

灵香草中多酚提取工艺优化研究^①

孙科¹, 李德慧², 孙伶俐², 彭冰³, 李容¹, 陈冉^{1②}

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: 1571474488@qq.com;

2. 右江民族医学院临床医学院 2014 级临床医学本科, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院检验学院 2013 级卫生检验与检疫本科, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 通过纤维素酶辅助—微波提取法, 首次对灵香草中多酚的提取工艺条件进行探讨。**方法** 采用单因素试验和正交试验法, 以灵香草中多酚得率为指标, 分别考察了酶用量、酶解时间、溶剂体积分数、料液比、提取时间、微波功率等因素对提取工艺的影响。**结果** 最佳工艺条件是: 酶用量 0.8%, 酶解时间 1.5 h, 乙醇体积分数 70%, 料液比 1:20, 提取时间 10 min, 提取温度 70 ℃, 微波功率 400 W。**结论** 本方法操作简单, 节能环保, 多酚的提取效果良好, 为该药材的质量控制和进一步开发研究提供参考依据。

关键词: 灵香草; 微波提取法; 纤维素酶; 多酚; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2016)03-0245-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.03.002

Process optimization for extraction of polyphenol from *Lysimachia foenum—graecum* Hance

Sun Ke¹, Li Dehui², Sun Liming², Peng Bing³, Li Rong¹, Chen Ran¹

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China

E-mail: 1571474488@qq.com;

2. Grade 2014, College of Clinical Medicine Science, Youjiang Medical University for Nationalities,

Baise 533000, Guangxi, China; 3. Grade 2013, College of Medical Laboratory Science,

Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** A cellulase—assisted microwave extraction method was used to research the extraction process conditions for extracting polyphenol from *Lysimachia foenum graecum* Hance for the first time.

Methods The single factor test and orthogonal test were performed in this paper. The yield of polyphenol from *Lysimachia foenum graecum* Hance was used as index for observing the effects of the factors such as the amount of cellulase, enzymatic hydrolysis time, solvent volume fraction, solid—liquid ratio, extraction time, microwave power and other factors on the extraction process.

Results The optimal conditions for extracting polyphenol: the amount of cellulase was 0.8%, enzymatic hydrolysis time 1.5 h, ethanol volume fraction 70%, solid—liquid ratio 1:20, extraction time 10 min, extraction temperature 70 ℃, the microwave power 400 W.

Conclusion This method was simple, energy saving and environment protection. The results of extracting polyphenol are good, providing a reference for quality control and further development of *Lysimachia foenum graecum* Hance.

Key words: *Lysimachia foenum—graecum* Hance; microwave extraction method; cellulase; polyphenol; orthogonal test

① 基金项目: 右江民族医学院 2014 年自然科学类科研课题(右医科字[2014]2 号), 广西自然科学基金资助项目(2015GXNSFBA139163), 广西高校科学技术研究资助项目(KY2015YB226)

② 通讯作者, E-mail: 2556720280@qq.com

灵香草(*Lysimachia foenum-graecum* Hance)为报春花科珍珠菜属植物,主产于广西、云南等地^[1]。全草入药,味辛、甘,性平,无毒,归肺、胃经,具有解表、行气、祛风寒、止痛、驱蛔等功效^[2]。灵香草富含多种活性物质,如黄酮类、三萜类、多酚类、多糖类等^[3-4]。天然的酚类化合物不仅具有较强的抗氧化能力,还具有很好的抗菌消炎、增加免疫力、改善心血管、降血脂、保护肝脏、抗癌等作用^[5-8],灵香草的抗氧化能力与其多酚的含量密切相关^[9]。但目前未见有关于优化灵香草中多酚提取工艺研究的文献报道。微波辅助提取法作为一种新型高效的萃取技术,具有高选择性、低耗能、高效率、低污染等优势,已被广泛用于天然产物有效成分的提取^[10]。酶法辅助提取是低能耗而经济的技术,近年来在中草药提取中逐渐得到应用^[11-12]。为此,本研究研究纤维素酶解预处理后微波提取灵香草总酚的工艺条件,探索高效节能的提取技术。

1 材料与方法

1.1 原料 灵香草(购于广西金秀香料香精有限责任公司),用清水洗净后阴干,均匀摊开后放入 70 ℃ 的烘箱中烘烤 4 h。取出后将烘干的灵香草放入中药高速粉碎机中粉碎,粉碎后过 20 目筛备用。

1.2 实验仪器与试剂 XH-100A 微波催化萃取仪(北京祥鹄科技发展有限公司),Cary 60 紫外可见分光光度计(安捷伦),HH-ZK600 智能恒温水浴锅(巩义市英峪高科仪器厂),KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),FA2004N 型电子分析天平(上海民析精密科学仪器公司),101-3 型电热鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器公司),FW177 型中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)。没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所);纤维素酶(C8270,北京索莱宝科技有限公司);福林酚试剂,碳酸钠,醋酸,醋酸钠,无水乙醇均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

1.3 标准曲线绘制 精密称取焦性没食子酸对照品 10.0 mg,用甲醇定容到 100 ml 的容量瓶中,得到浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 的焦性没食子酸标准储备液。分别移取 0 ml、0.1 ml、0.2 ml、0.4 ml、0.6 ml、0.8 ml 没食子酸标准储备液于 10 ml 容量瓶中,各加 5.0 ml 10% 福林酚试剂混合摇匀后反应 5 min,再加入 4.0 ml 7.5% 碳酸钠溶液,用蒸馏水定容,摇匀,常温静置 60 min。以标准液加入量为 0 ml 的溶液为参比,在 766 nm 处测定吸光度,以没食子酸浓度($\mu\text{g/ml}$)为横坐标,以吸光度为纵坐标,得到回归方程为: $y = 0.0524x - 0.0274$ ($r = 0.9994$),没食子酸在 1.0~8.0 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内有良好的线性关系。

1.4 灵香草多酚的提取测定 称取一定量的灵香草

粉末,加入 4 倍量 pH=4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液和一定量纤维素酶,充分搅拌后在 50 ℃ 恒温水浴下保温一定时间,100 ℃ 水浴灭活 2 min,移入圆底烧瓶中,加乙醇溶剂,摇匀。放入微波萃取装置中,在一定功率和 70 ℃ 温度下提取,过滤,用旋转蒸发仪浓缩,最后将滤液定容至 50 ml 的容量瓶中,待测。将提取液用乙醇稀释 25 倍,取 1 ml 按照上述“1.3”方法测定其吸光度,然后由回归方程计算多酚的含量。

灵香草中多酚得率 = 提取液中多酚的质量 / 原料质量 $\times 100\%$

1.5 灵香草提取液底物干扰试验 取“1.4”项下提取液,用蒸馏水稀释到 10 ml 容量瓶中。利用紫外分光光度计在 370~800 nm 波长范围内扫描,得到光谱吸收图,见图 1。由图 1 可知,在 700~800 nm 无吸收峰,且基线吸收接近 0。本实验选择在 766 nm 波长下测样品提取液中多酚的含量,因此样品提取液固有颜色对多酚的测定几乎没有干扰。

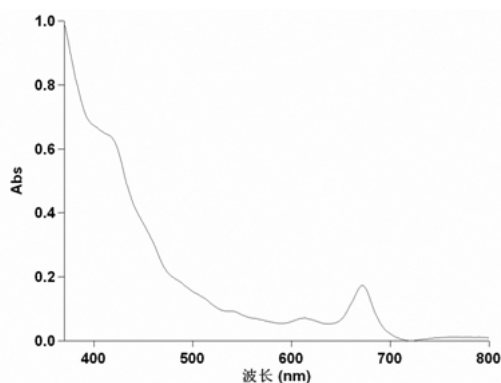


图 1 灵香草提取液的紫外吸收光谱图

1.6 单因素试验 以酶用量、酶解时间、乙醇浓度、料液比、提取时间、微波功率作为影响灵香草多酚得率的单因素,分别对灵香草多酚提取工艺进行考察,最后根据各单因素试验结果确定正交试验。

1.6.1 酶用量的影响 分别称取 10 g 灵香草粉末,加入 4 倍量的醋酸-醋酸钠缓冲液,各加入 0.1%、0.4%、0.8%、1.2%、1.6% 的纤维素酶,充分搅拌后,在 50 ℃ 恒温水浴下保温 1 h,取出后放入 100 ℃ 水浴灭活 2 min,按料液比 1:15(g/ml),加入 50% 的乙醇溶液,在 300 W 和 70 ℃ 微波条件下提取 10 min,抽滤,定容后检测计算多酚提取率。

1.6.2 酶解时间的影响 使用 0.8% 的纤维素酶,在其他条件一致的情况下,分别考察了 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h 的酶解时间对多酚得率的影响。

1.6.3 乙醇体积分数的影响 在其他条件一致的情况下,按料液比 1:15(g/ml) 分别加入 40%、50%、

60%、70%、80%的乙醇溶液,在 300 W 和 70 ℃微波条件下提取 10 min,抽滤,浓缩,定容检测。

1.6.4 料液比的影响 以 60%的乙醇溶液为提取溶剂,按不同料液比 1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30 (g/ml)加入,在 300 W、70 ℃微波条件下提取 10 min,抽滤,浓缩,定容检测。

1.6.5 提取时间的影响 选择料液比为 1 : 20 (g/ml),60%的乙醇溶液为提取溶剂,在 300 W、70 ℃微波条件下,考察了提取时间分别为 4 min、6 min、8 min、10 min、12 min、14 min 时灵香草中多酚的提取效果。

1.6.6 微波功率的影响 选择料液比为 1 : 20 (g/ml),60%的乙醇溶液为提取溶剂,当提取时间为 10 min,提取温度 70 ℃时,考察了提取功率分别为 200 W、300 W、400 W、500 W、600 W、700W 时灵香草中多酚的提取效果。

1.7 正交试验 通过正交试验对结果进行极差分析以确定最佳提取条件。本试验采用 $L_9(3^4)$ 正交表,选择酶用量、酶解时间、乙醇浓度、料液比等 4 个对多酚提取率影响较大的因素做正交试验,选取 3 个水平,试验因素与水平见表 1。

表 1 正交试验因素与水平

水平	A 酶用量 (%)	B 酶解时间 (h)	C 乙醇体积 分数(%)	D 料液比 (g/ml)
1	0.40	1.00	50	1 : 15
2	0.80	1.50	60	1 : 20
3	1.20	2.00	70	1 : 25

1.8 统计学方法 采用 SPSS 11.0 统计软件进行数据分析,采用正交设计资料的单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单因素试验

2.1.1 酶用量的选择 随着酶用量的增加,多酚的提取率呈现先上升后下降的趋势(见图 2),当加入 0.8%的纤维素酶时多酚提取率最高。这是由于在一定浓度范围内,酶活性与酶浓度成正比,在低浓度时,随着酶浓度增加酶活性也在不断增加,但当酶过量后,酶活性反而会降低,酶促反应速率下降。因此,选用 0.8%的纤维素酶为最佳酶用量。

2.1.2 酶解时间的选择 当酶解时间为 1.5 h 时多酚提取率较高,继续增加提取时间多酚得率变化微小,说明酶解时间为 1.5 h 时灵香草的细胞壁已有效破解,多酚已最大程度溶解到乙醇溶剂中(见图 3)。因此酶解时间选择 1.5 h。

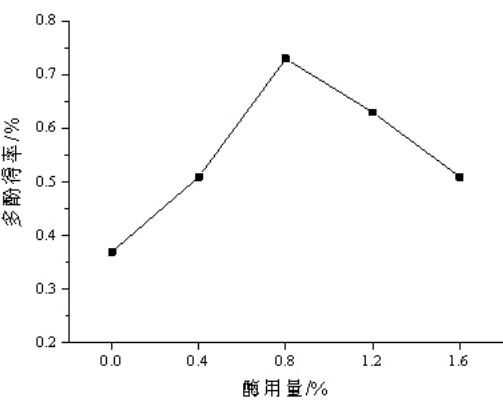


图 2 酶用量对多酚得率的影响

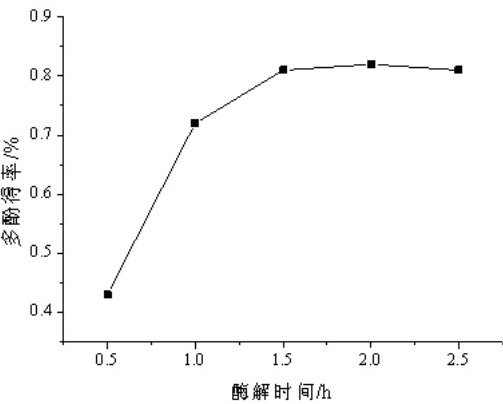


图 3 酶解时间对多酚得率的影响

2.1.3 乙醇体积分数的选择 随着乙醇的体积增加,多酚的提取率呈现先上升后下降的趋势,当乙醇的体积为 60%时,多酚的提取率最高(见图 4)。这是因为当乙醇的浓度较低时,不能破坏多酚与别的有机物质之间的氢键和疏水作用;乙醇浓度太高时,灵香草中醇溶型物质溶出量增加,由于竞争作用,使多酚的浸出过程受阻,且较多的杂质会干扰测定。因此选用 60%的乙醇为提取溶液。

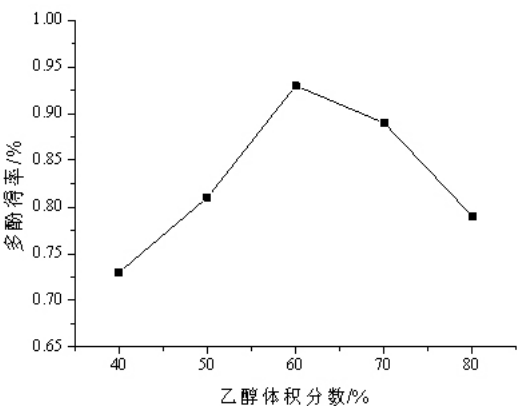


图 4 乙醇体积分数对多酚得率的影响

2.1.4 料液比的选择 随料液比增加,多酚得率也随之增高,当料液比超过 1 : 20 时多酚得率无明显变化(见图 5),且增加溶剂用量会使提取杂质增多,还会浪费溶剂,提取溶剂太少,溶液易达到饱和,有效成分无法提取完全,因此本试验采用料液比为 1 : 20。

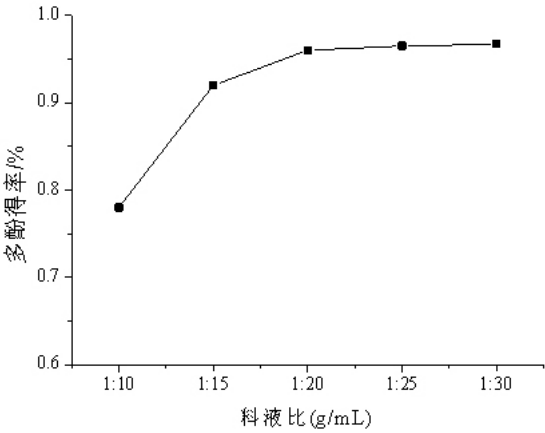


图 5 料液比对多酚得率的影响

2.1.5 提取时间的选择 在提取时间从 2~10 min 提取出的多酚得率有所增加,随着时间继续增加,多酚提取量变化不大(见图 6),表明 10 min 时间已经可以提取完全,故后续实验的提取时间定为 10 min。

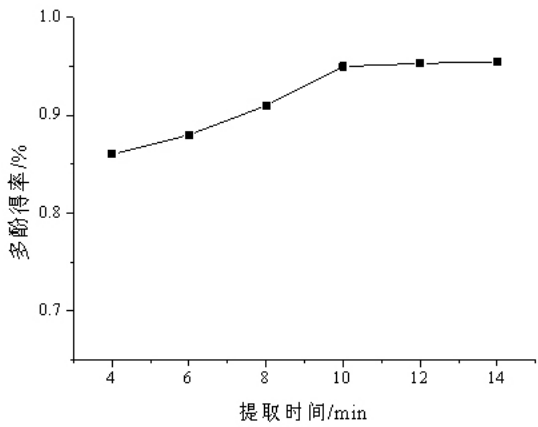


图 6 提取时间对多酚得率的影响

2.1.6 微波功率的选择 微波功率在 200~400 W 时多酚得率不断增高,超过 400 W 后反而降低(见图 7),这是由于微波功率增加,细胞壁受到电磁波作用更增强,细胞壁破碎程度增大,多酚的溶出量增大。但当功率增大到一定程度时,会破坏多酚分子内结构,导致多酚含量降低。故选择微波功率为 400 W。

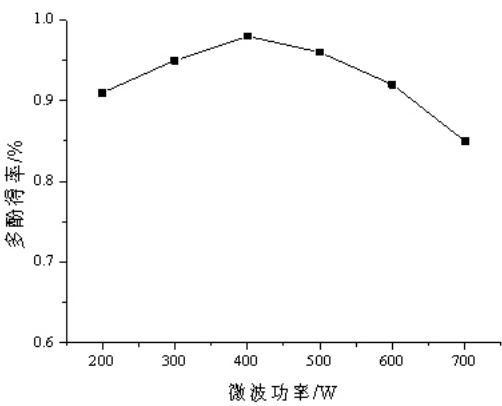


图 7 微波功率对多酚得率的影响

2.2 正交试验 参考单因素试验的结果,选取酶用量、酶解时间、乙醇浓度、料液比 4 个因素,按照 $L_9(3^4)$ 正交表安排进行试验设计,结果见表 2,方差分析结果见表 3。由表 2 和表 3 可知,4 个所考察的因素对多酚得率都有显著影响,主次顺序为 $A>B>C>D$,纤维素酶辅助—微波法提取灵香草中多酚的最佳工艺条件是 $A_2B_2C_3D_2$,即纤维素酶用量 0.8%、酶解时间 1.5 h、乙醇浓度 70%、料液比 1 : 20(g/ml)。在最优工艺条件下进行 3 次平行试验,得率分别为 0.96%、1.07%、1.03%,平均得率为 1.02%,数据稳定,结果可靠。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果与极差分析

试验号	A	B	C	D	得率(%)
1	1	1	1	1	0.52
2	1	2	2	2	0.81
3	1	3	3	3	0.72
4	2	1	2	3	0.90
5	2	2	3	1	1.03
6	2	3	1	2	0.89
7	3	1	3	2	0.85
8	3	2	1	3	0.84
9	3	3	2	1	0.78
K_1	2.05	2.27	2.25	2.33	
K_2	2.82	2.68	2.49	2.55	
K_3	2.57	2.39	2.60	2.46	
R	0.77	0.41	0.35	0.22	

表 3 方差分析结果

方差来源	离差平方和(SS)	自由度	F	P
A	0.299	2	202.16	<0.05
B	0.09	2	60.785	<0.05
C	0.062	2	40.095	<0.05
D	0.027	2	18.5	<0.05

3 讨论

酶解法是新型高效的绿色提取技术,纤维素酶是中药材提取中应用最广泛的酶,在 pH 4.0~6.0 和 40~60 ℃ 的环境下活性稳定性较好。因此选择在 pH=4.5 醋酸—醋酸钠缓冲液和 50 ℃ 恒温水浴条件下酶解灵香草^[13]。用纤维素酶处理灵香草药材,能够降解植物细胞壁及细胞间质中的纤维素等物质,破坏细胞壁的致密结构,从而促进有效成分多酚的提取,降低能耗。适当增加酶的浓度,可以改善降解的效果,提高多酚的提取率,然而酶浓度过高反而会降低酶的活性,不利于后续的提取。这是因为酶是在一定的浓度范围内才具有较好的活性^[13]。

在做料液比的选择时,虽然增加料液比能增加提取试剂与样品的接触面积,避免因提取液的饱和造成样品中多酚的浸出过程受阻,但料液比过大时,其他物质也容易浸出,不能改善提取效果,反而浪费试剂。

提高微波功率能促进多酚的浸出,加快多酚在样品和提取剂中的平衡速率,但微波功率太高反而会促进其他物质与多酚发生氧化作用,并且易破坏多酚的结构,从而降低多酚的提取率。

本文通过纤维素酶辅助—微波提取法,首次对灵香草中多酚的提取工艺条件进行探讨,实验证明,使用纤维素酶辅助提取,对灵香草中多酚的提取具有良好的效果,与单一的微波法相比,提取率提高 30% 左右,与文献中的浸提法相比^[9],不仅大大缩短提取时间,提取效果也有很大改善。经过单因素实验探索,由正交实验得知酶用量对多酚的得率影响最大,其次是酶解时间、乙醇体积分数,最后是料液比,最终确定最佳工艺条件是:酶用量 0.8%,酶解时间 1.5 h,乙醇浓度 70%,料液比 1:20,提取时间 10 min,提取温度 70 ℃,超声波功率 400 W。本方法操作简单,节能环保,多酚的提取效果良好,对灵香草的进一步开发利用提供了理论依据。

参考文献:

[1] 龚复俊,王有为.广西灵香草挥发油化学成分[J].植物资源与环境学报,2004,13(3):59—61.

- [2] 江苏新医学院.中药大辞典(下册)[M].上海:上海科学技术出版社,1986:2470—2472.
- [3] 胡展育,詹云静.灵香草的研究进展[J].安徽农业科学,2012,40(29):14240—14241.
- [4] 黄琼,田玉红,李志华.不同方法提取灵香草挥发油的比较研究[J].湖北农业科学,2010,49(4):944—946.
- [5] Daniel Granato, Flávia Chizuko, Inar Alves, et al. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality[J]. Food Chemistry, 2011, 129(2): 366—373.
- [6] Samia Oueslatia, Najla Trabelsi, Mondher Boulaaba, et al. Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal Suaeda species and related phenolic compounds [J]. Industrial Crops and Products, 2012, 36(1): 513—518.
- [7] 潘廷敏,文全泰,肖林彬,等.正交设计优化金樱子多糖的超声提取工艺[J].右江民族医学院学报,2012,34(4): 465—467.
- [8] 苏妹芬,罗宝芳,黄祉健,等.正交试验优选芒果叶多酚的微波提取工艺[J].右江民族医学院学报,2013,35(6): 790—792.
- [9] Hai-yun Li, Zai-bin Hao, Xiu-li Wang, et al. Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(2): 970—974.
- [10] 孙婷,姚佳,肖娅萍.七叶鬼灯檠总酚微波辅助提取工艺优化及其 DPPH 自由基清除能力分析[J].中成药, 2014, 36(2): 409—412.
- [11] 李亚辉,马艳弘,黄开红,等.芦荟多糖的超声波辅助纤维素酶提取及抗肿瘤活性研究[J].中国食品学报, 2015, 15(11): 91—97.
- [12] 张迪,刘洋,李书艺.响应面法优化复合酶法提取青蛇果多酚工艺及其抗氧化活性[J].食品科学, 2016, 37(4): 51—57.
- [13] 黄燕华,冯定远.ONS 法测定纤维素酶活性的适宜底物浓度、滤纸量、酶浓度和缓冲液用量的研究[C].中国畜牧兽医学会动物营养学分会——第九届学术研讨会.中国重庆,2004.

收稿日期:2016—04—18;修回日期:2016—06—23