

文章编号:1000-582X(2007)01-0123-03

应用超声波法提取金银花中绿原酸*

府旗中¹,王伯初¹,许祥武²

(1. 重庆大学 生物工程学院, 重庆 400030; 2. 江苏科技大学 生物技术学院, 江苏 镇江 212018)

摘要:应用超声波法提取金银花中的绿原酸。采用紫外分光光度法测定不同提取工艺下制备的提取物中绿原酸的含量,并与传统的水提法、乙醇回流提取法比较,根据绿原酸的得率及抑菌效果确定金银花提取的优化工艺。实验结果表明,超声波法的绿原酸提取率高于水提法、乙醇提取法,但超声波法、水提法及乙醇提取法制备的绿原酸提取物对大肠杆菌的抑菌效果没有明显差异,其最小抑菌浓度(MIC)均为250 $\mu\text{g/g}$ 。

关键词:超声波;金银花;绿原酸;抑菌活性

中图分类号:Q946

文献标识码:A

金银花为忍冬属(*Lonicera japonica* Thunb.)忍冬植物的干燥花蕾,为中医常用药,具有清热解毒,凉风散热,抗病毒,保肝利胆的功能^[1]。近年研究发现,金银花还有抗HIV和抗肿瘤的功效,应用前景广阔。金银花含有绿原酸、异绿原酸、三萜皂苷、木犀草素及肌醇等^[2],一般认为,金银花的抗菌有效成分为绿原酸,且常以绿原酸的含量高低来评价金银花质量的好坏。绿原酸是含有羧基和邻二酚羟基的有机酸,易溶于水、醇溶液和丙酮等溶剂。目前,从金银花中提取绿原酸的方法有传统的水提法、乙醇回流法等^[3]。

笔者应用超声波与传统提取方法联用,利用其空化作用实现提取液局部高温、高压,加之超声波的机械扰动作用,加快固液两相之间的传质,从而提高提取率。超声波提取作为一种新型的提取技术,在天然产物提取方面得到广泛的应用,具有被提取活性物质不被破坏,提取时间短、提取效率高等优点,特别适合于热敏性物质的提取^[4]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验材料

金银花,95%的乙醇,牛肉膏,胰蛋白胨,氯化钠,琼脂,大肠杆菌菌种,绿原酸标准品(sigma公司)

1.1.2 实验仪器

紫外可见分光光度计(756-MC型),超声波发生器(KCT-III型数控),分析天平(FA2104N),旋转蒸发器(Buchi),循环水真空泵(SHZ-DIII型),恒温培养箱(BS-1E型),超净工作台(苏净公司),粉碎机。

1.2 实验方法

1.2.1 紫外分光光度法

1)标准曲线的绘制。准确称取绿原酸标准品5.0 mg,用蒸馏水溶解并定容于25 mL容量瓶中。再利用该母液配成100 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、60 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液。然后选取绿原酸最大吸收波长324 nm^[5],分别测定不同浓度标准溶液的吸光度值(OD值),以绿原酸标准品浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,以其吸光度值(OD值)为纵坐标绘制标准曲线^[4]。

2)绿原酸含量测定。将不同提取工艺所得供试品各取1 mL用蒸馏水定容至100 mL;在324 nm处测其吸光度值,以计算其中绿原酸的含量及提取率。

1.2.2 绿原酸提取试验

1 水提法与超声波对比实验

a.水提法实验:称取6.0 g干燥并粉碎的金银花粉末3份装在3个烧杯中,分别贴上标签,分别加入100 mL蒸馏水,于60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中加热,第1份30

* 收稿日期:2006-08-28

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK2005059)

作者简介:府旗中(1982-),男,重庆大学硕士研究生,主要从事天然药物开发、生物制药工程等方面的研究。王伯初,男,教授,博士生导师,E-mail:wangbc2000@126.com.

min,第2份50 min,第3份70 min,提取完后,分别过滤,再分别向滤渣加入100 mL蒸馏水在各自提取相同时间,加热完后再过滤将滤渣倒掉,滤液在旋转蒸发仪上浓缩,浓缩液定容至20 mL.再分别抽滤,最后到离心机上4 000转离心10 min,将澄清的溶液放入冰箱待用.

b. 超声波加水提取:称取6.0 g干燥并粉碎的金银花3份分装在3个锥形瓶中,分别贴上标签,加入100 mL蒸馏水,于超声波发生器中60℃加热,超声波效率为100%,第1份30 min,第2份50 min,第3份70 min,提取完后,分别过滤,再向滤渣加入100 mL蒸馏水,重复上述操作,之后也将滤液浓缩至20 mL,再分别抽滤,最后到离心机上4 000转离心10 min,将澄清的溶液放入冰箱待用.

2) 醇提法与超声波对比试验

a. 乙醇提取:称6.0 g干燥并粉碎的金银花粉末5份装在5个锥形瓶中,分别贴上标签,分别加入40%,50%,60%,70%,80%的乙醇各100 mL,并且都密封,于60℃恒温水浴锅中加热30 min,提取完后,分别过滤,再分别向滤渣加入各自浓度的乙醇100 mL,重复上述操作,之后也将滤液浓缩至20 mL,再分别抽滤,最后到离心机上4 000转离心10 min,将澄清的溶液放入冰箱待用.

b. 超声波加乙醇提取:称6.0 g干燥并粉碎的金银花粉末5份分装在5个锥形瓶中,分别贴上标签,分别加入40%,50%,60%,70%,80%的乙醇各100 mL,并且都密封,于60℃超声波提取30 min,提取完后,分别过滤,再分别向滤渣加入各自浓度的乙醇100 mL,重复上述操作,之后也将滤液浓缩至20 mL,再分别抽滤,最后到离心机上4 000转离心10 min,将澄清的溶液放入冰箱待用.

1.2.3 抑菌试验

以常见的食品污染菌——大肠杆菌作菌株,以观察金银花叶提取物对消化道致病(炎症)菌的抑制作用^[6].

1) 制备菌种液

取大肠杆菌菌株,在牛肉膏蛋白胨培养基斜面37℃下培养约24 h后,经振荡、搅匀,作为菌种液.

2) 倒培养基

将不同提取工艺最佳条件下制备的绿原酸提取液定量的加入到已灭菌的牛肉膏蛋白胨培养基,搅匀,制成含绿原酸浓度为1 000 μg/g、500 μg/g、250 μg/g、125 μg/g、62.5 μg/g的5个平板.

3) 接种培养

在倒好培养基平板中,分别涂抹大肠杆菌细菌的种菌液置37℃培养箱中培养48 h.然后观察各平板的菌落

生长情况,确定出绿原酸提取物的最小抑菌浓度(MIC).

2 结果分析

2.1 标准曲线绘制

在324 nm最大吸收波长处测定不同浓度绿原酸的吸光度如下表1.

表1 绿原酸标准溶液吸光度测定

序号	1	2	3	4	5	6
浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10	20	40	60	80	100
OD值	0.333	0.588	1.043	1.543	1.906	1.995

根据表1数据绘图,得图1.

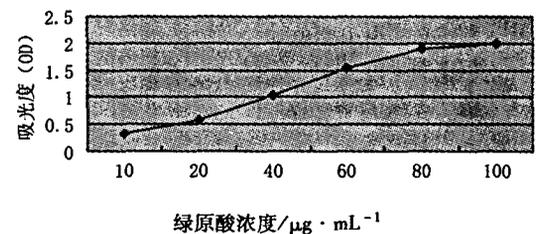


图1 绿原酸浓度标准曲线图

由图可知其回归方程: $Y = 0.02272X + 0.12833$, $R = 0.9972$. X 代表绿原酸浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$), Y 为吸光度.

2.2 绿原酸提取试验

2.2.1 水提法与超声波对比实验

通过测量不同提取时间水提法和超声波法提取液的吸光度,计算得出原料中绿原酸含量和收率如下表2所示.

表2 水提法与超声波法对比实验结果

时间 /min	吸光值 (OD)		提取液浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		绿原酸含量 /g		收率 /%	
	水提法	超声波法	水提法	超声波法	水提法	超声波法	水提法	超声波法
30	2.53	2.55	105.7	106.6	0.2114	0.2132	3.52	3.55
50	2.39	2.47	99.5	103.1	0.1990	0.2062	3.31	3.44
70	2.42	2.48	100.9	103.5	0.2108	0.2070	3.36	3.45

说明:收率(%) = 提取液中绿原酸质量/原材料的质量 \times 100%

从表2数据分析可知,超声波法提取效果要比传统水提法理想.同时可以看出提取时间为30 min最佳,伴随着提取时间的延长可能导致提取出的绿原酸结构的破坏,含量减少.

2.2.2 醇提法与超声波对比试验

通过测量不同乙醇浓度醇提法和超声波法提取液的吸光度,计算得出原料中绿原酸含量和收率如表3所示.

表3 醇提法与超声波对比试验结果

不同浓度的乙醇		40%	50%	60%	70%	80%
醇提法	吸光值(OD)	2.60	2.67	2.83	2.90	2.73
	提取液浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	108.8	111.9	118.9	120.0	114.5
	绿原酸含量/g	0.2176	0.2238	0.2378	0.2400	0.2290
	收率/%	3.63	3.73	3.96	4.00	3.82
超声波法	吸光值(OD)	2.79	2.85	2.98	2.79	2.71
	提取液浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	117.2	119.8	125.5	117.2	113.6
	绿原酸含量/g	0.2344	0.2396	0.2510	0.2344	0.2272
	收率/%	3.91	3.99	4.18	3.91	3.79

说明:收率(%) = 提取液中绿原酸质量/原材料的质量 \times 100%

从表3数据分析可知,超声波法提取绿原酸的效果要比传统醇提法效果好.同时可以看出先随着乙醇浓度的增加提取绿原酸的浓度增加,到达最高后随着乙醇浓度增加,绿原酸含量呈降低趋势.传统醇提法乙醇最佳浓度为70%,超声波醇提法乙醇最佳浓度为60%.

2.2.2 抑菌实验结果

不同提取工艺最佳条件下制备的金银花提取液对大肠杆菌的MIC结果如下表4.从结果可知,对于大肠杆菌,不同提取工艺最佳条件下制备的金银花提取物的MIC均为250 $\mu\text{g}/\text{g}$,说明在传统的水提法、乙醇提取法中加入超声后制备的绿原酸提取物对大肠杆菌的抑菌效果没有显著差异,且对大肠杆菌均有较好的抑菌效果.

表4 金银花提取物对大肠杆菌体外抑菌试验

浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	1000	500	250	125	62.5
水提法	-	-	-	+	+
超声加水提取	-	-	-	+	+
乙醇提取	-	-	-	+	+
超声加乙醇提取	-	-	-	+	+

说明:“+”表示有菌落出现,“-”表示无菌落出现.

Extraction Chlorogenic Acid from Lonicera by Ultrasonic Method

FU Qi-zhong¹, WANG Bo-chu¹, XU Xiang-wu²

(1. College of Bioengineering in Chongqing University, Chongqing 400030, China;

2. College of Biotechnology in Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China)

Abstract: Ultrasonic extracting chlorogenic acid from honeysuckle is studied in this paper, while quantity of chlorogenic acid is measured by ultraviolet and visible spectrophotometry. The optimization method of extraction was determined in view of the rate of extraction and effect of sterilization. The result of experiment shows that compared with traditional water extraction and ethanol extraction, ultrasonic extraction is better in rate of extraction and doesn't have evident difference in MIC of chlorogenic acid, which is 250 $\mu\text{g}/\text{g}$.

Key words: ultrasonic; honeysuckle; chlorogenic acid; antimicrobial activity

(编辑 陈移峰)

3 讨论

1)对于金银花不同的提取工艺分析可知,醇提法要比水提法效果好,绿原酸的提取率高.加入超声波提取以后,提取效率更高,提取物绿原酸含量增加.所以,选取60%的乙醇溶液,用超声波加载提取30 min的提取工艺最好.

2)MIC结果显示,不同提取工艺制备的绿原酸提取物对大肠杆菌的抑菌效果没有显著差异,且对大肠杆菌均有较好地抑菌效果.金银花作为我国的一种传统中药,其有效成分绿原酸及其它黄酮类物质不仅具有抗菌、防腐作用,还具有较强的抗氧化功能.金银花在我国较多省份都有较大面积种植,故其不仅是一种有用药材,还是一种天然抗氧化的提取源.为此,文中研究对于充分利用金银花有积极意义.

参考文献:

- [1] 林丹,赵国玲,刘佳佳.金银花不同提取方法的绿原酸比较研究[J].天然产物研究与开发,2003,15(2):124-126.
- [2] 黄云,肖艳萍,李娟,等.不同工艺的金银花提取物组分比较研究[J].中医药导报,2005,11(6):68-70.
- [3] 阎巧娟,韩鲁佳,江正强.金银花中绿原酸提取纯化工艺的优化[J].中国农业大学学报,2002,7(2):22-26.
- [4] 尹波,王科军.超声波法提取金银花中的绿原酸[J].林产化工通讯,2005,39(1):14-16.
- [5] 赵钟兴,韦藤幼,郝瑞然,等.从金银花中提取绿原酸生产工艺的改进[J].时珍国医国药,2004,15(12):829-830.
- [6] 武雪芬,景小琦,李国茹.金银花叶药用成分的提取及抑菌试验[J].天然产物研究与开发,2001,13(3):43-44.