双频超声强化从海金沙中提取黄酮的实验研究

贲永光，丘泰球，阎 杰

(华南理工大学轻化工研究所，广州 510640)

摘要：采用双频超声强化从海金沙中提取黄酮的研究结果显示:在 27℃, 海金沙质量与乙醇体积比为 0.05g/ml, 搅拌器转速、超声功率及频率不变的条件下，质量浓度达到平衡时的 60%，搅拌提取需 700min 以上，槽式超声需 105min, 探头式超声需 45min, 而双频超声所需时间不到 20min; 若提取时间均为 60min, 则双频超声的提取率为搅拌的 11 倍, 为槽式超声的 2 倍, 为探头式超声的 1.8 倍。通过选择乙醇浓度、溶剂用量、超声作用时间、浸泡时间因素进行正交实验, 得出双频超声提取最佳工艺条件: 浓度 70%用量为 40ml 的乙醇, 超声作用时间 30min, 浸泡时间为 4h。机理探讨表明, 当两束超声波同时传播时, 超声作用的均匀性增强, 声强增大, 使得海金沙颗粒的边界层变薄, 外表面剥落, 甚至使其颗粒发生碎裂, 传质速率大大提高, 试验结果表现为双频超声对提取过程具有协同增强作用。

关键词：双频超声; 搅拌; 槽式超声; 探头式超声

中图分类号：TQ460.2 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-3630(2006)-03-0209-05

Extracting flavone from lygodium japonicum (Thunb.) Sw. assisted by bifrequency ultrasound

BI Yong-guang, QIU Tai-qiu, YAN Jie

(Light Industry and Chemical Engineering Institute, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: This paper studies extraction of flavone from Lygodium japonicum (Thunb.) Sw. assisted by bifrequency ultrasound under various conditions. The result shows that, with the same concentration, stirrer needs more than 700mins, tank modes ultrasound 105mins, probe model 45mins, and bifrequency ultrasound less than 20mins. The optimum estraction conditions of flavonoids were investigated by using an orthogonal experimental design. The mechanism indicates that the bifrequency ultrasound can make the Nernst layer thin, flake the exterior surface, crack the particle and improve the effect of extraction. This is shown in the result of experiment by bifrequency ultrasound's multiplicative effect in the extraction process.

Key words: bifrequency ultrasound; stir; tank model ultrasound; probe model ultrasound

1 引 言

从植物中提取有效成分的传统方法为水或有机溶剂浸取, 这些方法耗时长, 得率低, 有效成分易被破坏, 且污染环境严重。由于超声的空化效应与机械效应使之具有破坏生物细胞，强化传质传热的功能, 因此, 用它强化天然产物的提取已成为当前研究的一个热点。所有这些研究的结果均表明: 超声强化提取的温度低, 时间短, 提取率高。但这些研究全采用单频超声辐照。1997 年, 冯若等首次将28kHz 与 0.8MHz 超声组合成 X-Z 轴向双频正交辐照系统, 并用电化学法与碘释放法对该辐照系统的声化学效应进行了实验研究, 结果发现, 该辐照系统给出的声化学产额远远超出两个单独辐照产额之和[1]。然而, 由于进行此项研究的时间不长, 许多研究尚有待深入,

收稿日期: 2005-11-25; 修回日期: 2006-01-20
基金项目: 广东省科技计划项目(2003B31709)
作者简介: 贲永光(1978-), 男, 广西宜州人, 博士生, 主要从事天然产物声化学技术研究。

故有关双频超声强化在提取及相关领域的应用研究还未见报道。

海金沙(Lygodium japonicum(Thunb.)Sw.)为海金沙科蕨类植物,又称左转藤、铁线藤、蛤蟆藤等,具清热利湿功能,为治疗淋症药物,主产于广东、浙江、江苏、江西、湖南、湖北、广西、云南、四川、贵州、陕西、河南等省。有资料报道,海金沙中含有黄酮[2],它的提取方法有热回流法、冷浸法和逆流提取法等,采用溶剂多为乙醇或甲醇。这些方法有着传统溶剂提取的缺点,本文首次采用双频超声强化从海金沙中提取黄酮,并与搅拌、单频超声强化进行对比研究。

2 材料和方法

2.1 材料、仪器

海金沙市售;芦丁标准品(上海生物试剂二厂);752紫外光栅分光光度计;超声波清洗槽(槽式超声,40kHz,100W);探头式超声波处理机(25kHz,功率可调,试验恒定为100W);双频声化学反应器(自制,见图1,其中1为探头式超声(25kHz,100W);2为槽式超声(40kHz,100W);3为循环水进口;4为循环水出口;5玻璃反应容器;6超声波发生器);超级恒温水浴锅;所有化学试剂均为分析纯。本文双频超声装置为探头式超声与槽式超声组合而成。探头式超声工作10s停10s,当它与槽式超声作用时,其实际作用时间仅为槽式超声的一半,为了实验方便,本文探头式超声的作用时间以总时间(作用时间与间隔时间之和)计。

2.2 测定方法

标准曲线,按文献[2]并略作改进。

(1)标准液制备:准确称取120℃干燥恒重的芦丁10.0mg,用60%微热乙醇定容至100ml,摇匀得浓度为0.1mg/mL的标准溶液。

(2)标准曲线的制作:准确吸取标准溶液0、2.5、5、7.5、10、12.5ml于6只25ml容量瓶中,加30%乙醇使成12.5ml,加5%的$NaNO_2$溶液1ml,摇匀,放置6min,加10%$Al(NO_3)_3$溶液1ml,摇匀,放置6min,加1mol/l NaOH溶液10ml,加水定容,摇匀,放置10min~15min,于510nm波长处测定吸光度。绘制浓度-吸光度(c-a)的标准曲线,经最小二乘法进行线性回归,得回归方程为:c=0.1221a-0.0002197,相关系数为r=0.9994。

(3)质量浓度的测定:估计样品的质量浓度,取1ml~3ml提取液于25ml容量瓶中,其余操作同步骤(2)的制作。

(4)平衡质量浓度的测定:将样品在恒定温度与料液比的情况下不断搅拌提取,每隔4~5小时取样测定黄酮的质量浓度,以其不再上升的质量浓度作为平衡质量浓度。

(5)海金沙中总黄酮含量的测定:精确称量海金沙粉末0.5000g,置索氏提取器中,用60%乙醇溶液250ml进行回流提取,提取液抽滤定容,按2.2方法测定A,计算提取液黄酮的含量,求出海金沙总黄酮的含量为5.11%。并以此计算出各处理的黄酮提取率。

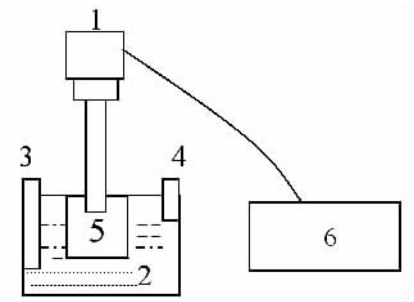


图1 双频超声提取试验装置

Fig.1 Experimental equipment of dual-freuuency ultrasound extraction

3 结果与讨论

3.1 几种方法提取效果的比较

按海金沙质量与无水乙醇体积比为0.05g/mL加入三口瓶中,水浴控制温度在27℃,定时取样测定提取液中黄酮的质量浓度。超声强化提取过程中,功率均恒定为100W,将三口瓶固定在超声波的清洗槽中,探头式超声的变幅杆插入瓶中的位置每次试验保持不变。

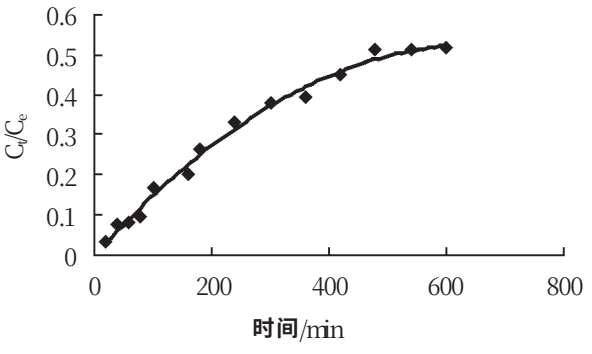


图2 搅拌加速提取

Fig.2 Accelerating Extraction by stirring

由图 2 知, 提取 480min 以后, 提取液的质量浓度为平衡质量浓度的 50%左右, 此时质量浓度上升极缓慢, 提取速率极低。由图 3 知, 提取 140min 以后, 提取液的质量浓度为平衡质量浓度的 73%左右, 此时质量浓度上升较缓慢。

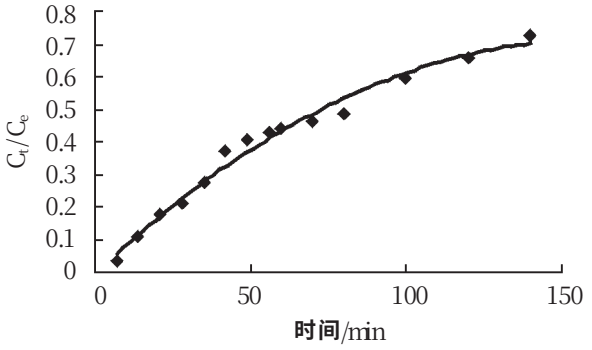


图 3　槽式超声强化提取

Fig.3　Extraction enhanced by ultrasonic bath

C_e 为达平衡时, 溶液中黄酮的质量浓度, C_t 为 t 瞬间溶液中黄酮的质量浓度(下文同)。

由图 4 可以看出, 探头式超声提取的前期速率较快, 提取 210min 以后, 提取液的质量浓度为平衡质量浓度的 90%左右, 此时浓度上升仍较快。由图 5 知, 双频超声提取的前 20min 速率特别快, 提取液的浓度呈跳跃式上升, 此后相对较慢, 提取时间达 100min 时, 体系已达平衡状态。

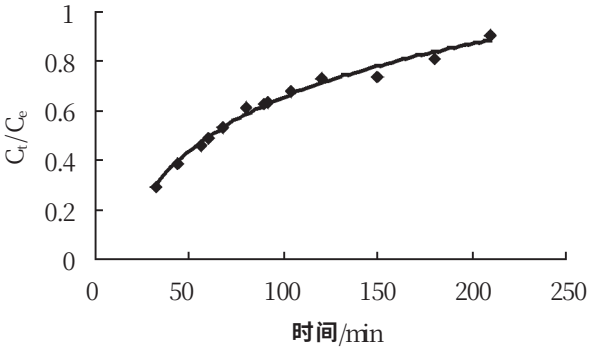


图 4　探头式超声强化提取

Fig.4　Extraction by ultrasonic horn

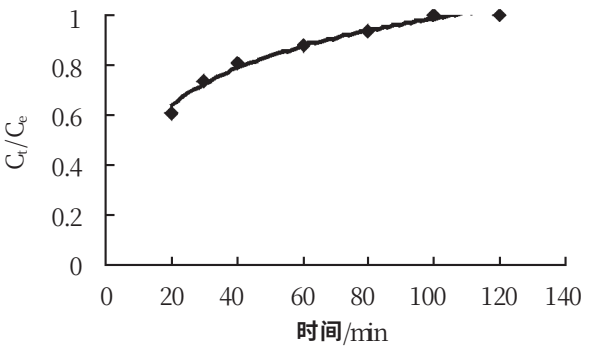


图 5　双频超声强化提取

Fig.5　Extraction enhanced by bifrequency ultrasound

综合分析图 2~图 5, 达到相同的提取率(取质量浓度为平衡质量浓度的 60%), 搅拌方法需 700min 以上 (回归预测为 998min), 槽式超声约需 105min, 探头式超声约需 45min, 而双频超声所需时间不到 20min (回归预测为 16min)。在同样的时间(取 60min), 双频超声的提取率为搅拌的 11 倍, 槽式超声的 2 倍, 探头式超声的 1.8 倍。

以上分析可以看出, 双频超声协同强化提取的效果非常显著。

根据文献报道, 在提取柑桔中水溶物及茶叶中咖啡因的动力学研究中[3-8], 应用了常见的‘恒态提取’理论公式, 即: $\ln(\frac{C_e}{C_e-C_t})=k_{obs}t+e$ 其中 k_{obs} 为表观速率常数。

令 $y=\ln(\frac{C_e}{C_e-C_t})$, 将 y 对 t 作图, 即可求出 k_{obs} 与截距 e。再令 $C_t=\frac{1}{2}C_e$, 根据以上公式, 可求出提取液浓度达平衡浓度一半所需的时间和 $t_{1/2}$, 结果见表 1:

表 1　各方法的动力学参数

Table 1　Dynamics parameter of methods

方法	k_{obs}/min^{-1}	截距 e	$t_{1/2}/min$	相关系数
搅拌	0.0013	0.0368	504.9	0.987
槽式超声	0.009	0.0119	75.7	0.994
探头式超声	0.0099	0.0701	62.9	0.977
双频	0.0299	0.4018	9.7	0.996

由表 1 可以看出, 超声的强化作用使 k_{obs} 提高, 使 $t_{1/2}$ 大幅度缩短, 它强化提取的作用非常显著, 且双频超声优于探头式超声, 探头式超声优于槽式超声。双频超声的表观速率常数比两个相应单频超声的速率常数之和大得多, 它的作用效果并非是两个单频超声作用效果的简单相加, 它们存在协同作用。

3.2　双频超声(40kHz+25kHz)强化提取的优化

影响总黄酮提取的因素有乙醇浓度、溶剂用量、超声作用时间、浸泡时间、超声功率、溶剂种类等。但是在实际的操作中, 各因素是相互交差影响的。因此, 为了方便实验和全面考察影响因素, 设计了四因素三水平正交实验, 结果见表 2, 表 3。

通过对乙醇浓度、溶剂用量、超声作用时间、浸泡时间的综合评价, 对提取率影响的主次顺序为 A>

B>C>D,上述结果表明:乙醇浓度对海金沙总黄酮的提取结果影响最大,浸泡时间影响最小。根据实验结果与分析,最佳的提取工艺条件为 $A_2B_3C_3D_2$ 即以浓度 70%, 用量为 40ml 的乙醇, 超声作用时间为 30min, 浸泡时间为 4h。在这个最佳条件下试验,总黄酮提取率 86.25%。

表 2 40kHz+25kHz 双频超声试验的因素及水平

Table 2 Factors and levels of experiment with 40kHz & 25kHz Dual-frequency ultrasound

	A	B	C	D
水平	乙醇浓度 /%	溶剂用量 /ml	超声作用时间 /min	浸泡时间 /h
1	60	20	10	0
2	70	30	20	4
3	80	40	30	12

表 3 $L_9(3^4)$ 40kHz+25kHz 双频正交实验结果与分析

Table 3 $L_9(3^4)$ orthogonal experiment results with 40kHz & 25kHz dual-frequency ultrasound and analysis

编号	A	B	C	D	黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	39.25
2	1	2	2	2	54.42
3	1	3	3	3	58.33
4	2	1	2	2	62.15
5	2	2	3	1	64.72
6	2	3	1	2	67.41
7	3	1	3	2	48.52
8	3	2	1	3	45.12
9	3	3	2	1	50.28
K1	152	149.92	151.78	154.25	
K2	194.28	164.26	166.85	170.35	
K3	143.92	176.02	171.57	165.60	
K1 均值	50.67	49.97	50.59	51.42	
K2 均值	64.76	54.75	55.62	56.78	
K3 均值	47.79	58.67	57.19	55.20	
R	16.79	8.70	6.60	5.36	

3.3 机 理

黄酮的提取过程可分为三个步骤:第一步,海金沙表面的黄酮溶解, 溶剂向海金沙内部渗透;第二步,黄酮溶解后扩散到固液界面,此时靠分子扩散;第三步,黄酮从固液界面向溶液主体扩散,这一步通过边界层(Nernst 层),该层阻力大,扩散缓慢,速率低。

当固液界面受到超声波作用时,固体表面成核产生空泡,该空泡会发生变形,它破裂时朝着固体表面产生高速喷射作用,并且,由于空化泡破裂所产生的冲击波也会冲击、剥离、侵蚀固体表面进而使得相界面得以更新。这一作用必然使边界层发生局部湍动,甚至出现空洞,边界层变薄,阻力减小;同时,超声还能在固体颗粒内传播,改变颗粒的组织结构,甚至使其碎裂,传质速度加快。但超声波传播的方向性较强且衰减迅速,故它作用的均匀性较差。当双频超声在溶液中同时传播时,其中一束声波空化泡崩溃所产生的微小气泡既可作为自身再空化的泡核,又可作为另一束声波空化的泡核,空化现象大大增加,另一方面,不同频率声波的叠加既利于提高声强,又利于消除驻波,增强超声作用的均匀性。不难设想,当双频超声强度足够大时,不仅海金沙颗粒的边界层完全消失,外表面发生剥落,甚至使颗粒破碎,比表面积增大,粒径减小,这导致主体溶液的浓度瞬间增大,提取速率增加。

4 结论与展望

对比试验显示,超声对海金沙中黄酮的提取有显著的强化作用,探头式超声的强化效果优于槽式超声,而双频超声强化效果最好。表观动力学研究表明,双频超声对于从海金沙中提取黄酮有协同强化作用,其表观速率常数比各个单频超声相应速率常数之和大得多。机理分析表明,双频超声协同作用时,声波在液体中传播的均匀性增强,空化强度增大,使得海金沙颗粒的边界层消失,外表面剥落,甚至碎裂,比表面积增大,粒径减小,故提取速率大大提高。

本实验结果表明:影响双频超声波法强化提取海金沙中总黄酮提取率的主次因素为: 乙醇浓度>溶剂用量>超声作用时间>浸泡时间。最佳提取工艺为浓度 70%的乙醇,乙醇用量为 40ml,超声作用时间为 30min, 浸泡时间为 4h。在这个最佳条件下试验,总黄酮提取率 86.25%。

单频超声在溶液中传播时衰减快,不均匀,双频超声同时传播时,克服了这一缺点,使得它协同强化提取的效果极其显著。双频超声提取方法的出现将改变从中药材及其它天然产物中提取有效成分的落后面貌, 使传统溶剂提取技术领域发生根本改变。有关双频超声对传质系数的影响,功率、频率如何匹配及温度对提取的影响有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] 冯若, 朱昌平, 赵逸云, 等. 双频正交辐照的声化学效应研究[J]. 科学通报, 1997, 42(9): 925-928.
FENG Ruo, ZHU ChangPing, ZHAO Yi Yun, et al. Research of sonochemistry effect of bifrequency ultrasonic orthogonal irradiation[J]. Chinese Science Bulletin, 1997, 42(9): 925-928.

[2] 蔡建秀, 吴文珊, 吴凌云, 等. 22 种药用蕨类植物的总黄酮含量研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2000, 16(4): 63-66.
CAI J X, WU W S, WU L Y, et al. Study on the total favonoids content of 22 kind of the medicial pteridophytes[J]. J Fujian Normal Univ-Nat Sci, 2000, 16(4): 63-66.

[3] Crank J. The mathematics of diffusion[M]. Oxford: Oxford University Press. 1975.

[4] Spiro M, Jago D S. Kinetics, Equilibria of Tea Infusion [J]. Journal of the Chemistry Society, Faraday Transactions I, 1982, 78: 295-305.

[5] [苏]B.B. 福明著, 张帆译. 萃取动力学[M]. 原子能出版社, 1988. 8.
[Soviet] B.B. Fu Ming, Zhang Fan. Extraction Dynamics [M]. Atomic Energy press, 1988. 8.

[6] Clark Chambers, Kim Exandi-Larsen, William E. Price. Aqueous extraction of solubles from oranges: a kinetics study[J]. Food Chemistry, 1996, 59(4):483-486.

[7] Deogratius Jaganyi, Robert D. Price. Kinetics of tea infusion: the effect of the manufacturing process on the rate of extraction of caffeine[J]. Food Chemistry, 1999, 64: 27-31.

[8] Deogratius Jaganyi, Thamsanqa Ndlovu. Kinetics of tea infusion. Part 3: the effect of tea bag size and shap on the rate of caffeine extraction from Ceylon orange pekoe tea[J]. Food Chemistry, 2001, 75: 63-66.