

青天葵提取液脱色工艺研究

黄松, 吴月娜, 刘梅, 赖小平*
(广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的: 优选出青天葵提取液最佳脱色工艺。方法: 以青天葵中提取液的氨基酸损失率和脱色率为考察指标, 在对 pH、活性炭用量、脱色温度及脱色时间进行单因素考察的基础上, 采用正交试验设计对工艺参数进行优选, 并进行验证试验。结果: 最佳脱色工艺为 pH 3.0, 活性炭加入量为 $0.01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 脱色温度为 40°C , 脱色时间为 20 min。结论: 优选得到的提取工艺稳定、可行。

[关键词] 青天葵; 氨基酸; 脱色

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0051-04

Decoloration Technology of *Nervilia fordii* Extract

HUANG Song, WU Yue-na, LIU Mei, LAI Xiao-ping*
(Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the decolorization technology of the extract of *Nervilia fordii*. **Method:** The loss of free amino acids and decolorization of the extract of *N fordii* were used as index. On the base of single factor screening, the effects of the pH value, the amount of activated carbon, decolorizing temperature and decolorizing time were investigated. The uniform design was adopted for getting the optimal mixed technique parameters, and verified by experiment. **Result:** The pH value of extract solution was 3.0; the activated carbon added was $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; temperature was at 40°C , and decolorizing time lasted for 20 min. **Conclusion:** The optimized extraction process is stable and feasible.

[Key words] *Nervilia fordii*; amino acid; decoloration

青天葵为兰科植物毛唇芋兰 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. 的全草, 是广西特产药材, 也是我国传统出口中药^[1-2]。别名独叶莲、独脚莲、珍珠叶等。性寒味甘, 归心、肺、肝经。能润肺, 清热解毒, 散瘀止痛。主治肺癆咯血, 肺热咳嗽, 口腔炎, 咽喉肿痛, 瘰疬, 疮疡肿毒, 跌打损伤^[3-5]。

有文献报道, 青天葵中总氨基酸为解热、抗炎、镇痛、止咳平喘和提高免疫力等作用的有效部

位^[6-7]。因此, 对青天葵的氨基酸进行提取研究, 对进一步的药理药效研究具有重要的意义。实验发现, 用水提取青天葵氨基酸时, 常伴随有大量色素, 这些色素的存在, 影响氨基酸的进一步纯化, 使其在工业中的应用受到了限制。因此, 在制备氨基酸的过程中, 很有必要将色素除去。本试验研究了活性炭对青天葵提取液脱色效果的影响因素, 并找到了较为理想的工艺参数。

1 仪器与试药

青天葵药材经广州中医药大学新药开发与研究中心赖小平研究员鉴定为兰科植物毛唇芋兰青天葵 *N. fordii* 的全草, 干燥、粉碎, 过二号筛; 亮氨酸对照品购于中国药品生物制品检定所, 批号 140687-200401; 茚三酮(分析纯)购于天津大茂化学试剂厂; Sartorius BP110S 电子天平(德国); Sartorius CP225D

[收稿日期] 20100915(010)

[基金项目] 国家自然科学基金重点资助项目(u0732004)

[第一作者] 黄松, 副教授, 博士, 研究方向: 天然活性成分, 新药开发, Tel: 020-39358183, E-mail: hsl318@yahoo.com

[通讯作者] * 赖小平, 研究员, 博士, 研究方向: 中药新药开发及中医药现代化发展战略, Tel: 020-39355456

电子天平(德国); Thermo electron corporation 紫外分光光度计(英国); 高速中药粉碎机(浙江瑞安市永历制药机械有限公司); 乙醇(分析纯); 活性炭(分析纯)

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 亮氨酸对照溶液的制备 精密称取 25 mg 亮氨酸, 置 25 mL 量瓶中, 用适量水溶解, 并定容至刻度, 作为对照品储备液。精密吸取 5 mL 储备液至 50 mL 量瓶中, 用水定容至刻度, 作为工作液 ($0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$); 精密称取水合茛三酮 2 g 至 100 mL 量瓶中, 用少量 95% 乙醇溶解并定容至刻度, 得 2.0% 茛三酮溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取粉末 0.4 g, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加水煎煮 3 次, 第 1 次精密加入水 40 mL, 煎煮 1.0 h, 趁热过滤; 第 2 次精密加入水 20 mL, 煎煮 0.5 h, 趁热过滤; 第 3 次精密加入水 20 mL, 煎煮 0.5 h, 趁热过滤; 合并 3 次滤液, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 作为供试品溶液。

2.2 分析方法

2.2.1 检测波长的选择 取供试品溶液和对照品溶液适量, 在分光光度计上 400 ~800 nm 扫描, 得吸收光谱。

青天葵药材供试品溶液与亮氨酸对照品溶液反应体系显色后, 最大吸收波长都在 568 nm, 因此确定 568 nm 作为检测波长。

2.2.2 色素含量的测定及色素除去率的计算

从脱色前液体和脱色后液体中各取 1.00 mL, 定容至 5.00 mL, 用紫外分光光度计在色素的最大光吸收处(波长 268 nm)测定其光吸收值。

色素除去率 = (脱色前色素吸光度 - 脱色后色素吸光度) / 脱色前色素吸光度 $\times 100\%$

2.2.3 氨基酸含量的测定及氨基酸损失率的计算

将提取液稀释到一定浓度, 移取一定量至 25 mL 量瓶中, 加入 pH 5.0 的醋酸钠缓冲盐溶液 1.0 mL, 2.0% 茛三酮溶液 2.0 mL, 沸水浴加热 19 min, 取出, 在室温放冷 10 min, 用水定容至刻度, 在分光光度计上以相应试剂为空白, 于 568 nm 处测定吸光度。

氨基酸损失率 = (脱色前氨基酸量 - 脱色后氨基酸量) / 脱色前氨基酸量 $\times 100\%$

2.3 单因素试验 影响脱色效果的主要因素有脱色溶液 pH, 活性炭用量、脱色时间、脱色温度等。本试验研究了活性炭对青天葵提取液脱色效果的影响

因素, 并找到了较为理想的工艺参数(青天葵水提取液总游离氨基酸含量为 $84.70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 色素吸光度: 0.540)。

2.3.1 不同 pH 的影响 在 80 °C 水浴条件下, 精密移取青天葵水提取液 10.00 mL, 加入活性炭 0.1 g, 在不同 pH 条件下加热 30 min, 结果见图 1。

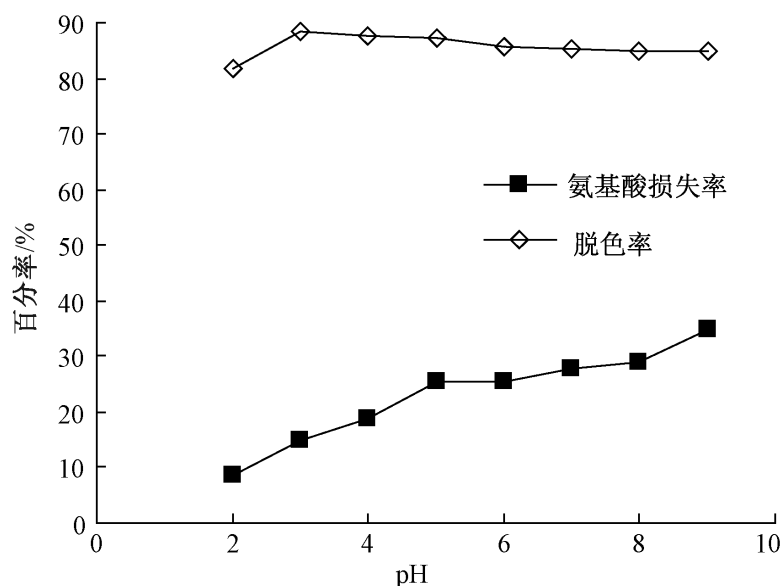


图 1 不同 pH 条件对青天葵提取液的影响

由图 1 可看出, pH 对氨基酸的影响, 在 pH 为 2.0 ~4.0, 氨基酸损失率较小, 当溶液 pH 接近中性及碱性时, 氨基酸损失率较大, 这可能是由于各种氨基酸的等电点造成的; pH 对脱色率的影响, 在 pH 3.0 时, 脱色效果最为理想, 当溶液 pH 接近中性尤其是偏碱性或酸性很强时, 活性炭脱色能力明显下降。利用活性炭在不同 pH 下吸附能力的差异, 还可以实现活性炭的再生回收, 从而实现活性炭的多次使用的目的。

2.3.2 活性炭用量的影响 精密移取青天葵水提取液 10.00 mL, 调 pH 为 3.0, 然后分别加入不同量的活性炭, 在 80 °C 水浴条件下加热 30 min, 结果见图 2。

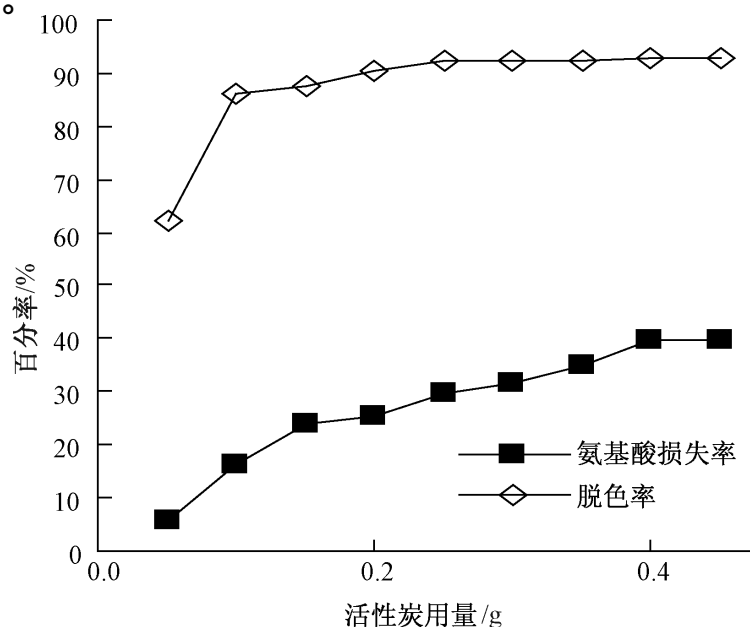


图 2 不同活性炭加入量对青天葵提取液的影响

由图2可看出,活性炭脱色效果随着其用量的增加而增强,活性炭用量为0.05 g时,溶液仍然是呈浅黄色,活性炭用量达到0.1 g后,脱色效果明显,溶液透明,基本无色,继续加入活性炭,溶液呈完全无色透明,但同时,氨基酸的损失率也明显增加,因此,活性炭的合理用量可确定在0.1 g/10 mL左右。

2.3.3 不同脱色时间的影响 精密移取青天葵水提取液10.00 mL,加入活性炭0.1 g,在80 ℃水浴条件下加热不同时间,结果见图3。

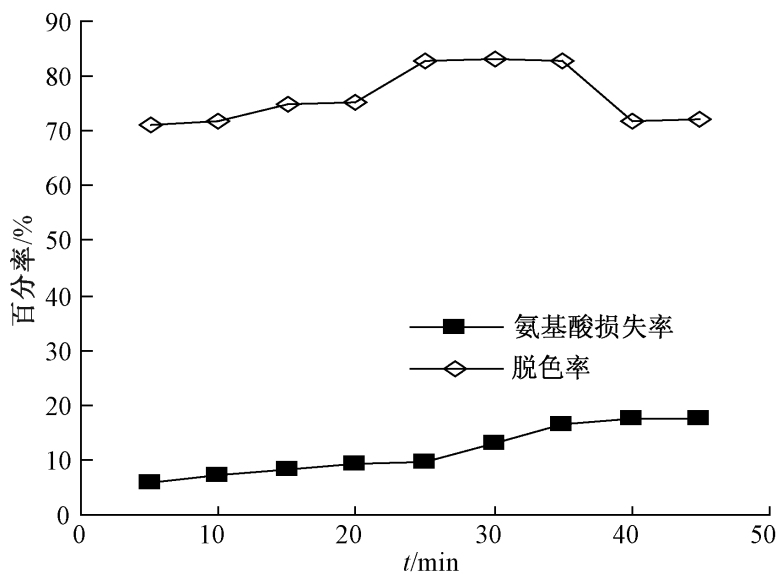


图3 不同加热时间对青天葵提取液的影响

活性炭对氨基酸的吸附和对色素的吸附有着动力学过程,在不同的脱色时间内它们的吸附和解吸附存在平衡。由图3可看出,在25 min之内,脱色效果随着时间的增大而增强,在此时间内色素处于吸附过程,在25~35 min内,色素吸附与解吸处于平衡状态,35 min后脱色率下降,而氨基酸的损失率则随着时间的增加而增大,30 min后活性炭胶色效果没有明显增加,综合考虑氨基酸损失率和脱色率两个参数,脱色时间可选在25~35 min。

2.3.4 不同脱色温度的影响 精密移取青天葵水提取液10.00 mL,加入活性炭0.1 g,在不同温度下加热30 min,结果见图4。

由图4可看出,脱色率随着脱色温度的升高而降低,在70 ℃以上,脱色效果明显下降,而氨基酸的损失率则随着温度的升高而增大,因此,脱色温度最好控制在40~50 ℃。

2.4 正交试验 单因素试验结果表明,影响脱色效果的主要因素有:脱色 pH,活性炭用量,脱色温度及脱色时间。根据单因素试验结果,选择脱色 pH,活性炭用量,脱色时间,脱色温度4项作为考察因素,各取3个水平,进行正交试验设计设定水平和因素,

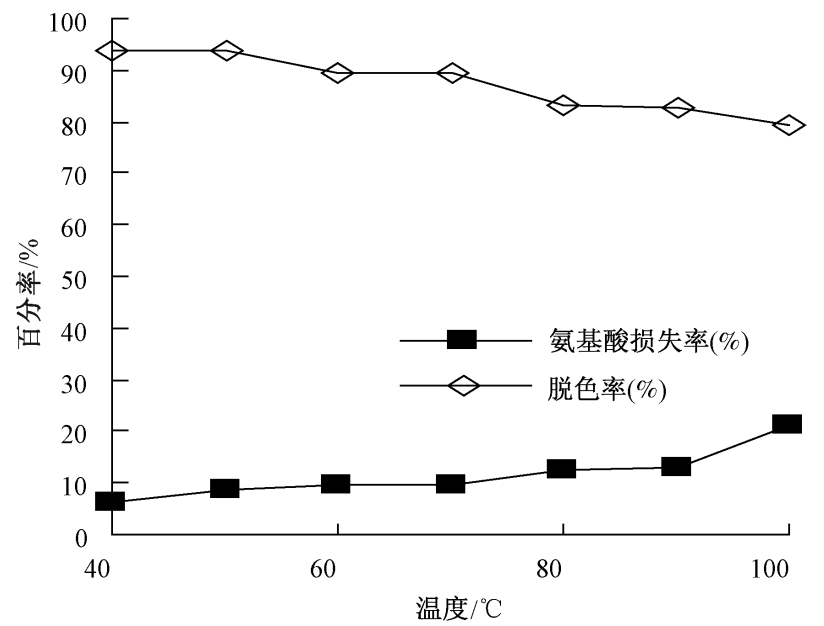


图4 不同脱色温度对青天葵提取液的影响

其因素和水平见表1~4。

表1 正交试验因素水平表

因素水平	A pH	B 活性炭 加入量 / g	C 脱色 时间 / min	D 脱色 温度 /
1	2	0.05	20	40
2	3	0.1	30	50
3	4	0.15	40	60

表2 青天葵脱色正交试验结果

Nb.	A	B/g	C/min	D/	氨基酸损 失率/%	色素除去 率/%
1	1	1	1	1	4.65	79.29
2	1	2	2	2	7.01	81.30
3	1	3	3	3	5.96	76.08
4	2	1	2	3	10.89	90.37
5	2	2	3	1	15.78	91.27
6	2	3	1	2	12.98	95.49
7	3	1	3	2	20.01	82.81
8	3	2	1	3	22.03	95.37
9	3	3	2	1	23.02	92.69
损	K_1	5.873	11.850	13.220	14.483	
失	K_2	13.217	14.940	13.640	13.333	
率	K_3	21.687	13.987	13.917	12.960	
	R	15.813	3.090	0.697	1.523	
脱	K_1	78.890	84.157	90.050	87.750	
色	K_2	92.377	89.313	88.120	86.533	
率	K_3	90.290	88.087	83.387	87.273	
	R	13.487	5.157	6.663	1.217	

以青天葵氨基酸损失率为考察指标,由表2中极差R值的大小可看出,各因素对青天葵水提取液的氨基酸损失率影响的大小顺序为A > B > D > C;

表 3 氨基酸损失率方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P
A	375.727	2	187.864	509.115	<0.01
B	15.022	2	7.511	20.355	<0.05
C	0.738	2	0.369	1.000	
D	3.782	2	1.891	5.125	
误差	0.738	2	0.369		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$, 表 4 同。

表 4 脱色率方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P
A	316.204	2	158.102	140.224	<0.01
B	43.541	2	21.771	19.309	<0.05
C	70.529	2	35.265	31.277	<0.05
D	2.255	2	1.128	1.000	
误差	2.255	2	1.128		

对脱色率影响的大小顺序为 $A > C > B > D$ 。由表 3 可看出, A 因素对氨基酸损失率的影响有极显著意义, 以 A_1 为最佳, B 因素的影响有显著意义, 以 B_1 为最佳, 而 C 和 D 因素对氨基酸损失率的影响无显著意义; 由表 4 可看出, A 因素对脱色率的影响有极显著意义, 以 A_2 为最佳, B 因素和 C 因素的影响有显著意义, 以 $B_2 C_1$ 为最佳, 而 D 因素对脱色率的影响无显著意义。综合考虑氨基酸损失率及脱色率, 选择 $A_2 B_2 C_1 D_1$ 为最佳脱色工艺, 即在 pH 3.0 的条件下, 活性炭用量为 0.1 g/10 mL, 在 40 水浴下脱色 20 min。

2.5 验证试验 精密移取 5 份青天葵水提取液 10.00 mL, 调 pH 3.0, 加入活性炭 0.1 g, 在 40 水浴下脱色 20 min, 结果见表 5。

表 5 最佳工艺重复试验结果(n=5)

No.	氨基酸损失率	脱色率
1	6.67	98.56
2	6.82	97.98
3	6.86	98.32
4	6.39	98.00
5	6.60	97.89

3 讨论

本实验所用到的茚三酮比色法测定氨基酸含量, 是实验中常用的方法, 所用的茚三酮溶液都需现配现用, 才能保证结果的稳定性及准确性。实验中还可以利用活性炭在不同 pH 下吸附能力的差异, 实现活性炭的再生回收, 从而实现活性炭的多次使用的目的。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 科学技术出版社, 1975: 1231.
- [2] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药志[M]. 南宁: 广西壮族自治区人民出版社, 1959: 328.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 8 册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 740.
- [4] 蔡永敏. 中药药名辞典[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1996: 183.
- [5] 《广东中药志》编辑委员会. 广东中药志. 第 2 卷[M]. 广州: 广东科技出版社, 1996: 120.
- [6] 谢友良. 南药青天葵的抗急性肺损伤作用机理及其质量标准研究[D]. 广州: 广州中医药大学新药开发与研究中心, 2008.
- [7] 甄汉深, 周燕园, 袁叶飞, 等. 青天葵中黄酮类化合物的体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3): 36.

[责任编辑 顾雪竹]