

表面活性剂-超声协同提取红景天总黄酮工艺优选*

洪松彬¹, 何石兰², 黄海潮³, 聂阳^{3△}

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 广东省中医院二沙岛分院, 广东 广州 510105;
3. 广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520)

摘要:目的 优选表面活性剂-超声协同提取红景天总黄酮的工艺。方法 以总黄酮提取率为评价指标, 对不同类型的表面活性剂进行筛选, 再分别以表面活性剂体积分数、乙醇体积分数、超声功率、提取时间、料液比进行单因素试验, 采用 $L_{27}(3^5)$ 正交试验优选提取工艺。结果 十二烷基硫酸钠(SDS)在 60% 乙醇中对总黄酮的增溶效果最好; 正交试验优选的最佳提取工艺为以 1.5% SDS 作为增溶剂, 超声功率为 600 W, 60% 乙醇为溶剂, 料液比为 1:15(g:L), 提取 15 min。验证试验结果显示, 总黄酮的平均提取率为 4.04%, RSD 为 0.81% ($n=5$)。结论 所建表面活性剂-超声协同提取工艺可经济、高效地提取红景天中总黄酮。

关键词: 红景天; 超声提取; 表面活性剂; 总黄酮; 正交试验; 工艺优化

中图分类号: R932; R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)04-0008-04

Process Optimization for Extraction of Total Flavonoids from *Rhodiola Crenulata* by Surfactant-Ultrasonic Synergistic Extraction

HONG Songbin¹, HE Shilan², HUANG Haichao³, NIE Yang³

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou, Guangdong, China 510405; 2. Ersha Island Branch Hospital, Guangdong Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510105; 3. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou, Guangdong, China 510520)

Abstract: **Objective** To optimize the synergistic extraction process of total flavonoids from *Rhodiola crenulata* by surfactant-ultrasonic synergistic extraction. **Methods** With the extraction rate of total flavonoids as the evaluation index, different types of surfactant were screened. Single factor test was carried out with the volume fraction of surfactant, the volume fraction of ethanol, ultrasonic power, extraction time and solid-liquid ratio, respectively. The extraction conditions were optimized by $L_{27}(3^5)$ orthogonal test. **Results** The sodium lauryl sulfate(SDS) had the best solubilization effect on flavonoids in 60% ethanol. The optimum extraction process of orthogonal test was as follows: 1.5% SDS was taken as solubilizer, ultrasonic power was 600 W, 60% ethanol was taken as the solvent, the solid-liquid ratio was 1:15(g:L), the extraction time was 15 min. The verification result showed that the average extraction rate of total flavonoids was 4.04% and RSD was 0.81% ($n=5$). **Conclusion** The established surfactant-ultrasonic synergistic extraction method is economical and efficient for extraction of total flavonoids from *Rhodiola crenulata*.

Key words: *Rhodiola crenulata*; ultrasonic extraction; surfactant; total flavonoids; orthogonal test; process optimization

红景天 *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba 为蔷薇目景天科多年生植物, 其根茎粗壮且略带芳香, 是主要入药部位^[1], 具有扶正固本、理气养血的功效, 主治气虚血瘀、气短乏力、倦怠气喘等气虚证。现代药理学研究表明, 其具有改善心肺功能、促进血管生长、保护缺氧心肌、改善急性脑梗死状态等作用^[2-4]。黄酮类化合物是红景天中主要活性成分之一, 包括山柰酚、草质素苷、槲皮素、花色苷等^[5]。黄酮类化合物一般以水溶性苷或脂溶性苷元 2 种形式存在, 由于苷与苷元的极性相差较大, 传统提取方法如水煎煮法、回流法、酶解法、超声法和微波法均难以同时提高两类成分的提取率^[6]。表面活性剂提取是近年兴起的中药提取法, 利用其增溶作用, 可增加药材中苷元等脂溶性成分的溶解度, 从而

大大提高低极性成分的提取率^[7]。本试验中采用表面活性剂-超声协同提取法, 通过正交试验优选红景天总黄酮的提取工艺参数, 为在工业化生产中引进高效、经济的中药提取方法提供参考。

1 仪器与试剂

仪器: UV-1800 型紫外分光光度计(日本岛津公司); SB-5200DTD 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); D101 型大孔树脂(天津波鸿树脂科技有限公司)。

试剂: 芦丁对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 100080-201708, 纯度 $\geq 99\%$); 红景天饮片(广东康美药业股份有限公司, 批号为 180120361); 试验所用试剂均为分析纯, 水为纯化水。

*基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目[B2018184]; 广东省中医药局项目[20161035]。

第一作者: 洪松彬, 男, 大学本科, 主管中药师, 研究方向为中药学, (电子信箱)jazzgz@qq.com。

△通信作者: 聂阳, 男, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为中药制剂, (电子信箱)380696279@qq.com。

2 方法与结果

2.1 药材处理流程及提取方法

红景天清洗→干燥→粉碎→过80目筛→密封保存→称取适量红景天粉末(5 g)→加入乙醇和1.0%十二烷基硫酸钠(SDS)溶液→超声提取→回收溶剂浓缩粗提取物→抽滤去除药材碎渣→大孔树脂柱纯化→微孔滤膜滤过不溶性颗粒→取上清液(即为供试品溶液)→检测。

2.2 红景天总黄酮的相关测定

测定波长选择:以芦丁为对照品,采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 法测定总黄酮含量。称取芦丁对照品10.80 mg,精密称定,以70%乙醇溶解并定容至50 mL,摇匀,得质量浓度为0.216 g/L的对照品溶液。分别吸取对照品溶液和2.1项下供试品溶液适量,各置25 mL容量瓶中,加入5% NaNO_2 溶液1.0 mL,摇匀,放置6 min,加10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液1.0 mL,摇匀,放置6 min,加入4% NaOH 溶液10.0 mL,用70%乙醇定容,摇匀,放置15 min。以70%乙醇为参比液,在300~700 nm波长区间扫描。结果对照品溶液和供试品溶液在510 nm波长处均有最大吸收,故选取510 nm为测定波长。

提取率计算:准确量取芦丁对照品溶液0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL,分别置25 mL容量瓶中,于510 nm波长处测定吸光度。以质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标,吸光度(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=0.0124X+0.00357$, $r=0.9994$ ($n=7$)。结果表明,芦丁质量浓度在5.417~55.282 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度线性关系良好。精密度和24 h稳定性试验结果的 RSD 分别为1.10%和0.92% ($n=6$);加样回收率为98.58%, $RSD=1.50\%$ ($n=6$)。取供试品溶液适量,依法操作,测定510 nm波长处吸光度,计算总黄酮质量浓度,并按公式计算提取率。提取率($\%$)= $[K \times c_x \times V / (10^6 \times m)] \times 100\%$,式中, K 为稀释倍数, c_x 为供试品溶液中总黄酮质量浓度($\mu\text{g/mL}$), V 为供试品溶液体积(mL), m 为红景天饮片质量(g)。

2.3 表面活性剂筛选

称取6份药材样品粗粉各5.00 g,置烧瓶中,加10倍量70%乙醇,分别加入体积分数为1.0%的不同亲水疏水平衡值(HLB)的表面活性剂,超声(功率为500 W)

提取1 h,滤过后得供试品溶液。按2.2项下方法测定吸光度,计算总黄酮提取率,结果见表1。阴离子表面活性剂的加入可显著提高总黄酮的提取率,其中以SDS效果最好,可能是SDS形成的胶束更有利于黄酮的增溶^[8]。故选用SDS作为表面活性剂。

2.4 单因素试验

称取6份药材样品粉末各5.00 g,试验条件为按料液比1:10(g:L)加入70%乙醇作为溶剂,加入SDS至终体积分数为1%,超声提取15 min。

SDS浓度选择:分别加入SDS至终体积分数依次为0.5%,1.0%,1.5%,2.0%,2.5%,3.0%,平行提取3次,按2.2项下方法测定总黄酮含量并计算其提取率,结果见图1。可见,随着SDS体积分数的增加,总黄酮提取率也逐渐升高,在SDS体积分数为1.5%时,总黄酮提取率最大,再增加SDS体积分数,总黄酮提取率不再升高,故SDS的体积分数应在1%~2%范围进行优化。

超声功率筛选:将超声功率分别设为300,400,500,600,700,800 W,平行提取3次。按2.2项下方法测定总黄酮含量并计算其提取率,结果见图2。可见,超声功率在300~600 W范围内总黄酮提取率逐渐升高,当功率超过700 W后,总黄酮提取率显著降低。其原因为超声功率过大时,高频振动产生的热效应使温度升高,导致热稳定性较差的黄酮类成分含量减少,故应在500~700 W范围内对超声功率进行优化。

提取时间筛选:分别超声提取5,10,15,20,25,30 min,平行提取3次,按2.2项下方法测定总黄酮含量并计算其提取率,结果见图3。可见,随超声时间的延长,总黄酮提取率逐渐升高,在15~20 min时总黄酮提取率最高,继续延长时间,总黄酮提取率反而降低。这可

表1 表面活性剂种类对总黄酮提取率的影响

表面活性剂	类型	HLB值	提取率(%)
SDS	阴离子型	13.0	3.34
SDS	阴离子型	40.0	3.62
吐温20	非离子型	16.7	1.97
吐温40	非离子型	15.6	2.88
吐温80	非离子型	15.0	3.12
水	-	-	1.12

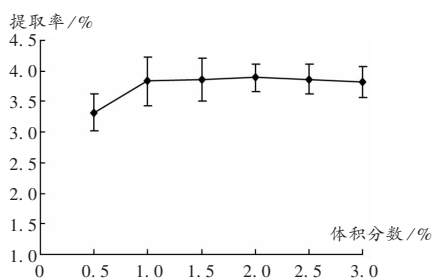


图1 SDS体积分数对总黄酮提取率的影响

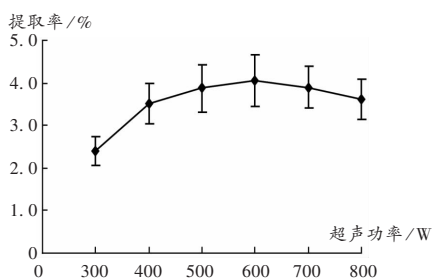


图2 超声功率对总黄酮提取率的影响

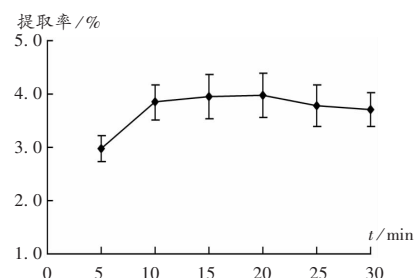


图3 超声时间对总黄酮提取率的影响

能是因超声波具有较强的热效应,过长时间作用会破坏黄酮类成分,故应在 15 ~ 25 min 范围内对提取时间进行优化。

乙醇体积分数筛选:分别以体积分数为 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 的乙醇作为溶剂进行提取,平行提取 3 次,按 2.2 项下方法测定总黄酮含量并计算其提取率,结果见图 4。可见,随着乙醇体积分数的增加,总黄酮提取率逐渐升高,当乙醇体积分数为 60% 时总黄酮提取效率最高,而乙醇体积分数大于 70% 时总黄酮提取率开始下降。这是因黄酮大多以苷的形式存在于药材中,其水溶性较好,当乙醇和水达到适合的比例时,糖苷与苷元两者均能更好地溶剂化,若乙醇体积分数过高则不利于黄酮苷类成分的溶解。此外,从实际生产成本方面考虑,需节约乙醇的用量,故乙醇体积分数应在 40% ~ 60% 范围内进行优化。

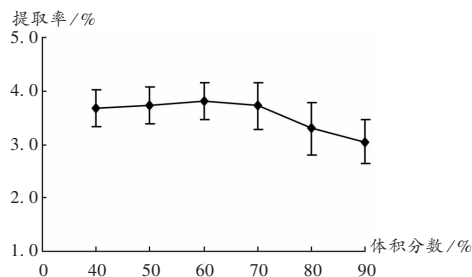


图4 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响

料液比筛选:分别按料液比 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30(g:L) 的比例加入溶剂进行提取,平行提取 3 次,按 2.2 项下方法测定总黄酮含量并计算其提取率,结果见图 5。可见,溶剂比例逐渐增大,总黄酮的提取率逐渐升高,但当料液比超过 1:15(g:L) 后,再增加溶剂的用量时总黄酮提取率并无明显提高,反而延长了溶剂回收、产物浓缩干燥等后续步骤的耗时,故对料液比应在 1:10 ~ 1:20(g:L) 范围内进行优化。

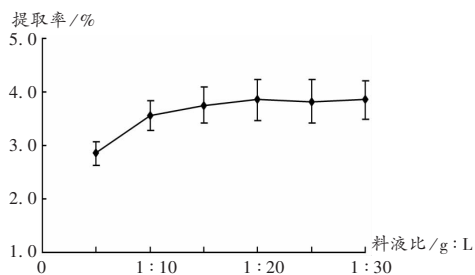


图5 料液比对总黄酮提取率的影响

2.5 正交试验

直观分析和极差分析:根据单因素试验,对提取总黄酮所需的 SDS 体积分数(A)、超声功率(B)、提取时间(C)、乙醇体积分数(D)、料液比(E)5 个因素进行 3 水平的正交试验 $L_{27}(3^5)$ 分析。结果见表 2 和表 3。得出的最佳提取条件为 $A_2B_2C_1D_3E_1$, 即 SDS 终体积分数为

1.5%, 超声功率为 600 W, 提取 15 min, 乙醇体积分数为 60%, 料液比为 1:15(g:L)。极差分析结果显示,各因素对总黄酮提取率的影响强度依次为 $A > B > D > E > C$ 。

表2 正交试验因素水平表

水平	因素 A(%)	因素 B(W)	因素 C(min)	因素 D(%)	因素 E(g:L)
1	1.0	500	15	40	1:15
2	1.5	600	20	50	1:20
3	2.0	700	25	60	1:25

表3 $L_{27}(3^5)$ 正交试验设计与结果

序号	A(%)	B(W)	C(min)	D(%)	E(g:L)	总黄酮提取率(%)
1	1	1	1	1	1	3.56
2	1	1	1	1	2	3.77
3	1	1	1	1	3	3.98
4	1	2	2	2	1	3.95
5	1	2	2	2	2	3.85
6	1	2	2	2	3	4.01
7	1	3	3	3	1	3.95
8	1	3	3	3	2	3.74
9	1	3	3	3	3	3.73
10	2	1	3	3	1	3.88
11	2	1	3	3	2	4.05
12	2	1	3	3	3	4.01
13	2	2	1	1	1	4.02
14	2	2	1	1	2	4.05
15	2	2	1	1	3	3.78
16	2	3	2	2	1	3.81
17	2	3	2	2	2	3.78
18	2	3	2	2	3	3.95
19	3	1	3	2	1	3.71
20	3	1	3	2	2	3.54
21	3	1	3	2	3	3.42
22	3	2	1	3	1	3.89
23	3	2	1	3	2	3.81
24	3	2	1	3	3	3.63
25	3	3	2	1	1	3.64
26	3	3	2	1	2	3.48
27	3	3	2	1	3	3.01
I	34.54	33.92	34.18	33.29	34.41	
II	35.33	34.99	33.88	34.02	34.07	
III	32.13	33.09	33.94	34.69	33.52	
K_1	11.51	11.31	11.39	11.10	11.47	
K_2	11.78	11.66	11.29	11.34	11.36	
K_3	10.71	11.03	11.31	11.56	11.17	
R	1.07	0.63	0.10	0.47	0.30	

方差分析:为了区分因素水平和试验误差引起的数据波动,需在直观分析和极差分析基础上进行方差分析^[9]。计算各因素的平均方差,其中因素 C 平均方差值最小,故将因素 C 选为误差项。方差分析结果表明,A,

B, D 3 个因素对总黄酮提取率的影响差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 C 和 E 两因素对总黄酮提取率的影响差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果见表 4。

表 4 方差分析结果

因素	离均差平方和	自由度	均方差	$F_{\text{临界值}}$	F 值	P
A	1.85	2	0.62	$F_{0.01}(2,2) = 99.01$	110.27	< 0.01
B	0.60	2	0.20	$F_{0.05}(2,2) = 19.00$	36.00	< 0.05
C	0.02	2	0.01	$F_{0.05}(2,2) = 19.00$	1.00	> 0.05
D	0.33	2	0.11	$F_{0.05}(2,2) = 19.00$	19.46	< 0.05
E	0.13	2	0.04	$F_{0.05}(2,2) = 19.00$	8.00	> 0.05

2.6 验证试验

称取 5 份药材样品, 每份各 5.00 g, 按 2.5 项下最佳提取条件进行操作, 按 2.2 项下方法测定总黄酮含量并计算其提取率。结果提取率分别为 4.03%, 4.02%, 4.05%, 4.03%, 4.06%, 平均 4.04%, RSD 为 0.81% ($n = 5$), 表明优化的提取工艺稳定可靠, 提取率较高。

3 讨论

$L_{27}(3^3)$ 正交试验分析结果表明, 表面活性剂体积分数、超声功率和乙醇体积分数为显著影响总黄酮提取率的主要因素。在表面活性剂的选择上, 本试验中分别考察了离子型和非离子型 2 种 HLB 值大于 13.0 的表面活性剂对总黄酮提取率的影响。可见, 使用离子型表面活性剂的提取率明显高于非离子型表面活性剂。黄酮类化合物结构上含有多个酚羟基而带有酸性, 在一定 pH 范围内带电, 因此可通过静电力与带有电荷的离子型表面活性剂相互亲合, 从而加强 SDS 等表面活性剂的增溶作用, 提高总黄酮提取率^[10]。表面活性剂可通过形成胶束结构来增加溶质的水溶性, 临界胶束浓度(CMC)是衡量表面活性剂增溶能力的关键指标, 溶剂中 CMC 值越小, 增溶能力越强。由表面活性剂的筛选结果可推测, 在 60% 乙醇中, SDS 的 CMC 值最小。单因素试验结果表明, 当 SDS 体积分数达 2.0% 后, 即使继续增加, 总黄酮的提取率也不再增加, 这是由于 SDS 体积分数超过 CMC 后, 继续增加 SDS 的剂量, 形成胶束数量并未随之增加, 故未能提高总黄酮提取率。此外, 过多使用 SDS, 可导致药材中其他成分的溶解度增加, 从而引入其他杂质。

超声提取法是目前广泛用于中药成分提取的方法之一, 利用超声波的高频机械振荡作用使溶剂快速进入植物细胞中, 同时通过空化效应瞬间将植物组织和细胞分解、破裂, 使细胞的内容物释放与溶出, 且超声波具有热效应, 可增大细胞内溶质的溶解度或扩散速率, 3 种作用机制相互配合发挥作用, 可大大提高中药成分的提取率^[11]。本试验结果表明, 超声功率是影响黄酮提取率的次要因素, 超声功率的设定必须适中, 功率偏低, 提取率不高, 而功率过高, 产生的热效应过大, 会导致稳定性较差的黄酮类成分氧化或分解^[12], 正交试验分析显示

功率设为 600 W 为最佳。

黄酮类化合物的提取主要以乙醇为溶剂, 90% ~ 95% 乙醇适用于苷元的提取, 60% 乙醇适用于黄酮苷的提取, 将优化工艺的验证结果和乙醇体积分数单因素提取结果进行对比分析, 可见在同样以 60% 乙醇作为提取溶剂的条件下, 前者的提取率明显高于后者, 原因是适量的 SDS 作为增溶剂能有效增加黄酮苷元在 60% 乙醇中的溶解度, 从而显著提高总黄酮提取率, 同时也可减少乙醇的用量, 降低生产成本。

超声提取时间和料液比在 5 个因素中对总黄酮提取率的影响较小, 但两提取因素的设定仍值得注意, 提取时间过长, 超声热效应可产生过多的热量, 会导致黄酮分子中具有还原性的酚羟基发生氧化^[13]; 溶剂用量过多, 会增加溶剂回收、提取物浓缩、产物干燥等后续步骤的时间消耗, 导致生产效率降低, 成本耗费增加。综合本试验各方面数据分析, 利用表面活性剂-超声协同提取红景天总黄酮, 按料液比 1:15(g:L) 加入 60% 乙醇作为溶剂, 以终体积分数 1.5% 的 SDS 为增溶剂, 超声(功率设为 600 W)提取 15 min, 可获得满意的总黄酮提取率。

参考文献:

- [1] 李海梅. 藏药材大花红景天的特征简述[J]. 中国民族医药杂志, 2013, 19(7): 15-16.
- [2] 韦迎娜, 王芳, 刘尚军. 大花红景天注射液治疗老年冠心病心绞痛 51 例[J]. 中国药业, 2014, 23(18): 109-110.
- [3] 倪付勇, 谢雪, 刘露, 等. 大花红景天黄酮类化学成分研究[J]. 中草药, 2016, 47(2): 214-218.
- [4] 王久敏. 大花红景天联合依达拉奉治疗急性脑梗死 54 例[J]. 中国药业, 2015, 24(4): 73-74.
- [5] 索朗, 贡布, 多杰仁青. 3 种红景天药效学比较研究[J]. 中国药业, 2014, 23(24): 44-45.
- [6] 程新燕. 植物中黄酮类化合物的提取工艺及药理活性研究进展[J]. 广西医科大学学报, 2016, 33(6): 1075-1076.
- [7] 聂阳, 黄勇红, 李博, 等. 表面活性剂-超声协同提取甘木通总黄酮工艺的研究[J]. 中成药, 2013, 35(9): 2040-2042.
- [8] 徐洁, 单爽, 黄静, 等. 四种表面活性剂对姜黄素和黄芩苷的增溶作用[J]. 中国药理学杂志(网络版), 2016, 14(3): 78-88.
- [9] 王文端, 崔洁, 施露, 等. 基于层次分析和正交设计法优选甘草提取工艺[J]. 中国现代中药, 2017, 19(8): 1181-1186.
- [10] 魏巍, 郭伟英. 响应面优化表面活性剂协同超声提取合欢花总黄酮的工艺[J]. 中药材, 2015, 38(3): 606-609.
- [11] 陈静, 崔玉梅. 超声提取中草药成分研究进展[J]. 西部中医药, 2016, 29(12): 141-142.
- [12] 于泽芳, 宋浩静, 李宵, 等. 3 个厂家银杏叶提取物注射液在两种溶媒中的稳定性考察[J]. 中国药师, 2018, 21(3): 504-508.
- [13] 赵雪巍, 刘培玉, 刘丹, 等. 黄酮类化合物的构效关系研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(21): 3264-3271.

(收稿日期: 2018-06-13)