

超声波提取抱茎苦苣菜总黄酮工艺的研究

王建安¹, 李艳芝¹, 吴国荣², 刘霞³, 艾俊丽¹

(1 济宁医学院药学院, 山东 日照 276826) (2 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)
(3 济宁医学院基础学院, 山东 日照 276826)

[摘要] 以抱茎苦苣菜全草为原料, 在单因素实验基础上, 以乙醇浓度、超声时间、超声功率、料液比 4 因素进行正交实验, 优化超声波提取抱茎苦苣菜内总黄酮物质的提取工艺. 在实验影响因素中, 影响程度从大到小依次为超声功率 > 乙醇浓度 > 料液比 > 超声提取时间. 实验结果表明, 抱茎苦苣菜全草中黄酮类物质的最佳提取条件为: 7.72 mol/L 乙醇, 料液比 1: 20, 超声功率 400 W, 在 50℃ 提取 60 min 连续提取 2 次, 总黄酮得率高达 1.102%.

[关键词] 抱茎苦苣菜, 总黄酮, 超声波, 提取工艺

[中图分类号] R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)01-0120-04

Study on Ultrasonic Wave Extraction of Flavonoids From
Ixeris Sonchifolia (Bge.) Hance.

Wang Jian'an¹, Li Yanzhi¹, Wu Guorong², Liu Xia³, Ai Junli¹

(1 School of Pharmaceutical Science, Jining Medical University, Rizhao 272826, China)
(2 School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)
(3 School of Basic Medical, Jining Medical University, Rizhao 272826, China)

Abstract The aim of the study was to confirm the optimum technique condition of extracting total flavonoids from *Ixeris sonchifolia* (Bge.) Hance by ultrasound wave. Based on single factor test, the orthogonal experiments were conducted with 4 factors of ethanol concentration, the ratio of raw materials to solvent, ultrasonic power and extracting time. The impact will activate by ultrasonic power, concentration of alcohol, material liquid ratio, ultrasonic time. Under the conditions of 7.72 mol/L ethanol as extraction solvent, material to ethanol ratio 1: 20, ultrasonic power 400 W, extraction time 60 min, treating with ultrasonic for twice repeatedly at the temperature of 50℃, the total flavonoids extraction efficiency can reach as high as 1.102%.

Key words *Ixeris sonchifolia* (Bge.) Hance, total flavonoids, ultrasonic wave, extracting techniques

抱茎苦苣菜 *Ixeris sonchifolia* (Bge.) Hance 为菊科苦苣菜属植物, 别名苦碟子、满天星等, 我国各地均有分布, 盛产于东北、华北等地. 《内蒙古中草药》记载, 抱茎苦苣菜味苦、辛, 具清热解毒、排毒、止痛之功效^[1]. 可用于治疗无名肿痛、乳痈疔肿、阑尾炎、肝炎等各种炎症以及肺热咳嗽、肺结核等^[2]. 其化学成分以黄酮类物质含量最高^[3]. 目前临床使用的纯中药注射液“碟脉灵注射液”就是以抱茎苦苣菜全草为原料精制而成的治疗心脑血管疾病的药物.

目前提取药用植物中黄酮类化学物质多采用热回流法进行, 热回流法因长时间受热而易破坏其中的有效成分. 超声波技术随着科学技术的发展已被应用到多种物质的提取中. 大量资料表明, 超声波的强烈搅拌、振动、空化作用可以破坏细胞结构, 加速有效物质的溶出^[4], 不仅可以提高提取效率, 而且可以大大地缩短时间, 节省能源. 如苹果渣多酚提取^[5]、元宝枫叶总黄酮^[6]的提取等. 笔者以抱茎苦苣菜为对象, 研究了超声提取过程中相关条件对黄酮提取率的影响, 为优化抱茎苦苣菜黄酮的提取工艺进行了探索, 旨在建立一种快速、简便、有效的提取方法.

1 仪器和材料

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司), 电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司), 电热干燥箱 (上海申光仪器仪表有限公司), JY92-II 型超声波细胞破碎仪 (宁波新芝科学仪器厂), 旋转蒸发器 RE-52 (上海精宏实验设备有限公司), LD4-2A 型低速离心机 (北京医用离心机厂)。

乙醇、亚硝酸钠、无水三氯化铝、氢氧化钠均为市售分析纯; 芦丁标准品 (上海生化试剂)。

抱茎苦蕒菜全草采集于济宁医学院日照校区院内, 由药学院生药学教研室鉴定。置通风处阴干, 密闭保存, 临用前在 60℃ 下烘烤至恒重后粉碎, 过 80 目筛, 备用。

2 实验方法

2.1 芦丁对照溶液的制备

精密称取 105℃ 常压干燥至恒重的芦丁对照品 25.01 mg 置于 50 mL 容量瓶中, 加 1 L 15 mol/L 乙醇适量, 超声振荡使溶解, 加 1 L 15 mol/L 乙醇至刻度, 摇匀, 即得 8.20×10^{-4} mol/L 芦丁对照品溶液。

2.2 标准曲线的绘制

精密量取标准溶液 0.0 (空白对照), 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 各加 10.29 mol/L 乙醇使成 5.0 mL, 各精密加入 0.73 mol/L 亚硝酸钠溶液 0.10 mL, 摇匀, 放置 6 min 后, 加 0.75 mol/L AlCl_3 溶液 0.30 mL, 摇匀, 放置 6 min 后, 加 1 mol/L NaOH 溶液 4.0 mL, 用蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 放置 15 min 取标准储备液 1 mL, 按标准曲线操作, 在紫外分光光度计上进行全波长扫描, 总黄酮反应物在 506 nm 下有最大吸收峰。因此, 确定 506 nm 为测定波长。并在此波长下应用 UV-win5.0 软件测定各溶液的吸光度。

以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线 (见图 1)。得芦丁标准溶液浓度 C 与吸光度值 A 关系曲线的回归方程式: $A = 105.997 \times (C) - 0.0097$, $R^2 = 0.9995$

2.3 总黄酮得率的测定

精密量取正交试验中提取的抱茎苦蕒菜的抽滤液 0.20 mL 于 25 mL 容量瓶中, 按 2.2 中方法显色后, 同法测定吸光度, 代入回归方程计算黄酮含量, 根据标准曲线计算出浸提液中总黄酮的得率。

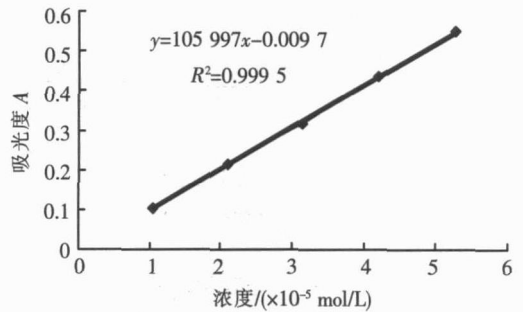


图 1 芦丁标准曲线

Fig.1 Standard curve of rutin

3 结果

3.1 超声提取黄酮单因素考察

3.1.1 提取温度对提取的影响

精确称取 5.00 g 粉碎后的抱茎苦蕒菜粉末, 以 10.29 mol/L 的乙醇为溶剂, 料液比 1:20 分别在 40℃、50℃、60℃、70℃ 下提取 30 min。从实验结果来看 (见图 2), 在 50℃ 时黄酮含量达到最高, 随温度增加含量并无明显变化。因温度过高乙醇挥发严重, 而且杂质溶出增加; 温度过低, 影响黄酮在乙醇中的溶出, 综合考虑, 选取 50℃ 进行正交实验。

3.1.2 不同料液比对提取的影响

精确称取 5.00 g 粉碎后的抱茎苦蕒菜粉末, 以 10.29 mol/L 乙醇为溶剂, 超声功率 400 W, 提取时间 30 min, 温度 50℃, 考察不同料液比对其黄酮提取的影响 (见图 3)。实验结果表明, 黄酮浸出率随溶剂量的增加而增加, 但当料液比大于 1:20 时, 黄酮得率不再增加, 且略有下降。这可能是由于在超声波的作用下, 其中所含黄酮类物质已经基本提取完全, 且其他杂质进入浸提液, 使浸提液黏度增大, 扩散速度变慢, 导致黄酮类化合物不易溶出。

3.1.3 乙醇浓度对提取的影响

精确称取 5.00 g 粉碎后的抱茎苦蕒菜粉末, 在料液比 1:15, 超声功率 400 W, 温度 50℃, 分别用浓度为 3.43, 6.86, 10.29, 13.72, 16.29 mol/L 的乙醇提取 30 min (见图 4)。结果表明, 乙醇浓度在 10.29 mol/L 左右时提取的黄酮得率最高; 当乙醇含量高于 80% 时, 随乙醇浓度的增加, 提取的黄酮得率反而下降。这可能是因

为部分黄酮类化合物是水溶性的, 如果提取溶剂中水分含量太少, 黄酮类化合物则不能充分溶解.

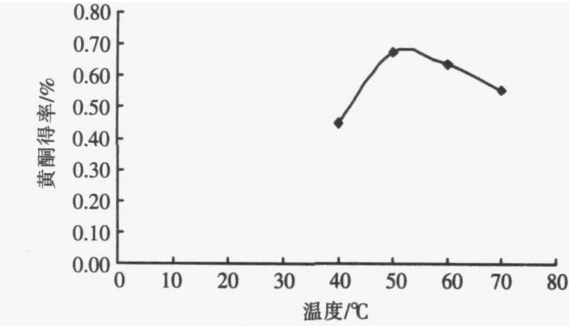


图 2 提取温度对提取率的影响
Fig.2 Effects of temperature on extraction rate

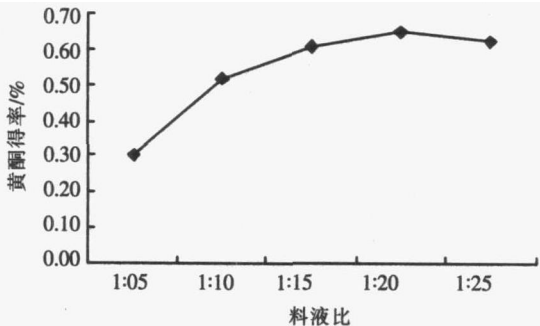


图 3 料液比对提取率的影响
Fig.3 Effects of material-liquid ratio on extraction rate

3. 1. 4 超声功率对提取的影响

精确称取 5.00 g 粉碎后的抱茎苦苣菜粉末, 在料液比 1:15 乙醇浓度为 10.29 mol/L, 温度 50℃, 超声功率依次为 200W、400W、600W、800W、1000W 测定黄酮得率, 结果如图 5 所示, 黄酮提取率在超声功率 200~600W 有明显上升趋势, 而到达 800W 后提取率则增加缓慢. 这可能是由于随着功率增大, 产生的热量使溶质扩散加快, 当温度达到一定程度时, 温度对传质效应的影响变小的缘故.

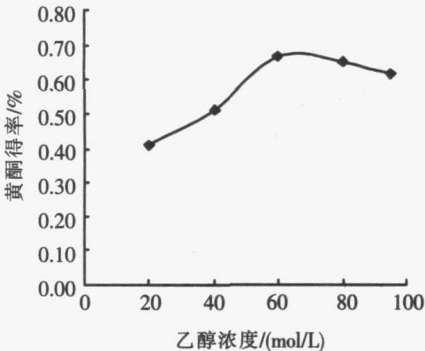


图 4 乙醇浓度对提取率的影响
Fig.4 Effects of alcohol concentration on extraction rate

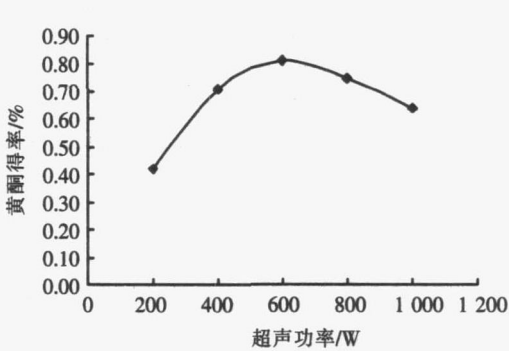


图 5 超声功率对提取率的影响
Fig.5 Effects of ultrasonic power on extraction rate

3. 1. 5 超声时间对提取的影响

精确称取 5.00 g 粉碎后的抱茎苦苣菜粉末, 在 10.29 mol/L 乙醇, 超声功率 400W, 温度 50℃, 超声时间分别为 15、35、55、75、95 min 时进行提取. 从实验结果可以看出, 随着时间的增加黄酮得率也在增加, 但提取 55 min 以后增长趋缓, 总黄酮得率反而有所降低 (见图 6). 这可能是提取时间太长, 植物组织中大量细胞破裂, 导致细胞内大量不溶物及较多黏液质等混入提取液中, 使溶液中杂质增多, 黏度增大, 从而增大了传质阻力, 影响了有效成分的溶出.

3. 1. 6 超声次数对提取的影响

由图 7 可知, 提取次数为 3 次时, 黄酮得率最高. 提取次数再增加, 黄酮得率反而下降. 鉴于节约溶剂和节省提取时间考虑, 且第 2 次与第 3 次增加幅度不大, 因此后续试验均以提取 2 次为准.

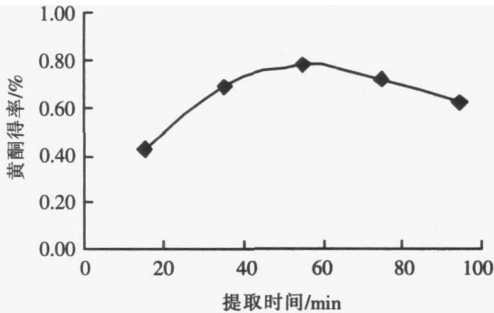


图 6 超声时间对提取率的影响
Fig.6 Effects of processing time on extraction rate

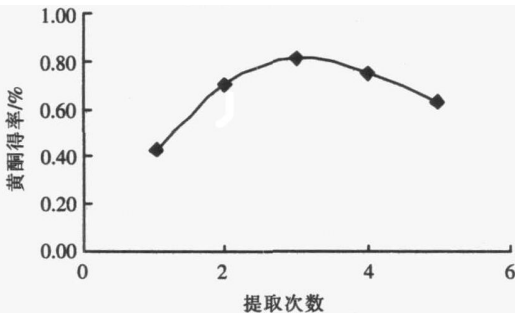


图 7 超声次数对提取率的影响
Fig.7 Effects of extracting times on extraction rate

3.2 正交实验设计及各因素水平设置

根据单因素实验结果, 拟选取乙醇浓度 (A)、超声功率 (B)、料液比 (C)、提取时间 (D) 等 4 个因素作为考察指标, 各因素及水平设置如表 1 所示. 正交实验采用 4 因素 3 水平正交表, 即 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验, 试验结果见表 2

经方差分析表明 (见表 3): 乙醇浓度与超声功率对抱茎苦苣菜黄酮提取率都具有显著的影响 ($P < 0.05$), 而提取时间与料液比则均未达到显著水平 ($P > 0.05$).

采用极差法对正交试验结果进行分析, 由表 2R 值可知, 影响抱茎苦苣菜中总黄酮得率的因素依次为 $B > A > C > D$, 即超声波功率 $>$ 乙醇浓度 $>$ 料液比 $>$ 超声提取时间, 最佳提取条件为 $A_1B_2C_2D_3$, 即 7.72 mol/L 乙醇, 料液比 1:20, 超声功率 400W, 在 50℃ 提取 60min

3.3 最佳工艺验证实验

在拟选定的最佳提取条件下进行 3 次重复实验, 所提取的总黄酮得率平均值为 1.102%, 大于正交设计中的得率, 故认为此正交实验得出的最优水平是可靠的, 且该工艺稳定可行.

4 结 论

超声波是一种弹性机械振动波, 它在溶液中疏密相间地向前辐射, 使液体流动而产生数以万计的微小气泡, 这些气泡纵向传播, 在负压区形成、生长, 而在正压区迅速闭合. 在此“空化”效应中, 气泡闭合可形成 101MPa 的瞬间高压, 连续不断产生的高压就像一连串小“爆炸”, 不断冲击物料表面. 超声波就是通过这种超声化作用向物质提供能量, 产生强烈振动、空化效应及搅拌作用, 使其局部升温 and 局部高压, 破坏植物组织结构, 产生局部粉碎作用, 强化提取过程. 因此超声提取具有提取速度快、得率和纯度较高的优点, 并且可免去高温对活性成分的影响^[7-9].

本文在单因素实验基础上进行了多因素正交实验, 研究了超声波法提取抱茎苦苣菜总黄酮的最佳工艺. 从正交试验的直观分析和方差分析可知, 影响提取液黄酮浓度的因素主次顺序为 $B > A > C > D$, 并根据 R 值的大小, 确定最佳组合 $A_1B_2C_2D_3$, 即 7.72 mol/L 乙醇, 料液比 1:20, 超声功率 400W, 在 50℃ 提取 60min 连续提取 2 次, 黄酮得率达到最高.

[参考文献]

[1] 江苏新医学院编. 中药大辞典 (上册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 1300
[2] 《全国中草药汇编》编写组编. 全国中草药汇编 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 532
[3] 戴锦娜, 尹然, 陈晓辉, 等. 苦碟子化学成分和药理作用研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2006, 21(4): 94-96
[4] 郭孝武. 超声技术在中草药成分提取中的应用 [J]. 中草药, 1993, 24(10): 548
[5] 葛蕾, 李志西, 翔宇, 等. 超声波提取苹果渣多酚工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2005, 26(1): 79-81.
[6] 刘祥义. 超声波提取元宝枫叶总黄酮方法研究 [J]. 云南化工, 2003, 30(1): 27-28
[7] 赵兵, 王玉春, 欧阳藩. 超声波在植物提取中的应用 [J]. 中草药, 1999, 30(3): 附 1-3
[8] 李红兵, 孙立华, 孙国才. 超声波提取法在中国药典中的应用探讨 [J]. 中国药品标准, 2001, 4(2): 18-20
[9] 董嘉德. 超声波在中药提取中的应用 [J]. 中国药业, 2002, 11(11): 55

[责任编辑: 孙德泉]

表 1 $L_9(3^4)$ 正交因素与水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test $L_9(3^4)$				
水平	因素			
	A 乙醇浓度 /(mol/L)	B 超声 功率 /W	C 料液比	D 提取 时间 /min
1	7.72	200	1:15	20
2	10.19	400	1:20	40
3	12.86	600	1:25	60

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal test					
试验	A	B	C	D	提取率 /%
1	1	1	1	1	0.82
2	1	2	2	2	0.97
3	1	3	3	3	0.74
4	2	1	2	3	0.91
5	2	2	3	1	0.85
6	2	3	1	2	0.64
7	3	1	3	2	0.69
8	3	2	1	3	0.74
9	3	3	2	1	0.62
R1	0.843	0.807	0.733	0.763	
R2	0.800	0.853	0.833	0.767	
R3	0.683	0.667	0.763	0.797	
极差 R	0.160	0.186	0.100	0.034	

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance of extraction rate of flavonoids					
偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性	
乙醇浓度	0.041	2	20.500	19.000	*
超声功率	0.057	2	28.500	19.000	*
料液比	0.016	2	8.000	19.000	
提取时间	0.002	2	1.000	19.000	
误差	0.00	2			

* 表示 $P < 0.05$ * * 表示 $P < 0.01$.