

Study on Extraction Technology of Triterpenoids from Gentian

Haipin Zhou, Yaru Yang, Kangteng Lei

College of Materials & Chemical Engineering, Chuzhou University, Chuzhou Anhui
E-mail: 87biner@163.com

Received: Oct. 23rd, 2018; accepted: Nov. 4th, 2018; published: Nov. 15th, 2018

Abstract

Triterpenoids from gentian is extracted in combination with ultrasound and determined by UV spectrum. The best extraction process was obtained by single factor test and orthogonal test such as ethanol concentration, reaction temperature, solid-liquid ratio, and extracting time. The results suggest that the optimum conditions for this extraction are ethanol concentration 80%, reaction temperature 65°C, solid-liquid ratio 1:35 g/mL, extracting time 2.5 h. Under the optimum condition, the extraction rate of triterpenoids is 1.579%.

Keywords

Gentian, Triterpenoids, Ultrasonic Extraction, Orthogonal Test

龙胆草三萜化合物的提取工艺研究

周海嫔, 杨亚如, 雷康藤

滁州学院, 材料与化学工程学院, 安徽 滁州
E-mail: 87biner@163.com

收稿日期: 2018年10月23日; 录用日期: 2018年11月4日; 发布日期: 2018年11月15日

摘要

以龙胆草为原料, 采用水浴加热、超声振荡法提取龙胆草中三萜化合物, 以紫外光谱法检测其含量。通过乙醇含量、反应温度、反应时间、料液比等单因素试验和正交试验, 得到最佳提取工艺。试验结果表明, 最佳提取工艺为反应温度65°C, 乙醇含量80%, 料液比1:35 g/mL, 反应时间2.5 h, 在此条件下测

得三萜化合物提取率为1.578%。

关键词

龙胆草, 三萜, 超声提取, 正交试验

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

龙胆草是多年生草本植物, 生长范围较广, 具有清热利胆, 杀菌, 消炎, 健胃, 保肝等功效, 在临床上有较多应用。龙胆草中包含许多种化学成分, 其中龙胆草有效成分之一为三萜类。研究发现其兼有抗炎, 抗抑郁, 抗肿瘤的效果, 但现有较少的关于三萜化合物提取的报道。本课题采取超声波振荡提取龙胆草中三萜化合物[1] [2] [3] [4], 用紫外可见分光光度法对提取物进行检测, 以齐墩果酸为参照标准, 用于三萜化合物含量的计算[5]。并且用正交试验法筛选最优提取工艺路线, 为后期的药理活性研究打下基础。

2. 材料与方法

2.1. 试剂

95%乙醇(分析纯); 龙胆草购自亳州; 齐墩果酸标准品(>98.9%)购于合肥博美生物科技有限公司。

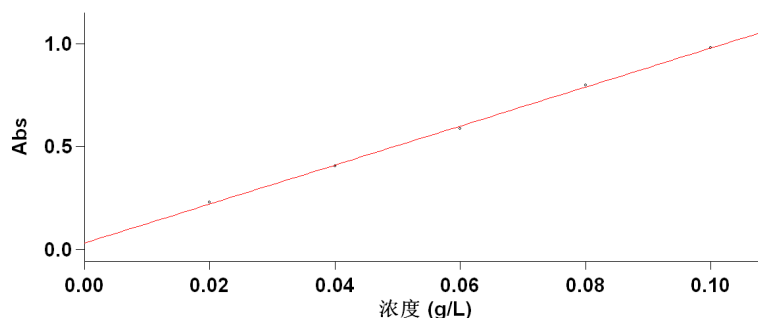
2.2. 仪器

Varian Cary 100 紫外可见分光光度计; 超声波清洗器(上海之信仪器有限公司); 中草药粉碎机(郑州驰邦机械设备有限公司); 电子天平(德国赛多利斯公司); 抽滤瓶(郑州兴华玻璃仪器厂); 容量瓶(北京玻璃仪器厂); 移液管(泰州市恒博医疗器械有限公司); KDM 型调温电热套(天津塞得利斯实验分析仪器制造厂); 圆底烧瓶。

3. 实验过程

3.1. 标准曲线的绘制[6]

称取齐墩果酸粉末 10 mg 于烧杯中, 加入约 2 mL 95%的乙醇溶液溶解, 完全溶解后转移至 50 mL 容量瓶中, 95%乙醇定容, 盖紧瓶塞, 混合均匀, 配成 0.2 mg/mL 的标准溶液。分别移取 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL 的标准溶液于 5 个编号分别为 1、2、3、4、5 的 10 mL 容量瓶中, 另外移取 1 mL 95%乙醇溶液至另一个 10 mL 容量瓶中, 并将其编号为 6, 再用 95%乙醇定容、混匀。先用 0.2 mg/mL 的标准溶液在 200~800 nm 的紫外波长下扫描, 观察到在 250 nm 的波长处有最大紫外吸收, 在此条件下, 用 6 号空白溶液调零后, 依次测定标准溶液的吸光度值, 横坐标为浓度, 纵坐标为吸光度值时, 作浓度 - 吸光度值曲线, 如图 1 所示。



校正方程 $Abs = 9.46294 * C + 0.03203$
 相关系数 0.99908

Figure 1. Concentration absorbance curve
图 1. 浓度 - 吸光度曲线

3.2. 实验样品的处理

将干燥的龙胆草研碎，过筛，选用细碎的粉末，将所用的样品粉末收集于袋中，封口，保存在低温干燥处待用。

3.3. 实验操作过程

精密称取 20 g 龙胆草粉末于 50 mL 锥形瓶中，按料液比 1:25 加入 95% 的乙醇溶液，加塞，摇匀，使药材充分浸泡。

打开超声波清洗器开关，设置温度为 60℃，当水温达到设置的温度时，打开超声波，将盛有样品溶液的锥形瓶放入上述水中，超声振荡 2 h。反应过程中可摇晃几次锥形瓶，使药材充分受热和振荡。

反应完毕后，停止加热和振荡，取出锥形瓶，摇晃，静置，抽滤，滤液呈澄清淡黄色。将滤液倒入圆底烧瓶中，打开电热套开关，设置温度为 80℃，圆底烧瓶固定在铁架台上，滤液加热被浓缩成浸膏后，用 80% 的乙醇将其溶解，待溶解完全后，转移到 50 mL 容量瓶中，再用 80% 的乙醇定容至刻度线，混匀，在最优吸收波长处检测吸光度值，再带入标准曲线计算浓度值，最后计算出提取率。

3.4. 三萜化合物提取率的计算[7] [8] [9]

三萜化合物提取率(%) = 三萜化合物的浓度/龙胆草的质量*100%

3.5. 设计单因素实验

影响提取率的因素主要有反应时间、乙醇含量、料液比、反应温度，为了解各个因素变化对实验结果的影响，现采用控制变量法[10]，分别对单个因素进行试验，每次 5 组实验，记录数据，画图，获得该因素的最佳反应条件。

3.6. 正交试验的设计

根据单因素实验的结果，设计乙醇含量、反应时间、反应温度、料液比 4 个因素三个水平的正交试验[11]，探究龙胆草中三萜化合物提取的最佳工艺路线。

4. 实验结果与分析

4.1. 反应时间改变对实验结果的影响

在乙醇含量为 95%、料液比为 1:25 ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、反应温度为 60℃ 时，考察不同反应时间对龙胆草中三

萜化合物提取率的影响,按照 2.3 实验操作流程,得出以下结果(见图 2)。

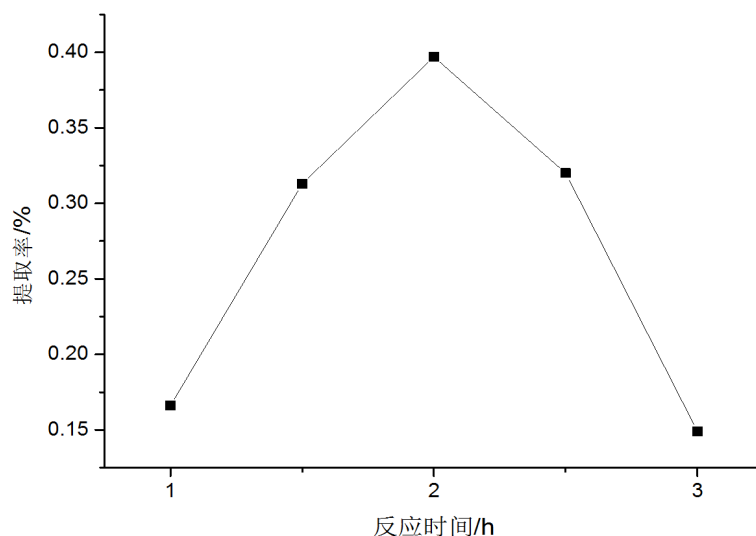


Figure 2. Effect of extracting time on the extraction rate of triterpenoids
图 2. 反应时间对三萜化合物提取率的影响

上图结果表明,当其他条件不变时,提取率随着反应时间的增加先升高后下降,在反应时间为 2 h 时,有最大提取率 0.397%。继续延长时间后提取率下降,可能是超声时间过长破坏了三萜化合物的结构,此结论还需进一步证实。折线变化幅度较大,可知反应时间对三萜化合物的提取率影响较大,所以提取时间最好控制在 2 h。

4.2. 乙醇含量变化对实验结果的影响

在反应时间为 2 h、料液比为 1:25 ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、反应温度为 60°C 时,考察不同含量的乙醇对三萜化合物提取率的影响,按照 2.3 实验操作流程,得出以下结果(见图 3)。

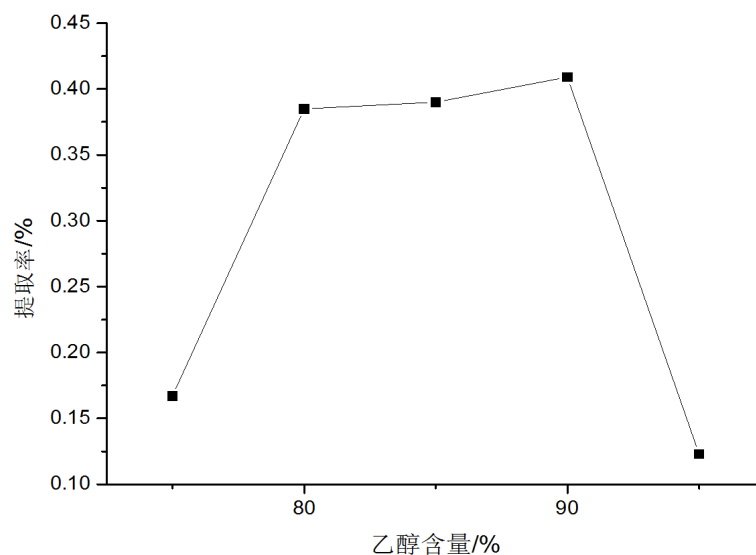


Figure 3. Effect of ethanol concentration on the extraction rate of triterpenoids
图 3. 乙醇含量对三萜化合物提取率的影响

由以上图可得,其他条件不变时,随着乙醇浓度的增加,提取率先升高后下降,在 90%乙醇含量时,

有最大提取率 0.409%。继续加大乙醇浓度会降低溶剂的极性，而龙胆草中三萜类具有较强的极性，所以其溶解度降低从而提取率下降。

4.3. 料液比变化对实验结果的影响

在乙醇含量为 90%、反应时间为 2 h、反应温度为 60℃时，考察不同料液比对三萜化合物提取率的影响，按照 2.3 操作流程，得出以下结果(见图 4)。

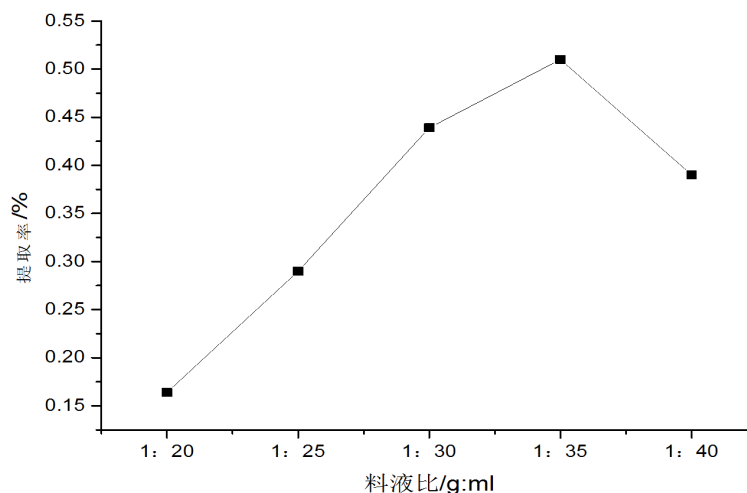


Figure 4. Effect of solid-liquid ratio on extraction rate of triterpenoids
图 4. 料液比对三萜化合物提取率的影响

由以上图可得，其他条件不变时，随着料液比的增加，提取率先升高后下降，在料液比为 1:35 时，有最大提取率 0.510%。溶剂乙醇量的增加有助于样品基质更好地扩散，从而使样品与溶剂接触面积增大，提高提取率，但是溶剂过量会产生稀释效应会使提取率下降。

4.4. 反应温度变化对实验结果的影响

当反应时间为 2 h、料液比为 1:35 ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、乙醇含量为 90%时，考察不同反应温度对三萜化合物提取率的影响，按照 2.3 操作流程，得出以下结果(见图 5)。

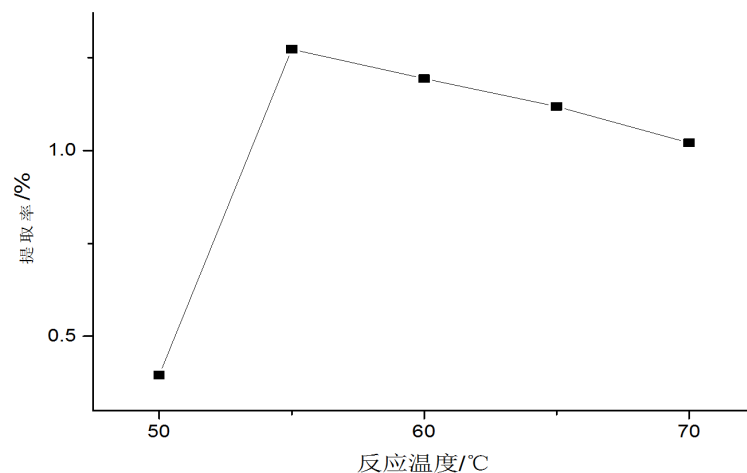


Figure 5. Effect of reaction temperature on the extraction rate of triterpenoids
图 5. 反应温度对三萜化合物提取率的影响

上图结果表明,其他条件不变时,随着反应温度的增加,提取率先升高后下降,在 55℃ 反应温度时,有最大提取率 1.273%。由此可得恰当地升温有助于溶质的扩散和溶剂向样品渗透,进而有利于提高提取率。但是温度太高时会改变三萜化合物结构,使得提取率降低。

4.5. 正交试验设计

通过以上单因素实验的结果可以得到,当反应条件分别为反应时间 2 h、乙醇含量为 90%、料液比为 1:35、反应温度为 55℃ 时,对龙胆草中三萜化合物有最大的提取率。为最大限度地设计一条反应路线得到最大提取率,现采用正交试验的方法,选取主要的四个因素,每个因素设计三个水平:乙醇含量分别为 80%、85%、90%;料液比分别为 1:25、1:30、1:35;超声时间分别为 1.5 h、2 h、2.5 h;反应温度分别为 55℃、60℃、65℃ (见表 1)。按 L₉(3⁴) 进行正交试验[12][13][14],得出以下正交试验因素水平表(见表 2)。

Table 1. Orthogonal factor level table

表 1. 正交因素水平表

水平	A	B	C	D
	乙醇含量/%	料液比/g·mL ⁻¹	超声时间/h	提取温度/℃
1	80	1:25	1.5	55
2	85	1:30	2	60
3	90	1:35	2.5	65

Table 2. Results of orthogonal test

表 2. 正交试验数据结果

试验号	因素				提取率/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.106
2	1	2	2	2	1.340
3	1	3	3	3	1.578
4	2	1	2	3	1.102
5	2	2	3	1	1.303
6	2	3	1	2	1.209
7	3	1	3	2	1.089
8	3	2	1	3	0.989
9	3	3	2	1	1.011
K ₁	1.341	1.099	1.101	1.140	—
K ₂	1.205	1.211	1.151	1.213	—
K ₃	1.030	1.266	1.323	1.223	—
极差 R	0.311	0.167	0.222	0.083	—
主次因素	A > C > B > D				
最优方案	A ₁ B ₃ C ₃ D ₃				

由结果可得,最佳提取工艺条件为 80%乙醇、1:35 的料液比、2.5 h 的超声时间、65℃ 的反应温度,

可以得出最大提取率 1.578%。为检验最佳提取工艺条件的可实施性,实施三次关于最佳方案的平行实验,得出以下结果(见表 3)。

Table 3. Results of optimum process conditions
表 3. 最佳工艺条件验证结果

试验批次	1	2	3	平均提取率
A	4.511	4.3380	4.3112	1.578%
提取率	1.560%	1.592%	1.583%	

由结果可知,按 $A_1B_3C_3D_3$ 方案提取龙胆草中三萜化合物的平均提取率为 1.578%,高于其他方案所得的提取率,因此方案 $A_1B_3C_3D_3$ 可行。

5. 实验结果讨论

由以上单因素试验得到各因素对龙胆草中三萜化合物提取率的影响为:当反应条件分别为反应时间 2 h、乙醇含量为 90%、料液比为 1:35、反应温度为 55℃时,对龙胆草中的三萜化合物有最大的提取率。从正交试验中得出对提取率的影响的 4 个因素,它们由小到大为:反应温度 < 料液比 < 超声时间 < 乙醇含量,且单因素实验的结果与分析的结果大致相同。为实现高的提取率,需对乙醇的含量和超声时间严格控制,可得最佳工艺条件为 80%的乙醇含量、2.5 h 的超声时间、1:35 的料液比和 65℃的反应温度。此条件下,龙胆草中三萜化合物的提取率可达最大为 1.578%,这为后期进一步研究药理活性奠定了基础。

基金项目

滁州学院科研启动基金资助项目, 2015qd16。

参考文献

- [1] 李志,冯佳佳,徐俐,等. 薏苡仁中三萜化合物提取的工艺研究[J]. 食品工业, 2016, 37(8): 28-32.
- [2] 凡芸,宋雅,孙月,等. 超声辅助乙醇提取杏鲍菇总三萜化合物工艺研究[J]. 食品工业, 2016, 37(8): 124-126.
- [3] 郭丹钊,郑威,马海乐,等. 超声波辅助提取樟芝菌丝体活性物质的工艺研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 157-162.
- [4] 张喜锋,周敏,李煜国. 秦岭猪苓活性成分提取工艺与鉴定研究[J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(8): 84-86.
- [5] 戚月婷,玄光善. 桦褐孔菌总三萜化合物提取工艺研究[J]. 应用化工, 2015, 44(5): 924-932.
- [6] 史姝,赵艳敏,刘岱琳,等. 苹果树枝中总三萜的提取工艺[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2015, 24(7): 253-254.
- [7] 罗玥倩,李妍,汤婷,等. 委陵菜属药用植物三萜类化合物的提取分离[J]. 保健文汇, 2017(5): 135.
- [8] 牟建楼,陈志周,王颀,等. 灵芝废弃物三萜类化合物提取工艺研究[J]. 食品科技 2014, 39(12): 235-237.
- [9] 李雨婷,李萌,金周雨,吴雷,宋慧,等. 超声波提取云芝发酵浸膏总三萜化合物最佳工艺研究[J]. 现代园艺, 2014(14): 17-18.
- [10] 林倩倩,赵淑杰,朱鹤,等. 树舌灵芝中三萜类化合物的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2012(18): 9669-9671.
- [11] 邓波,尚旭岚,方升佐,等. 超声辅助提取青钱柳叶总三萜化合物的工艺优化[J]. 南京林业大学学报(自然出版社), 2012, 36(6): 101-104.
- [12] 李芳清,辛欣,魏强,等. 藜蒿三萜提取工艺的研究[J]. 现代测量与实验室管理, 2010, 18(1): 23-24.
- [13] 张志军,朱越,罗莹,等. 灵芝中三萜化合物提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(9): 81-83.
- [14] 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.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2163-1557，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：aac@hanspub.org