

文章编号:1673-1689(2006)04-0051-05

双频超声对海金沙中黄酮提取率影响的研究

贲永光, 丘泰球

(华南理工大学 轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 采用双频超声技术提取海金沙黄酮, 选择乙醇体积分数、溶剂体积、超声作用时间、浸泡时间等因素进行正交实验, 得出影响总黄酮提取率的因素次序为: 乙醇体积分数 > 溶剂体积 > 超声作用时间 > 浸泡时间, 双频超声提取最佳工艺条件为: 乙醇体积分数为 70%, 乙醇体积为 40 mL, 超声作用时间为 30 min, 浸泡时间为 4 h。在此条件下, 总黄酮提取率为 86.25%。在相同的条件下, 与单频超声提取方法相比较, 具有溶剂用量少, 提取效率高, 提取时间短等优点。

关键词: 双频超声; 海金沙; 黄酮; 提取

中图分类号: O 622.4

文献标识码: A

Effect of Dual-Frequency Ultrasound Technique on the Extraction Rate of Flavonoids from *Lygodium japonicum*

BI Yong-guang, Qiu Tai-qiu

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

Abstract: A novel extraction process of flavonoids from *lygodium japonicum* by dual-frequency ultrasound wave was tested. The optimum extracting conditions of flavonoids were investigated by using orthogonal experimental design. The significance of these factors affecting flavonoids extraction was in the following order: ethanol volume fraction > solvent volume > ultrasound time > extraction time. Their optimal parameters were: ethanol volume fraction of 70%, solvent volume of 40 mL, ultrasound time of 30 min, and extraction time of 4 h. Under this optimal condition, the extraction rate of flavonoids was 86.25%. Compared with conventional extraction, it was more effective with the advantages of short extraction period, higher yield and saving solvent amount.

Key words: dual-frequency ultrasound; *Lygodium japonicum*; flavonoids; extraction

超声波是频率高于 20 kHz, 并且不引起听觉的弹性波。利用超声振动能量可改变物质组织结构、状态、功能或者加速这些改变的过程。现普遍认为超声波的空化效应、热效应和机械作用是超声技术强化提取的三大理论依据^[1-4]。从植物中提取药用

成分的首要条件是提取物能够快速高效地进入提取介质, 如水溶液、有机溶剂等。然而, 大多植物的有效成分存在于细胞内, 因此萃取的主要问题是有效地打破细胞壁这层势垒, 让有效成分从细胞中释放出来与溶剂直接接触^[5]。近年来, 人们用超

收稿日期: 2005-12-01; 修回日期: 2006-01-15.

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, 食品科学与工程博士研究生。

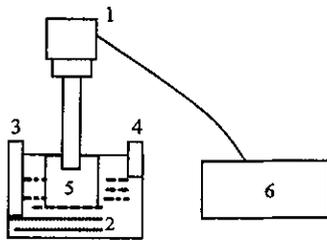
声波提取植物中的黄酮化合物、生物碱、苷类等有效成分,都表明其具有能耗低、效率高、不破坏有效成分的特点^[6-8]。1997年,冯若等首次将28 kHz与0.87 MHz超声组合成X-Z轴向双频正交辐照系统,并用电化学法与碘释放法对该辐照系统的声化学效应进行了实验研究,结果发现,该辐照系统给出的声化学产额远远超出两个单独辐照产额之和^[1]。然而,由于进行此项研究的时间不长,许多研究有待深入。有关双频超声强化在提取及相关领域的应用研究还未见报道。

海金沙(*Lygodium japonicum* (Thunb.))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,主产于我国东南地区。有资料报道,海金沙中含有黄酮^[2],其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。由于传统的溶剂提取还存在一定缺陷,作者采用双频超声强化从海金沙中提取黄酮,并与单频超声提取进行比较。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器

海金沙市售;芦丁标准品,上海生物试剂二厂产品;752紫外光栅分光光度计;槽式超声处理机(40 kHz,100 W);探头式超声波处理机(25 kHz,电功率可调,试验恒定为100 W);超级恒温水浴锅;双频声化学反应器(自制,见图1);双频超声装置为探头式超声与槽式超声组合而成。探头式超声每作用5 s,停5 s,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,探头式超声的作用时间均以总时间(作用时间与间隔时间之和)计。



1. 探头式超声换能器(25 kHz,100 W);2. 槽式超声处理机(40 kHz,100 W);3. 循环水进口;4. 循环水出口;5. 玻璃反应器;6. 探头式超声波发生器

图1 双频超声提取试验装置

Fig. 1 Dual-frequency ultrasound extraction of experiment and equipment

1.2 测定方法

1.2.1 芦丁对照品溶液的制备 准确称取120℃

减压干燥至恒重的芦丁对照品30.0 mg,置100 mL容量瓶中,加适量体积分数60%乙醇,置水浴上微热使溶解,放冷,加体积分数60%的乙醇溶液稀释至刻度,摇匀,即得(每1 mL溶液中含无水芦丁0.300 mg)。

1.2.2 标准曲线制备 准确吸取芦丁对照品溶液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL分别置25 mL容量瓶中,加体各分数30%乙醇至12.5 mL,加质量分数5%的亚硝酸钠溶液1 mL,摇匀,放置6 min,加质量分数10%的硝酸铝溶液1 mL,摇匀,放置6 min后,加质量分数4%的氢氧化钠溶液10 mL,最后用水稀释至刻度,摇匀,放置15 min^[2]。在510 nm的波长下测定吸光度,以吸收值A为纵坐标,质量浓度 ρ 为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $\rho=0.1221A-0.0002$, $r=0.9998$ ($n=6$)。结果表明,芦丁质量浓度在0.300~1.500 mg/mL范围内与吸收值线性关系良好。

1.2.3 海金沙中总黄酮含量的测定 精确称量海金沙粉末0.5000 g,置索氏提取器中,用体积70%乙醇溶液250 mL进行回流提取,提取液抽滤定容,按1.2.2方法测定A,计算提取液黄酮的质量分数,得到海金沙总黄酮的质量分数为5.11%。并以此计算出各处理的黄酮提取率。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响 称取1 g海金沙粉末,加入40 mL不同体积分数的乙醇溶液,乙醇体积分数分别为:20%、40%、60%、70%、80%,采用40 kHz、25 kHz的单频超声和40 kHz+25 kHz双频超声(40 kHz超声电功率为100 W,25 kHz超声电功率为100 W)分别处理10 min。结果见图2。

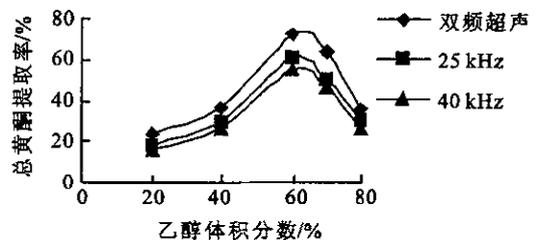


图2 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effect of ethanol volume fraction on total flavonoids yield

由图2可以看出,随着乙醇体积分数的升高,海金沙总黄酮提取率呈上升趋势,当乙醇体积分

在60%时,双频超声提取的总黄酮提取率为72.6%,比25 kHz超声提取的60.58%和40 kHz超声提取的54.48%都高。但当体积分数进一步增加,提取率反而降低。分析原因,超声强化溶剂提取时一方面溶剂的极性对提取率有很大的影响;另一方面还要求溶剂对分离成分有较强的溶解能力。对于黄酮类化合物这种极性物质,一般选择极性溶剂,有利于使固体试样中的黄酮与基体物质的有效分离。当乙醇的体积分数升高时,溶液的极性增强,黄酮类化合物的溶解度增加,但是当乙醇的体积分数增加到一定程度时,溶液的介电常数发生变化,溶液沸点下降过大,导致溶剂挥发过大,不利于黄酮的溶出,提取率下降。

2.1.2 溶剂体积对总黄酮提取率的影响 称取1 g海金沙粉末,分别加入10,20,30,40,50,60 mL体积分数为70%的乙醇溶液,采用40 kHz、25 kHz的单频超声和40 kHz+25 kHz双频超声分别处理10 min,结果见图3。

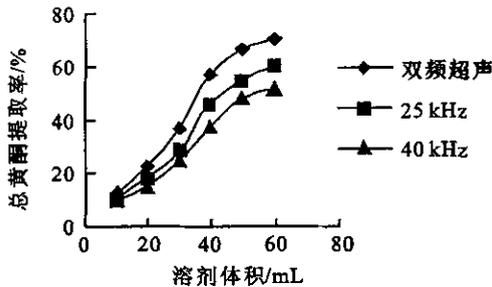


图3 溶剂体积对总黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effect of solvent volume on total flavonoids yield

由图3中双频超声和单频超声强化提取的结果表明,海金沙中总黄酮的提取率随溶剂体积的增加而增加。溶剂体积从10 mL到40 mL提取率增加最多,而从40 mL到60 mL提取率的增幅较小。在这是由于溶剂体积大,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,扩散推动力大,因而提取率高;反之,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。双频超声在溶剂体积为40 mL时,提取率为57.17%,25 kHz超声在溶剂体积为50 mL时,提取率为54.32%,40 kHz超声在溶剂体积为60 mL时,提取率为51.53%。由此可见,双频超声在同样的条件下,可以减少溶剂体积。

2.1.3 超声作用时间对总黄酮提取率的影响 称取1 g海金沙粉末,加入40 mL体积分数为70%的乙醇溶液,采用40 kHz、25 kHz的单频超声和40 kHz+25 kHz双频超声分别处理10、20、30、40、50、

60、70、80、90 min。结果见图4。

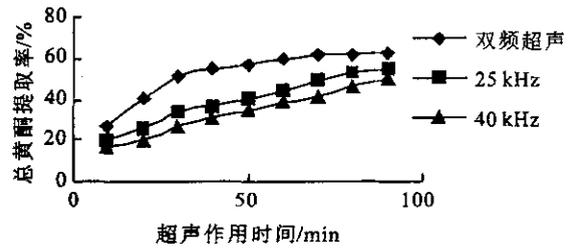


图4 超声作用时间对总黄酮提取率的影响

Fig. 4 Effect of ultrasound time on total flavonoids yield

从图4可以看出,随着提取时间从10 min到90 min,海金沙总黄酮提取率随之增加,提取开始阶段,总黄酮提取率增加较快,提取后期提取率增加较慢,增加的幅度变小。分析原因,超声法提取的主要推动力是有效成分浓度差,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,溶剂中的有效成分浓度逐渐增大,和固相中的浓度差逐渐变小,推动力也变小,也就是提取液中黄酮质量分数已基本与海金沙中黄酮质量分数达到平衡,所以提取率慢慢减缓,提取率增加不明显,直至推动力为零,有效成分不再溶解,因此再延长提取时间对与于显著提高总黄酮的提取率没有价值。双频超声提取时间20 min时,提取率是40.44%,而25 kHz超声提取50 min,提取率是40.18%,对于40 kHz超声提取70 min,提取率才达到41.67%。由此看出,双频超声相比单频超声来说,在相同的时间里,双频超声提取海金沙中总黄酮的提取率高。

2.1.4 浸泡时间对总黄酮提取率的影响 称取1 g海金沙粉末,加入40 mL 70%乙醇溶液,分别浸泡0,2,4,8,10,12,18,24 h后,采用40 kHz、25 kHz的单频超声和40 kHz+25 kHz双频超声分别处理10 min,结果见图5。

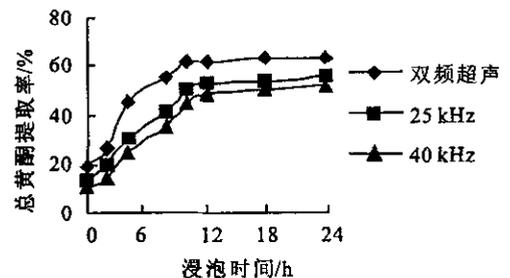


图5 浸泡时间对总黄酮提取率的影响

Fig. 5 Effect of extraction time on total flavonoids yield

从图5可知,对于双频超声提取结果来看,浸泡时间对总黄酮的提取率有很大影响,没有浸泡的海金沙经超声作用后提取率为50.35%,而浸泡12

h后提取率达到61.53%，浸泡24h后提取率达到63.56%，比没有浸泡的高了11%。而在相同的浸泡时间下，双频这可能是因为经过浸泡黄酮类化合物在溶剂中的溶解度增大，超声波的空化作用、热效应和机械作用在溶液中可以充分发挥、使提取率升高。在浸泡时间为8h时，双频超声所得的提取率为55.65%，单频25kHz和40kHz超声所得的提取率分别为41.57%，35.62%。由此看出，双频超声相比单频超声来说，在相同的浸泡时间里，双频超声提取海金沙中总黄酮的提取率高。

2.2 双频超声正交实验确定提取最佳条件

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，结果见表1，表2。

通过对乙醇体积分数、溶剂体积、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：乙醇体积分数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 $A_2 B_3 C_3 D_2$ 即以70%的乙醇，乙醇体积为40mL，超声作用时间为30min，浸泡时间为4h。此条件下试验，总黄酮提取率为86.25%。

表1 40kHz+25kHz双频超声试验的因素及水平

Tab. 4 Factors and levels of 40 kHz+25 kHz Dual-frequency ultrasound

水平	乙醇 体积分数 A/%	溶剂 体积 B/mL	超声 作用时间 C/min	浸泡 时间 D/h
1	60	20	10	0
2	70	30	20	4
3	80	40	30	12

表2 $L_9(3^4)$ 40kHz+25kHz双频正交实验结果与分析

Tab. 5 $L_9(3^4)$ orthogonal experiment results and anlysis of 40 KHz+25 KHz Dual-frequency ultrasound

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

万方数据

续表2

编号	A	B	C	D	黄酮 提取率/%
8	3	2	1	3	45.12
9	3	3	2	1	50.28
K_1	152	149.92	151.78	154.25	
K_2	194.28	164.26	166.85	170.35	
K_3	143.92	176.02	171.57	165.60	
K_1 均值	50.67	49.97	50.59	51.42	
K_2 均值	64.76	54.75	55.62	56.78	
K_3 均值	47.79	58.67	57.19	55.20	
R	16.79	8.70	6.60	5.36	

3 结论

黄酮类化合物是植物中非常重要的一类次生代谢物，是植物中广泛存在的一种有效成分，具有活血化瘀、保肝抗炎、抗菌、抗病毒及泻下，解痉的多种药理作用^[9-10]。因此，植物中总黄酮的有效提取及含量测定，是了解其药理作用和合理开发的重要基础工作。为此，作者首次运用双频超声技术，对海金沙中总黄酮进行提取和测量，并与单频超声提取进行了比较。结果表明，在相同的条件下，双频超声提取海金沙中总黄酮的提取率高于单频超声，且具有节省溶剂用量、省时、高效、有效成分提取率高的特点，适于推广应用。

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：乙醇体积分数 $>$ 溶剂体积 $>$ 超声作用时间 $>$ 浸泡时间。最佳提取工艺为乙醇体积分数70%，乙醇体积为40mL，超声作用时间为30min，浸泡时间为4h，在此条件下试验，总黄酮提取率可达86.25%。

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。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。双频超声提取方法应用于中药材及其它天然产物中提取有效成分，可使传统溶剂提取技术发生根本改变。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.
- [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.
- [3] 张冬冬,王春艳,解春华. 薄层析法测定黄花菜中黄酮成分[J]. 中国卫生检验杂志. 2002,12(8):445.
- [4] 曾里,夏之宁. 超声波和微波对中药提取的促进和影响[J]. 化学研究与应用,2002,14(3):245-249.
- [5] 季大洪,苏瑞强,王颖. 高新技术在中药提取分离中应用[J]. 时针国医国药,2000,11(4):369-370.
- [6] 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):548-549.
- [7] 关崇新,回瑞华,侯冬岩. 从总黄芩中提取总黄酮的方法研究[J]. 鞍山师范学院学报,2000,2(4):87-90.
- [8] 孙波,彭密军,杨晓燕. 超声波提取杜仲叶的工艺研究[J]. 林产化学与工业,1999,19(3):67-70.
- [9] Sinisterra J V. Application of ultrasound to biotechnology:an overview[J]. *Ultrasonic*,1992,30(3):180-185.
- [10] Clark Chambers, Kim Exandi-Larsen, William E. Aqueous extraction of solubles from oranges: a kinetics study[J]. *Food Chemistry*,1996,59(4):483-486.

(责任编辑:朱明)

(上接第46页)

参考文献:

- [1] 肖亚中. 真菌漆酶研究[D]. 合肥:中国科技大学,2002.
- [2] 钆亚鹏,叶军,钱世钧. 担子菌组成型漆酶产生特性的研究[J]. 微生物学报,2000,40(6):628-632.
- [3] 郭梅,蒲军,路福平,等. 白腐菌漆酶特性及其应用前景[J]. 天津农学院学报,2004,11(3):44-47.
- [4] 曹治云,郑腾,谢必峰,等. 漆酶工业应用的研究进展[J]. 生物技术通讯,2004,15(4):414-416.
- [5] 钆亚鹏,钱世钧. 真菌漆酶及其应用[J]. 生物工程进展,2001,21(5):23-28.
- [6] Stanley C F, Karl-Erik E. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase[J]. *J Bacteriol*,1974,120(1):458-465.
- [7] Gianna P, Paola G, Carmen B, et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* [J]. *Appl Environ Microbiol*,2000,66(3):920-924.
- [8] Petr B, Jiri G. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus* [J]. *FEMS Microbiol Lett*,2002,206:69-74.
- [9] Stanley C F, Karl-Erik E. Induction of *Neurospora crassa* laccase with protein synthesis inhibitors[J]. *J Bacteriol*,1974,120(1):458-465.
- [10] 周小玲,沈微,饶志明,等. 一种快速提取真菌染色体DNA的方法[J]. 微生物学通报,2004,31(4):89-92.
- [11] Germann U A, Lerch K. Isolation and partial nucleotide sequence of the laccase gene from *Neurospora crassa*; Amino acid sequence homology of the protein to human ceruloplasmin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1986,83:8854-8858.
- [12] 彭日荷,熊爱生,李贤,等. 苏云金芽孢杆菌 cryIA(c)Bt 基因的合成及其在大肠杆菌中稳定表达[J]. 生物化学与生物物理学报,2001,33(2):219-224.
- [13] 彭日荷,熊爱生,李贤,等. 应用毕氏酵母高效表达耐高温植酸酶[J]. 生物化学与生物物理学报,2002,34(6):725-730.
- [14] 彭日荷,熊爱生,李贤,等. 信号肽序列对毕赤酵母表达外源蛋白质的影响[J]. 生物化学与生物物理学报,2003,35(2):154-160.
- [15] 陆长梅,袁生,赵庆新. 用 Overlap-PCR 法从 *Trichoderma reesei* QM9414 基因组 DNA 中克隆并表达木聚糖酶 III [J]. 生物工程学报,2004,20(5):764-769.

(责任编辑:李春丽)