

超声强化溶剂提取车前草中总黄酮的研究

贲永光¹, 丘泰球², 李康¹, 李坤平¹, 孔繁晟¹

(1. 广东药学院药科学院, 广州 510006; 2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510640)

摘要: 采用超声技术对车前草中总黄酮提取进行强化, 选择料液比、超声提取时间、提取温度、超声功率四因素进行正交实验, 得出影响总黄酮提取率大小的次序先后为: 提取温度>超声功率>超声提取时间>料液比。在实验参数的基础上, 为了获得较高的提取率和节省溶剂用量, 各因素的优化工艺参数为: 料液比 1:20, 超声提取时间 30min, 超声提取温度为 50℃, 超声功率为 200W, 在这个最佳条件下试验, 总黄酮的提取率为 0.645%。相对常规回流提取法而言, 采用超声法提取具有快速、节省溶剂、节省时间、提取的有效成分含量较高等优点。

关键词: 超声; 车前草; 黄酮; 提取

中图分类号: TQ460.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3630(2009)-02-0133-04

DOI 编码: 10.3969/j.issn1000-3630.2009.02.009

Study on ultrasound enhanced extraction of the total flavonoid from Plantago

BI Yong-guang¹, QIU Tai-qiu², LI kang¹, LI Kun-ping¹, KONG Fan-sheng¹

(1. College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. College of Light Chemistry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A novel extraction process of the total flavonoid from Plantago by ultrasound has been studied. The optimum extracting conditions of the total flavonoid are investigated by using orthogonal experimental design. The significance of these factors affecting the total flavonoid is in the following order: extraction temperature > ultrasound power > ultrasound time > solid/liquid ratio. The optimal parameters are: solid/liquid ratio 1:20 g/mL, ultrasound extraction time 30min, extraction temperature 50℃, ultrasound power 200W. Under this optimal condition, the extraction rate of flavonoid is 0.645%. Compared with conventional extraction, it is more effective with advantages in short extraction period, higher yield and saving solvent amount.

Keywords: ultrasound; Plantago; flavonoids; extraction

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, 有效成分易破坏, 且环境污染严重。超声作用于媒质的热力学、机械作用和空化机制有破坏生物细胞、强化传质传热的功能。与常规提取法相比, 超声提取具有提取时间短、产率高、无需加热等特点。同时, 提高了破碎速度, 缩短了破碎时间, 可极大地提高效率, 节约溶剂, 免去了高温对提取成分的影响。超声波是频率大于 20kHz 以上, 人的听觉阈以外的声波, 具有频率高、波长短的特点。它在液体介质中

传播时, 能产生空化作用及一系列特殊效应, 具有搅拌、分散成雾、凝聚、冲击破碎和疲劳损坏、加热、促进氧化-还原、促进高分子物质的聚合或解聚等作用。超声波提取法是近年来应用到中草药有效成分提取分离的一种新手段。现普遍认为其空化效应、热效应和机械作用是超声技术在中药提取中的三大种作用机制^[1,2]。近年来, 超声技术已广泛应用于生物碱、黄酮类、多糖、皂苷、有机酸、蛋白质、油脂等物质的提取, 应用研究表明超声提取法具有能耗低、效率高、不破坏有效成分的特点, 有较高的开发价值^[3-5]。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。

车前草系多年生草本植物车前科车前 Plantago siatical. 或平车前 Plantago depressa Willd. 的全草, 含有桃叶珊瑚苷、车前苷和各种有机酸等成分, 有利尿、祛痰、抗菌、消炎、降血压等作用^[6,7]。有资料报道, 车前草的提取方法有回流法、煎煮法和冷浸法等, 这些方法有着传统溶剂提取的缺点, 本文

收稿日期: 2008-10-15; 修回日期: 2008-12-03

基金项目: 广东药学院博士启动基金项目(2007YKX12); 广州市科技计划项目(2005Z3-E5071)

作者简介: 贲永光(1976-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为天然产物声化学和制药工程技术。

通讯作者: 贲永光, E-mail: biyongguang2002@163.com

采用超声强化溶剂提取车前草中的总黄酮,并用正交设计法确定超声提取的最佳工艺条件,为车前草的工业应用提供工艺参数。

2 材料与方 法

2.1 材料、仪器

车前草市售;芦丁对照品(中国药品生物制品检定所);HH-6 恒温水浴锅(江苏金坛市宏华仪器厂);RE-52CS 旋转蒸发器(巩义市英峪予华仪器厂);予华牌循环水真空泵(河南省巩义市英峪予华仪器厂);UV1101 紫外/可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);JA2003 电子天平(上海恒平科学仪器有限公司);KH-400KDB 型高功率数控超声清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);摇摆式高速中药粉碎机(大德中药机械有限公司)。

2.2 测定方法

(1) 草经粉碎机粉碎后过 40 目筛备用。

(2) 对照品溶液的制备:精密称取对照品芦丁 10.0mg,置 100mL 容量瓶中,加入 70%乙醇溶解,并稀释至刻度。摇匀即得(每 1mL 中含芦丁 0.100mg)。

(3) 吸收波长的选择

对照品测定波长的确定:取对照品溶液 1mL,按标准曲线项下的方法进行,在 400nm~700nm 波长范围内扫描,结果在 507nm 波长处为最大吸收。

样品测定波长的确定:取样品的乙醇提取液 1mL,按标准曲线项下的方法进行,在 400nm~700nm 波长范围内扫描,结果在 507nm 波长处有最大吸收。

(4) 标准曲线制备:精密称取对照品芦丁 10.0mg,用 70%的乙醇溶解并定容至 100mL,使其浓度为 100 μ g/mL。将芦丁溶液用 70%的乙醇稀释成 10 μ g/mL、20 μ g/mL、30 μ g/mL、40 μ g/mL、50 μ g/mL、60 μ g/mL,各取 1mL 于试管中,加 70%的乙醇 1mL,加入 300 μ L 5%的 NaNO₂, 6min 后加入 300 μ L 10%的 Al(NO₃)₃ 溶液,6min 后再加入 2mL 4%的 NaOH 溶液,10min 后于分光光度计波长 507nm 处测定吸光度。以吸光度 A 为纵坐标,浓度 C 为横坐标,经回归统计,得到标准曲线方程为:

$$A = 0.002811C + 0.0000154, r = 0.9995 \quad (1)$$

可以看出,浓度在 0~60 μ g/mL 范围内与吸收值线性关系良好。

(5) 车前草中总黄酮提取率的测定:取车前草中总黄酮提取液用紫外分光光度计于 507nm 下测出吸光度 A ,代入式(1)及提取率计算公式(2),计算出车前草中总黄酮的提取率。

$$\text{提取率}(\%) = (C \times V \times 10^{-6} / W) \times 100\% \quad (2)$$

式中, V 为定容体积(ml), W 为车前草药粉质量(g), C 为车前草提取液浓度 μ g/mL。

3 结果与讨论

3.1 单因素试验

3.1.1 考察料液比对提取率的影响

本实验采用车前草粉(过 40 目筛)作为原料,在温度为 25 $^{\circ}$ C、超声 10min、功率为 280W 时,绘制提取率与料液比关系曲线图如图 1 所示。

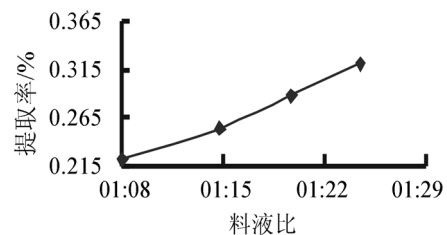


图 1 料液比对提取率的影响

Fig.1 Effect of solid/liquid ratio on total flavonoids yield

由图 1 可以看出,料液比分别为 1:8, 1:15, 1:20, 1:25 时,提取率分别是 0.221%, 0.254%, 0.286%, 0.321%。随着实验范围内溶剂用量的增加,车前草中总黄酮的提取率呈上升趋势。这是由于溶剂量大,溶剂中的有效成分浓度低,与物料及溶剂边界层的有效成分浓度差大,扩散推动力较大,所以提取率高;相反,溶剂中有效成分浓度高,扩散推动力小,不利于扩散,有效成分提取率低。但是,如果溶剂用量太大,在经济上不合算,由于有效成分的提取率并不是随着溶剂量增大而无限量的增大的,当溶剂量增大到一定值后,有效成分的提取率增加的幅度会很快降低到一个很小的值。另外,溶剂用量增大会引起一系列如蒸发浓缩等问题的出现。所以实验中要选择合适的料液比。

3.1.2 考察温度对提取率的影响

本实验采用车前草粉(过 40 目筛)作为原料,在料液比为 1:20、超声 10min、功率为 280W 时,绘制单因素趋势图(见图 2)。

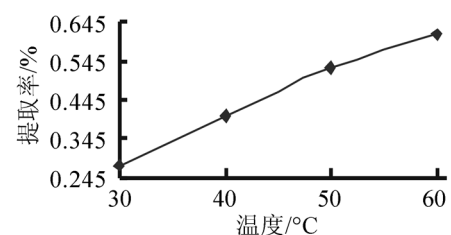


图 2 温度对提取率的影响

Fig.2 Effect of ultrasound temperature on total flavonoids yield

由图 2 可以看出, 温度分别为 30℃、40℃、50℃、60℃, 提取率分别为 0.275%、0.404%、0.525%、0.614%。随着实验范围内提取温度的增加, 超声提取车前草中总黄酮的提取率呈上升趋势。一般来说, 温度升高, 溶剂的表面张力系数及粘滞系数下降, 蒸气压升高, 超声空化阈值下降, 有利于空化泡的产生, 但是另一方面, 由于蒸气压的增大, 导致空化强度或空化效应下降, 从而不利于提取过程的强化。

3.1.3 考察超声时间对提取率的影响

本实验采用车前草粉(过 40 目筛)作为原料, 在料液比为 1:20, 温度为 25℃, 功率为 280W 条件下, 绘制单因素趋势图(见图 3)。

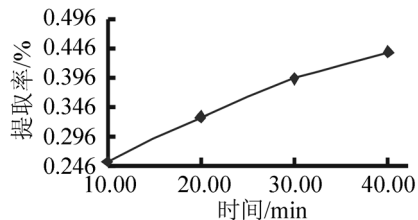


图 3 超声时间对提取率的影响
Fig.3 Effect of ultrasound time on total flavonoids yield

由图 3 可以看出, 时间分别为 10min、20min、30min、40min, 提取率分别是 0.254%、0.329%、0.396%、0.439%。随着实验范围内提取时间的增加, 车前草中总黄酮的提取率呈上升趋势。由于有效成分浓度差是超声提取的主要推动力, 在提取初期, 有效成分浓度差大, 因此提取速率快, 提取率增加明显, 随着提取时间的延长, 溶剂中有效成分浓度逐渐增大, 和固相中的浓度差逐渐变小, 也就是推动力变小, 所以提取速率慢慢减慢, 提取率增加不明显, 直至推动力为零, 有效成分不再溶解。

3.1.4 考察超声功率对提取率的影响

本实验采用车前草粉(过 40 目筛)作为原料, 在料液比为 1:20, 25℃状态, 超声 10min 条件下, 绘制单因素趋势图(见图 4)。

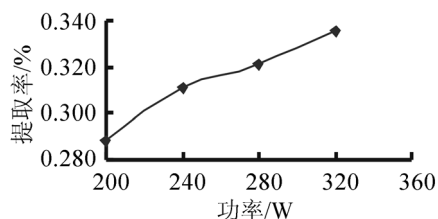


图 4 超声功率对提取率的影响
Fig.4 Effect of ultrasound power on total flavonoids yield

由图 4 可以看出, 在超声清洗机标称功率分别为 200W、240W、280W、320W 时, 提取率为 0.289%、

0.311%、0.321%、0.336%。随着实验范围内的提取功率增加, 超声提取车前草中总黄酮的提取率呈上升趋势。对一定频率和一定发射面的超声来说, 功率增大, 声强随之增大。如果声强增大, 声压幅值以及液体中相应负压力亦增大, 造成空化泡的半径逐渐增大至极限, 空化泡崩溃所需的时间将变得更短, 也就是说单位时间内超声产生的空化事件增多, 从而有利于植物药有效成分提取率的提高。

3.2 正交实验

上面讨论了各单因子的影响, 但是在实际的操作中, 各因素是相互交叉影响的。因此, 为全面考查影响因素, 设计了四因素三水平正交实验, 实验结果见表 1、表 2。

表 1 试验的因素及水平
Table 1 Factors and levels of experiment

水平	A	B	C	D
	料液比 /(g/mL)	超声作用时间 /min	提取温度 /°C	超声功率 /W
1	1:15	20	30	200
2	1:20	30	40	240
3	1:25	40	50	280

表 2 超声法提取车前草中总黄酮的正交实验结果

Table 2 Orthogonal experiment results with ultrasound extraction					
编号	A	B	C	D	总黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	0.325
2	1	2	2	2	0.482
3	1	3	3	3	0.496
4	2	1	2	3	0.350
5	2	2	3	1	0.657
6	2	3	1	2	0.368
7	3	1	3	2	0.564
8	3	2	1	3	0.339
9	3	3	2	1	0.532
K ₁	1.303	1.239	1.032	1.514	
K ₂	1.375	1.478	1.364	1.414	
K ₃	1.435	1.396	1.717	1.185	
k ₁	0.434	0.413	0.344	0.505	
k ₂	0.458	0.493	0.455	0.471	
k ₃	0.478	0.465	0.572	0.395	
R	0.044	0.080	0.228	0.110	

由表 2 可以看出, 在影响超声法提取车前草中总黄酮的四个因素(料液比、超声作用时间、超声提取温度、标称功率)中, 超声温度的影响最大, 料液比的影响最小。其影响总黄酮的提取率的大小次序先后为: C>D>B>A, 即超声提取温度>超声功率>提取时间>料液比, 在本实验参数的基础上, 为了获得较高的提取率和节省溶剂用量, 各因素的优化工艺参数为 A₂B₂C₃D₁, 即料液比 1:20, 超声提取时间 30min, 超声提取温度 50℃, 超声标称功率 200W。

3.3 超声提取与常规提取法的比较

超声提取按上述的最佳提取工艺(即 $A_2B_2C_3D_1$) 进行, 常规回流提取: 即用 95% 乙醇, 回流提取一定时间, 结果见表 3。由表 3 可以看到, 超声提取 30min, 提取率即达到 0.645%, 而回流提取 60min、90min、120min, 提取率分别为 0.476、0.628、0.651, 显然超声波强化达到省时、高效、节能的目的。

表 3 超声处理与常规法提取的比较
Table 3 Ultrasound extraction compared with conventional extraction

提取方法	提取率/%				
	时间/min=	30	60	90	120
超声法		0.645	/	/	/
常规回流法		/	0.476	0.628	0.651

4 结 论

本实验结果表明: 温度的适当升高、溶剂用量的增大、提取时间的延长、适当增大超声功率有利于提高有效成分提取率。各因素对总黄酮的提取率的影响大小次序先后为: 提取温度>超声功率>超声作用时间>料液比。在本实验参数的基础上, 为了获得较高的提取率和节省溶剂用量, 各因素的优化工艺参数为: $A_2B_2C_3D_1$, 即料液比 1:20, 超声提取时间 30min, 超声提取温度 50℃, 超声功率 200W, 在这个最佳条件下试验, 总黄酮提取率为 0.645%。

相对常规回流提取法而言, 采用超声法提取具有快速、节省溶剂、节省时间、提取的有效成分含量较高等优点。

参 考 文 献

- [1] 胡爱军, 杨日福, 丘泰球, 等. 超声强化超临界流体萃取装置的设计及应用[J]. 声学技术, 2005, 24(3): 178-180.
HU Aijun, YANG Rifu, QIU Taiqiu, et al. Design and application of ultrasonic apparatus for SFE enhancement[J]. Technical Acoustics, 2005, 24(3): 178-180.
- [2] 贲永光, 丘泰球, 闫杰. 双频超声强化从海金沙中提取黄酮的实验研究[J]. 声学技术, 2006, 25(3): 209-213.
BI Yongguang, QIU Taiqiu, YAN Jie. Extracting flavone from *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw. assisted by bifrequency ultrasound[J]. Technical Acoustics, 2006, 25(3): 209-213.
- [3] 张涛, 马海乐. 超声波提取辣木黄酮技术的研究[J]. 粮油食品科技. 2005, 13(5): 19-21.
ZHANG Tao, MA Haile. The study of extraction of moringa flavone with ultrasonic assistance[J]. Technology of Grain and Oil, 2005, 13(5): 19-21.
- [4] WANG Jun, HAN Jiantao, ZHANG Yang. The application of ultrasound technology in chemical production[J]. Contemporary Chemical Industry, 2002, 12(4): 187-189.
- [5] 王万能, 全学军, 郑一敏. 超声波碱水法提取灯盏花总黄酮的研究[J]. 声学技术, 2006, 25(3): 214-215.
WANG Wanneng, QUAN Xuejun, ZHENG Yimin. Lye extraction of *ergeron breviscapus* flavonoids by ultrasound[J]. Technical Acoustics, 2006, 25(3): 214-215.
- [6] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社. 2005:57-58.
- [7] Nishibe S, Tomayama Y, Sasahara M, et al. Aphenyl ethanoid glycoside from *plantago asiatica*[J]. Phytochem, 1995, 38(3): 741-742.