoides oliv*)是我国特有的木本植物,是名贵的中药材。杜仲传统以皮入药,但杜仲皮的生长年限较长,一般 10~20 年才能剥皮,且剥皮后树易死亡,不利于可持续生产。

研究发现,杜仲叶与皮化学成分基本一致,在药理和药效上具有同等功效。它们都含有苯丙素类化合物绿原酸、环烯醚萜类化合物、木脂素类化合物、黄酮类物质、多糖等活性成分^[1]。其中绿原酸(Chlorogenicacid, CHA)具有利胆、抗菌、抗病毒、止血、增加白血球、缩短血凝和出血时间以及兴奋中枢神经系统等药用功能^[2]。

目前天然产物提取常用方法主要分为热水法、乙醇回流法和酶法提取,存在着提取时间长、提取液中杂质多、分离困难、热敏性化合物易变性等不足。

超高压技术是一种新兴技术,广泛用于食品加工,达到灭菌、灭酶、改变生物大分子结构的目的^[3],具有提取速率快、提取率高、常温提取、提取物生理活性好^[4]的优势。

作者应用超高压提取法对杜仲叶的绿原酸进行了提取,确定了最佳工艺条件,并与其他传统提取法进行了比较。

收稿日期:2007-10-03.

作者简介:田龙(1977-),男,河南南阳人,工学硕士,讲师. Email: tianlong@nynu. edu. cn

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

1.1.1 仪器与试剂 Milli-Q 超纯水系统:由北京爱思泰克公司提供;FA2004A 电子天平:上海昕天科学仪器有限公司产品;HX-400A 型高速粉碎机:浙江省永康市溪岸五金药具厂生产;TDL-40B 台式离心机:上海安亭科学仪器厂生产;DL700 间歇式超高压提取设备:上海大隆机器厂生产;索氏提取器,电热恒温水浴锅:上海博迅实业有限公司医疗设备厂生产;ZK-82A 型真空干燥箱:上海市实验仪器总厂生产。

1.1.2 粉末样品的制备 将杜仲叶粉碎后过孔径 0.9 mm 筛,用烘箱 40 ℃ 烘至恒重,得粉末样品。

1.2 超高压提取工艺流程

原料→粉碎→加溶剂→超高压处理→滤除渣→提取液→分离纯化→纯品。

超高压提取在间歇式超高压提取装置中完成。

1.3 标准溶液的制备及绿原酸测定

准确称取绿原酸标准品 0.03 g, 20 mmol/L 硼砂溶解,用 20 mmol/L 硼砂定容至 10 mL,即得 3 mg/mL 的绿原酸储备液。绿原酸的测定用分光光度法,以 330 nm 为测定波长,用紫外分光光度法测定提取物中的绿原酸含量。绿原酸标准品的浓度—吸光度回归方程: $A = 15.949X + 0.0267$,相关系数为 0.997 9^[5]。

1.4 样品溶液的制备及绿原酸测定

准确称取干燥杜仲叶粉末 2 g,装入密封袋中加入 60 mL 体积分数为 70% 的乙醇,密封混匀,在 200 MPa 高压提取 2 min,离心,取上层清液 5 mL 减压浓缩挥发干溶剂后,以 20 mmol/L 硼砂稀释成 20 mL,然后用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤即得待测样品溶液。并由下式计算提取率(%)。

提取率(%) = $0.0198 \times A \times (V/V_1) \times (1/m) \times 100\%$
式中,A:吸光度;V:溶液总体积;V₁:检测时所取溶液体积;m:样品质量。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验分析

分别考查超高压提取各提取条件对杜仲叶绿原酸提取率的影响,包括溶剂、溶剂浓度、料液比、提取压力和提取温度。

2.2 超高压提取条件单因素试验

2.2.1 提取溶剂的确定 提取绿原酸等有机酸要

选择溶解性大而对杂质成分溶解性小、提取后易于分离的提取溶剂^[6]。由于乙醇有提取率高、无毒、无不良气味、易回收等优点,故本实验选取乙醇水溶液作为超高压提取杜仲叶绿原酸的溶剂。

2.2.2 乙醇体积分数的单因素试验 在其它条件相同时,考察 30%、50%、70%、90% 不同体积分数乙醇对提取率的影响,结果见图 1。

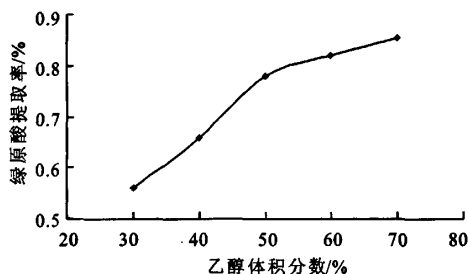


图1 乙醇浓度对提取率的影响

Fig.1 Effect of ethanol density on extraction rate

由图 1 可知,乙醇体积分数增大,绿原酸的提取率也增大。这与所提取物质的结构有关。乙醇体积分数增大,提取物的溶解性增大。因此,提取率随乙醇体积分数的增大而增加;但是当乙醇体积分数过高时,杜仲叶色素等其它组分也大量溶出,另一方面也增加了成本,并为乙醇回收带来困难,综合考虑乙醇体积分数以 70% 左右较好。

2.2.3 提取压力单因素试验 在其他参数完全相同的条件下进行超高压提取,考察不同提取压力对绿原酸提取率的影响,结果见图 2。

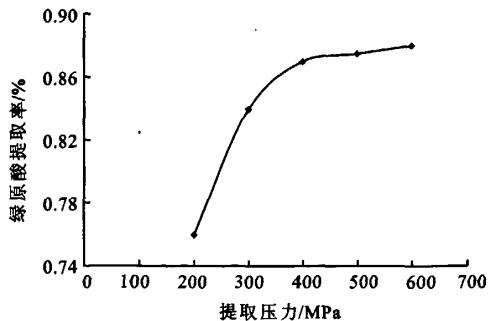


图2 提取压力对提取率的影响

Fig.2 Effect of pressure on extraction rate

从图 2 可以看出,压力对提取率有影响,压力从 200 MPa 变化到 600 MPa 的过程中,在 400 MPa 时提取率最高,压力大于 400 MPa 后,随压力增大,提取率不再增加。增大提取压力可增加提取溶剂向固体组织的渗透速率,使固体组织内部快速充满溶剂,缩短提取时间;也可使组织细胞内外的压力差增大,卸压时提供的反向压力差大,在有效成分向组织外扩散过程中,提供强大的传质动力,有效

成分快速扩散到固体组织外^[7]。故在一定的压力范围内,增加提取压力有利于绿原酸的溶出,但设备投资也提高。

2.2.4 每克料溶剂添加量的单因素试验 改变每克料溶剂添加量,在其它条件相同的条件下进行超高压提取,然后测定绿原酸含量,计算提取率。结果见图 3。

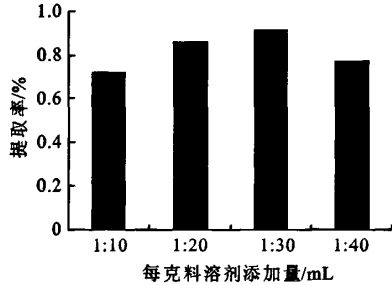


图 3 料液比对提取率的影响

Fig. 3 Effect of the ratio of material fluid on extraction

从图 3 可以看出,每克料溶剂添加量对杜仲叶绿原酸提取率有影响,当每克料溶剂添加量大于 40 mL 以后,提取率有下降趋势。这可能是由于每克料溶剂添加量增大,有效成分在由固体组织向外扩散的过程中,浓度梯度增大,扩散速率提高,有利于提高提取率。当每克料溶剂添加量超过最佳值时,提取率的下降可能与绿原酸的分解有关,因此必须确定适当的每克料溶剂添加量,以提高绿原酸的提取率。

2.2.5 提取温度单因素试验 改变提取温度,在其它条件相同的条件下进行超高压提取,然后测定绿原酸含量,计算提取率。结果见图 4。

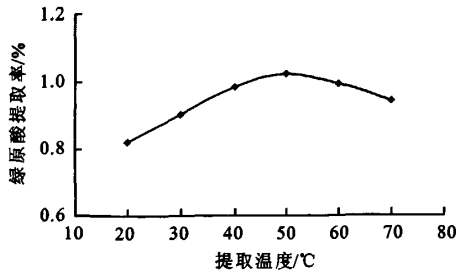


图 4 提取温度对提取率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on extraction rate

由图 4 可知,杜仲叶绿原酸提取率随着提取温度的升高而增加,在 50℃ 时提取率最高,此后温度再升高时提取率有下降趋势。这是因为杜仲叶绿原酸主要存在于细胞内的液泡中,较高的温度能加快分子运动速率,利于溶剂分子有效地渗透进组织细胞,同时也能软化表面的细胞壁,降低绿原酸类化合物由组织细胞内向外扩散的传质阻力,提

高了提取率。但绿原酸化合物在高温下不稳定而降解,温度过高提取率会下降。

2.2.6 提取时间单因素试验 改变提取时间,在其它条件相同的条件下进行超高压提取,然后测定绿原酸含量,计算提取率。结果见图 5。

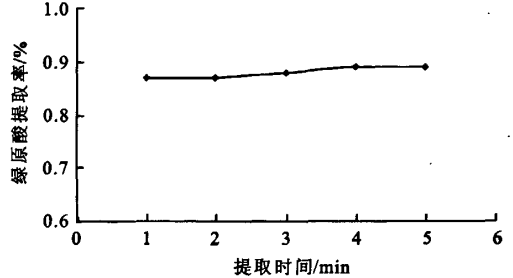


图 5 不同提取时间对提取收率的影响

Fig. 5 Effect of extraction time on extraction rate

由图 5 可知,不同的提取时间对超高压提取绿原酸影响不大。这是由于超高压提取技术的提取压力较高,溶剂能够在极短的时间渗透到细胞内部,而且绿原酸这种有机酸能够快速达到溶解平衡,因此提取时间较短。延长提取时间并不能明显增加绿原酸的提取率。在正交试验中提取时间不作为考虑因素^[8]。

2.3 正交试验结果与数据分析

在以上单因素试验基础上,对影响杜仲叶超高压提取效果的因素乙醇体积分数(A)、提取压力(B)、每克料溶剂添加量(C),温度(D)进行正交试验,如表 1,2 所示。

表 1 因素水平表

Tab. 1 Levels of the factors

水平	因素			
	A 乙醇体积分数/%	B 提取压力/MPa	C 溶剂添加量/mL	D 提取温度/°C
1	50	300	1 : 20	30
2	60	400	1 : 30	40
3	70	500	1 : 40	50

表 2 正交试验设计方案及结果

Tab. 2 The result of the levels orthogonal design

实验号	A	B	C	D	绿原酸提取率/%
1	1	1	1	1	0.81
2	1	2	2	2	0.88
3	1	3	3	3	0.92
4	2	1	2	3	0.99
5	2	2	3	1	1.12
6	2	3	1	2	1.05
7	3	1	3	2	0.94

续表 2

实验号	A	B	C	D	绿原酸 提取率/%
8	3	2	1	3	1.02
9	3	3	2	1	0.97
K ₁	0.870	0.913	0.960	0.967	
K ₂	1.053	1.007	0.947	0.957	
K ₃	0.977	0.980	0.993	0.977	
R	0.183	0.094	0.046	0.020	

从表 2 可知,4 个因素对提取效果影响的顺序为:A(乙醇浓度)>B(提取压力)>C(每克料溶剂添加量)>D(温度)。最佳工艺条件为:溶剂为 60%体积分数乙醇,压力为 400 MPa,杜仲叶粉末每克溶剂添加量为 40 mL,温度为 50 ℃。

2.4 验证试验

表 2 显示,最优组合不在所做的实验里,因此以最优组合确定的工艺条件重复做 3 次试验,以验证其是否为最优组合,见表 3。可见优化结果为试验范围内的最优组合,且比表 2 中的最优组合(5 号)有较大提高。

表 3 验证试验结果

Tab. 3 Results of rerification test

编号	平均值提取率/%
1	1.14
2	1.16
3	1.15
平均值	1.15

参考文献(References):

[1] 张康健. 中国杜仲研究[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1992:9—23.

[2] 马清温,万鹏,孙震晓. 山东药用植物[M]. 济南:山东科学技术出版社,1998.

[3] 刘世献, 闫治成, 刘弘, 等. 高压加工技术在食品加工中的应用[J]. 食品科学, 2000, 21(12): 171—172.
LIU Shi-xian, RUN Zhi-cheng, LIU Hong, et al. High-pressure processin gtechnology in the food processing[J]. Food Science, 2000, 21(12): 171—172. (in Chinese)

[4] Zhang Shouqin, Zhu Junjie, Wang Changzhen. Novel high pressure extraction technology[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2004, 278: 471—474.

[5] 郭明全, 宋凤瑞, 陈貌连. 超声提取一分光光度法测定刺五加叶中总皂苷含量[J]. 分析化学, 2002, 30(2): 250.
GUO Ming-quan, SONG Feng-rui, CHEN Mao-lian. Ultrasonic extraction-ciwuja spectrophotometric determination of total saponin contentin leaves[J]. Analytical chemistry, 2002, 30(2): 250. (in Chinese)

[6] 陈瑞战, 张守勤, 王长征. 常温超高压提取人参总皂苷. 化工学报[J]. 2005, 56(5): 911—914.
CHEN Rui-zhan, ZHANG Shou-qin, WANG Chang-zheng. EHV at room temperature extraction ginsenoside[J]. Chemical Journal, 2005, 56(5): 911—914. (in Chinese)

[7] 陈瑞战, 张守勤, 王长征, 等. 超高压提取西洋参皂苷的工艺研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(5): 150—154.
CHEN Rui-zhan, ZHANG Shou-qin, WANG Chang-zheng, et al. American ginseng extract soap celecoxib EHVStudy[J]. Journal of Agricultural Engineering, 2005, 21(5): 150—154.

[8] Zhang Shouqin, Xi Jun, Wang Changzheng. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005, 80: 50—54. (in Chinese)

(责任编辑:杨 萌)

2.5 方法比较

本实验同时用索式回流、超声提取、浸泡提取法对杜仲叶的绿原酸进行了提取,各种方法所用原料均为同一批,4 种提取方法比较结果列于表 4。

表 4 绿原酸提取方法比较

Tab. 4 Comparison of different extraction methods of chlorogenic acid

方法	提取溶剂	溶剂 添加量/mL	提取 时间/min	提取 率/%
索式回流	60%乙醇	10	180	5.56
超声提取	60%乙醇	20	60	0.87
超高压提取	60%乙醇	40	2	1.15
浸泡提取	60%乙醇	20	48h	5.06

从表 4 可以看出,在对杜仲叶绿原酸提取中,超声提取法和超高压提取法在缩短时间、提高提取率方面比传统方法要佳,特别是超高压提取法,大大缩短了提取时间,而且提高了提取率。

3 结 语

作者建立了杜仲叶绿原酸的超高压提取方法。在此基础上,以分光光度法为检测手段,以绿原酸的提取率为考察参数,将超高压提取法与索氏回流和浸泡提取法进行了比较。结果表明,在提取时间、提取剂用量等方面,超高压提取更有优势,提取时间短、提取率高,因而是有效成分提取的一种极富潜力的提取法。