

超声波辅助萃取法提取乌药叶黄酮类化合物的工艺研究



CHEN Jian-jun

陈建军¹, 何国庆²

(1. 台州职业技术学院, 浙江 台州 318000;

2. 浙江天台山乌药生物工程有限公司, 浙江 天台 317000)

摘 要: 以乌药叶为原料, 用均匀设计试验法优化了乌药叶总黄酮(FL)的超声波提取工艺, 考察了乙醇体积分数、液固比、超声波功率和超声波作用时间 4 个因素对乌药叶总黄酮提取率的影响, 确立了乌药叶总黄酮的优化超声波提取工艺条件为: 5 g 乌药叶粉, 超声波作用时间 18 min, 超声波功率 250 W, 乙醇体积分数 40%, 液固比 10:1 (mL:g), 测得乌药叶总黄酮得率为 2.13%。对超声波提取进行了数学模拟, 模拟值与试验结果吻合良好。

关键词: 超声波辅助萃取; 乌药叶; 黄酮类化合物

中图分类号: TQ91; R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2010)06-0102-05

Ultrasound-assisted Extraction of Flavonoids from Leaves of *Lindera aggregata* (Sims.) Kosterm

CHEN Jian-jun¹, HE Guo-qing²

(1. Taizhou Vocational Technology College, Taizhou 318000, China; 2. Zhejiang Tiantaishan Wuyao

Biological Engineering Co., Ltd., Tiantai 317000, China)

Abstract: Ultrasound-assisted extraction of flavonoids in leaves of *Lindera aggregata* (Sims.) Kosterm (FL) was optimized by a uniform design experiment. The effects of ethanol volume fraction, ratio of liquid to solid, ultrasound power and ultrasound treatment time on the extraction yield of FL were investigated. The optimized ultrasound-assisted extraction was determined as follows: 5 g leaves of FL, ultrasound treatment time 18 min, ultrasound power 250 W, ethanol volume fraction 40%, ratio of liquid to solid 10:1 (mL:g). Under these conditions, the extraction yield of FL reached 2.13%. Mathematical simulation values based on ultrasound-assisted extraction was consistent with experimental values.

Key words: ultrasound-assisted extraction; leaves of *Lindera aggregata* (Sims.) Kosterm; flavonoids

乌药叶为樟科山胡椒属植物乌药 (*Lindera aggregata* (Sims.) Kosterm) 的干燥叶, 根据文献记载乌药的叶、根、茎皆可入药^[1], 乌药主要分布在长江中下游地区, 主产于浙江、安徽、湖南、广东、广西。为研究乌药叶抗病毒、抗炎、抑菌的有效成分和开发新药用资源, 张朝凤等^[2-4]对乌药叶的化学成分进行了研究, 分离并鉴定了 18 种化合物, 主要为倍半萜类和黄酮醇及其苷类化合物, 其中黄酮类化合物有 10 余种。作者以乙醇-水体系为浸提溶剂, 考察相关因素对超声波辅助萃取效果影响, 找出各个单因素较好的水平范围, 并进一步用均匀设计试验法对试验结果进行回归分析得出回归方程^[5-6], 同时对回归方程进行试验条件优化, 以期得出最优提取条件, 为工业化生产提供参考依据。

1 实验

1.1 原料和仪器

乌药叶购自浙江天台医药材公司, 于 105 °C 干燥至质量恒定, 粉碎至 0.25 mm; 芦丁对照品购自中

收稿日期: 2010-05-27

基金项目: 浙江工业大学重中之重学科开放研究基金资助项目(20050617)

作者简介: 陈建军(1967-), 男, 浙江台州人, 工程师, 硕士, 主要从事生物制药及其分离研究; E-mail: cjjkey@126.com。

国药品生物制品检定所,其他试剂为化学纯。Spectrumlab54 紫外-可见分光光度计,上海棱光技术有限公司;JY92-II 型超声波细胞粉碎机,宁波新兴科器研究所。

1.2 单因素试验

在固定其他因素不变的条件下,考察某一因素变化对总黄酮得率的影响。

1.3 均匀实验

在单因素试验的基础上,以总黄酮得率为指标,利用均匀设计试验,对超声波功率、作用时间、乙醇体积分数和液固比等因素进行进一步的研究,以期得出回归方程。

1.4 测定方法

1.4.1 标准工作曲线的绘制 采用以芦丁为对照品的分光光度法,参照文献[7]显色测定吸光度(A),得到回归方程为: $c(\text{mg/L}) = 97.121A - 2.9213$, $r = 0.9997$,回归方程在 4.00~62.00 mg/L 范围内呈线性关系。

1.4.2 样品的测定 乌药叶溶液稀释到一定倍数,吸取稀释液 1 mL 于 25 mL 容量瓶中,按上述方法显色测定吸光度,计算出乌药叶提取液总黄酮的得率。

乌药叶提取液总黄酮的得率:指每次在各种不同提取条件下提取的总黄酮的质量与原料乌药叶的质量之比,则可由下式计算产品中总黄酮得率:

$$E = \frac{c \times V \times N}{m \times 10^6} \times 100 \%$$

式中: E —总黄酮得率,%; c —乌药叶总黄酮提取液的质量浓度,mg/L; V —乌药叶总黄酮提取液的体积,mL; N —稀释倍数; m —原料质量,g。

2 结果与讨论

2.1 单因素条件对总黄酮得率的影响

2.1.1 乙醇体积分数 超声波辅助提取中,称取过 0.25 mm 筛的乌药叶粉末 5 g,设定超声波功率 200 W,作用时间 8 min,液固比 15:1(mL:g,下同),浸提温度为 40 ℃,乙醇体积分数对总黄酮得率的影响见图 1(a)。从图 1(a)可以看出:随着乙醇体积分数的增加,总黄酮得率也增大,当乙醇体积分数达到 80% 时,黄酮类化合物溶解度最大,得率最高。而后,乙醇体积分数再增加,黄酮类化合物溶解度减少;同时一些醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分溶出量增加,干扰因素随之增大,这些成分与黄酮类化合物竞争同乙醇水分子结合,从而导致黄酮类化合物的得率下降。这是由于黏度较小的溶剂有利于溶质的传递,而超声波振动作用减小了溶剂黏度对传质的影响。综上考虑,乙醇体积分数在 80% 左右较为合适。

2.1.2 液固比 固定乙醇体积分数为 80%,其他条件同 2.1.1 节,液固比对总黄酮得率的影响见图 1(b)。一般来说,液固比越大,即溶剂用量越大,提取物得率越大,故在此体系中稍大较好,以便充分分散,促进提取。实验结果显示当液固比达到 20:1 后,得率趋于稳定,此时提取物已基本提取完全。且过大的液固比会造成溶剂和能源的浪费,并给后序的浓缩工作带来困难,因此从降低成本等综合考虑,确定液固比为 20:1 比较合理。

2.1.3 超声波功率 固定乙醇体积分数为 60%,其他条件同 2.1.1 节,超声波功率对总黄酮得率的影响见图 1(c)。从图 1(c)可知:随着超声波功率的增大,总黄酮得率增加,在 200~250 W 时总黄酮得率增加得比较快,以后逐渐减缓。这可能是由于随着功率增大,产生的热使溶质扩散加快,当温度达到一定程度时,温度对传质效应的影响变小。在 250~300 W,总黄酮得率增加不大,所以功率可能不是影响提取的关键因素。

2.1.4 超声波作用时间 固定乙醇体积分数为 70%,其他条件同 2.1.1 节,超声波作用时间对总黄酮得率的影响见图 1(d)。由图 1(d)可知:超声波提取在开始的 5 min 内,总黄酮得率快速增加,而后增加的速度减慢,在 14 min 左右开始减少。这是因为刚开始时细胞内外溶质的浓度差很大,另外溶质从被

破碎的外层组织细胞释放比从完整的内层释放容易得多,同时随着超声波作用时间的增加,超声波瞬间产生大量的热和强烈的空化效应,可能对总黄酮的结构有一定的破坏作用,所以超声波作用时间不宜过长。

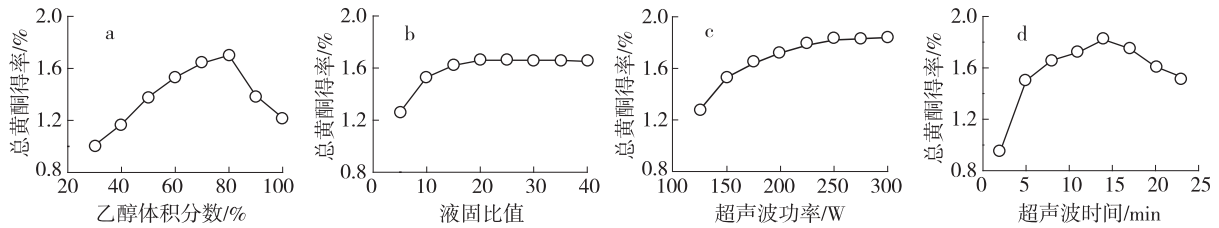


图1 不同反应条件对总黄酮得率的影响

Fig.1 Effects of different reaction conditions on flavonoids yields

2.2 均匀试验结果

由单因素试验数据可设定各因素水平范围是:超声波功率 100~350 W、超声波作用时间 2~24 min、乙醇体积分数 40%~90%、液固比 10:1~35:1 (mL:g),利用混合均匀设计表 U_{12} ($12 \times 6 \times 6 \times 6$) 设计试验方案,试验设计用表及结果如表 1 所示。

表1 均匀设计试验方案及结果分析

Table 1 Scheme and results analysis of uniform design experiment

试验号 No.	X_1 超声波作用时间/min ultrasound times	X_2 超声波功率/W ultrasound power	X_3 乙醇体积分数/% ethanol volume fraction	X_4 液固比 (mL:g) liquid to solid ratio	Y 总黄酮得率/% yield of flavonoids
1	2	150	50	35:1	1.15
2	4	200	70	30:1	1.21
3	6	300	90	25:1	1.25
4	8	350	50	20:1	1.59
5	10	100	70	15:1	1.46
6	12	200	90	10:1	1.71
7	14	250	40	35:1	1.97
8	16	350	60	30:1	1.62
9	18	100	80	25:1	1.43
10	20	150	40	20:1	1.81
11	22	250	60	15:1	1.94
12	24	300	80	10:1	1.73

运用 Uniform design Version 2.1 软件,对表 1 中的试验数据进行全回归分析,回归方程中各系数值见表 2~表 7。

试验设计采用 U_n^* ,选用均匀设计表 U_{12} ,均匀设计偏差 $D = 0.2618$ 。

表2 回归方程中各系数的值

Table 2 Coefficient values of regression equation

来源 sources	回归系数 regression coefficient	标准回归系数 standard regression coefficient	偏回归平方和 partial regression sum of squares
X_1	9.22×10^{-2}	2.45	0.198
X_2	6.57×10^{-3}	2.12	5.29×10^{-2}
X_3	-4.22×10^{-3}	-0.272	5.22×10^{-4}
X_4	-3.76×10^{-2}	-1.21	2.31×10^{-2}
X_1^2	-2.64×10^{-3}	-1.92	0.122
X_2^2	-1.33×10^{-5}	-1.95	4.47×10^{-2}
X_3^2	-2.02×10^{-5}	-0.170	2.05×10^{-4}
X_4^2	6.39×10^{-4}	0.939	1.40×10^{-2}
常数 constant	1.08		

回归分析采用后退法,显著性水平 $\alpha = 0.05$,将所得试验数据经全回归分析,得出以总黄酮得率为因变量,4因素水平值为自变量的回归方程: $Y = 1.08 + 9.22 \times 10^{-2} X_1 + 6.57 \times 10^{-3} X_2 - 4.22 \times 10^{-3} X_3 - 3.76 \times 10^{-2} X_4 - 2.64 \times 10^{-3} X_1^2 - 1.33 \times 10^{-5} X_2^2 - 2.02 \times 10^{-5} X_3^2 + 6.39 \times 10^{-4} X_4^2$;复相关系数 $R = 0.9928$;剩余标准差 $S = 6.34 \times 10^{-2}$ 。

表3 回归方程的显著性检验表

Table 3 Significance test of regression equation

变异来源 variation sources	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F
回归 regression	0.831	8	0.104	25.79
剩余 surplus	1.21×10^{-2}	3	4.03×10^{-3}	$F(0.05, 8, 3) = 8.845$
总和 sum	0.843	11		

由表3可知 F 值大于 F 临界值,回归方程显著。

根据标准回归系数的绝对值可以看出:各因素对黄酮得率影响的主次顺序为: X_1 (超声波作用时间) $> X_2$ (超声波功率) $> X_4$ (液固比) $> X_3$ (乙醇体积分数),说明在所选定的4个因素中,超声波作用时间对总黄酮得率的影响最大,而乙醇体积分数对总黄酮得率的影响最小。

第7方程项 X_3^2 对回归的贡献最小,对其进行显著性检验:检验值 $F(7) = 5.096 \times 10^{-2}$,临界值 $F(0.05, 1, 3) = 10.13$, $F(7) \leq F(0.05, 1, 3)$,此方程项不显著,需要剔除。剔除不显著方程项,新建回归方程: $Y = 1.19 + 9.09 \times 10^{-2} X_1 + 6.37 \times 10^{-3} X_2 - 6.58 \times 10^{-3} X_3 - 3.76 \times 10^{-2} X_4 - 2.59 \times 10^{-3} X_1^2 - 1.29 \times 10^{-5} X_2^2 + 6.40 \times 10^{-4} X_4^2$;复相关系数 $R = 0.9927$;剩余标准差 $S = 5.54 \times 10^{-2}$,结果见表4。

表4 回归方程中各系数的值

Table 4 Coefficient values of regression equation

来源 sources	回归系数 regression coefficient	标准回归系数 standard regression coefficient	偏回归平方和 partial regression sum of squares
X_1	9.09×10^{-2}	2.42	0.237
X_2	6.37×10^{-3}	2.05	6.50×10^{-2}
X_3	-6.58×10^{-3}	-0.441	0.116
X_4	-3.76×10^{-2}	-1.21	2.31×10^{-2}
X_1^2	-2.59×10^{-3}	-1.88	0.146
X_2^2	-1.29×10^{-5}	-1.89	5.47×10^{-2}
X_4^2	6.40×10^{-4}	0.939	1.41×10^{-2}
常数 constant	1.19		

表5 回归方程的显著性检验表

Table 5 Significance test of regression equation

变异来源 variation sources	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F
回归 regression	0.830	7	0.119	38.63
剩余 surplus	1.23×10^{-2}	4	3.07×10^{-3}	$F(0.05, 7, 4) = 6.094$
总和 sum	0.843	11		

由表5可知 F 值大于 F 临界值,回归方程显著。

第7方程项 X_4^2 对回归的贡献最小,对其进行显著性检验:检验值 $F(7) = 4.579$,临界值 $F(0.05, 1, 4) = 7.709$, $F(7) \leq F(0.05, 1, 4)$,此方程项不显著,需要剔除。

第2次剔除不显著项,新建回归方程: $Y = 0.794 + 8.82 \times 10^{-2} X_1 + 7.69 \times 10^{-3} X_2 - 6.84 \times 10^{-3} X_3 - 8.81 \times 10^{-3} X_4 - 2.48 \times 10^{-3} X_1^2 - 1.58 \times 10^{-5} X_2^2$;复相关系数 $R = 0.9842$;剩余标准差 $S = 7.26 \times 10^{-2}$,结果见表6。

表6 回归方程中各系数的值
Table 6 Coefficient values of regression equation

来源 sources	回归系数 regression coefficient	标准回归系数 standard regression coefficient	偏回归平方和 partial regression sum of squares
X_1	8.82×10^{-2}	2.34	0.227
X_2	7.69×10^{-3}	2.48	0.118
X_3	-6.84×10^{-3}	-0.441	0.116
X_4	-8.81×10^{-3}	-0.284	3.59×10^{-2}
X_1^2	-2.48×10^{-3}	-1.81	0.137
X_2^2	-1.58×10^{-5}	-2.32	0.104
常数 constant	0.794		

表7 回归方程的显著性检验表
Table 7 Significance test of regression equation

变异来源 variation sources	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F
回归 regression	0.816	6	0.136	25.83
剩余 surplus	2.63×10^{-2}	5	5.27×10^{-3}	$F(0.05, 6, 5) = 4.950$
总和 sum	0.843	11		

由表7可知F值大于F临界值,回归方程显著。

第4方程项 X_4 对回归的贡献最小,对其进行显著性检验:检验值 $F(4) = 6.819$,临界值 $F(0.05, 1, 5) = 6.608$, $F(4) > F(0.05, 1, 5)$,此方程项显著。

将所得的实验数据经3次全回归分析,得出以总黄酮得率为因变量,4因素的水平值为自变量的回归方程: $Y = 0.794 + 8.82 \times 10^{-2} X_1 + 7.69 \times 10^{-3} X_2 - 6.84 \times 10^{-3} X_3 - 8.81 \times 10^{-3} X_4 - 2.48 \times 10^{-3} X_1^2 - 1.58 \times 10^{-5} X_2^2$;复相关系数 $R = 0.9842$;剩余标准差 $S = 7.26 \times 10^{-2}$ 。

试验优化:运用Uniform design Version 2.1采用网格法对回归方程进行实验条件优化,经分析最优条件为:超声波作用时间为17.75 min,超声波功率243.6 W,乙醇体积分数为40%,液固比10:1(mL:g),此时的指标预期最大值为 $2.15\% \pm 0.187\%$ 。

其他参数不变,在优化的工艺参数取整数条件下做验证实验,即超声波作用时间为18 min,超声波功率为250 W,乙醇体积分数为40%,液固比10:1(mL:g),得到的总黄酮得率为2.13%,与回归的指标预期值偏差不大。

3 结论

3.1 在单因素试验的基础上,采用均匀实验设计对结果进行优化,得出超声波辅助萃取提取乌药叶总黄酮的最佳工艺条件为:5 g 乌药叶粉,超声波时间18 min,超声波功率250 W,乙醇体积分数为40%,液固比10:1(mL:g),采用一次超声波辐射浸提,此时总黄酮得率为2.13%。

3.2 超声波可以强化乙醇浸提效果,达到省时、节能的目的,是一条较为理想的提取黄酮类物质的途径,具有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] 张茂江. 乌药叶的临床应用[J]. 四川中医, 1994, 12(5): 18.
- [2] 张朝凤, 孙启时, 赵燕燕, 等. 乌药叶中黄酮类成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2001, 11(5): 274-276.
- [3] 张朝凤, 孙启时, 王峥涛, 等. 乌药叶化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(11): 765-767.
- [4] 张朝凤, 孙启时, 俞桂新, 等. 乌药叶中黄酮类成分研究(2)[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(5): 342-344.
- [5] 李进伟, 丁霄霖. 超声波提取金丝小枣多糖的工艺研究[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(3): 73-76.
- [6] 丁为民, 王洋, 阎秀峰, 等. 均匀设计法优化桦木醇的超临界二氧化碳萃取工艺[J]. 林产化学与工业, 2007, 27(3): 63-66.
- [7] 陈建军, 钱俊青, 范长春. 大孔吸附树脂纯化乌药叶黄酮化合物研究[J]. 浙江工业大学学报, 2009, 37(5): 530-534.