

## 超声辅助提取连翘总黄酮工艺优选

吴艳芳<sup>1</sup>, 王新胜<sup>2,3</sup>, 尹延彦<sup>1</sup>, 韩宁坤<sup>1</sup>

(1. 新乡医学院药学院, 河南 新乡 453003; 2. 河南科技大学化工与制药学院, 河南 洛阳 471003; 3. 南京中医药大学药学院, 南京 210046)

**[摘要]** 目的: 优选超声波辅助提取连翘中总黄酮的工艺参数。方法: 采用单因素和正交试验进行超声波辅助提取连翘总黄酮, 以紫外分光光度法测定连翘总黄酮的吸光度, 标准曲线法计算含量。结果: 最佳工艺条件为 65% 乙醇 60 ℃ 超声提取 10 min, 连翘总黄酮的平均质量分数为 2.58%。结论: 优化工艺简单, 稳定, 高效, 可行。

**[关键词]** 超声提取; 连翘; 总黄酮; 正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0030-03

## Study on Ultrasonic Wave Extraction Process of Total Flavones from Forsythiae Fructus

WU Yan-fang<sup>1</sup>, WANG Xin-sheng<sup>2,3</sup>, YIN Yan-yan<sup>1</sup>, HAN Ning-kun<sup>1</sup>

(1. Pharmaceutical College, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; 2. Chemical and Pharmaceutical College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 3. Pharmaceutical Collage, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish optimal process of extracting total flavonoids from Forsythiae Fructus by single factor test and orthogonal test. **Method:** The absorption of total flavonoids was determined by uv-spectrophotometer and the standard curve was used to calculate the content. **Result:** The optimum conditions for extracting the total flavonoids assisted by ultrasonic wave were as follow: 65% ethanol, ultrasonic time 15 min and extraction temperature 60 ℃. The mass fraction of total flavonoids extracted was up to 2.58%. **Conclusion:** The optimum extraction process was simple, stable, efficient and feasible.

**[Key words]** ultrasonic wave extraction; Forsythiae Fructus; total flavonoids; orthogonal test

连翘 *Fructus Forsythia* 为木犀科连翘属植物连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl. 的干燥果实, 味苦, 性微寒, 具有清热解毒、疏散风热、消痈散结、强心利尿和降血压之功效, 是我国常用的大宗药材之一。近几年来, 连翘提取物广泛用于保健品、食品防腐等领域, 在日本已将连翘果实应用于

食品保鲜工业。黄酮类化合物是许多中草药的有效成分, 具有抗肿瘤、延缓衰老、增强免疫力、调节内分泌系统、抑菌等生物活性<sup>[1]</sup>, 杨建雄等<sup>[2]</sup>通过体外实验表明, 连翘黄酮具有明显的体外抗氧化作用。超声波具有“空化现象”、“机械振动”以及“热效应”等特性, 可以使植物物质膨胀和水化, 并使可溶性成分通过扩散和传递向溶剂中传递, 从而极大地提高提取效率, 节约提取成本, 提高产品质量, 是当前浸出提取中最具前途的技术之一<sup>[3-4]</sup>, 已被广泛应用到各种天然活性成分的提取中。本实验通过超声波辅助提取连翘总黄酮, 以正交试验设计对其提取工艺进行优化, 为工业化生产提供依据。

**[收稿日期]** 20101016(002)

**[基金项目]** 河南省科技创新杰出青年基金项目 (104100510016); 新乡医学院省级重点学科开发课题 (ZD 200968)

**[第一作者]** 吴艳芳, 硕士, 讲师, 从事生药鉴定及品质评价, Tel: 0373-3831981, E-mail: wyf245@163.com

## 1 材料

Tu -1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用),SK 3310 HP 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),FA 2104 型电子分析天平(上海浦春计量仪器有限公司),JDF -300(B)型多功能粉碎机(鹤壁市天田山苑电器有限公司)。

连翘采自河南省辉县万仙山,由新乡医学院中药学教研室吴艳芳讲师鉴定为连翘 *Forsythia suspense* 的干燥果实;芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100080-200707);其他试剂均为国产分析纯。

## 2 方法

**2.1 标准曲线的绘制** 精密称取芦丁对照品 0.005 0 g 于 50 mL 量瓶中,用 80% 乙醇溶液定容。配制成  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液。分别精密量取 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 对照品溶液于 10 mL 量瓶中,加入 1%  $\text{AlCl}_3$  溶液 1 mL,定容,摇匀显色后以蒸馏水为空白在 275 nm 处测定吸光度。以吸光度( $A$ )为纵坐标,质量浓度( $C$ )为横坐标进行回归,得回归方程  $A = 0.026 3C - 0.000 4 (r = 0.999 9)$ 。

**2.2 样品溶液的制备** 连翘粉碎,过 60 目筛。精确称量约 0.5 g 的连翘粉末,加入一定体积分数的乙醇溶液,称重,分别在超声波频率 40 kHz,不同温度下,提取不同时间,冷却补重,过滤,得滤液,备用。

**2.3 连翘总黄酮含量测定** 按照 2.1 项下方法测定样品溶液的吸光度,以标准曲线法计算连翘总黄酮的质量分数。

## 3 结果与分析

### 3.1 单因素试验

**3.1.1 不同体积分数的乙醇对连翘总黄酮质量分数的影响** 分别用体积分数为 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 的乙醇溶液, 1:10 的料液比, 频率 40 kHz, 20 °C 超声 20 min, 按照 2.3 项下方法计算总黄酮的质量分数, 结果分别为 1.00%, 2.22%, 2.24%, 2.27%, 2.25%, 随着乙醇体积分数的增加, 连翘总黄酮的质量分数在 70% 达到最大, 之后下降, 同时试验中发现, 40% 乙醇提取液比较浑浊, 可能是因为连翘里面的糖类和蛋白质等大分子物质也被少量提取出来的缘故。

**3.1.2 提取时间对连翘总黄酮质量分数的影响** 设定用 60% 乙醇, 1:10 的料液比, 频率 40 kHz, 30 °C 超声 10, 20, 30, 40, 50, 60 min, 按照 2.3 项下方法

计算总黄酮的质量分数, 结果分别为 1.54%, 1.79%, 1.84%, 1.84%, 1.85%, 1.87%, 在 30 min 以前, 连翘总黄酮的质量分数随着时间的增加而增加, 50 min 后增加缓慢, 可能因为刚开始细胞内外连翘总黄酮浓度差最大, 提取时间过短, 黄酮溶解不充分, 质量分数较低, 随着提取过程的进行连翘总黄酮逐渐溶入提取液。在 30 min 后总黄酮质量分数增加不明显, 说明在 30 min 提取基本达到平衡。

### 3.1.3 提取温度比对连翘总黄酮质量分数的影响

设定用 60% 乙醇, 1:10 的料液比, 频率 40 kHz, 分别于 20, 30, 40, 50, 60, 70 °C 下超声 20 min, 按照 2.3 项下方法计算总黄酮的质量分数, 结果分别为 1.34%, 1.52%, 1.97%, 2.03%, 2.31%, 2.16%, 随着温度的升高, 连翘总黄酮的质量分数增加, 但是 50 °C 以后增加不大, 但是如果温度过高, 一些热敏性组分被破坏或溶剂挥发导致乙醇浓度降低而使总黄酮的质量分数下降<sup>[5]</sup>。

### 3.1.4 料液比对连翘总黄酮质量分数的影响

用 60% 乙醇, 分别设定 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30 的料液比, 频率 40 kHz, 分别于 30 °C 超声 20 min, 按照 2.3 项下方法计算总黄酮的质量分数, 结果分别为 1.80%, 1.90%, 2.10%, 2.10%, 2.20%, 不同的料液比对连翘总黄酮的质量分数有明显影响, 当料液比小于 1:20 ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 时, 随着料液比的增大, 连翘总黄酮质量分数不断增大。料液比越大, 连翘总黄酮质量分数越高。其原因可能是提取溶剂体积越大, 溶剂与浸提物的接触越充分, 能在相同时间内溶解出更多的黄酮从而使质量分数增大。当料液比大于 1:20 ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 时, 基本饱和。如果料液比过小, 没有足够的溶剂带出药材粉末表面的黄酮, 从而使质量分数降低; 如果料液比过大, 会消耗更多的能量和时间, 同时也会增加超声波破碎细胞的阻力, 使细胞破碎程度下降, 从而降低总黄酮的质量分数, 因此料液比为 1:20 ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为宜。

**3.2 正交设计** 根据单因素试验结果, 选择不同乙醇体积分数、提取时间、提取温度 3 个因素的较优水平, 按  $L_9(3^4)$  设计进行正交试验, 因素与水平见表 1。正交实验和方差分析见表 2, 3。

极差  $R$  表明温度是超声波提取连翘总黄酮的主要因素, 其次是乙醇体积分数, 提取时间对总黄酮的质量分数影响最小。直观分析最佳提取工艺为  $A_3B_3C_3$ , 即 60% 乙醇 60 °C 超声提取 30 min。方差分

表 1 超声波提取工艺因素水平

| 水平 | A        | B        | C      |
|----|----------|----------|--------|
|    | 乙醇体积分数/% | 提取时间/min | 提取温度/℃ |
| 1  | 45       | 10       | 40     |
| 2  | 55       | 20       | 50     |
| 3  | 65       | 30       | 60     |

表 2 超声波提取工艺正交试验

| No.   | A    | B    | C    | D    | 总黄酮/% |
|-------|------|------|------|------|-------|
| 1     | 1    | 1    | 1    | 1    | 1.64  |
| 2     | 1    | 2    | 2    | 2    | 2.07  |
| 3     | 1    | 3    | 3    | 3    | 2.46  |
| 4     | 2    | 1    | 2    | 3    | 2.16  |
| 5     | 2    | 2    | 3    | 1    | 2.58  |
| 6     | 2    | 3    | 1    | 2    | 1.86  |
| 7     | 3    | 1    | 3    | 2    | 2.58  |
| 8     | 3    | 2    | 1    | 3    | 1.98  |
| 9     | 3    | 3    | 2    | 1    | 2.50  |
| $K_1$ | 6.17 | 6.38 | 5.47 | 6.71 |       |
| $K_2$ | 6.59 | 6.62 | 6.72 | 6.51 |       |
| $K_3$ | 7.05 | 6.82 | 7.62 | 6.60 |       |
| R     | 0.30 | 0.15 | 0.72 | 0.30 |       |

表 3 方差分析

| 方差来源  | SS   | f | MS   | F      | P     |
|-------|------|---|------|--------|-------|
| A     | 0.13 | 2 | 0.07 | 19.14  | <0.05 |
| B     | 0.03 | 2 | 0.02 | 4.67   |       |
| C     | 0.78 | 2 | 0.39 | 110.69 | <0.01 |
| D(误差) | 0.01 | 2 | 0.00 | 1.00   |       |

注： $F_{0.05}(2,2)=19,F_{0.01}(2,2)=99$ 。

析结果可以看出温度对连翘总黄酮质量分数有极显著影响,乙醇体积分数对连翘总黄酮质量分数有显著影响,提取时间和误差项对总黄酮质量分数没有显著影响,因此从节约成本角度考虑,确定最佳提取工艺为  $A_3B_1C_3$ ,即 65% 乙醇 60 ℃ 超声提取 10 min,按此工艺进行了 3 次验证试验,结果连翘总黄酮的平均质量分数达到 2.58%,和上述正交试验表中的

结果相当,提取比较完全,表明最佳提取工艺条件可行。

4 小结

本研究采用超声波辅助提取法,以连翘总黄酮质量分数为考察指标,在单因素实验的基础上,采用正交试验确定了超声波法提取连翘总黄酮的最佳工艺条件为 65% 乙醇 60 ℃ 超声提取 10 min,连翘的平均质量分数为 2.58%。超声波辅助提取连翘总黄酮需设备简单、操作方便、提取时间短、提取率高、节能、节约药材、无需加热等优点,其在提取中草药成分方面的应用受到越来越多的重视,本实验方法简单,易行,可为连翘总黄酮的工业化生产提供参考。近年来,针对超声提取过程中存在的工艺放大的难题,我国科研人员研发了循环超声提取技术,该技术大幅度提高超声场的利用率,解决局部过度超声处理和超声波在介质中的快速衰减问题,使提取时间短、提取率更高。在保证物料循环流动的前提下,可使超声场处理的物料量不受限制,解决了超声提取的工艺放大难题,从而大大拓宽了超声提取的应用范围。

[参考文献]

[1] Kanako S, Kouji M, Kazuaki O, et al. Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of sophora flavescens [J]. Plant Physiol, 2008, 146(3): 1075.

[2] 杨建雄, 杨晨, 邱娟, 等. 连翘叶黄酮的体外抗氧化作用[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19: 97.

[3] Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction [J]. Ultrason Sonochem, 2001, 8(2): 137.

[4] 曹雁平, 刘佐才. 植物成分超声浸取研究现状[J]. 化工进展, 2005, 24(11): 1249.

[5] 王志刚, 秦民坚, 郝利君, 等. 超声法提取菝葜中总黄酮的正交实验研究[J]. 中国野生植物资源, 2009, 25(5): 54.

[责任编辑 全燕]