

# 微波辅助提取金银花中绿原酸及其清除 自由基活性初步研究

李永霞, 孙小丽, 何红芳, 杜丽娟, 李满秀\*

(忻州师范学院化学系 忻州 034000)

**摘要:** **目的** 筛选微波辅助提取金银花中绿原酸的最佳工艺; 初步探讨绿原酸清除自由基的活性。**方法** 以金银花中绿原酸含量为考察指标, 考查提取溶剂浓度、料液比、提取时间、微波功率等因素对提取效果的影响。采用正交试验设计优化了最佳提取工艺, 采用 DPPH·法测定不同物质对总自由基的清除作用。**结果** 最佳提取条件为: 乙醇浓度 55%, 料液比 1:40, 提取时间 2 min, 微波功率 520 W。金银花中绿原酸有良好的抗氧化性。**结论** 微波辅助提取金银花中绿原酸的最佳工艺可为其开发应用提供参考。

**关键词:** 微波提取; 金银花; 绿原酸; 抗氧化性

## Preliminary study on microwave-assisted extraction and free radical-scavenging activity of chlorogenic acid in honeysuckle

LI Yong-Xia, SUN Xiao-Li, HE Hong-Fang, DU Li-Juan, LI Man-Xiu\*

(Department of Chemistry, Xinzhou Teachers University, Xinzhou 034000, China)

**ABSTRACT: Objective** To optimize the conditions of the microwave-assisted extraction, and to study the free radical-scavenging activity of chlorogenic acid from honeysuckle. **Method** The extraction yield of chlorogenic acid was investigated, and the effects of ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction time and microwave power on extraction efficiency were analyzed. The optimum conditions of extraction were obtained by the orthogonal experiment design. Scavenging effect of different substances on total DPPH· free radicals were determined. **Results** The optimum extracting conditions of chlorogenic acid from honeysuckle were as follows: ethanol concentration was 55%, solid-liquid ratio was 1:40, extraction time was 2 min and microwave power was 520 W. Chlorogenic acid in honeysuckle had good antioxidant activity. **Conclusion** The optimize conditions of the microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from honeysuckle can provide some reference for the exploitation and application of chlorogenic acid.

**KEY WORDS:** microwave-assisted extraction; honeysuckle; chlorogenic acid; antioxidant activity

## 1 引言

金银花为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或带初开的花

<sup>[1]</sup>, 在中国分布甚广。金银花中含有绿原酸、异绿原酸、肌醇、黄酮、皂素及多酚类物质等<sup>[2]</sup>, 药用历史悠久<sup>[3]</sup>, 为常用的清热解毒药。绿原酸是金银花的主要抗菌成分, 具

基金项目: 山西省重点学科项目(20141010)、忻州师范学院青年科研基金项目

**Fund:** Supported by the Key Disciplines Program in Shanxi Province (20141010) and the Youth Science Fund Project in Xinzhou Teachers University

\*通讯作者: 李满秀, 教授, 主要研究方向为发光分析及功能物质提取。E-mail: lmxxz@sohu.com

\*Corresponding author: LI Man-Xiu, Professor, Department of Chemistry, Xinzhou Teachers University, Xinzhou 034000, China. E-mail: lmxxz@sohu.com

有广泛的生物活性, 有抗菌、抗病毒、止血、提高白血球、缩短血凝和出血时间的作用, 被称为植物黄金。绿原酸除可作医学用途外, 还广泛用于食品保鲜剂、食品添加剂、植物生长激素及一些高级化妆品的添加剂等, 是食品、药品、化妆品等工业的重要原料<sup>[4]</sup>。

绿原酸提取方法主要有浸提法<sup>[5]</sup>、回流法<sup>[5]</sup>、微波提取法<sup>[6-8]</sup>、超声提取法<sup>[9,10]</sup>等。目前比较成熟的提取工艺是前 2 种方法, 但浸提法提取率低, 金银花得不到充分利用, 且浸提剂较难除去; 回流法提高了溶剂的利用率, 但回流时间比较长, 长时间受热会造成提取物中的有效成分部分发生变性, 导致提取物损失。超声提取法、微波提取法提取时间短、提取率较高, 但无法应用于工业化大生产。鉴于此, 本文通过微波辅助提取法对金银花中的绿原酸的提取进行研究, 探讨最佳提取工艺条件及绿原酸清除自由基的活性, 为绿原酸的开发应用提供一定的参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器及材料

LWMC-201 电脑微波化学反应器(南京陵江科技开发有限责任公司); 723 型可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); FW135 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司)。

绿原酸(中国药品生物制品检定所); 槲皮素(中国预防医学科学院劳卫所); 二苯带苦肼基自由基 (DPPH·) 试剂(东京化成工业株式会社); 95% 乙醇(天津化学试剂三厂)。试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 金银花中绿原酸的提取<sup>[11,12]</sup>

金银花经烘干、粉碎(过 100 目筛), 置于干燥器中备用, 采用微波法对金银花中绿原酸进行提取。准确称取粉碎后的金银花 1 g 于容器中, 在 55% 乙醇为溶剂、料液比 1:40, 提取时间 2 min, 微波功率 520 W 的条件下提取, 取出过滤, 将滤液进行减压浓缩, 将浓缩液定容至 100 mL, 测定溶液中绿原酸的含量, 计算得率。

#### 2.2.2 绿原酸含量的测定<sup>[13,14]</sup>

准确移取一定体积的绿原酸标准溶液, 分别加入 0.5 mL 5% NaNO<sub>2</sub> 和 0.5 mL 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 静置 5 min, 再加入 2 mL 1 mol/L NaOH 溶液并用 95% 乙醇定容至 10 mL, 以 95% 乙醇作空白溶液, 在 530 nm 处测定吸光度。绿原酸在 1.7×10<sup>-6</sup>~8.5×10<sup>-5</sup> mol/L 之间线性关系良好, 回归方程为 A=0.0609C+0.0044, r=0.9998。提取液按照上述标准曲线进行测定。

#### 2.2.3 DPPH·法<sup>[15]</sup>测定不同物质对总自由基的清除作用

取不同浓度被测物 2 mL, 再加 2 mL 2.0×10<sup>-4</sup> mol/L 的

DPPH·溶液到 10 mL 比色管中摇匀, 静置 30 min 后, 以被测物作参比, 测定其吸光度 A<sub>样</sub>。同时用无水乙醇作参比, 测定 2 mL 2.0×10<sup>-4</sup> mol/L 的 DPPH·溶液与 2 mL 无水乙醇混合液的吸光度值 A<sub>对</sub>, 根据下面公式计算清除率:

$$\text{清除率} = \frac{A_{\text{对}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{对}}} \times 100\% = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{参比}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样参}})}{A_{\text{对照}} - A_{\text{参比}}} \times 100\%$$

A<sub>参比</sub>: 指加入无水乙醇时的吸光度值; A<sub>对照</sub>: 指加入 DPPH· 的自由基体系的吸光度值; A<sub>样品</sub>: 指加入不同被测物后的吸光度值; A<sub>样参</sub>: 指加入不同被测物, DPPH· 后的自由基体系的吸光度值。

## 3 结果与讨论

### 3.1 单因素实验

#### 3.1.1 乙醇浓度的影响

固定微波功率 520 W、提取时间 2 min、料液比 1:40, 分别考察不同乙醇浓度对绿原酸提取率的影响。由图 1 可见, 乙醇浓度达到 55% 时, 绿原酸的得率最高, 继续提高乙醇浓度绿原酸得率开始下降, 原因是随着乙醇浓度的增大, 使一些脂溶性物质的溶出增加。因此, 确定乙醇浓度为 55%。

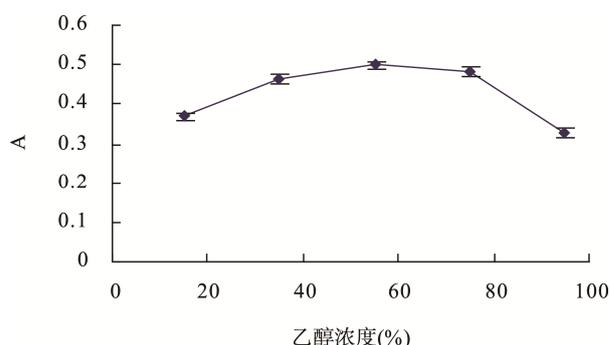


图 1 乙醇浓度对提取效果的影响 (n=3)

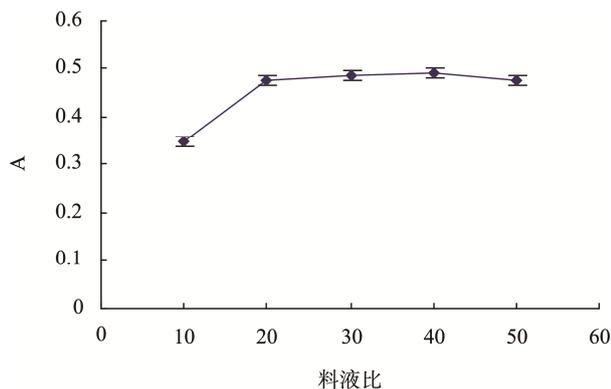
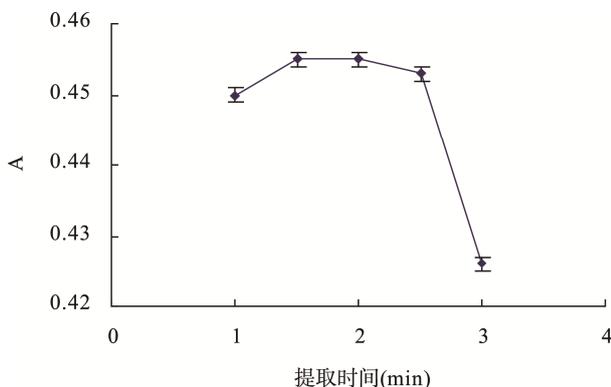
Fig. 1 Effect of ethanol concentration on extraction efficiency (n=3)

#### 3.1.2 料液比的影响

固定微波功率为 520 W、提取时间 2 min、乙醇浓度为 55%, 分别考察料液比为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50(g/mL)对绿原酸提取率的影响。由图 2 可见, 料液比 1:40 为绿原酸得率最高点, 继续增加料液比绿原酸得率变化不明显。选择提取时料液比为 1:40。

#### 3.1.3 提取时间的影响

固定微波功率 520 W、料液比 1:40、乙醇浓度为 55%, 分别考察微波提取时间为 1、1.5、2、2.5、3 min 对绿原酸提取率的影响。由图 3 可见, 提取时间 2 min 时, 绿原酸的得率最高, 再延长提取时间得率明显下降, 选择提取时间为 2 min。

图2 料液比对提取效果的影响( $n=3$ )Fig. 2 Effect of solid-liquid ratio on extraction efficiency ( $n=3$ )图3 提取时间对提取效果的影响( $n=3$ )Fig. 3 Effect of extraction time on extraction efficiency ( $n=3$ )

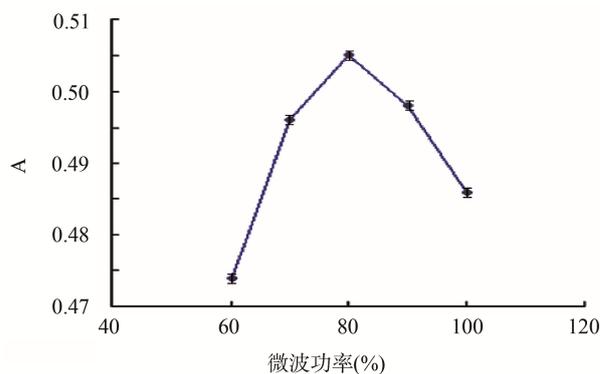
### 3.1.4 微波功率的影响

选取料液比 1:40、乙醇浓度为 55%、提取时间 2 min, 分别考察微波最大输出功率(650 W)的 60%、70%、80%、90%、100%对绿原酸提取率的影响。由图 4 可见, 微波功率达到 80%(520 W)时, 绿原酸的得率最高, 继续增加微波功率绿原酸的得率明显下降, 所以选择微波功率 520 W 提取绿原酸。

## 3.2 正交实验

在单因素试验的基础上, 选取乙醇浓度、料液比、提取时间、微波功率, 利用正交试验分析了四因素三水平对

金银花中绿原酸提取效果的影响(见表 1)。

图4 微波功率对提取效果的影响( $n=3$ )Fig. 4 Effect of microwave power on extraction efficiency ( $n=3$ )

由表 2 数据用极差法分析金银花中提取绿原酸的最佳工艺条件为: 乙醇浓度 55%, 料液比 1:40, 提取时间 2 min, 微波功率 520 W。各因素对提取效果影响的主次顺序为: 乙醇浓度>料液比>微波功率>提取时间。

用多元回归法分析金银花中绿原酸的最佳工艺条件为: 乙醇浓度 54.88%, 料液比 1: 44.54, 提取时间 1.87 min, 微波功率 529 W(见图 5)。

可见多元回归分析法与极差分析法结果基本一致, 但多元回归分析法比极差分析法优化条件更精确。

### 3.3 DPPH·法测定不同物质对总自由基的清除作用

金银花的有效成分有绿原酸和黄酮类化合物等。分别用槲皮素(quercetin)、绿原酸(chlorogenic acid)标准液和金银花提取液比较其抗氧化活性, 结果见表 3。对表 3 分析可知: 槲皮素和绿原酸都能有效地清除总自由基, 清除总自由基的能力大小为: 在  $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.9 \times 10^{-5}$  mol/L 浓度范围内, 槲皮素 > 绿原酸。金银花提取液对总自由基都有明显的清除作用, 并且清除能力与浓度有明显的量效关系, 浓度越大其清除效果越明显。在金银花的抗氧化性能中, 黄酮类化合物和绿原酸都起着重要作用, 其抗氧化性是各种成分协同作用的结果。

表 1 正交试验方案的设定  
Table 1 The orthogonal test scheme

因素水平	乙醇浓度(%)	料液比	提取时间(min)	微波功率(%)
1	35	1:30	1	70
2	55	1:40	2	80
3	75	1:50	3	90

表 2 正交试验结果  
Table 2 The results of orthogonal test

实验号	A 乙醇浓度(%)	B 料液比	C 提取时间(min)	D 微波功率(%)	吸光度(A)	绿原酸得率(%)
1	35	1:30	1	70	0.453	6.5
2	35	1:40	2	80	0.483	7.0
3	35	1:50	3	90	0.475	6.8
4	55	1:30	2	90	0.482	6.9
5	55	1:40	3	70	0.494	7.1
6	55	1:50	1	80	0.504	7.3
7	75	1:30	3	80	0.464	6.7
8	75	1:40	1	90	0.479	6.9
9	75	1:50	2	70	0.476	6.9
$K_1$	1.411	1.399	1.436	1.424		
$K_2$	1.480	1.456	1.442	1.451		
$K_3$	1.420	1.456	1.433	1.436		
$k_1$	0.470	0.466	0.479	0.475		
$k_2$	0.493	0.485	0.481	0.484		
$k_3$	0.473	0.485	0.478	0.479		
D	0.023	0.019	0.003	0.009		
优水平	$A_2$	$B_2$	$C_2$	$D_2$		

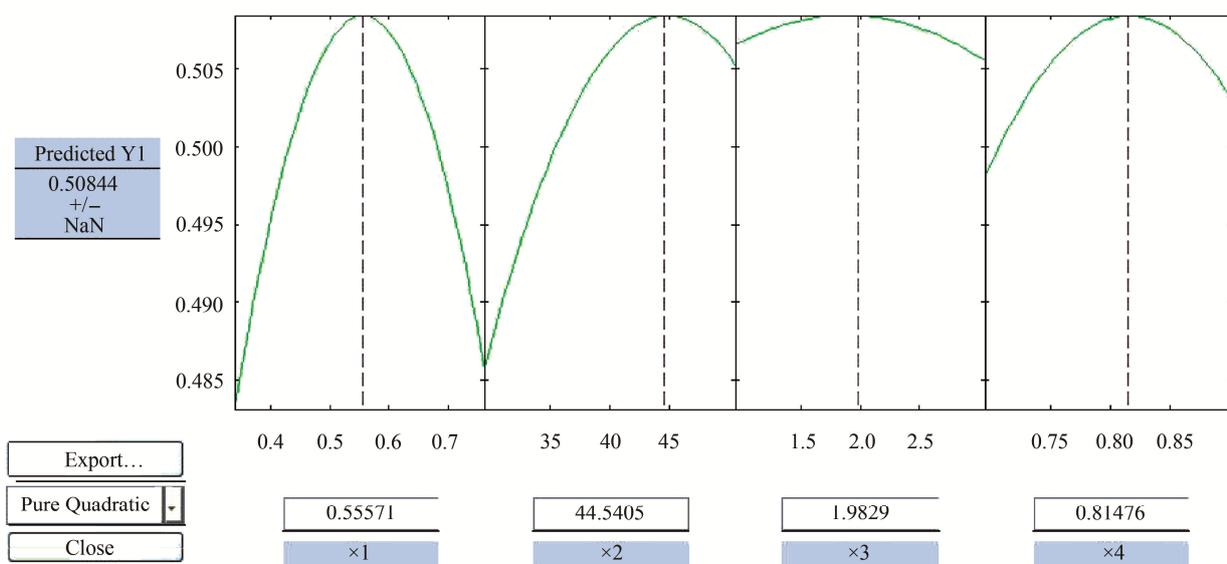


图 5 多元回归法对结果的分析  
Fig. 5 Analysis of the results by multiple regression

表3 DPPH·法测定槲皮素和绿原酸对总自由基的清除率  
Table 3 Determination of total free radical clearance rate of quercetin and chlorogenic acid by DPPH·

	浓度( $10^{-5}$ mol/L)	$A_{530}$	总清除率(%)	$I_{C50}(10^{-5}$ mol/L)
槲皮素	0(对照)	0.437		
	0.01	0.401	8.24	
	0.02	0.363	16.93	
	0.03	0.304	30.43	0.0497
	0.04	0.268	38.67	
	0.05	0.217	50.34	
	0.06	0.161	63.16	
绿原酸	0(对照)	0.437		
	0.19	0.395	9.61	
	0.38	0.358	18.08	
	0.58	0.323	26.09	0.932
	0.67	0.306	29.98	
	0.96	0.212	51.49	
	1.92	0.102	76.66	

#### 4 结 论

与常规提取方法(浸提法、回流法)相比,微波法提取金银花中绿原酸,缩短了提取时间,减少了长时间加热对提取物中绿原酸损失的影响。同时,DPPH·法测定表明,金银花提取液能有效清除总自由基,在本实验条件下清除率达76.16%,具有良好的抗氧化性。

#### 参考文献

- [1] 张卫, 黄璐琦, 李超霞, 等. 金银花品种的本草考证[J]. 中国中药杂志, 2014, 29(12): 2239-2245.  
Zhang W, Huang LQ, Li CX, *et al.* Literature study on species of honeysuckle flower [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2014, 29(12): 2239-2245.
- [2] 杨欣欣, 包永睿, 王帅, 等. 不同采收期金银花药材质量评价研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(6): 1466-1468.  
Yang XX, Bao YR, Wang S, *et al.* Study on the quality evaluation of honeysuckle [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2015, 26(6): 1466-1468.
- [3] 王亚丹, 杨建波, 戴忠, 等. 中药金银花的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(11): 1928-1935.  
Wang YD, Yang JB, Dai Z, *et al.* Research progress on honeysuckle [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(11): 1928-1935.
- [4] 耿敬章, 芦智远. 金银花绿茶复合饮料的工艺优化[J]. 食品工业, 2010, 31(4): 69-70.  
Geng JZ, Lu ZY. Preparation of honeysuckle and green tea compound beverage [J]. *Food Ind*, 2010, 31(4): 69-70.
- [5] 贺义昌, 李湘洲, 旷春桃, 等. 绿原酸和芦丁的提取工艺研究进展[J]. 应用化工, 2011, 40(11): 2001-2003.  
He YC, Li XZ, Kuang CT, *et al.* Research progress on extraction process of chlorogenic acid and rutin from eucommia ulmoides [J]. *Appl Chem Ind*, 2011, 40(11): 2001-2003.
- [6] 李燕婷, 周文富. 金银花中绿原酸的微波辅助提取工艺研究[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(10): 65-69.  
Li Y, Zhou WF. Study on microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from honeysuckle [J]. *Chem Bioeng*, 2011, 28(10): 65-69.
- [7] 李庆龙, 曲有乐, 欧阳小琨. 离子液体微波辅助萃取金银花中绿原酸的研究[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2010, 29(1): 30-33.  
Li QL, Qu YL, Ouyang XK. Application of ionic liquids in microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from honeysuckle [J]. *J Zhejiang Ocean Univ (Nat Sci)*, 2010, 29(1): 30-33.
- [8] 郭振库, 王旭兵. 微波提取技术的研究方向探讨[J]. 材料导报, 2007, 21(11A): 28-30.  
Guo ZK, Wang XB. The discussion on the direction of research in microwave extraction Techniques [J]. *Mater Rev*, 2007, 21(11A): 28-30.
- [9] 肖卓炳, 郭瑞轲, 郭满满, 等. 金银花中绿原酸超声微波双辅助提取工艺优化[J]. 食品科学, 2012, 33(22): 111-114.  
Xiao ZB, Guo RK, Guo MM, *et al.* Optimization of ultrasonic-microwave assisted extraction of chlorogenic acid from flos lonicerae [J]. *Food Sci*, 2012, 33(22): 111-114.
- [10] 宣寒, 谢发之. 响应面法优化金银花中绿原酸的超声提取工艺[J]. 应用化工, 2010, 39(10): 1474-1477.  
Xuan H, Xie FZ. Optimizaton of ultraction of chlorogenic acid from flos lonicerae by response surface methodology [J]. *Appl Chem Ind*, 2010, 39(10): 1474-1477.
- [11] 黄小梅, 邓祥, 吴狄. 金银花中绿原酸的超声波提取工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(2): 41-44.  
Huang XM, deng X, Wu D. Progress optimization of ultrasonic extraction of chlorogenic acid in honeysuckle flower [J]. *Food Res Dev*, 2015, 36(2): 41-44.

- 41-44.
- [12] 尤秀丽, 迟路花, 曹云梅, 等. 响应面法优化微波双辅助提取金银花绿原酸工艺[J]. 食品工业科技, 2014, 35(12): 272-276.  
You XL, Chi LH, Cao YM, *et al.* Optimization of microwave-ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid in honeysuckle using response surface methodology [J]. Food Sci Technol Ind, 2014, 35(12): 272-276.
- [13] 申世刚, 董文静, 周建科. 油炸薯条中酚类抗氧化剂的高效液相色谱法测定[J]. 食品工业科技, 2008, 29(8): 270-271.  
Shen SG, Dong WJ, Zhou JK. Determination of phenolic antioxidants in fried potato by HPLC [J]. Food Sci Technol Ind, 2008, 29(8): 270-271.
- [14] 岳振峰, 蓝芳, 谢丽琪. 气相色谱—质谱法测定 XO 酱中 BHA、BHT 和 TBHQ[J]. 中国粮油学报, 2004, 19(5): 205-207.  
Yue ZF, Lan F, Xie LQ. Determination of BHA, BHT and TBHQ in XO sauce by GC-MS [J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 2004, 19(5): 205-207.
- [15] 胡喜兰, 韩照祥, 陶莹, 等. DPPH·法测定 17 种植物的抗氧化活性[J]. 食品科技, 2006, 27(10): 264-268.  
Hu XL, Han ZX, Tao Y, *et al.* Antioxidant activity detection of 17 plant

samples by using DPPT· method [J]. Food Sci Technol, 2006, 27(10): 264-268.

(责任编辑: 金延秋)

### 作者简介



李永霞, 硕士, 实验师, 主要研究方向为分析化学及食品安全。  
E-mail: 397977874@qq.com



李满秀, 教授, 主要研究方向为发光分析及功能物质提取。  
E-mail: lmxxz@sohu.com

## “果蔬加工与质量安全控制”专题征稿函

随着我国经济的飞速发展, 我国农业发展也迎来新的机遇和挑战。近年来, 通过农业经济结构调整和农业标准化体系建设, 农产品质量有较大提高, 但也存在安全问题, 果蔬是重要的经济作物, 在保证果蔬的营养的同时, 果蔬产品的质量与安全也越来越受到重视, 控制好其质量与安全具有重要的实际意义。

鉴于此, 本刊特别策划了“果蔬加工与质量安全控制”专题, 专题主要围绕果蔬加工(加工前处理、加工新方法、新工艺、新技术等); 果蔬生产控制(农药残留、重金属超标等)和采后控制(加工、包装和储运保鲜等过程中的产品质量控制)等您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2016 年 9 月出版。

本刊主编吴永宁研究员和编辑部特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2016 年 8 月 10 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持! 也谢谢您帮忙转发, 祝好! 盼回复!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsqq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部