

超声辅助提取青钱柳叶总三萜化合物研究

尹忠平^{1,2}, 上官新晨^{1,2*}, 黎冬明², 吴少福², 陈继光², 张月红²

(1. 南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2. 江西农业大学 植物资源开发与利用研究室, 江西 南昌 330045)

摘要:以青钱柳叶为原料,以乙醇为溶剂,超声辅助提取总三萜化合物。对提取液乙醇体积分数、料液比和提取时间 3 个主要因素进行单因素和正交优化实验,并对提取级数和正丁醇萃取次数进行探索。结果表明:体积分数为 65%乙醇提取液、1:12 料液比、30 min 提取时间为优化参数,优化条件下得率为 9.19%;乙醇溶液 2 级提取和正丁醇 2 次等体积萃取,总三萜化合物提取较为完全。

关键词:青钱柳;总三萜;超声辅助提取

中图分类号: Q949.735; O657.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2286(2010)02-0373-05

A Study on Ultrasonic-assisted Extraction of Total Triterpenoids from *Cyclocarya paliurus* Leaves

YIN Zhong-ping^{1,2}, SHANGGUAN Xin-chen^{1,2*}, LI Dong-ming²,
WU Shao-fu², CHEN Ji-guang², ZHANG Yue-hong²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Laboratory of Plant Resources Exploitation & Utilization, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: Three major factors such as extraction solution concentration of alcohol, ratio of material and extraction solution and extraction time in the ultrasonic-assisted extraction of total triterpenoids from *Cyclocarya paliurus* leaves were studied by single factor experiments and orthogonal experiment, and series experiments of extraction and extraction times of BuOH were also studied. The results indicated that 65% of alcohol solution, 1:12 between material and extraction solution and 30 minutes for extraction were optimal parameters, and the output of total triterpenoids extracted under the optimal parameters was 9.19%. Two times extraction from material and two times extraction by BuOH were reasonable.

Key words: *Cyclocarya paliurus*; total triterpenoids; ultrasonic-assisted extraction

青钱柳 [*Cyclocarya Paliurus* (Batal) Iljin sk] 为我国特有的胡桃科青钱柳属单种属珍稀植物,主要分布于我国长江中下游地区,是江西省的特色资源,民间将其叶制成降糖降脂保健茶饮用已有 200 多年历史,江西修水青钱柳降糖神茶系列产品还取得中国原产地标记保护,已受世界知识产权保护。研究表明,青钱柳富含三萜类、黄酮类、多糖类及微量元素等功能活性成分,具有降糖、降脂、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老及提高免疫力等多种功能,是非常好的天然保健食品资源^[1-7]。三萜化合物是青钱柳中一类重

收稿日期: 2010-03-03 修回日期: 2010-03-16

基金项目: 江西省自然科学基金项目 (2007GZN0214) 和江西省科技支撑计划项目 (2009BSB09100)

作者简介: 尹忠平 (1971-), 男, 博士生, 讲师, 主要从事食品化学与营养研究, E-mail: yinzp2008@yahoo.com.cn; *

通讯作者: 上官新晨, 教授, 博导, 主要从事植物资源开发与利用研究, E-mail: shangguanxc_818@sina.com.

要的活性物质,具有降糖、降压等功能活性^[8],目前关于此类物质的研究报道较少,本文对青钱柳总三萜化合物的提取进行探讨,旨在为青钱柳资源的深度开发利用提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

青钱柳叶采自江西省修水县,去除杂质和枝杆后,常压干燥,粉碎过 60 目筛备用。所用化学试剂均为分析纯;人参皂甙 Rb₁ 标准品(中国药品生物制品检定所)。

1.2 主要仪器设备

UV - 754 紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);HF - 2 5B 超声循环提取机(北京弘祥隆生物技术开发有限公司);RE - 52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);QT - 1 旋涡混合器(上海琪特分析仪器系统有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 总三萜化合物检测方法 参照徐睿庸^[9]、洪艳平等^[10]的方法。检测标准曲线的绘制如下:精确吸取对照品人参皂甙 Rb₁ 溶液(62 μg/mL)0.25,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0 mL,分别加入具塞试管,水浴挥干。分别加入 50 g/L 香草醛——冰乙酸和高氯酸各 0.3 mL 和 0.6 mL,混匀,80 ℃ 水浴 10 min,迅速冷却后加入 3 mL 冰乙酸,于 550 nm 波长测定吸光度。标准曲线如图 1 所示。

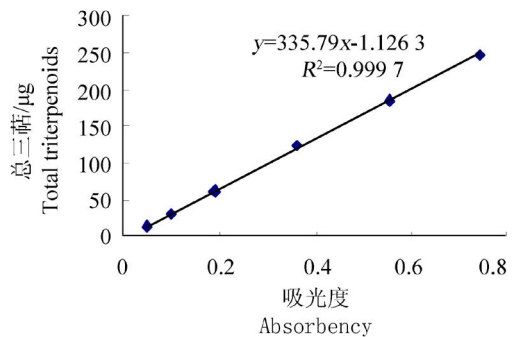


图 1 总三萜化合物测定标准曲线

Fig 1 Standard curve for determination of total triterpenoids

1.3.2 总三萜化合物提取及测定流程 青钱柳叶干粉(60 ℃ 干燥至恒重) 体积分数为 65%乙醇超声提取 离心(3 000 r/min、10 min) 合并各级提取液 真空浓缩挥干乙醇(60 ℃) 定容 石油醚脱脂(等体积萃取脱脂 2 次) 饱和正丁醇萃取(等体积萃取) 定容 取样检测。

1.3.3 提取单因素实验 通过单因素实验考察超声辅助提取时提取液的乙醇体积分数、料液比和提取时间 3 个因素对总三萜化合物提取率的影响,以确定各参数范围,为优化工艺参数提供依据。各单因素实验设计如下:提取液乙醇体积分数设 0%、25%、50%、75%、95% 共 5 个梯度;料液比设 1:8、1:12、1:16、1:20 共 4 个梯度;提取时间设 15、30、45、60、75 min 共 5 个梯度。各单因素实验中,超声提取温度为 60 ℃,提取级数为 2 级,正丁醇萃取次数为 2 次。

1.3.4 提取工艺参数优化 采用 L₉(3⁴) 正交表进行优化设计,在单因素实验基础上确定因素水平,各因素水平设计如表 1 所示,其它参数同 1.3.3。

表 1 正交优化实验因素水平

Tab 1 Factors and levels of orthogonal test for optimizing

水平 Level	因素 Factor		
	A 乙醇体积分数 /%	B 料液比	C 提取时间 /min
	Concentration of ethanol	Material /liquid ratio	Extraction time
1	65	1:12	20
2	75	1:15	30
3	85	1:18	40

1.3.5 提取级数选择 采用优化后的条件,进行 4 级提取实验,并对每级提取得率进行测定,以确定合理的提取级数。

1.3.6 正丁醇萃取次数 对挥干乙醇后的提取液进行 4 次萃取,测定每 1 次萃取的得率,以确定合理的萃取次数。

1.4 数据处理方法

采用统计软件 DPS(6.55)进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 提取单因素实验结果

根据预实验的结果,选择对提取效果影响较大的提取液乙醇体积分数、料液比和提取时间 3 个因素进行因素实验,结果如图 2、图 3、图 4 所示。

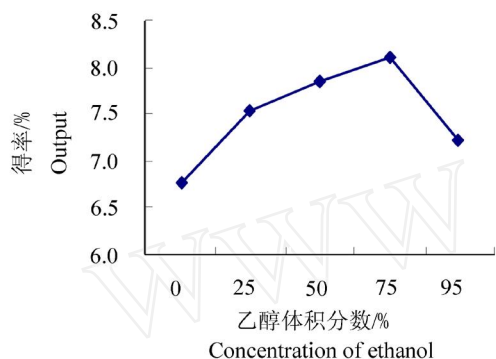


图 2 不同乙醇浓度下的提取得率

Fig 2 Extraction ratio treated with different concentration of ethanol

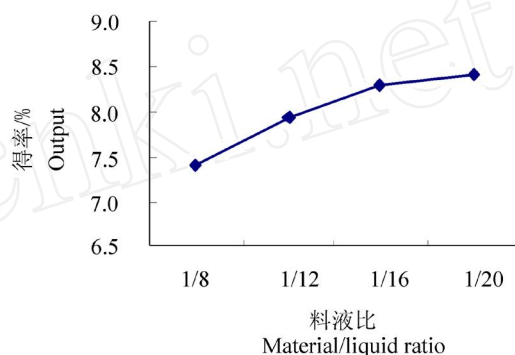


图 3 不同料液比下的提取得率

Fig 3 Extraction ratio treated with different ratio of material and extraction solution

结果表明:总三萜化合物得率随着提取液乙醇体积分数的升高呈先升后降之势,在 75% 左右达到峰值;随着料液比的增加,目标物得率逐步提升,但在 1/16 后上升较小,提示优化实验时料液比应在 1/16 前后设置;提取时间为 15 min 时得率较低,30 min 后有所增加,45 min 以上时反而略有降低,因此优化实验中提取时间应在 30 min 左右设置。

2.2 提取工艺参数优化

正交实验结果如表 2 所示。极差分析表明,3 个实验因素中影响最大的是提取时间,其次是提

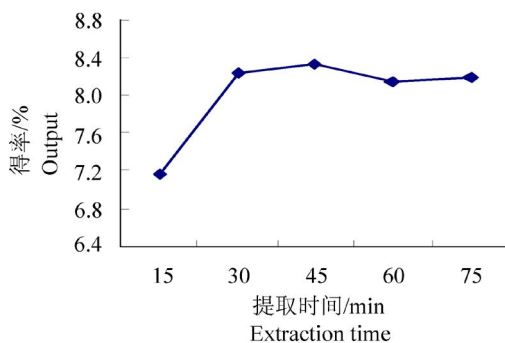


图 4 不同提取时间下的提取得率

Fig 4 Extraction ratio treated with different extraction time

表 2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal experiment

序号 Serial number	A	B	C	D (空列) (Null list)	得率 /% Output
1	1	1	1	1	7.45
2	1	2	2	2	9.11
3	1	3	3	3	8.42
4	2	1	2	3	8.73
5	2	2	3	1	8.47
6	2	3	1	2	7.49
7	3	1	3	2	7.78
8	3	2	1	3	6.95
9	3	3	2	1	8.05
k_1	8.33	7.99	7.30	7.99	
k_2	8.23	8.18	8.63	8.13	
k_3	7.59	7.99	8.22	8.03	
R	0.73	0.19	1.33	0.14	

表 3 正交试验方差分析

Tab 3 Analysis of variance of orthogonal experiment

变异来源 Source of variance	平方和 Mean sum of variances	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F值 Fischer's test	显著水平 Significant
A	0.952 5	2	0.476 2	32.544 4	0.029 8
B	0.072 2	2	0.036 1	2.467 0	0.288 4
C	2.801 9	2	1.400 9	95.735 8	0.010 3
D	0.029 3	2	0.014 6		
总和 Sum	3.855 8				

取液乙醇体积分数,相对较小是料液比。方差分析结果(表 3)表明,提取时间、提取液乙醇体积分数对总三萜化合物得率有较大影响,均达到显著水平,料液比影响不显著。综合考虑目标物得率和成本等因素,优化工艺参数为 $A_1B_1C_2$,即提取液乙醇体积分数为 65%、料液比为 1:12、提取时间为 30 min。

由于所选择的优化工艺参数不在正交实验组合之内,本文对优化条件进行验证试验,结果表明:优化条件下总三萜化合物的提取得率为 9.19%,高于正交实验非优化组。

2.3 提取级数对提取得率的影响

结果(表 4)表明,4级提取的总得率 9.86%;1级提取不完全,所提取出来的总三萜占 4级提取总量的 78.6%;前 2级总计提取的总三萜占 4级提取总量的 94.4%,已将原料中的总三萜化合物大部分提取出来;第 3级提取所得的三萜量很少,仅占总量的 4.6%;第 4级提取的量则更少。从目标物得率、成本及实际操作等角度综合考虑,2级提取较为合理。

表 4 提取级数实验结果

Tab 4 Results of series experiments of extraction

项目 Item	提取级数 Extraction series			
	第 1级 First	第 2级 Second	第 3级 Third	第 4级 Fourth
得率 / % Output	7.75	1.56	0.45	0.10
累计得率 / % Accumulated output	7.75	9.31	9.76	9.86
累计得率占总得率比例 / % Percentage of accumulated output to the sum	78.6	94.4	99.0	100.0

2.4 正丁醇萃取次数对提取得率的影响

萃取实验结果(表 5)表明:2次萃取的目标物累计萃取率为 91.9%,萃取已较为完全,合理的萃取次数为 2次。

表 5 正丁醇萃取实验结果

Tab 5 Results of series experiment of extraction with BuOH

项目 Item	萃取次数 Extraction time			
	第 1级 First	第 2级 Second	第 3级 Third	第 4级 Fourth
萃取率 / % Extraction percentage	73.1	18.8	3.1	0.9
累计萃取率 / % Accumulated extraction percentage	73.1	91.9	95.0	95.9

3 讨 论

(1)由于三萜化合物分子中没有能够产生紫外 - 可见光吸收或产生荧光的结构,含量测定多采用先显色后比色的方法。本文采用了经典的香草醛 - 高氯酸比色法,其原理是高氯酸将酚羟基氧化成羰基,增加 1 个双键结构,再经双键移位、双分子缩合等反应生成共轭双键系统,在酸作用下形成阳碳离子盐而显色^[11-12]。该方法被认为是三萜及皂甙类化合物的特征显色方法,操作简便,精密度高。但应注意的是,一些含有酚羟基结构且与三萜性质相近的物质(如黄酮)可能对测定有一定的影响,其影响程度有待于进一步研究。

(2)在选择提取液时,本文设置了 0% ~ 95% 共 5 个乙醇体积分数进行实验,发现低体积分数或高体积分数的乙醇提取时,提取液中的色素含量相对中体积分数来说较低,但色素对后续总三萜的测定基本无影响,也可以通过后续纯化(如过大孔树脂柱等)来去除,更重要的是中体积分数提取时目标物提取率相对较高。因此,本文认为体积分数为 65% 乙醇作为提取液较为合适。

4 结 论

以乙醇为溶剂,超声辅助提取青钱柳叶总三萜化合物的优化工艺参数为:体积分数为 65% 乙醇提取液、1:12 料液比、30 min 提取时间,优化条件下得率为 9.19%;乙醇溶液 2 级提取和正丁醇 2 次萃取较完全,为合理的提取级数和萃取次数。

参考文献:

- [1] 谢明勇,谢建华. 青钱柳研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(1): 113 - 121.
- [2] 筱香香,方升佐. 青钱柳次生代谢产物及其生理功能 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(28): 13612 - 13614.
- [3] Ming - Yong xie, Lei Li, Shao - Ping nie, et al. Determination of speciation of elements related to blood sugar in bioactive extracts from *Cyclocarya paliurus* leaves by FA - ICP - MS [J]. Eur Food Res Technol, 2006, 223: 202 - 209.
- [4] 王克全,曹莹. 青钱柳化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 黑龙江医学, 2007, 31(8): 577 - 579.
- [5] 上官新晨,陈锦屏,吴少福,等. 青钱柳提取物对家兔实验性糖尿病模型降血糖作用的研究 [J]. 西北农林科技大学学报, 2003, 31(6): 117 - 120.
- [6] 陈薇,段小群,卢曦. 青钱柳提取物清除羟自由基和抑制脂质过氧化的作用 [J]. 右江医学, 2009, 37(4): 381 - 383.
- [7] 段小群,梁成钦,徐庆. 青钱柳正丁醇提取物抗脂质过氧化作用的实验研究 [J]. 广西中医药, 2009, 32(4): 57 - 59.
- [8] 舒任庚. 青钱柳植物化学成分研究简报 [J]. 江西中医学院学报, 1996, 8(2): 34.
- [9] 徐睿庸,洪艳平,上官新晨,等. 分光光度法测定青钱柳叶中总三萜皂甙含量 [J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(3): 449 - 453.
- [10] 洪艳平,尹忠平,上官新晨,等. 光皮木瓜总三萜化合物提取和含量测定 [J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(2): 225 - 229.
- [11] 姚新生,吴立军,吴继洲,等. 天然药物化学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2003: 292.
- [12] 闫雪,钱和,张根义. 分光光度法测定水杨苷含量的研究 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(1): 111 - 113.