

- 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°C 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: lixi-aofang918@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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2-4]</sup>。目前，对山香圆叶总黄酮提取的研究较少，仅有回流提取法<sup>[5]</sup>和微波提取法<sup>[6]</sup>，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<sup>[7-8]</sup>。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<sup>[9]</sup> 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  $A = 0.0767C + 0.0288$  ( $r = 0.9996$ )，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 °C 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<sup>[10]</sup>，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
十二烷基磺酸钠	阴离子型	40.0	3.23
十二烷基苯磺酸钠	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 °C、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<sup>[12]</sup>,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 $Y = 3.25 + 0.096A + 0.069B - 0.12C$  ( $r = 0.4458$ ),二次多项式回归方程为 $Y = 3.41 + 0.096A + 0.069B +$

$0.12C + 0.04AB + 0.01AC + 0.12BC - 0.15A^2 - 0.028B^2 - 0.15C^2$  ( $r = 0.9836$ ),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	<0.0001
A	0.074	1	61.94	0.0001
B	0.038	1	31.60	0.0008
C	0.12	1	96.29	<0.0001
AB	0.0064	1	5.35	0.054
AC	0.0006	1	0.52	0.4933
BC	0.055	1	46.16	0.0003
A <sup>2</sup>	0.098	1	81.84	<0.0001
B <sup>2</sup>	0.0032	1	2.66	0.1468
C <sup>2</sup>	0.095	1	79.18	<0.0001
残差	0.0084	7	—	—
失拟项	0.0038	3	1.09	0.4481
纯误差	0.0046	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。

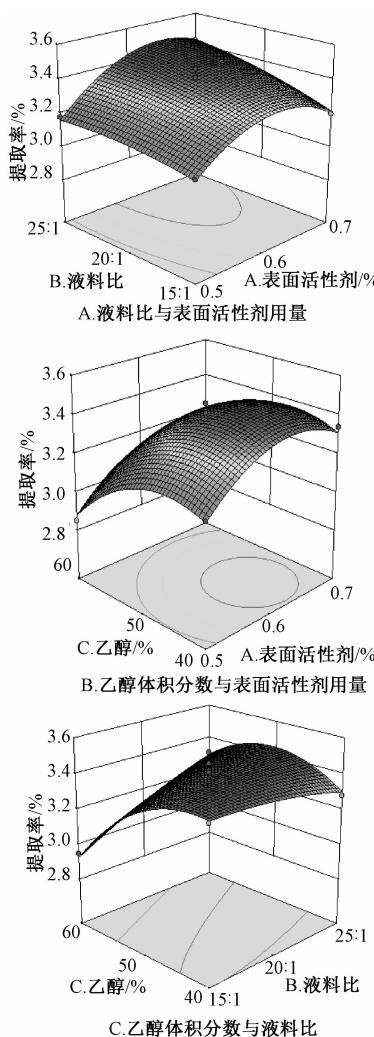


图1 三维效应面图

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% ( $RSR < 2.0\%$ ), 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  $NaNO_2$ - $Al(NO_3)_3$ - $NaOH$  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<sup>[15-16]</sup>, 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<sup>[17-18]</sup>, 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 <sup>[13]</sup>	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子和野漆树子的含量[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.