

# 应用正交设计优化甘薯叶绿原酸提取工艺研究

李 光<sup>1</sup>, 余 霜<sup>2</sup>

(1. 安顺学院 农学院, 贵州 安顺 561000; 2. 安顺学院 资源与环境工程学院, 贵州 安顺 561000)

**摘 要:**以甘薯叶为试材,通过 5 因素 4 水平正交实验设计的方法,考察了不同酒精浓度、料液比、pH 值、提取次数、提取时间对甘薯叶绿原酸提取的影响。结果表明:影响绿原酸提取的主要因素为酒精浓度>提取次数>料液比>pH 值>提取时间;最佳提取工艺为 30%乙醇、料液比 1:20 g/mL、pH 5.0,提取 4 次,每次提取时间 90 min。验证试验提取获得的绿原酸含量为 3.517%,优于正交实验最佳提取获得的含量,表明该实验获得的最佳方案提取量稳定,提取效率高。

**关键词:**甘薯叶;绿原酸;提取工艺;正交设计

**中图分类号:**S 531 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0119-03

红薯属旋花科一年生或多年生蔓生草本植物,又称番薯、山芋、甘薯、地瓜等。红薯起源于墨西哥以及哥伦

比亚、厄瓜多尔到秘鲁一带的热带美洲,16 世纪末从南洋引入我国<sup>[1]</sup>。在我国,红薯是仅次于水稻、小麦和玉米的第四大粮食作物。甘薯全身都可以被利用,甘薯块根可以被人们食用,根茎叶还是优良的饲料,营养价值极高,据中国预防医学科学院检测,甘薯茎叶与菠菜、胡萝卜等 14 种蔬菜相比,在 14 种营养成分中,甘薯茎叶的蛋白质、微量元素、维生素等 13 项指标均居首位<sup>[2]</sup>,尤为重要是甘薯茎叶提取物富含活性多糖和绿原酸类化

**第一作者简介:**李光(1980-),男,博士,副教授,研究方向为植物学及作物遗传育种。E-mail:lg20029@126.com.

**基金项目:**贵州省农业攻关资助项目(黔科合 NY 字[2010]3014);贵州省教育厅科技创新人才支持计划资助项目(黔教合 KY 字[2013]148)。

**收稿日期:**2014-01-17

[3] 赵统利,周翔,朱朋波,等.百合花粉生活力测定方法的比较研究[J].江苏农业科学,2006(5):143.

[4] 左丹丹,明军,刘春,等.植物花粉生活力检测技术进展[J].安徽农业科学,2007,35(16):4742-4745.

[5] 贾文庆,刘会超,姚连芳.紫薇花粉萌发特性研究[J].西北林学院学报,2007,22(6):18-20.

[6] 马书燕,郑亚军,凌燕,等.紫荆栽培管理技术[J].现代农业科技,2007(2):33.

[7] Shivanna K R, Linskens H F. Pollen vitality and pollen vigor[J]. Theor Appl Genet Springer Verlag, 1991, 81(1): 38-42.

[8] 金爱红,储立民,徐东青,等.钙对葱兰花粉萌发和花粉管生长的影响[J].湖北农业科学,2005(3):91-93.

[9] Akhond M A Y, Molla M A H, Islam M O, et al. Cross compatibility between *Abelmoschus esculentus* and *A. moschatus*[J]. Euphytica, 2000, 114(3):175-180.

## Study on the Determination of *Cercis chinensis* Pollen Viability and Its Storage Method

LI Rong

(Henan Xinji Landscape Company, Xinxiang, Henan 453003)

**Abstract:** Taking fresh pollen of *Cercis chinensis* as material, pollen viability was tested by some methods including culture *in vitro*, I<sub>2</sub>-KI staining, carmine acetate dyeing and TTC, in order to study characteristics of pollen germination and the suitable method of pollen storage. The results showed that culture media with different concentration of sucrose and boric acid had good effect on the pollen germination. The pollen germination rate reached 88.64% after cultured on the media supplemented with 15% sucrose, 0.004% boric acid and 0.08% agar. I<sub>2</sub>-KI staining and TTC staining were not suitable for testing pollen viability of *Cercis chinensis*, carmine acetate dyeing could be used to test pollen viability of *Cercis chinensis*. Pollen vitality decreased as time gone on, 4°C dry storage was the best storage condition to keep the vitality of pollen. Pollen could be stored over 26 d with significant viability.

**Key words:** *Cercis chinensis* Bunge; pollen; germination; viability; pollen storage

合物。但是由于甘薯茎叶食味苦涩,质地老化,有大量绒毛等影响口感的因素存在,导致我国对甘薯茎叶的加工利用极少,一般只用作饲料,大部分茎叶被作为废弃物抛弃,造成资源浪费和环境污染。

绿原酸具有显著的清热解毒、抗菌消炎和抗衰老等作用,绿原酸是许多药材的有效成分,并已成为某些中药制剂质量控制的重要指标。除了药用外,绿原酸还可作为食品和果品的保鲜剂应用于食品工业。目前,有关绿原酸的研究主要以金银花和杜仲为材料,以甘薯叶为原料提取绿原酸的报道相对较少,在当前金银花、杜仲资源日益紧俏的情况下,甘薯茎叶资源却被当做废弃物丢弃,造成了资源的极大浪费。因此,如果能够对甘薯叶含有的绿原酸资源加以开发利用,无疑将产生巨大的社会效益和经济效益。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试甘薯叶购置于贵州省贵阳市煤矿村农贸市场,绿原酸标准品;甲醇、乙腈为色谱纯;无水乙醇、磷酸为分析纯。

Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent 公司),DHG-90A(101AB)干燥箱(上海索谱仪器有限公司),AR1140 电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司),WB-400 小型高速粉碎机(北京维博创机械设备有限公司),TDL-5C 型低速台式离心(上海安亭科学仪器厂),AKJY-20 超纯净水机(艾柯),PHS-3C 型酸度计(上海虹仪仪器有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 绿原酸提取液制备 甘薯叶洗净晾干后,取 100 g 红薯叶 60℃烘至恒重,粉碎后过直径 0.42 mm 的筛,准确称取 3.0 g 干粉,提取 2 次,每次获得的提取液 2 000 r/min 离心 1 min,合并提取液即为绿原酸提取液。

1.2.2 正交实验 采用  $L_{16}(4^5)$  正交表进行正交实验,考察酒精浓度、料液比、pH 值、提取次数、提取时间等 5 项指标及其水平对甘薯叶绿原酸提取的影响(表 1)。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factor				
	酒精浓度 Alcohol concentration/%	料液比 liquid ratio /g · mL <sup>-1</sup>	pH 值 pH value	提取次数 Extracting times/次	提取时间 Distilled time/min
1	0	1:10	3	1	30
2	30	1:20	4	2	60
3	60	1:30	5	3	90
4	90	1:40	6	4	120

1.2.3 绿原酸含量的测定 准确称取薯叶粉末 2.00 g,按正交实验方案提取,提取液用旋转蒸发仪浓缩后,用 50%乙醇洗入 50 mL 容量瓶中,定容后测量并计算绿原酸含量。绿原酸含量的测定采用高效液相法<sup>[3]</sup>,  $C_{18}$  色谱

柱(5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 250.0 mm);流动相:乙腈-0.2%磷酸水溶液(8:92,V/V);流速 1.2 mL/min;柱温 25℃;检测波长 327 nm。

## 2 结果与分析

### 2.1 正交实验结果

由表 2、3 可知,酒精浓度对甘薯叶绿原酸提取的影响达到极显著水平,提取次数对甘薯叶绿原酸提取的影响达到显著水平,料液比、pH 值和提取时间对甘薯叶绿原酸提取的影响不显著,作用强弱依次为酒精浓度>提取次数>料液比>pH 值>提取时间,最佳组合为  $A_2B_2C_3D_4E_3$ ,故甘薯叶提取的最佳工艺为采用 30%浓度的酒精溶液,料液比 1:20 g/mL,pH 值 5,提取 4 次,每次提取 1.5 h。

表 2 正交实验结果

Table 2 The results of orthogonal experiment

试验号 Number	A 酒精浓度 Alcohol concentration /%	B 料液比 Material liquid ratio /g · mL <sup>-1</sup>	C pH 值 pH value	D 提取次数 Extracting times /次	E 提取时间 Distilled time /min	绿原酸含量 Chlorogenic acid content /%
1	0	1:10	3	1	30	0.327
2	0	1:20	4	2	60	2.214
3	0	1:30	5	3	90	2.696
4	0	1:40	6	4	120	2.465
5	30	1:10	4	3	120	2.549
6	30	1:20	3	4	90	3.388
7	30	1:30	6	1	60	1.836
8	30	1:40	5	2	30	2.864
9	60	1:10	5	4	60	2.570
10	60	1:20	6	3	30	2.507
11	60	1:30	3	2	120	2.193
12	60	1:40	4	1	90	1.585
13	90	1:10	6	2	90	0.537
14	90	1:20	5	1	120	0.704
15	90	1:30	4	4	30	1.249
16	90	1:40	3	3	60	0.600
K1	1.926	1.496	1.627	1.113	1.737	
K2	2.659	2.203	1.899	1.952	1.805	
K3	2.214	1.994	2.209	2.088	2.051	
K4	0.773	1.878	1.836	2.418	1.978	
R	1.886	0.707	0.582	1.305	0.314	

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

因素 Factor	偏差平方和 Quadratic sum	自由度 Degrees of freedom	F 值 F value	F 临界值 Critical value of F	显著性 Significance
酒精浓度	7.787	3	30.182	29.500	**
料液比	1.058	3	4.101	29.500	
pH 值	0.695	3	2.694	29.500	
提取次数	3.702	3	14.349	29.500	*
提取时间	0.258	3	1.000	29.500	
误差	0.26	3			

注:“\*”表示在  $\alpha=0.01$  水平具显著性。“\*”表示在 0.05 水平具有显著性。

Note:“\*” mean very significant difference at 0.01 level. “\*” mean significant difference at 0.05 level.

## 2.2 验证试验

对正交实验所得优化提取工艺条件进行验证试验,重复3次,得到绿原酸含量为3.517%。验证试验优于正交实验提取获得的含量,表明正交实验获得的最佳方案提取量稳定,提取效率高。

## 3 讨论

该试验研究考察了酒精浓度、料液比、pH值、提取次数、提取时间等5项指标及其水平对甘薯叶绿原酸提取的影响。结果表明有4个指标分别在该试验设定的水平内均达到最大的作用效果,只有提取次数这个指标随着次数的增加而递增,表明随着提取次数的增加从甘薯叶中提取出的绿原酸量也增加,有利于绿原酸的提取,但是提取次数的增加也预示着获得的提取液也相应增加,加大了后期处理的难度。另外,孟辉等<sup>[4]</sup>研究确定的甘薯茎叶中绿原酸提取的最优工艺为提取2次,与该研究确定的红薯叶提取最优工艺不同,这可能是由于红薯叶产地不同造成的,因此,需要对不同产地的红薯茎叶绿原酸提取工艺进行综合比较,找到一个较为通用的红薯茎叶绿原酸提取工艺。

通过该研究的结果与其它相关报道比较发现,贵州产甘薯叶绿原酸的含量高于“湘福1号”和“济薯”,与“渝薯263”相当,低于“京薯”、“川山紫”等品种<sup>[5]</sup>,这可能是因为贵州省的地理位置与重庆市相距较近,甘薯品种、气候和地理位置也相似的缘故造成的,而“京薯”、“川山紫”为紫薯品种,它们的叶子中含有更高的绿原酸。同时该研究确定pH 5.0为甘薯绿原酸提取的最适pH值,与张冕等<sup>[6]</sup>确定的甘薯绿原酸提取液pH为9.5的结论

相差较大,与向昌国等<sup>[7]</sup>研究确定的提取液pH为4.0的结论相似,因此,红薯茎叶绿原酸所用提取液pH值还需要进一步的研究确定。

由于绿原酸有很强的抗菌作用,其具有良好的发展前景。从已有报道发现,甘薯叶绿原酸含量要低于金银花和杜仲中的绿原酸含量,但是甘薯产地众多,红薯叶容易获取、价格低廉<sup>[8-10]</sup>,因此,从红薯叶中提取绿原酸具有较好的应用前景。

## 参考文献

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1979, 64(1): 88-90.
- [2] 甘学德, 黄洁. 菜用型甘薯的研究概况及发展对策[J]. 热带农业科学, 2009(9): 29-33, 45.
- [3] 雒淑珍, 雷耀湖, 赵继荣, 等. HPLC法测定金银花中绿原酸含量[J]. 现代农业科技, 2011(17): 41-42.
- [4] 孟辉, 于艳. 甘薯茎叶中绿原酸提取工艺的研究[J]. 辽东学院学报(自然科学版), 2012(1): 1-4.
- [5] 李鑫, 王征. 高效液相色谱法测定甘薯叶中绿原酸含量[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2009(2): 130-132.
- [6] 张冕, 胡小莲, 姚芳芳. Box-Behnken实验设计法优化红薯叶中绿原酸的提取工艺[J]. 德州学院学报, 2013(4): 56-60.
- [7] 向昌国, 李文芳, 聂琴, 等. 甘薯茎叶中绿原酸提取方法的研究及含量测定[J]. 食品科学, 2007(1): 126-130.
- [8] 郑锡任, 张龙, 陈勇, 等. 不同采收期山绿茶药材绿原酸和芦丁的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013(18): 65-67.
- [9] 肖卓炳, 郭瑞珂, 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(22): 111-114.
- [10] 王茜, 李智, 何琦, 等. 杜仲叶中绿原酸提取分离工艺条件的研究[J]. 离子交换与吸附, 2008(1): 73-80.

## Study on Extraction Technology for Chlorogenic Acid From Sweet Potato Leaves by Orthogonal Design

LI Guang<sup>1</sup>, YU Shuang<sup>2</sup>

(1. College of Agronomy, Anshun University, Anshun, Guizhou 561000; 2. College of Resources and Environmental Engineering, Anshun University, Anshun, Guizhou 561000)

**Abstract:** Using sweet potato leaves as material, the effect of 5 factors (different alcohol concentration, material liquid ratio, pH value, extracting times, distilled time, chlorogenic acid content) to extraction of chlorogenic acid from sweet potato leaves were studied through the orthogonal test. The results showed that the effect of each factor on the extraction of chlorogenic acid order were as follows: alcohol concentration > extraction times > materials-liquid ratio > pH value > distilled time. The optimal parameters were alcohol concentration 30%, liquid material ratio 1 : 20 g/mL, pH value 5.0, extracting times four times, distilled 90 minutes. The content of chlorogenic acid extracted from sweet potato leaves by the optimum extracting technology reached to 3.517%. The optimum technology was feasible and the content of chlorogenic acid extracted from sweet potato leaves by the optimum extracting technology was higher.

**Key words:** sweet potato leaves; chlorogenic acid; extraction technology; orthogonal design