

环糊精包合物中桂皮醛、丁香酚、苍术素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 86-88.

[13] 黄 进, 杨国宇, 李宏基, 等. 抗氧化剂作用机制研究进展[J]. 自然杂志, 2004, 26(2): 74-77.

[14] 汤务霞, 陈明涛, 阙晓莉. 抗氧化剂 BHT 和维生素 E 对菜籽油的抗氧化研究[J]. 中国食品添加剂, 2011(4): 59-62.

[15] 穆筱梅, 钟振声. 维生素 E、维生素 C 和 BHT 对大豆磷脂脂质体的抗氧化作用[J]. 大豆科学, 2006, 25(4): 434-437.

[16] 刘成梅, 冯妹元, 刘 伟, 等. 天然维生素 E 及其抗氧化机理[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(6): 205-207.

表面活性剂-超声协同提取山香圆叶总黄酮工艺的优化

罗开沛, 李小芳*, 林 浩, 罗 佳, 杨 露, 刘海霞
(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137)

摘要: **目的** 优化表面活性剂-超声协同提取山香圆 *Turpinia arguta* Seem. 叶总黄酮工艺。**方法** 在单因素试验基础上, 以十二烷基硫酸钠 (SDS) 用量、液料比、乙醇体积分数为影响因素, 总黄酮提取率为评价指标, Box-Behnken 设计优化提取工艺。**结果** 最佳条件为十二烷基硫酸钠用量 0.64%, 液料比 25 : 1, 乙醇体积分数 50%, 超声温度 60 ℃, 超声时间 40 min, 总黄酮提取率为 3.48%。**结论** 该方法简单、节能、省时, 可用于山香圆叶总黄酮的提取。**关键词:** 山香圆; 叶; 总黄酮; 表面活性剂-超声协同提取; Box-Behnken 设计
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)12-2585-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.12.012

Optimization of surfactant assisted ultrasonic extraction for total flavonoids from *Turpinia arguta* leaves

LUO Kai-pei, LI Xiao-fang*, LIN Hao, LUO Jia, YANG Lu, LIU Hai-xia
(College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; The Ministry of Education Key Laboratory for Standardization of Chinese Herbal Medicine; Key Laboratory for Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province—State Key Laboratory Breeding Base Co-founded by Province and Ministry, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the surfactant assisted ultrasonic extraction process for total flavonoids from *Turpinia arguta* Seem. leaves. **METHODS** Based on single factor test, sodium dodecyl sulfate (SDS) amount, liquid-solid ratio and ethanol concentration were determined to be the influencing factors, and Box-Behnken design was applied to optimizing the extraction with the extraction rate of total flavonoids as an evaluation tool. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 0.64% for sodium dodecyl sulfate consumption, 25 : 1 for liquid-solid ratio, 50% for ethanol concentration, 60℃ for ultrasonic temperature, and 40 min for ultrasonic time at 3.48% total flavonoids extraction rate. **CONCLUSION** This energy and time saving, and yet simple method can be used for the extraction of total flavonoids from *T. arguta* leaves.
KEY WORDS: *Turpinia arguta* Seem.; leaves; total flavonoids; surfactant assisted ultrasonic extraction; Box-Behnken design

收稿日期: 2016-01-04
基金项目: 四川省教育厅重点项目 (15ZA0094); 四川省科技厅“苗子工程”重点项目 (2016RZ0037)
作者简介: 罗开沛 (1991—), 男, 硕士生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。Tel: 15351218131, E-mail: luokaipei@126.com
* 通信作者: 李小芳 (1964—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。Tel: 13808195110, E-mail: lixiaofang918@163.com

山香圆叶又称两指剑、七寸钉等，为省沽油科植物山香圆 *Turpinia arguta* Seem. 的干燥叶，其味苦，性寒，归肺、肝经，具有清热解毒、利咽消肿之效，主治咽喉肿痛、乳蛾喉痹等病症^[1]。现代研究表明，总黄酮是其主要有效部位，具有抗菌、抗炎、增强免疫等药理作用^[2-4]。目前，对山香圆叶总黄酮提取的研究较少，仅有回流提取法^[5]和微波提取法^[6]，均存在一定缺陷，如前者溶剂用量大、提取周期长，而后者对仪器设备要求较高，对药物和溶媒选择性较强，而且存在安全隐患。

表面活性剂-超声协同提取是近年来兴起的一种提取方法，兼顾了表面活性剂的润湿、增溶作用和超声波的振动、空化效应，具有减少耗能、缩短时间、提高得率等优点，尤其适用于黄酮类化合物的提取^[7-8]。本实验采用该方法提取山香圆叶总黄酮，首先对可能影响提取率的因素进行考察，确定主要因素及其大致范围，再通过 Box-Behnken 设计进一步优化提取工艺，旨在为山香圆叶资源的合理开发提供理论基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器 PS-60A 超声波清洗器（成都雅荣实验仪器有限公司）；UV-6000 紫外可见分光光度计（上海美谱达仪器有限公司）；UPT-I-10T 超纯水器（成都超纯科技有限公司）；BP211DAG 电子天平（十万分之一，德国 Satorius 公司）。

1.2 材料 芹菜素对照品（成都曼思特生物科技有限公司，批号 MUST-15032610）。山香圆叶（江西青峰药业有限公司），由成都中医药大学药学院蒋桂华教授鉴定为正品。吐温-20、吐温-80、司盘-80、十二烷基磺酸钠（SBS）、十二烷基苯磺酸钠（DBS）、十二烷基硫酸钠（SDS）、乳化剂 OP-10（成都市科龙化工试剂厂）；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 表面活性剂-超声协同提取方法 取山香圆叶粗粉 1 g，加入适量表面活性剂和乙醇溶液，超声（40 kHz、350 W）提取一定时间，过滤，即得供试品溶液。

2.2 总黄酮测定方法

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取芹菜素对照品 5.10 mg，置于 50 mL 量瓶中，甲醇超声溶解后定容，摇匀，得到 0.102 mg/mL 对照品溶液。

2.2.2 测定波长的选择^[9] 将对照品溶液和供试品溶液分别稀释至一定浓度，在 200 ~ 500 nm 波长之间进行扫描，发现两者均在 268.5 nm 波长处有

最大吸收，故选择 268.5 nm 作为检测波长。

2.2.3 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL，置于 25 mL 量瓶中，甲醇定容，在 268.5 nm 波长处测定吸光度，以芹菜素质量浓度（C）对吸光度（A）进行线性回归，得标准曲线 $A = 0.076\ 7C + 0.028\ 8$ （ $r = 0.999\ 6$ ），表明芹菜素在 2.04 ~ 10.20 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.2.4 含有量的测定 取山香圆叶粗粉 1 g，在一定条件下超声提取，过滤，得到样品液，量取适量并稀释至适宜浓度，在 268.5 nm 波长处测定吸光度，将其代入“2.2.3”项下标准曲线以计算总黄酮含有量。

2.3 单因素试验

2.3.1 表面活性剂种类对提取率的影响 称取 7 份山香圆叶粗粉，每份 1 g，置于烧瓶中，加入 0.5% 不同表面活性剂和 60% 乙醇，固定液料比 20 : 1，在 50 ℃ 下超声 30 min，过滤，即得提取液，按“2.2.4”项下方法测定总黄酮含有量，计算提取率（总黄酮含有量/药材质量），结果见表 1。由表可知，阴离子型表面活性剂提取率普遍高于非离子型，这可能与其增溶水量大于后者有关^[10]，其中又以十二烷基硫酸钠的提取效果最好，而且价格便宜，因此选择其作为表面活性剂。

表 1 表面活性剂种类对提取率的影响
Tab. 1 Effects of surfactant types on extraction rate

表面活性剂	类型	亲水亲油平衡值 (HLB)	提取率/%
吐温-20	非离子型	16.7	2.21
吐温-80	非离子型	15.0	2.46
司盘-80	非离子型	4.30	1.52
十二烷基硫酸钠	阴离子型	40.0	3.23
十二烷基磺酸钠	阴离子型	13.0	3.04
十二烷基苯磺酸钠	阴离子型	10.6	2.97
乳化剂 OP-10	非离子型	14.5	2.65

2.3.2 表面活性剂用量对提取率的影响 在液料比 20 : 1、乙醇体积分数 60%、超声温度 50 ℃、超声时间 30 min 条件下，考察 0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8% 十二烷基硫酸钠用量对总黄酮提取率的影响。结果，提取率先随用量增加而升高，但当用量大于 0.6% 后反而有所降低，这可能是由于表面活性剂达到临界胶束浓度后，形成的胶团与其他物质结合，减弱了对黄酮类化合物的增溶作用，导致提取率有所下降。因此，选择 0.5%、0.6%、0.7% 用量作进一步优化。

2.3.3 液料比对提取率的影响 在乙醇体积分数 60%、十二烷基硫酸钠用量 0.6%、超声温度 50 ℃、超声时间 30 min 条件下,考察 10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1 液料比对总黄酮提取率的影响。结果,液料比增加会提高总黄酮提取率,但大于 20 : 1 后,其他杂质也会相应增加,导致其溶出受到干扰。因此,选择 15 : 1、20 : 1、25 : 1 液料比作进一步优化。

2.3.4 超声温度对提取率的影响 在液料比 20 : 1、乙醇体积分数 60%、十二烷基硫酸钠用量 0.6%、超声时间 30 min 条件下,考察 40、50、60、70、80 ℃ 超声温度对总黄酮提取率的影响。结果,随着温度升高,提取率逐渐增大,可能是由于高温加快了分子运动而有利于其溶出;当温度达到 60 ℃ 时,总黄酮溶解度已基本趋于饱和,增幅明显变缓。从节约成本角度考虑,固定超声温度为 60 ℃,不作后续优化。

2.3.5 超声时间对提取率的影响 在液料比 20 : 1、乙醇体积分数 60%、十二烷基硫酸钠用量 0.6%、超声温度 50 ℃ 条件下,考察 20、30、40、50、60 min 提取时间对总黄酮提取率的影响。结果,超声时间越长,提取率越高,但增长幅度不明显,考虑到时间过长不仅浪费能源,而且会缩短仪器的使用寿命,还可能提取出更多的无效成分,故最终固定超声时间为 40 min,不作后续优化。

2.3.6 乙醇体积分数对提取率的影响 在液料比 20 : 1、乙醇体积分数 60%、十二烷基硫酸钠用量 0.6%、超声时间 30 min 条件下,考察 30%、40%、50%、60%、70% 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响。结果,当乙醇体积分数为 50% 时,提取率最大;继续增加体积分数,提取率反而明显下降,可能此时易提取出一些极性较小的杂质(如叶绿素),从而阻碍了总黄酮溶出。因此,选择 40%、50%、60% 乙醇体积分数作进一步优化。

2.4 Box-Behnken 设计

2.4.1 方法 参考文献 [11] 并结合单因素试验,根据 Box-Behnken 设计原理^[12],以总黄酮提取率(Y)为评价指标,十二烷基硫酸钠用量(A)、液料比(B)、乙醇体积分数(C)为影响因素进行优化,因素水平见表 2,设计结果见表 3。

2.4.2 模型拟合 应用 Design-Expert 8.0.6 软件分析实验数据,拟合多元线性回归方程为 $Y = 3.25 + 0.096A + 0.069B - 0.12C$ ($r = 0.445\ 8$),二次多项式回归方程为 $Y = 3.41 + 0.096A + 0.069B +$

$0.12C + 0.04AB + 0.01AC + 0.12BC - 0.15A^2 - 0.028B^2 - 0.15C^2$ ($r = 0.983\ 6$),由于后者 r 值较大,即模型拟合情况良好,故对其进行方差分析,结果见表 4。由表可知,整体模型 $P < 0.01$,表明该响应面模型显著性较高;失拟项 $P > 0.05$,表明该模型试验误差小,可对总黄酮提取进行分析及预测。

表 2 因素水平

Tab. 2 Factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
A 十二烷基硫酸钠/%	0.5	0.6	0.7
B 液料比	15 : 1	20 : 1	25 : 1
C 乙醇/%	40	50	60

表 3 Box-Behnken 设计结果

Tab. 3 Box-Behnken design results

编号	A 十二烷基硫酸钠/%	B 液料比	C 乙醇/%	Y 提取率/%
1	0	0	0	3.39
2	1	1	0	3.43
3	-1	0	1	2.85
4	0	1	-1	3.28
5	0	-1	1	2.95
6	0	1	1	3.31
7	0	0	0	3.46
8	0	0	0	3.41
9	0	0	0	3.37
10	1	-1	0	3.20
11	-1	0	-1	3.15
12	1	0	1	3.09
13	1	0	-1	3.34
14	-1	-1	0	3.11
15	-1	1	0	3.18
16	0	-1	-1	3.39
17	0	0	0	3.42

表 4 方差分析

Tab. 4 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	F 值	P 值
模型	0.5	9	46.53	<0.000 1
A	0.074	1	61.94	0.000 1
B	0.038	1	31.60	0.000 8
C	0.12	1	96.29	<0.000 1
AB	0.006 4	1	5.35	0.054
AC	0.000 6	1	0.52	0.493 3
BC	0.055	1	46.16	0.000 3
A ²	0.098	1	81.84	<0.000 1
B ²	0.003 2	1	2.66	0.146 8
C ²	0.095	1	79.18	<0.000 1
残差	0.008 4	7	—	—
失拟项	0.003 8	3	1.09	0.448 1
纯误差	0.004 6	4	—	—
总离差	0.51	16	—	—

2.4.3 响应面分析 根据回归方程绘制三维效应面图，见图 1。

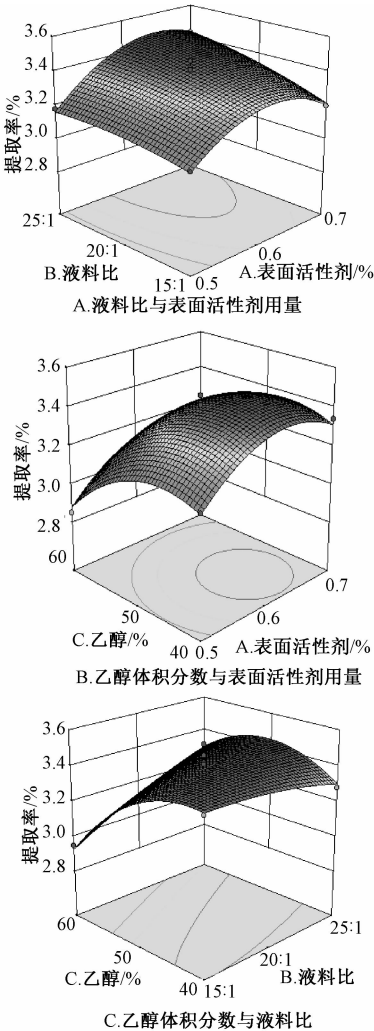


图 1 三维效应面图

Fig. 1 Three-dimensional response surface graphs

2.4.4 验证试验 通过以上分析，得到最佳条件为表面活性剂用量 0.64%，液料比 25：1，乙醇体积分数 50.09%，总黄酮提取率预测值 3.5%。为了便于实验操作，将其修正为表面活性剂用量 0.64%，液料比 25：1，乙醇体积分数 50%。进行 3 批验证试验，测得总黄酮提取率分别为 3.53%、3.45%、3.47%，平均值 3.48%（RSD < 2.0%），与预测值接近，表明所建立的模型预测性良好，准确性较高。

2.5 不同提取方法的比较 根据优化得到的最佳工艺条件，与回流法和超声法进行比较，结果见表 5。由表可知，表面活性剂-超声法对总黄酮的提取率高于同条件下的超声法，提取率提高 7.74%；相较于回流提取法，其提取温度降低，提取时间明显缩短，提取率提高 21.25%，具有节能、省时、高效等优点。

3 讨论

前期预实验参考文献 [14]，以芦丁为对照品来测定总黄酮含有量，但在样品液中加入 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 后，并没有出现特征性酒红色，而且在 510 nm 波长处没有与对照品相似的吸收峰。查阅文献发现，只有含邻二酚羟基，而且其邻位没有发生取代结构的物质才会出现显色反应和 510 nm 波长处的吸收峰^[15-16]，而山香圆叶主要的黄酮类成分为芹菜素及其苷类等，苷类一般在 5 或 7 位取代，如女贞苷、野漆树苷和芹菜素-7-新橙皮糖苷等^[17-18]，并不存在邻二酚羟基结构。因此，本实验以芹菜素为对照品，直接测定山香圆叶中总黄酮的含有量，该方法操作简便，重复性好。

表 5 3 种提取方法的比较 (n = 3)

Tab. 5 Comparison of three extraction methods (n = 3)

提取方法	提取溶剂(乙醇)/%	液料比	提取温度/℃	提取时间/min	提取次数/次	提取率/%
乙醇回流法 ^[13]	70	10：1	80	120	3	2.87
超声法	50	25：1	60	40	1	3.23
表面活性剂-超声法	50	25：1	60	40	1	3.48

由单因素试验可知，用量相同而亲水亲油平衡（HLB）值不同的表面活性剂的增溶效果有所差异，而且同种表面活性剂的用量不同，增溶效果也不同。临界胶束浓度（CMC）是影响其增溶能力的主要因素，CMC 越小，增溶能力越强；CMC 越大，增溶能力越弱。根据实验结果可知，在 50% 乙醇、温度 60℃ 的条件下，0.5% ~ 0.7% 十二烷基硫酸钠的 CMC 较小，增溶效果显著。

目前，对山香圆叶提取工艺的优化均选用正交

设计，存在预测性不理想、精准度低等缺点，而本实验采用 Box-Behnken 设计进行研究。前期对提取次数进行了考察，发现第 1 次提取率为 88.23%，第 2 次为 6.51%，第 3 次为 2.76%，3 次总提取率达 97.50%，但考虑到能源成本和浓缩效率，确定以提取一次为宜。

研究结果显示，表面活性剂-超声法的提取率较高，其原因可能是黄酮类物质通常与糖结合，形成相对分子质量较大的苷类，而表面活性剂对大分

子有良好的增溶作用，有利于总黄酮溶出。文献[19]报道，表面活性剂的复配体系较单一的表面活性剂对药物的提取效果更佳，其能否提高山香圆叶总黄酮的提取率有待作进一步研究。然而，表面活性剂的加入可能会增加杂质的溶出，其本身也是一种杂质，给后续纯化带来一定困难，因此其在提取方面的应用还需深入探索。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2010 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2010：28.

[2] 詹怡飞，张建军，毛友昌，等. 山香圆含片抗菌作用的试验研究[J]. 江西中医学院学报，2005，17(2)：55-55.

[3] 张磊，李俊，余世春，等. 山香圆总黄酮的抗炎作用[J]. 安徽医科大学学报，2003，38(3)：185-188.

[4] 张磊，李俊，余世春，等. 山香圆总黄酮体外对大鼠佐剂性关节炎免疫功能的影响[J]. 中国药理学通报，2007，23(1)：106-110.

[5] 曾贤，陈世华，黄佩蓓，等. 山香圆总黄酮提取工艺的研究[J]. 现代中药研究与实践，2015，29(5)：46-48.

[6] 吴珊，李小芳，舒予，等. 正交优化-微波辅助提取山香圆叶总黄酮的工艺研究[J]. 成都中医药大学学报，2014，37(2)：15-17.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 李桂兰，贺智勇，薛雨晨，等. 闪式提取法用于大蝎子草总黄酮的工艺条件研究[J]. 中成药，2015，37(7)：1603-1605.

[10] 杨转萍，罗仓学，李祥. 超声波-表面活性剂协同萃取黄姜中薯蓣皂苷的工艺研究[J]. 食品科学，2010，31(22)：46-49.

[11] 宫坤，詹小龙，郭中婷，等. 表面活性剂辅助提取石榴叶中总黄酮工艺的研究[J]. 食品工业科技，2014，35(23)：261-264.

[12] 张文秀，朱卫丰，聂鹤云，等. Box-Behnken 响应面法优化马钱子提取工艺[J]. 中成药，2015，37(9)：1932-1936.

[13] 吴珊. 山香圆分散片的制备工艺及质量标准研究[D]. 成都：成都中医药大学，2014.

[14] 罗宪堂，熊友香，余世平. UV 法测定山香圆叶中黄酮类成分含量[J]. 中医药研究，2002，18(5)：48-49.

[15] 马陶陶，张群林，李俊. 中药总黄酮的含量测定方法[J]. 安徽医药，2008，11(11)：1030-1032.

[16] 吴珊，李小芳，罗佳，等. 大孔树脂纯化山香圆叶中的总黄酮[J]. 华西药学杂志，2014，29(6)：680-682.

[17] 孙敬勇，孙洁，武海艳，等. 山香圆叶化学成分研究[J]. 食品与药品，2012，14(5)：162-165.

[18] 章光文，周国平，杨香菊，等. HPLC 法同时测定山香圆片中女贞苷和野漆树苷的含量[J]. 药物分析杂志，2009，29(6)：912-914.

[19] 李祥，兀浩，文星，等. 表面活性剂及其复配体系对盾叶薯蓣中薯蓣皂苷提取率影响的研究[J]. 中成药，2013，35(2)：407-411.