

亳芍多酚提取工艺及栽培年限对总多酚积累的影响研究

陈乃东^{1,2,3*}, 陈瀚¹, 朱旺生^{1,2}, 于丹¹

¹皖西学院生物与制药工程学院; ²皖西中药与天然药物工程技术研究中心, 六安 237012; ³安徽医科大学, 合肥 230032

摘要:以没食子酸为对照品, 采用 Folin-Ciocalteu 比色法、在正交实验确定亳芍总多酚最佳提取条件基础上对不同栽培年限的亳芍多酚含量进行测定。结果表明, 亳芍总多酚最佳提取工艺条件为: 乙醇浓度为 60%, 料液比为 1:35 g/mL, 提取时间为 2.0 h, 提取温度为 70 °C。在此条件下测得栽培 1~7 的亳芍总多酚占其干重的含量依次为: 2.63 ± 0.49%、3.82 ± 0.55%、3.64 ± 0.64%、2.42 ± 0.61%、2.51 ± 0.76%、2.57 ± 0.87%、2.55 ± 0.72%。研究结果为亳芍的规范化栽培和临床用药提供参考依据。

关键词: 亳芍; 总多酚; 规范化栽培

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.033

Extraction and Accumulation of Polyphenol from Bozhou Peony *Paeonia lactiflora* with different plant ages

CHEN Nai-dong^{1,2,3*}, CHEN Han¹, ZHU Wang-sheng¹, YU Dan¹

¹ College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University;

² West Anhui Biotechnology Research Center of Natural Medicine and Traditional

Chinese Medicine, West Anhui University, Lu'an 237012, China; ³ Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Abstract: In order to explore the total polyphenol contents of different years-old Bozhou Peony and provide references for its standard cultivation and medical application, the Folin-Ciocalteu chromatometry with gallic acid as standard preparation was applied to detect the contents of polyphenol from different years-old Bozhou peony on the optional conditions which was obtained from the orthogonal experiments. The results showed that most of the polyphenol could be extracted from Bozhou Peony using 60% ethanol as extraction solvent with ratio of material to liquid 1:35 on the condition that extraction time and temperature were 2.0 h and 70 °C, respectively. Remarkable variation of the polyphenol content was existed between different years-old Bozhou Peonys with the orders of cultivation years 1-7: 2.63 ± 0.49%, 3.82 ± 0.55%, 3.64 ± 0.64%, 2.42 ± 0.61%, 2.51 ± 0.76%, 2.57 ± 0.87%, 2.55 ± 0.72%. Our experiments might provide valuable references for the standardized cultivation and clinical medication of Bozhou Peony.

Key words: Bozhou Peony *Paeonia lactiflora*; total polyphenols; standardized cultivation

亳芍即亳白芍, 主产安徽亳州地区, 指芍药科植物芍药或其变种毛果芍药栽培品的根, 为多年生草本植物。每年 8~10 月采挖, 洗净、去皮、晒干后即可入药。加工后的芍药呈粉白色或白色, 故又称“白芍”, 含有萜类、多酚和生物碱等成分^[1-6], 具养血敛阴、柔肝止痛、平抑肝阳等功效^[7]。

植物多酚 (Plant Polyphenols) 是多羟基酚类化合物的总称, 是植物主要的次生代谢产物之一, 具有抗菌消炎、抗氧化、降血压、增强免疫力等作用^[8-10], 研究多酚类组分对于亳芍资源开发、揭示亳芍药效物质基础具有重要意义。

目前对亳芍多酚的研究多集中在分离鉴定和药理活性, 对于多酚类提取工艺及其在亳芍中积累规律笔者尚未见报道, 有鉴于此, 本实验采用 Folin-Ciocalteu 比色法、在正交实验确定亳芍总多酚最佳提取条件基础上对不同栽培年限的亳芍多酚含量进行测定, 为亳芍的规范化栽培、品质控制和临床用药提供参考依据。

收稿日期: 2014-09-17 接受日期: 2015-04-02

基金项目: 国家自然科学基金 (81274021); 中国博士后研究面上项目 (2014M551791); 安徽省人事厅博士后研究项目; 安徽高校省级科学研究重点项目 (KJ2012A277); 六安市定向委托皖西学院市级研究重点项目 (2011LWA001)

* 通讯作者 E-mail: 2004cnd@163.com

1 仪器、材料与试剂

1.1 仪器

电子分析天平(FA1004型,中国上海精科有限公司),TU-1901双光束紫外可见分光光度计(上海谱元仪器有限公司),旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),恒温水浴锅(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂)等。

1.2 材料与试剂

实验材料亳芍2013年9月采自安徽省亳州市亳芍种植基地,品种经皖西学院陈乃东博士鉴定为毛茛科植物亳芍(*Bozhou Peony Paeonia lactiflora*)。分别挖取株龄1~7年的亳芍,洗净,去皮,晾干,备用。

没食子酸标准品(北京世纪奥科生物技术有限公司),Folin-Ciocalteu试剂(上海荔达生物有限公司)。

2 实验方法

2.1 标准液的配制

精确称取25 mg没食子酸标准品,用蒸馏水溶解并定容至1000.0 mL,得到浓度为25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准液,备用。

准液,备用。

2.2 标准曲线的测定

亳芍总多酚的含量测定参照卜彦花,刘顺航等^[11,12]方法,在预实验基础上改进而来:准确吸取没食子酸标准液0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2 mL,分别置于一系列10 mL的容量瓶中,加入0.4 mL Folin-Ciocalteu试剂,摇匀,4~6 min内加入1.6 mL质量分数为15%的 Na_2CO_3 溶液,以蒸馏水定容至刻度,室温静置反应1 h,在745 nm波长下测定吸光度值(A)。以没食子酸浓度为横坐标(x)/吸光度值为纵坐标(y),最小二乘法获回归方程。

2.3 单因素实验

精密称取5.0 g干燥至恒重的亳芍粉末若干份,按表1设计进行单因素实验,依次考察乙醇浓度、料液比、提取时间、温度对亳芍总多酚提取物的影响。当考察一个因素影响时,其它三个因素均采用第3水平代表的条件。

2.4 提取工艺优化

根据单因素实验结果,选择合适的因素水平,设计4因素3水平正交实验,确定亳芍总多酚最佳提取工艺条件。

表1 单因素实验设计表

Table 1 Design of single factor experiments

因素 Factor	水平 Level				
	1	2	3	4	5
乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	20	40	60	80	100
料液比 Solid/liquid ratio (g/mL)	1:5	1:15	1:25	1:35	1:45
温度 Extraction Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	40	50	60	70	80
提取时间 Extraction time (h)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

2.5 不同生长年限的亳芍多酚含量比较研究

按2.4中确定的最佳条件,分别提取栽培1~7年的亳芍总多酚,按2.2建立的方法测定样品液的吸光度,代入标准曲线计算总多酚含量,实验设3次重复。

3 结果与分析

3.1 标准曲线测定结果

按2.2操作,测得没食子酸标准曲线,得回归方程: $y = 0.1129x - 0.0261$, $R^2 = 0.9993$,没食子酸浓度在1.0~8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与范围内吸光度线性关系良好。

3.2 总多酚提取工艺条件测定结果

3.2.1 乙醇浓度对总多酚提取率的影响

乙醇浓度对亳芍总多酚的影响如图1所示,随乙醇浓度增加测得的多酚含量也升高,表明总多酚

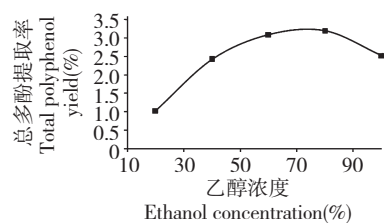


图1 乙醇浓度对亳芍总多酚提取的影响

Fig. 1 The effect of ethanol concentration on the yield of polyphenols

的提取率随乙醇浓度的增高而增加,当浓度超过80%,提取率下降,可能是亳芍中脂溶性非酚类成分在高浓度醇中溶解度升高所致,故选择40%、60%、80%为继续优化亳芍总多酚提取条件的乙醇浓度。

3.2.2 料液比对总多酚提取的影响

亳芍总多酚提取率随料液比的增加而增加(图2),当料液比超过1:35 g/mL时,多酚提取率增加缓慢,但耗费的试剂增多,后处理工作量增大。综合考虑,选择料液比1:15~1:35 g/mL,作为进一步优化提取条件的料液比考察范围。

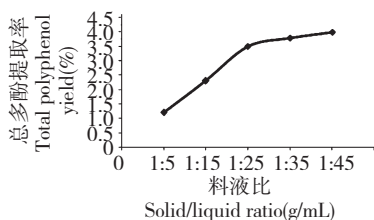


图2 料液比对亳芍总多酚提取的影响

Fig. 2 The effect of solid-liquid ratio on the yield of polyphenols from Bozhou Peony

3.2.3 提取温度对总多酚提取的影响

随着温度的升高,多酚提取率增加,当温度达60℃,提取率最高,然后随着温度的升高多酚的提取率下降(图3),故实验选择50、60、70℃作为进一步优化提取条件的温度范围。

3.2.4 提取时间对总生物碱提取的影响

结果如图4,随提取时间的增加,总多酚提取率

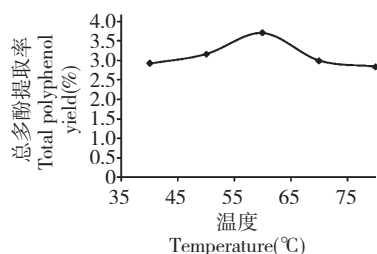


图3 温度对提取亳芍总多酚提取的影响

Fig. 3 The effect of extraction temperature on the yield of polyphenols from Bozhou Peony

增加,而时间为1.5 h时,随着时间推移,提取率增加缓慢甚至有减少的趋势,故选1.0、1.5、2.0 h作为进一步优化提取条件的时间范围。

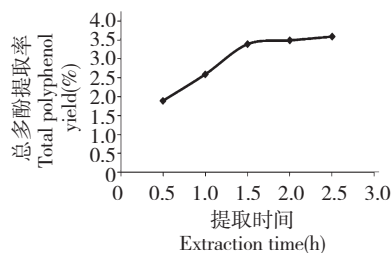


图4 提取时间对亳芍总多酚提取的影响

Fig. 4 The effect of extraction time on the yield of polyphenols from Bozhou Peony

3.2.5 提取工艺优化

根据单因素实验结果,选择每个因素的三个水平(表2),以 $L_9(4^3)$ 正交实验设计对多酚提取工艺进行优化。

表2 因素水平表

Table 2 Levels and factors of orthogonal experiment

水平 Level	A 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	B 料液比 Ratio of solid-liquid (g/mL)	C 提取时间 Extraction time (h)	D 提取温度 Extraction temperature (°C)
1	40	1:15	1.0	50
2	60	1:25	1.5	60
3	80	1:35	2.0	70

正交实验结果如表3所示,在影响多酚提取因素中,对提取率影响由大到小依次为:提取时间(C) > 提取温度(D) > 乙醇浓度(A) > 料液比(B),提取亳芍总生物碱的最佳提取工艺条件为 $A_2B_3C_3D_3$,即乙醇浓度为60%,料液比为1:35 g/mL,提取时间为2.0 h,提取温度为70℃。

3.3 方法评价

3.3.1 精密度实验

取1份1.0 mL没食子酸标准液,按照2.2设定

的方法,重复测定6次,测得吸光度的RSD为2.36%,表明含量测定方法及仪器精密度良好。

3.3.2 稳定性实验

取6份0.1 mL样品液,按照2.2设定的方法,避光放置1、5、10、15、20、25 h,测得吸收度RSD为2.89%,说明实验构建的多酚测定方法稳定性良好。

3.3.3 重复性实验

取6份5.0 g亳芍粉末,按照2.4确定的最佳提取方法提取多酚,按2.2设定的方法测定含量,

表3 正交实验与结果

Table 3 Orthogonal experiment and results

实验号 No.	A	B	C	D	多酚含量 Content of polyphenol (%)
1	1	1	1	1	1.09
2	1	2	2	2	1.53
3	1	3	3	3	3.59
4	2	1	2	3	2.52
5	2	2	3	1	2.55
6	2	3	1	2	2.60
7	3	1	3	2	2.35
8	3	2	1	3	1.39
9	3	3	2	1	1.51
k1	6.21	5.96	5.08	5.51	
k2	7.67	5.47	5.56	6.48	
k3	5.25	7.7	8.49	8.46	
R	2.42	2.23	3.41	2.95	

RSD 为 2.21%,说明实验构建的方法重现性较好。

3.3.4 加标回收实验

取 6 份 5.0 g 亳芍粉末分别加入不同体积的没食子酸标准液,按照 2.4 确定的最佳提取方法提取多酚、按 2.2 设定的方法测定含量,没食子酸的回收率为 $102.8 \pm 4.29\%$ 。

3.4 不同栽培年限亳芍的总多酚含量测定

按 2.4 确定的最佳提取条件,测得栽培 1~7 年的亳芍多酚含量如图 5 所示。可见,不同栽培年限的亳芍总多酚含量明显不同,其中,1 年生亳芍总多酚含量为 $2.63 \pm 0.49\%$;2 年生亳芍总多酚含量达到最高 $3.82 \pm 0.55\%$;3 年开始,随着栽培年限增加,亳芍总多酚含量逐渐下降,多酚含量由三年的 $3.64 \pm 0.64\%$ 下降至栽培 4~7 年的 $2.62 \pm 0.61\%$ 、 $2.51 \pm 0.76\%$ 、 $2.57 \pm 0.87\%$ 、 $2.55 \pm 0.72\%$ 。方差分析显示,栽培 2 年和栽培 3 年亳芍,总多酚含量差

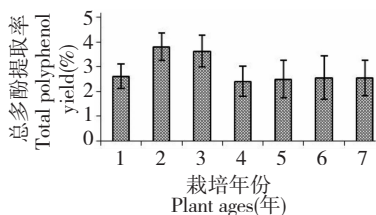


图5 不同栽培年限亳芍总多酚的含量

Fig. 5 The contents of polyphenols from Bozhou Peony of different plant ages

别无统计学意义;栽培 4-7 年亳芍总多酚含量差别无统计学意义,因此,亳芍多酚含量以栽培 2~3 年的含量最高,栽培 3 年后,总多酚含量下降,四年后含量趋于稳定,从总多酚含量角度,栽培年限 2~3 年的亳芍药材品质最好。

4 结论

亳芍中含有较为丰富的多酚类组份。以含水醇为提取剂,其最佳提取工艺条件为:乙醇浓度为 60%,料液比为 1:35 g/mL,提取时间为 2.0,提取温度为 70 °C。在此条件下,测得栽培 1~7 年的亳芍多酚含量依次为: $2.63 \pm 0.49\%$ 、 $3.82 \pm 0.55\%$ 、 $3.64 \pm 0.64\%$ 、 $2.42 \pm 0.61\%$ 、 $2.51 \pm 0.76\%$ 、 $2.57 \pm 0.87\%$ 、 $2.55 \pm 0.72\%$ 。从总多酚含量角度,亳芍栽培 2~3 年药材品质最好。

参考文献

- Zhang XY (张晓燕), Li X (李铤), Gong JH (工金辉). Studies on chemical constituents in *Radix Paeoniae Alba*. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2001, 18: 30-32.
- Lee B, Shin YW, Bae EA, et al. Antiallergic effect of the root of *Paeonia lactiflora* and its constituents paeoniflorin and paeonol. *Arch Pharm Res*, 2008, 31: 445-450.
- Tomoda M, Mastsumoto K, Shimizu N, et al. An acidic poly-

- saccharide with immunological activities from the root of *Paeonia lactiflora*. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17:1161-1164.
- 4 Lee SC, Kwon YS, Son KH, *et al*. Antioxidative constituents from *Paeonia lactiflora*. *Arch Pharm Res*, 2005, 28:775-783.
 - 5 Kim N, Park KR, Par IS, *et al*. Application of novel HPLC method to the analysis of regional and seasonal variation of the active compounds in *Paeonia lactiflora*. *Food Chem*, 2006, 96:496-502.
 - 6 Chen ND(陈乃东), Zhou F(周飞). The primary research of the extracting and assaying of the alkaloids from Bozhou Peony *Paeonia lactiflora*. *Chin J Inf TCM* (中国中医药信息杂志), 2013, 10(20):49-50.
 - 7 Liu YX(刘鹰翔), Ma YZ(马玉卓). Advances on the chemical constituents and pharmacological studies of *Radix Paeoniae Alba*. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 1995, 26:437-440.
 - 8 Gong WF(龚文菲), Wang TS(汪铁山), Lin JM(林敬明). Determination of the content of total polyphenols in the leaves of *Jatropha curcas*. *J Southern Med Univ* (南方医科大学学报), 2010, 30:1321-1322.
 - 9 Xiong HP(熊皓平), Yang WL(杨伟丽), Zhang YS(张友胜), *et al*. A comparative study on the determination method of tooth significantly snake grape polyphenol content. *J Hunan Agric Univ, Nat Sci* (湖南农业大学学报, 自科版), 2001, 27:381-383.
 - 10 Li JX(李巨秀), Li LX(李利霞), Zeng WM(曾王旻), *et al*. Studies on extraction and antioxidant activity of oat polyphenol compounds. *J Chin Instit Food Sci Technol* (中国食品学报), 2010, 10(5):14-21.
 - 11 Pu YH(卜彦花), Zhou NN(周娜娜), Wang CY(王春悦), *et al*. Comparative study on determination of total phenolics content of Jujube fruit with FC and UV-spectrophotometric method. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2012, 2:212-217.
 - 12 Liu SH(刘顺航), Meng XJ(孟宪军), Niu T(牛涛), *et al*. Determination of total polyphenol in grape seeds. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2007, 22:715-716.

(上接第 155 页)

- 3 Guo L, Zhu W, Liu Y, *et al*. Response surface optimized extraction of flavonoids from mimenghua and its antioxidant activities *in vitro*. *Food Sci Biotechnol*, 2013, 22:1285-1292.
- 4 Jiang X, Chen YJ, Shi LG. Optimization of flavonoids extraction from bombyx batryticatus using response surface methodology and evaluation of their antioxidant and anticancer activities *in vitro*. *J Food Sci Technol*, 2013, 22:1707-1715.
- 5 Luo Q(罗群), Li J(李洁), Huang CP(黄春萍). Optimizing ultrasonic extraction process of total flavones from pomegranate peel. *J Southern Agric* (南方农业学报), 2013, 44:1529-1533.
- 6 Shao P, He JZ, Sun PL, *et al*. Analysis of conditions for microwave-assisted extraction of total water-soluble flavonoids from *Perilla Frutescens* leaves. *J Food Sci Technol*, 2012, 49:66-73.