

微波辅助提取石蒜和虎杖中有效成分的热力学机理研究

范华均^{1,2}, 林广欣¹, 肖小华¹, 李攻科¹

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275; 2. 广东药学院药科学院, 广州 510006)

摘要 采用微波辅助提取(MAE)技术研究了石蒜和虎杖两种不同植物中石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏以及白藜芦醇和大黄素提取过程的热力学机理. 以溶剂回流提取方法(SRE)作为对比, 采用一种简单的测定提取分配系数的方法, 计算了这些组分在两种提取过程中的热力学函数 ΔH^0 , ΔS^0 和 ΔG^0 , 对其化学结构与极性以及在 MAE 过程中的热力学行为进行了讨论, 并用扫描电镜法观察了 MAE 和 SRE 提取后样品的细胞结构. 结果表明, 石蒜和虎杖的提取是一个吸热熵增的过程, 微波的作用导致石蒜和虎杖细胞结构发生显著变化, 使 MAE 热力学函数变化较大, 其提取过程的热力学行为特征与 SRE 明显不同, 但提取效率提高.

关键词 微波辅助提取; 热力学; 机理; 石蒜; 虎杖

中图分类号 O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)12-2271-06

自 Ganzler^[1,2] 首次将微波辅助提取技术(MAE)应用于植物样品的提取, 由于 MAE 具有加热快速、高效节能及提取效率高等特点, 因而在天然植物有效成分提取中越来越受到重视^[3,4], 但涉及其作用机理的研究报道较少. Pare 等^[5,6] 提出细胞破壁机理认为, MAE 提取效率高是由于细胞中的水分等极性物质吸收了微波, 细胞内压力增大并迅速膨胀, 使细胞壁破坏, 导致内容物流出, 从而加速了被提取组分的溶解扩散. Lay-Keow 等^[7] 在研究烟草中尼古丁的提取机制时认为, 水分含量对提取率的影响是由于微波引起细胞破壁所致; 李核等^[8] 用扫描电镜发现 MAE 可导致虎杖细胞破壁, 且提取效率明显高于索氏提取法; 但用透射电镜观察微波提取后的阔叶十大功劳叶、葛根和刺五加及银杏叶时发现, 细胞仅发生质壁分离, 细胞壁依然完整^[9,10]. 由于受诸多因素的影响, 目前大多数的研究仅限于提取条件的优化, 对于 MAE 的热力学机理的研究尚未见文献报道.

石蒜(*Lycoris radiata*)和虎杖(*Rhizma Polygoni Cuspidati*)是两种重要的中药材, 它们分别属于石蒜科和蓼科类植物. 石蒜中含有的石蒜碱、加兰他敏和力可拉敏是重要的乙酰胆碱酶抑制剂, 且具有抗肿瘤等作用; 而虎杖含有丰富的活性成分白藜芦醇和大黄素等, 大黄素是临床上广泛使用的强抗茵剂, 白藜芦醇则是一种抗毒剂, 具有抗癌、预防和治疗心血管疾病、抗氧化及抗衰老等作用^[11].

本文选择这两种不同类型的植物作为研究对象, 研究其在 MAE 过程中各组分的热力学过程; 通过与常规的溶剂回流提取法(SRE)对比, 研究了不同提取方式对提取过程的影响; 在此基础上计算各种组分的分配系数 K 、焓变、熵变和自由能变化等热力学函数, 旨在了解这些组分在 MAE 提取过程中的热力学机理, 探讨它们的热力学行为与其化学结构的关系, 为 MAE 提取植物中有效成分的研究和工艺改进提供了理论依据.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

MARX-X 微波炉(美国 CEM 公司), 带有光纤温度监测探头, 可实时监控提取温度; LC-2010C 液

收稿日期: 2006-01-18.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20375050)和国家重点基础研究发展规划项目(批准号: G2000026302)资助.

联系人简介: 李攻科(1963年出生), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事现代分离分析、中草药提取分离技术及色谱分析等研究.

E-mail: cesgkl@mail.sysu.edu.cn

相色谱仪(日本岛津公司); XMTA 数显恒温水浴(余姚市远东数控仪器厂)。

所用试剂有石蒜碱、加兰他敏、白藜芦醇和大黄素(Sigma 公司)和力可拉敏(广东天普药业有限公司提供)标准品; 还有体积分数为 95% 的乙醇(分析纯)。

1.2 实验过程

将干燥的石蒜鳞茎和虎杖的根茎粉碎, 过筛. 称取 2.0 g 80 目样品于萃取灌中, 加入 30 mL 95% 的乙醇, 盖上罐盖, 置于 MAR-X 微波炉中. 调节微波功率为 300 W, 搅拌速度为 460 r/min, 在一定温度下分别进行提取, 提取温度由仪器自带的光纤温度探头监测. 提取液通过 0.45 μm 滤膜后, 采用 HPLC 法测定各组分的含量^[12].

各组分的提取率按下式计算:

$$\text{提取率}(\text{mg/g}) = \frac{\text{提取液浓度} \times \text{提取液体积}}{\text{样品质量}} \times 100\%$$

1.3 提取过程的热力学计算理论基础

在中药提取过程中, 首先溶剂向细胞渗透, 细胞内的组分由内向外扩散, 继而溶解于溶剂中. 由于细胞内组分的化学势大于溶剂的化学势, 即 $\mu_{\text{B}}(\text{s}) > \mu_{\text{B}}(\text{l})$, 在传质过程中细胞中的组分自由能减少, 溶剂中组分的自由能增加, 两相中自由能变化的总和即是整个提取体系自由能的变化, 传质过程的 ΔG^0 将随着固-液两相组分的浓度分配而变化^[13, 14].

$$\mu_{\text{B}}(\text{s}) = \mu_{\text{B}}^0(\text{s}) + RT \ln c_{\text{B}}(\text{s}) \quad (1)$$

$$\mu_{\text{B}}(\text{l}) = \mu_{\text{B}}^0(\text{l}) + RT \ln c_{\text{B}}(\text{l}) \quad (2)$$

式中 $\mu_{\text{B}}(\text{s})$, $\mu_{\text{B}}^0(\text{s})$, $\mu_{\text{B}}(\text{l})$, $\mu_{\text{B}}^0(\text{l})$, $c_{\text{B}}(\text{s})$ 和 $c_{\text{B}}(\text{l})$ 分别为组分在实验提取温度下固相的化学势、固相标准化学势、液相的化学势、液相标准化学势、组分在固相和在液相中的浓度. 当达到平衡时, 即 $\mu_{\text{B}}(\text{s}) = \mu_{\text{B}}(\text{l})$ ^[13], 则

$$K = \frac{c_{\text{B}}(\text{l})}{c_{\text{B}}(\text{s})} = \exp\left[\frac{\mu_{\text{B}}^0(\text{l}) - \mu_{\text{B}}^0(\text{s})}{RT}\right] \quad (3)$$

式中 K 为组分的分配系数, 是与温度和压力有关的热力学常数.

在 MAE 过程中, 由于较难直接测定固相中组分的浓度, 因此采用下式计算:

$$K = \frac{c_{\text{B}}(\text{l})}{c_{\text{B}}(\text{s})} = \frac{c_{\text{B}}(\text{l})}{c_{\text{T}} - c_{\text{B}}(\text{l})} = \frac{c_{\text{B}}(\text{l})}{\sum c_{\text{B},i}(\text{l}) - c_{\text{B}}(\text{l})} \quad (4)$$

其中 c_{T} 为组分在两相中的总浓度, $c_{\text{B},i}$ 为在第 i 次提取液中的浓度. 当达到平衡时提取液中组分的浓度 $c_{\text{B}}(\text{l})$ 用 HPLC 直接测定, 固定相中组分浓度为组分 c_{T} 与 $c_{\text{B}}(\text{l})$ 之差, 在理论上经过无限多次提取后 $\sum c_{\text{B},i}(\text{l}) \approx c_{\text{T}}$. 实验中经 6 次提取后检测不到提取液中待测组分时, 组分的总浓度近似等于各次提取的组分浓度之和, 从而可计算出组分的分配系数.

在密闭式微波辅助提取的恒温恒压过程中, 自由能变化 ΔG^0 由以下公式计算^[14]:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (5)$$

在一定的温度范围内提取达到平衡时, 提取焓变 ΔH^0 及熵变 ΔS^0 可由 van't Hoff 方程计算^[14]:

$$\ln K = -(\Delta H^0/RT) + (\Delta S^0/R) \quad (6)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (7)$$

根据式(6)作 $\ln K \sim (1/T)$ 图, 直线斜率和截距分别为 $-\Delta H^0/R$ 和 $-\Delta S^0/R$, 根据式(5)~式(7)可计算出提取过程的 ΔH^0 , ΔS^0 和 ΔG^0 .

2 结果与讨论

2.1 提取温度和提取时间的影响

在 MAE 提取中, 提取温度和提取时间是组分热力学行为中最重要的因素, 直接影响组分的提取率. 经过筛选, 以 95% 乙醇作为提取溶剂, 在 50~90 $^{\circ}\text{C}$ 下对样品提取 1~30 min, 实验结果见图 1.

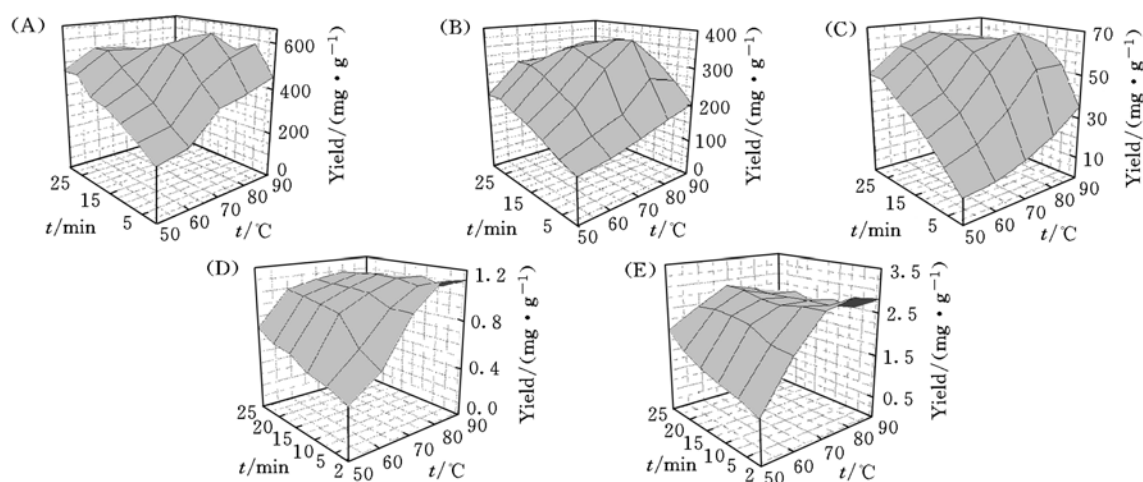


Fig. 1 The effects of extraction temperature and time on the MAE yields

(A) Lycorine; (B) lycoramine; (C) galanthamine; (D) resveratrol; (E) emodin.

在 MAE 提取过程中,不同温度下各组分达到分配平衡的时间不同.提高提取温度和延长提取时间均使体系可吸收更多的微波能,促进组分的扩散传质达到提取平衡.在温度低于 80 °C 时组分的提取率随温度和提取时间的增加而增大;当提取温度高于 80 °C 时,大黄素和白藜芦醇的提取率几乎不再增加,但在 80 °C、提取时间超过 10 min 时,石蒜生物碱的提取率减小,这可能是由于较高的温度和较长的提取时间使石蒜生物碱发生了分解所致.实验结果表明,这两种不同类型的植物由于基体和组分性质的差异表现出不同的提取行为特征:石蒜和虎杖的适宜提取温度均为 80 °C,但最佳的提取时间却分别为 10 和 2 min.虎杖中组分所需的提取时间比石蒜的短,且有相对稳定的提取率区间,表明微波的作用更易使虎杖中的组分摆脱细胞组织的束缚被提取出来.

2.2 MAE 提取的焓变 ΔH^0 和熵变 ΔS^0

将 MAE 与 SRE 法进行对比研究,按实验方法进行提取和测定,通过式(4)计算不同提取温度下各组分的分配系数 K ,并由 van't Hoff 方程式绘制 $\ln K \sim (1/T)$ 曲线[MAE 法的 $\ln K \sim (1/T)$ 曲线见图 2],分别计算各组分在 MAE 和 SRE 提取过程中的 ΔH^0 和 ΔS^0 ,结果见表 1.

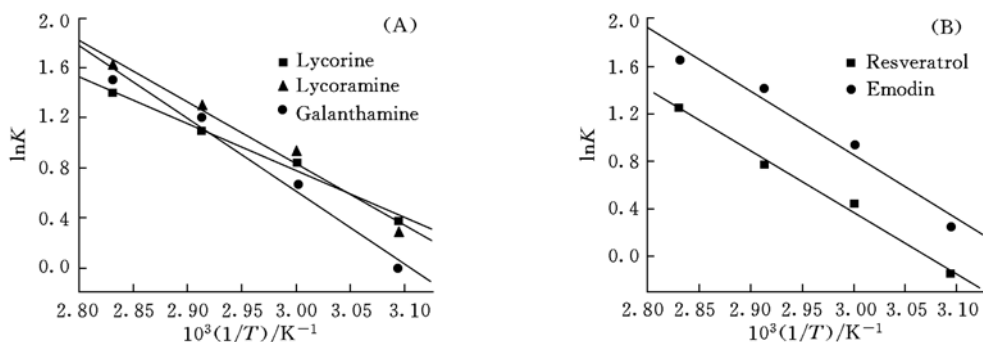


Fig. 2 The relationship of $\ln K$ against $1/T$ in MAE

(A) *Lycoris radiata* Herbert: $\ln K = -3770.7/T + 12.087$, $r = 0.9912$ for lycorine, $\ln K = -5831.7/T + 18.111$, $r = 0.9908$ for lycoramine, $\ln K = -4938.6/T + 15.650$, $r = 0.9903$ for galanthamine; (B) *Rhizma Polygoni Cuspidati*: $\ln K = -5142.4/T + 15.799$, $r = 0.9953$ for resveratrol, $\ln K = -5332.3/T + 16.851$, $r = 0.9846$ for emodin.

Table 1 The calculated results of enthalpy and entropy changes

Compound	MAE		SRE	
	$\Delta H^0 / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S^0 / (\text{J} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H^0 / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S^0 / (\text{J} \cdot \text{mol}^{-1})$
Lycorine	31.35	100.51	26.56	84.24
Lycoramine	48.48	150.57	23.71	74.46
Galanthamine	41.06	130.11	26.36	80.03
Resveratrol	42.75	131.35	17.63	55.39
Emodin	44.33	140.10	16.25	51.44

由表 1 结果可见, 几种组分的 ΔH^0 和 ΔS^0 均大于零, 表明 MAE 和 SRE 均为吸热熵增加的过程, MAE 的 ΔH^0 和 ΔS^0 明显大于 SRE 的 ΔH^0 和 ΔS^0 . 由于在提取过程中压力 p 和体积 V 的改变很小, ΔH^0 近似地等于组分提取能 $\Delta E^{0[13]}$, 即

$$\Delta H^0 = \Delta E^0 + \Delta(pV) \cong \Delta E^0 \quad (8)$$

对于同样的提取体系, ΔE^0 的差异意味着提取过程的不同. 在 MAE 过程中, 体系的能量来自于极性分子吸收微波能, 并立即将其转化为热能, 加速了分子的热运动(即所谓的“体加热”), 且细胞内外的分子热传递是双向的, 这明显不同于 SRE 由外向内的单向热传递方式, 因此热效率大大提高; 高频的微波场对细胞内分子的作用使细胞结构发生变化, 所需的能量更多, 因而组分在 MAE 过程中的 ΔE^0 明显大于 SRE 的 ΔE^0 . MAE 的这种影响同时也使分子的混乱度增大, 熵增加 ΔS^0 更大, 有利于分子扩散传质. 与 MAE 相比, SRE 仅依赖于外部溶剂的热对流传递, 热效率相对较低, 分子的热运动对细胞结构的影响小, 其 ΔE^0 和 ΔS^0 也较小.

2.3 MAE 提取的自由能变化 ΔG^0

ΔG^0 可表征一个过程是否属于自发过程. MAE 和 SRE 提取石蒜和虎杖组分过程中的 ΔG^0 计算结果列于表 2.

Table 2 The calculated results of Gibbs energy change [$\Delta G^0 / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$]

$t / ^\circ\text{C}$	Lycorine		Lycoramine		Galanthamine		Resveratrol		Emodin	
	MAE	SRE	MAE	SRE	MAE	SRE	MAE	SRE	MAE	SRE
50	-1.108	-0.676	-0.154	-0.353	-0.967	-0.499	-0.324	-0.385	-0.922	-0.440
60	-2.113	-1.518	-1.660	-1.097	-2.268	-0.302	-0.990	-0.754	-2.323	-0.771
70	-3.118	-2.360	-3.166	-1.842	-3.569	-1.102	-2.303	-1.213	-3.724	-1.388
80	-4.123	-3.203	-4.671	-2.587	-4.870	-1.902	-3.617	-1.920	-5.125	-2.013
90	-2.157	-1.981	-2.171	-1.857	-3.066	-1.516	-2.332	-1.520	-3.155	-1.851

从表 2 可知, 随着温度的增加, ΔG^0 变小, 说明相对于提取过程所需要的能量 ΔH^0 , 熵变 ΔS^0 的增加更为显著; 各组分在 MAE 和 SRE 提取过程中的 $\Delta G^0 < 0$, 表明石蒜和虎杖在实验温度下的提取过程是一个自发过程. 与 SRE 相比, 各组分在 MAE 过程中的 ΔG^0 更小, 意味着微波对体系的作用显著, 表明采用 MAE 法提取这些组分比 SRE 更容易进行. 因为 SRE 仅提供了提取所需要的能量, 而 MAE 的微波加热效应不仅提供了组分被提取所需要的能量, 而且在高频的微波场中有利于 ΔS^0 的增加.

提取温度对各个组分 ΔG^0 的影响如图 3 所示, $\Delta G^0 \sim t$ 曲线在 80 $^\circ\text{C}$ 明显出现拐点, 超过 80 $^\circ\text{C}$ 时 ΔG^0 均有不同程度的增大, 这意味着提取过程发生了新的化学变化. 分析结果表明, 其提取液中各组分的浓度均减小, 且提取时间越长, 浓度越低, 采用 SRE 法也发现同样的现象, 因此应避免在高温下长时间提取.

2.4 化学结构的影响

从表 1 和表 2 可知, 组分的热力学函数在数值上相差较大; 分子极性较强, 其 ΔH^0 和 ΔS^0 值却相对较小, 这可能与它们的化学结构有关.

如图 4 所示, 3 种石蒜生物碱均含有氨基、羟基和烷氧基等极性基团, 力可拉敏和加兰他敏还含有羰基. 根据它们的化学结构和在 GC, HPLC 色谱柱上的保留行为, 其极性大小依次为石蒜碱 > 力可拉敏 > 加兰他敏. 两种虎杖组分除各含有 3 个羟基外, 大黄素还含有 2 个羰基, 化学结构对称, 极性比白藜芦醇小, 在反相 HPLC 中要求洗脱溶剂的极性更小. 在 MAE 中, 由于这些组分具有的极性能够吸收微波, 并与溶剂极性分子在微波场作用下一起高速旋转和摆动. 极性越强, 这种分子运动越剧烈,

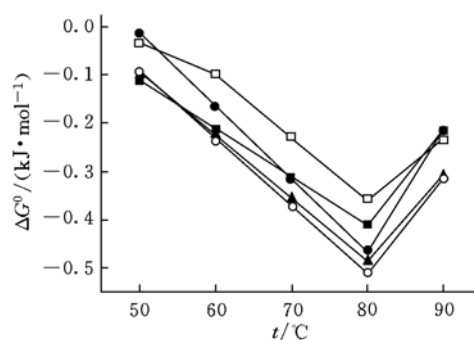


Fig. 3 The effects of temperature on Gibbs energy change of the constituents extracted in MAE processes
 ■ Lycorine; ● lycoramine; ▲ galanthamine;
 □ resveratrol; ○ emodin.

越有利于摆脱细胞组织的束缚而扩散到细胞外，克服分子间作用力所需要的能量相对越小，因而其 ΔH^0 和 ΔS^0 值较小。

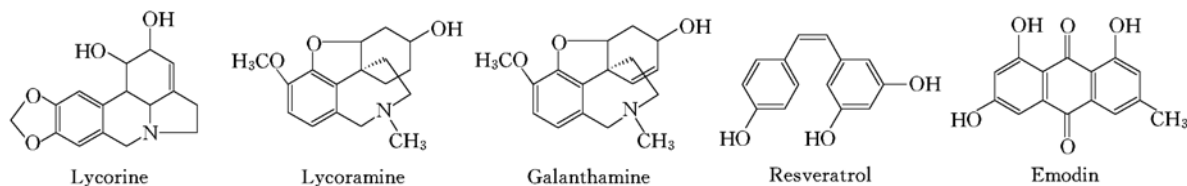


Fig. 4 The chemical structures of the constituents from *Lycoris radiata* and *Rhizma Polygoni Cuspidati*

由于微波对极性较小的分子的作用相对较小，大黄素具有共面刚性结构且对称，分子的摇摆和扭曲等运动在一定程度上受到限制，分子的运动需要借助于渗透到细胞内的溶剂分子和细胞外的溶剂分子的能量以及溶剂分子对细胞的作用，使细胞结构松散以便摆脱束缚扩散到细胞外，因而需要的能量更高，对细胞结构变化的影响较大，其 ΔH^0 和 ΔS^0 值也更高。但力可拉敏的 ΔH^0 和 ΔS^0 却高于加兰他敏，在结构上两者相似，仅相差一个双键，这可能是由于双键的电子云更容易变形极化，使加兰他敏的 ΔH^0 和 ΔS^0 更小。因此在 MAE 提取过程中组分的化学结构及极性直接影响其热力学过程。

与 MAE 相比，SRE 的 ΔH^0 和 ΔS^0 更小，表现出的 ΔG^0 值更大。测定样品中各组分的含量大小依次为石蒜碱 > 力可拉敏 > 加兰他敏；大黄素 > 白藜芦醇，可以发现其 SRE 过程的 ΔG^0 数值大小顺序也与此一致，因为在 SRE 提取过程中，提取的驱动力是浓度梯度，组分扩散的方向与热传递方式相反，传质阻力较大，在 SRE 提取过程中组分的化学结构及极性差异未表现出明显的特征。

2.5 表面结构观察

为考察 MAE 和 SRE 提取对细胞结构的影响，采用扫描电镜 (SEM) 分别观察了石蒜和虎杖的细胞表面结构的变化，如图 5 所示。

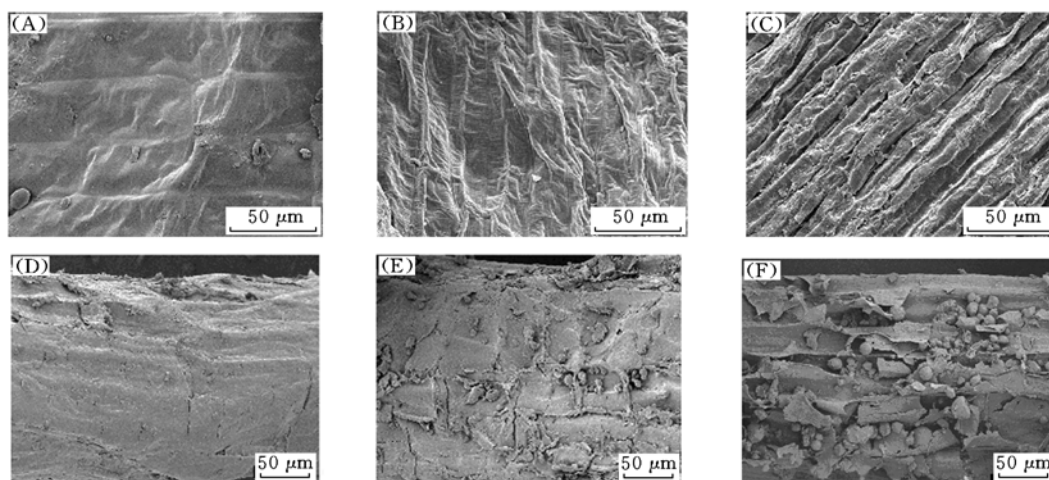


Fig. 5 The scan electron microscopic images of the samples

(A) Raw material of *Lycoris radiata*; (B) *Lycoris radiata* sample extracted by SRE; (C) *Lycoris radiata* sample extracted by MAE; (D) raw material of *Rhizma Polygoni Cuspidati*; (E) *Rhizma Polygoni Cuspidati* sample extracted by SRE; (F) *Rhizma Polygoni Cuspidati* sample extracted by MAE.

由图 5 可知，SRE 提取后石蒜细胞完整，略微收缩，经 MAE 提取后石蒜细胞严重收缩，变得“疏松”；虎杖经过 MAE 提取后细胞表面遭到破坏，而 SRE 提取后的细胞表面较为完整。

SEM 图表明，两种提取方法提取后石蒜和虎杖的细胞结构截然不同，证明其提取过程的机制明显不同。在 SRE 提取过程中，主要依靠组分的浓度梯度扩散，组分透过细胞膜溶解于溶剂中，因而细胞结构保持较完整；而 MAE 在提取过程中除了浓度梯度扩散驱动外，微波作用更有利于组分扩散传质，细胞结构的“疏松”或破坏，强化了提取过程，使组分更容易溶出，因而使各组分的 ΔG^0 比 SRE 的小，提取效率增加。

参 考 文 献

- [1] Ganzler K. , Salgó A. , Valkó K. . J. Chromatogr. A[J], 1986, **371**: 299—306
- [2] Ganzler K. , Szinai I. , Salgó A. . J. Chromatogr. A[J], 1990, **520**: 257—262
- [3] Jin Q. , Liang F. , Zhang H. *et al.* . Trends Anal. Chem. [J], 1999, **18**: 479—484
- [4] LI He(李核), LI Gong-Ke(李攻科), ZHANG Zhan-Xia(张展霞). Chin. J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 2003, **31**(10): 1261—1268
- [5] Pare J. R. J. , Sigouin M. , Lapointe J. . Microwave-assisted Natural Products Extraction, US Patent No. 519588(5002784)[P], 1991
- [6] Pare J. R. J. , Belanger J. M. R. , Stafford S. S. . TrAC Trends Anal. Chem. [J], 1994, **13**(4): 176—184
- [7] Lay-Keow Ng, Hupe M. . J. Chromatogr. A[J], 2003, **1011**: 213—219
- [8] LI He(李核), LI Gong-Ke(李攻科), ZHANG Zhan-Xia(张展霞). J. Instrum. Anal. (分析测试学报)[J], 2004, **23**(5): 12—16
- [9] HAN Wei(韩伟), GAO Shan(高珊), DENG Xiu(邓修). Journal of East China University Science and Technology(华东理工大学学报)[J], 2002, **28**(4): 337—340
- [10] HAO Jin-Yu(郝金玉), HAN Wei(韩伟), DENG Xiu(邓修). Chin. Traditional & Herbal Drug(中草药)[J], 2002, **33**(8): 739—741
- [11] Editorial Committee of Zhonghua Bencao of State Administration of Traditional Chinese Medicine. Zhonghua Bencao(中华本草)[M], Shanghai: Shanghai Press of Science and Technology, 1999: 207—210
- [12] FAN Hua-Jun(范华均), LUAN Wei(栾伟), LI Gong-Ke(李攻科). J. Instrum. Anal. (分析测试学报)[J], 2006, **25**(3): 27—30
- [13] XU Guang-Xian(徐光宪), WANG Wen-Qing(王文清), WU Jin-Guang(吴瑾光) *et al.* . Principle on Extraction Chemistry(萃取化学原理)[M], Shanghai: Shanghai Press of Science and Technology, 1984: 24—26
- [14] SHEN Wen-Xia(沈文霞). Physical Chemistry: A Key Course(物理化学核心教程)[M], Beijing: Science Press, 2004: 110—123

Investigation of Thermodynamic Mechanism for Extraction of Active Constituents in *Lycoris radiata* and *Rhizma Polygoni Cuspidati* Using Microwave-assisted Extraction

FAN Hua-Jun^{1,2}, LIN Guang-Xin¹, XIAO Xiao-Hua¹, LI Gong-Ke^{1*}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224, China)

Abstract The extraction mechanism of lycorine, lycoramine, galanthamine and resveratrol, emodin in two dissimilar plants namely *Lycoris radiata* and *Rhizma Polygoni Cuspidati* was investigated by using the closed microwave-assisted extraction (MAE), respectively. Solvent reflux extraction (SRE) was also performed for comparison study. A simple model was applied to calculate partition coefficients K , ΔH^0 , ΔS^0 and ΔG^0 of the constituents determined for MAE and SRE, and their thermodynamic behavior, chemical structures and polarities were further discussed. With the observation of scan electron microscopy, the cell microstructures of *Lycoris radiata* Herbert and *Rhizma Polygoni Cuspidati* were changed in MAE process. The results show that MAE and SRE were endothermic and entropy increase processes, the effects of microwave on cell led thermodynamic functions to greater change, MAE with the higher yields was more spontaneous than SRE.

Keywords Microwave-assisted extraction; Thermodynamics; Mechanism; *Lycoris radiata*; *Rhizma Polygoni Cuspidati*

(Ed. : A, G)