

土木香中总酚酸和绿原酸的微波辅助提取工艺优选

王金¹, 赵永明¹, 贾英华², 谢俊霞³, 郭春燕^{1*}

(1. 河北北方学院药学系, 河北 张家口 075000;

2. 浙江九旭药业有限公司情报科研所, 浙江 金华 321016;

3. 河北化工医药职业技术学院, 石家庄 050026)

[摘要] **目的:** 优选土木香中总酚酸和绿原酸的提取工艺。**方法:** 以总酚酸和绿原酸提取量为指标, 在单因素试验基础上, 通过正交试验考察提取时间、乙醇体积分数、固液比及提取温度对微波提取工艺的影响。采用 UV 测定总酚酸含量; HPLC 测定绿原酸含量, 流动相乙腈-0.4% 磷酸溶液 (13:87), 检测波长 327 nm。**结果:** 最佳微波提取工艺条件为 35% 乙醇, 提取时间 5 min, 固液比 1:23, 提取温度 75 °C; 总酚酸、绿原酸提取量分别为 (6.78 ± 0.19), (1.53 ± 0.09) mg·g⁻¹。**结论:** 优选的微波提取工艺具有效率高、能耗低等优点, 适用于工业化生产。

[关键词] 土木香; 微波提取工艺; 正交设计; 单因素试验; 总酚酸; 绿原酸

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0022-03

[doi] 10.11653/syfy2014040022

Optimization of Microwave-assisted Extraction Process for Total Phenolic Acids and Chlorogenic Acid from Inulae Radix

WANG Jin¹, ZHAO Yong-ming¹, JIA Ying-hua², XIE Jun-xia³, GUO Chun-yan^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2. Institute of Information Research, Zhejiang Jiuxu Pharmaceutical Co. Ltd, Jinhua 321016, China;

3. Hebei Chemical and Pharmaceutical College, Shijiazhuang 050026, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total phenolic acids and chlorogenic acid from Inulae Radix. **Method:** With extracting amounts of total phenolic acids and chlorogenic acid as indexes, based on single factor tests, orthogonal test was adopted to optimize microwave-assisted extraction technology by taking extraction time, ethanol concentration, solid-liquid ratio and extraction temperature as factors. The content of total phenolic acids was determined by UV; HPLC was adopted to determine the content of chlorogenic acid with mobile phase of acetonitrile-0.4% phosphoric acid (13:87) and detection wavelength at 327 nm. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: ethanol concentration of 35%; extracted 5 minutes with solid-liquid ratio of 1:23, extraction temperature at 75 °C; Under these conditions, extracting amounts of total phenolic acids and chlorogenic acid were (6.78 ± 0.19) and (1.53 ± 0.09) mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** Optimized microwave-assisted extraction process was effective with low energy consumption, which was suitable for industrial production.

[Key words] Inulae Radix; microwave-assisted extraction process; orthogonal design; total phenolic acids; chlorogenic acid

[收稿日期] 20130704(013)

[基金项目] 河北省中医药管理局项目(2010046);河北北方学院课题(Q2013029)

[第一作者] 王金, 硕士, 讲师, 从事中药新药开发研究, Tel:18931316090, E-mail:wangjinzym@163.com

[通讯作者] *郭春燕, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药药物分析及相关研究, Tel:0313-4029305, E-mail:guochy0311@163.com

土木香广泛分布于欧洲(中部、北部、南部)、亚洲(西部、中部)、苏联西伯利亚西部至蒙古北部和北美^[1],以根入药,具有健脾和胃、行气止痛、安胎之功效,常用于治疗脘腹胀痛、呕吐泻痢、岔气作痛、胎动不安^[2]。酚酸类化合物结构多样,广泛分布于药用植物中,具有清除自由基、抗炎、抗菌抗病毒和免疫调节等作用^[3-5]。目前尚无土木香总酚酸提取工艺的研究报导,本实验以土木香总酚酸及绿原酸提取量为考察指标,采用正交试验优选提取工艺,为土木香的开发研究和工业化生产提供参考。

1 材料

UV-2100型紫外-可见分光光度计(美国Labtech集团),MAS-I型微波提取仪(上海新仪微波化学科技有限公司),AB135-S型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器公司)。土木香(购自张家口市医药公司,经河北北方学院中医学院赵恒成教授鉴定为菊科植物土木香 *Inula helenium* L. 的干燥根,粉碎过4号筛备用),没食子酸、绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110831-201204,110753-200212),乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总酚酸的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品10 mg,置于25 mL量瓶中,加无水乙醇溶解并定容至刻度,精密量取该溶液1 mL,用无水乙醇稀释并定容至10 mL量瓶中,得 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.1.2 标准曲线的制备^[6-7] 精密量取对照品储备液0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 mL,分别置于25 mL量瓶中,依次加入无水乙醇、0.3%十二烷基硫酸钠溶液及0.6%三氯化铁-0.9%铁氰化钾(1:9),摇匀,暗处静置20 min,加盐酸溶液定容至刻度,暗处放置20 min,于720 nm处测定吸光度(A),同时做空白对照试验,以总酚酸质量浓度为横坐标,A为纵坐标,得回归方程 $A = 0.005C - 0.0223$ ($r = 0.9997$),表明总酚酸在 $0.16 \sim 1.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与A呈良好线性关系。

2.1.3 精密度试验 取同一对照品溶液,按2.1.2项下方法显色,连续测定5次,结果A的RSD 0.63%,表明仪器精密度良好。

2.1.4 稳定性试验 精密量取供试品溶液0.2 mL,按2.1.2项下方法显色,分别在0,20,40,60,80,100,120 min时测定A,结果RSD 1.63%,表

明供试品溶液显色后在2 h内稳定。

2.2 绿原酸的含量测定

2.2.1 色谱条件^[2] Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.4%磷酸溶液(13:87),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长327 nm,柱温30 °C,进样体积20 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品4.8 mg,置于25 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,得对照品贮备液。

2.2.3 标准曲线的制备 精密量取对照品储备液0.5,1.0,2.0,4.0,8.0 mL,分别置于50 mL量瓶中,加流动相定容,按2.2.1项下色谱条件测定,以治疗浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 37.628X + 15.276$ ($r = 0.9996$),线性范围 $1.92 \sim 30.72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.4 精密度试验 取 $3.84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的绿原酸对照品溶液连续进样5次,按2.2.1项下色谱条件测定,计算峰面积的RSD 0.69%,说明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性考察 取同一供试品溶液,分别在0,2,4,6,8 h按2.2.1项下色谱条件测定,结果峰面积的RSD 0.94%,表明供试品溶液在8 h内稳定性良好。

2.3 供试品溶液的制备 称取土木香粉末10 g置锥形瓶中,加入乙醇溶液100 mL,50 °C微波提取4 min,离心($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min,下同),取上清液,得土木香提取液。取土木香提取液0.2 mL置于25 mL量瓶中,得总酚酸含量测定的供试品溶液;精密量取土木香提取液,用流动相稀释10倍,得绿原酸含量的供试品溶液。

2.4 单因素试验考察

2.4.1 微波时间 精密称取土木香粉末5份,10 g,分别置于圆底烧瓶中,各加入50%乙醇溶液150 mL,分别于60 °C微波提取2,4,6,8,10 min,提取液离心,计算总酚酸和绿原酸含量。结果显示随着微波提取时间的延长,总酚酸和绿原酸提取量逐渐升高,于6 min时达最大值,之后提取量不再增大,甚至略有降低。

2.4.2 提取溶剂 精密称取土木香粉末4份,每份10 g,分别置于圆底烧瓶中,分别加入25%,50%,75%,100%的乙醇溶液150 mL提取,于60 °C微波提取6 min,提取液离心,计算总酚酸和绿原酸含量。结果表明当乙醇体积分数为25%时总酚酸和绿原酸提取量最高,含乙醇量过高或过低均不利于提取。

2.4.3 固液比 精密称取土木香粉末 5 份, 每份 10 g, 分别置于圆底烧瓶中, 分别按固液比 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30 加入 25% 乙醇溶液, 于 60 °C 微波提取 6 min, 结果发现总酚酸和绿原酸提取量随固液比增加而增加, 在固液比 1:20 时达最大值, 继续增加提取液, 总酚酸提取量几乎不变。

2.4.4 提取温度 精密称取土木香粉末 5 份, 每份 10 g, 分别置于圆底烧瓶中, 各加入 25% 乙醇溶液 200 mL, 分别于 40, 50, 60, 70, 80 °C 微波提取 6 min, 提取液离心, 计算总酚酸和绿原酸提取量。结果表明随着提取温度升高, 提取量先增加后减小, 当提取温度为 70 °C 时提取量最高。

2.5 正交试验优选 在单因素试验基础上, 选择提取时间、乙醇体积分数、固液比及提取温度为考察因素, 以总酚酸和绿原酸提取量为评价指标, 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 正交试验安排及结果见表 1。

表 1 土木香中总酚酸和绿原酸提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 提取 时间 /min	B 乙醇 体积分数 /%	C 固液比	D 提取 温度 /°C	土木香 总酚酸 /mg·g ⁻¹	绿原酸 /mg·g ⁻¹
1	5	15	1:17	65	5.48	1.06
2	5	25	1:20	70	4.58	0.92
3	5	35	1:23	75	7.19	1.35
4	6	15	1:20	75	5.65	1.12
5	6	25	1:23	65	5.01	0.97
6	6	35	1:17	70	4.87	0.92
7	7	15	1:23	70	5.49	1.07
8	7	25	1:17	75	4.68	0.87
9	7	35	1:20	65	5.02	1.12
总酚酸	K_1	5.75	5.54	5.01	5.17	
	K_2	5.18	4.76	5.08	4.98	
	K_3	5.06	5.69	5.90	5.84	
	R	0.69	0.93	0.89	0.86	
绿原酸	K_1	1.10	1.08	0.95	1.05	
	K_2	1.00	0.92	1.05	0.97	
	K_3	1.02	1.13	1.13	1.13	
	R	0.10	0.21	0.18	0.14	

由直观分析可知, 各因素对土木香总酚酸及绿原酸提取量的影响顺序均为乙醇体积分数 > 固液比 > 提取温度 > 提取时间, 确定最佳工艺为

$A_1B_3C_3D_3$, 即提取时间 5 min, 乙醇体积分数 35%, 固液比 1:23, 提取温度 75 °C。

2.6 验证试验 称取 3 份土木香粉末, 每份 15 g, 按优选的工艺条件提取, 结果总酚酸提取量分别为 6.84, 6.57, 6.94 mg·g⁻¹, 绿原酸提取量分别为 1.45, 1.51, 1.62 mg·g⁻¹, 表明该提取工艺条件合理稳定。

3 讨论

试验过程中发现, 介电常数大的提取溶剂能迅速吸收微波能量, 利于提取过程; 而根据“极性相似相溶”原理, 乙醇对酚酸类成分有较大的溶解度, 故选用乙醇-水作为酚酸类的提取溶媒。优化的提取工艺和文献相同, 能显著降低提取时间, 节约能耗, 适用于土木香酚酸类成分的提取^[8-10]。

[参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 75, 252.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 15.

[3] 彭宗根, 陈鸿珊. 紫草酸 B 的药理作用研究进展[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(10): 744.

[4] 倪学文, 杨志坚, 吴谋成. 银杏外种皮中银杏酚酸的分离和抑菌试验[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(6): 30.

[5] 欧仕益, 包惠燕, 蓝志东. 阿魏酸及其衍生物的药理作用研究进展[J]. 中药材, 2001, 24(3): 220.

[6] 李敏, 王胜春, 王晓鹃, 等. 五灵丸中丹参总酚性成分的含量测定[J]. 中成药, 1990, 12(1): 12.

[7] 王文祥, 周巧霞, 顾明, 等. 不同对照品对芍药胶囊总酚酸含量测定的影响[J]. 中成药, 2001, 23(7): 536.

[8] 赵永明, 张敬, 王哲, 等. 土木香根中土木香内酯和异土木香内酯的微波辅助提取工艺优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 30.

[9] 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.

[10] GUO C Y, WANG J, HOU Y, et al. Orthogonal test design for optimizing the extraction of total flavonoids from *Inula helenium* [J]. Pharmacogn Mag, 2013, 9(35): 192.

[责任编辑 仝燕]