

微波-超声波协同辅助夏枯草中熊果酸的提取工艺研究

罗容珍^{1,2}, 杜怀明², 张利¹, 李再新¹

(1 四川理工学院化学与制药工程学院, 四川 自贡 643000; 2 四川理工学院材料与化学工程学院, 四川 自贡 643000)

摘要: 文章采用微波-超声波协同辅助夏枯草中熊果酸的提取, 对乙醇浓度、液固比、提取温度和提取时间进行了研究。结果表明, 熊果酸提取的最佳工艺条件是: 乙醇的体积分数为 95%、液固比为 12:1、提取温度为 70℃、提取时间为 240 s, 此条件下的提取率为 98.84%。

关键词: 微波-超声波协同辅助; 夏枯草; 熊果酸; 提取工艺

中图分类号: TQ460.6

文献标识码: A

夏枯草是一味常用中药, 药理作用明显, 具有开发利用价值, 是一种有潜力的药物资源^[1], 熊果酸是其主要成分之一。熊果酸(Ursolic acid)又名乌索酸, 是具有五环的三萜皂苷类化合物, 具有镇静、抗炎、抗菌、较显著的免疫作用和抗癌作用, 极有可能成为低毒有效的新型抗癌药物^[2]。熊果酸在自然界分布广泛, 存在于苦丁茶、山楂叶、车前草、夏枯草、女贞子、地榆和白花蛇草等天然植物中^[3-6]。目前从天然植物中提取熊果酸的方法主要有: 回流提取法、渗漉法、超临界萃取法、超声波提取法、常温超高压提取法和沉淀吸附法等^[7]。这些方法部分已经用于工业化生产, 但都存在着一些不足, 例如回流提取法溶剂消耗量大, 提取时间较长; 渗漉法操作时间较长, 对药材粒度要求较高, 有污染存在; 超临界萃取法操作压力高、能耗大和设备成本高; 常温超高压提取法对设备有较高的要求, 一次性投资大。近年来, 超声波强化提取法和微波辅助提取法被广泛应用于植物有效成分的提取, 并取得了较好的效果, 但将二者结合起来作用于天然有效物提取的研究还未见公开报道。为了充分利用超声波的震动空化作用和微波的高能作用, 本文以夏枯草为研究对象, 采用微波-超声波协同作用的方法对熊果酸的提取工艺进行了研究, 为该技术的工业化应用奠定了基础。

1 实验部分

1.1 主要试剂

夏枯草; 香草醛(AR); 无水乙醇(AR); 冰醋酸(AR); 高氯酸(AR); 石油醚(AR); 对照品熊果酸(含量 $\geq 98\%$)。

1.2 主要仪器

CW-2000型微波-超声波协同萃取仪(上海新拓分析仪器科技有限公司); UV-1100紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); AR1140型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); DK-S22型电热恒温水浴锅(上海精密实验设备有限公司); SHB-3型循环多用真空泵(郑州杜甫仪器厂); DFY-400型 400 g 摇摆式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的绘制

(1) 对照品溶液的制备

准确称取 105℃干燥至恒重的熊果酸对照品 10.0 mg, 置于 100 mL 容量瓶中, 加无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。得浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

(2) 熊果酸最大吸收波长的测定

准确吸取对照品溶液 0.4 mL, 置于 5 mL 容量瓶中, 加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL,

将容量瓶放入 60 °C 热水浴中加热 15 min, 放冷至室温, 用冰醋酸定容^[8], 摇匀; 以未加对照品的比色液做空白, 于 400 nm - 800 nm 波长间扫描, 得到熊果酸的最大吸收波长为 548 nm。

(3) 标准曲线绘制

分别量取熊果酸对照品溶液 0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL、0.6 mL 于 5 mL 容量瓶中, 按测定最大吸收波长的方法, 在 548 nm 波长下测溶液吸光度, 以吸光度 A 和熊果酸浓度 C 作图, 得标准曲线如图 1 所示。

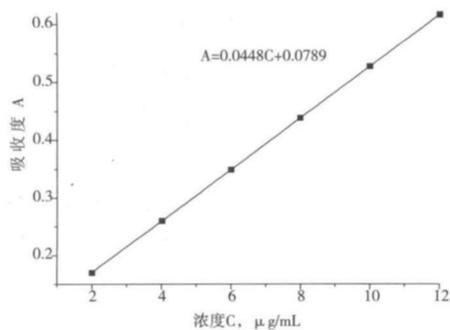


图 1 熊果酸标准曲

由图 1 得线性回归方程为 $A = 0.0448C + 0.0789$, $R^2 = 0.9997$ 。因此熊果酸浓度在 2 μg/mL - 12 μg/mL 范围线性良好。

1.3.2 熊果酸的提取

(1) 夏枯草于 50 °C 下干燥、粉碎过 40 目筛备用。

(2) 准确称取 10.0 g 夏枯草粉, 置于与 50 W 超声波换能器紧密粘结的 250 mL 玻璃萃取瓶中, 加入适量萃取溶剂, 浸泡 30 min, 将换能器卡入微波腔中央底部, 萃取容器通过转换接头与回流冷凝管相连。设定萃取阶段及各阶段的萃取时间、微波辐射功率、超声波开关和萃取温度, 开启仪器。当萃取完成后, 放置冷却, 取出, 抽滤。滤液 85 °C 水浴减压蒸馏得浸膏, 同时回收萃取溶剂; 浸膏用蒸馏水洗涤 2 次, 石油醚洗涤 3 次^[9], 过滤, 得熊果酸粗品。

1.3.3 熊果酸的含量测定

(1) 用无水乙醇溶解熊果酸粗品, 定容成 50 mL, 再从中取 1 mL 用无水乙醇定容成 50 mL 得供试品溶液。

(2) 取供试品溶液 1 mL 置于 5 mL 容量瓶中, 加入 5% 香草醛 - 冰醋酸溶液 0.2 mL、高氯酸 0.8 mL, 将容量瓶放入 60 °C 热水浴中加热 15 min, 放冷至室温, 用冰醋酸定容, 摇匀; 另取一容量瓶不加供试品溶液同法制得空白对照液。在 548 nm 波长下测溶液吸光度 A。

(3) 熊果酸的提取率计算。

$$\text{提取率 } \eta = \frac{C \times D}{m \times y} \times 100\%$$

其中, C 为按回归方程 $A = 0.0448C + 0.0789$ 计算出的浓度, D 为稀释倍数, m 为夏枯草的质量, y 为夏枯草中熊果酸的理论含量。

1.3.4 熊果酸理论含量的计算

准确称取夏枯草粉末 10.0 g 按 1.3.2 的方法, 提取 5 次, 合并提取液。按 1.3.3 的方法测定熊果酸的吸光度, 夏枯草中熊果酸的理论含量计算,

$$y = \frac{C \times D}{m} \times 100\%$$

其中, C 为按回归方程 $A = 0.0448C + 0.0789$ 计算出的浓度, D 为稀释倍数, m 为夏枯草质量。

2 实验结果与讨论

2.1 乙醇体积分数对熊果酸提取率的影响

固定提取温度 70 °C, 液固比 12:1 微波 - 超声波协同作用时间 240 s 考察乙醇体积分数对熊果酸提取率的影响, 实验结果如图 2 所示。

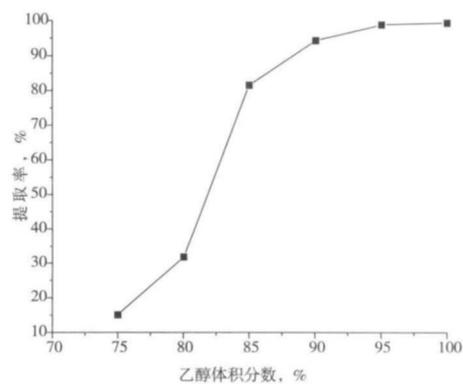


图 2 乙醇体积分数对熊果酸提取率的

由图 2 可以看出, 随着乙醇体积分数的增加熊果酸提取率增大, 乙醇体积分数达到 95% 以后, 熊果酸提取率增加缓慢。这是因为熊果酸为弱极性分子, 溶于乙醇, 不溶于水和石油醚^[10], 提取溶液中乙醇体积分数越高, 溶剂极性越弱, 根据相似相溶原理提取率就会随着溶剂的极性减弱而提高, 因此最佳的乙醇体积分数为 95%。

2.2 液固比对熊果酸提取率的影响

固定提取温度 70 °C, 乙醇体积分数 95%, 微波 - 超声波协同作用时间 240 s 考察液固比对熊果酸提取率的影响, 实验结果如图 3 所示。

由图 3 可以看出, 随着液固比的增大熊果酸的提取率增加, 当液固比达到 12:1 后, 提取率增加缓慢, 即在原料量一定时, 提取溶剂量增大, 熊果酸的浸出量增大。

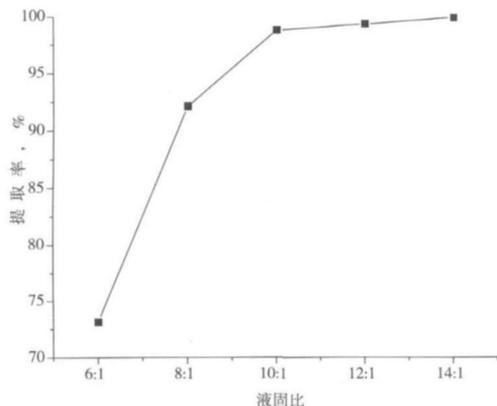


图3 液固比对熊果酸提取率的影响

但提取溶剂用量并非越大越好,若提取溶剂用量太大,回收溶剂的成本增加,同时提取过程加热的能耗增加,因此最佳液固比为 12:1。

2.3 提取温度对熊果酸提取率的影响

固定液固比 12:1,乙醇体积分数 95%,微波-超声波协同作用时间 240 s,考察提取温度对熊果酸提取率的影响,实验结果如图 4所示。

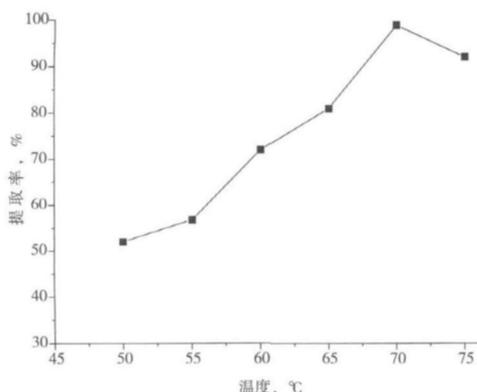


图4 提取温度对熊果酸提取率的影响

由图 4可以看出,熊果酸提取率随提取温度的升高而增加,但是温度高于 70 °C时,提取率反而下降。这是由于温度高于 70 °C时,在微波-超声波协同作用下,乙醇汽化速度增大来不及冷凝回流,萃取瓶中有效的提取溶剂体积减小,萃取过程中传质推动力减小,熊果酸提取率减小;当温度高于 75 °C时,乙醇汽化速度进一步提高,发生冲料事故,因此最佳的提取温度为 70 °C。

2.4 提取时间对熊果酸提取率的影响

固定液固比 12:1,乙醇体积分数 95%,反应温度 70 °C,考察微波-超声波协同作用时间对提取率的影响,实验结果如图 5所示。

由图 5可以看出熊果酸的提取率随微波-超声波协同作用时间的增加而增大,当协同作用时间超过 240 s后,曲线趋于平缓,再增加提取时间对增加熊果酸的提

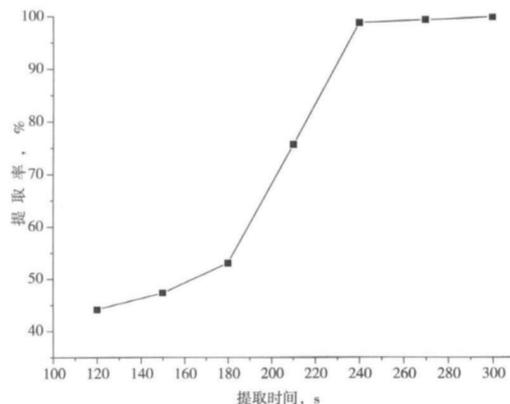


图5 提取时间对熊果酸提取率的影响

取率意义不大;同时熊果酸长时间受热,分子结构可能会发生变化^[11],对产品纯度和收率都会有影响,因此最佳提取时间为 240 s。

综上所述,微波-超声波协同作用辅助提取夏枯草中熊果酸的最佳工艺条件为:液固比 12:1,乙醇体积分数 95%,提取温度 70 °C,微波-超声波协同作用时间 240 s。

2.5 验证实验

对得到的最佳工艺条件进行验证,实验结果见表 1。

表1 验证试验结果

试验次数	熊果酸提取率 (%)	平均提取率 (%)
1	98.82	98.84
2	98.76	
3	98.94	

由表 1可以知,实验重现性好,熊果酸的平均提取率达 98.84%。因此采用微波-超声波协同作用从夏枯草中提取熊果酸的最佳工艺条件是可行的。

2.6 微波或超声波辅助提取试验

固定液固比 12:1,乙醇体积分数为 95%,提取温度 70 °C,仅用微波或超声波辅助提取 240 s,平行试验 3次,结果见表 2。

表2 微波或超声波提取试验结果

试验次数	微波辅助提取率 (%)	超声波辅助提取率 (%)
1	54.68	14.54
2	52.36	15.76
3	53.30	14.67
平均提取率 (%)	54.45	14.99

比较表 1和表 2的实验结果可知,在其他条件不变的情况下,仅用微波或超声波辅助提取熊果酸效果不及微波-超声波协同作用好。主要原因是协同作用充分利用了超声波的震动空化作用和微波的高能作用,使提取率大大提高。

3 结论

试验结果表明微波-超声波协同辅助夏枯草中熊

果酸的提取,比仅用微波或超声波辅助提取所得熊果酸的提取率高;通过单因素试验对微波-超声波协同辅助夏枯草中熊果酸的提取工艺条件进行了研究,得出优化的工艺条件为:液固比 12:1,乙醇体积分数 95%,提取温度 70℃,微波-超声波协同作用时间 240 s 在该工艺条件下熊果酸的提取率可以达到 98.84%。

参考文献:

- [1] 刘明生,姚丽玲.夏枯草研究进展[J].国外医药,1993,8(3):104-106
- [2] 刘淑娟,罗明标,林海祿,等.夏枯草中熊果酸的提取及表征[J].化学世界,2005(10):617-620
- [3] Abe F, Yanouchi T, Minato K. Presence of cardenolides and ursolic acid from oleander leaves in larvae and frass of daphnia pulex[J]. Phytochemistry, 1996, 42(1): 45-49
- [4] Novotny L, Mohamed E, Abdel H, et al. Development of LC-MS method for determination of ursolic acid application to the analysis of ursolic acid in staphylococcus aureus[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 31: 961-968
- [5] 王鹏,张忠义,吴忠.熊果酸在药用植物中的分布及药理作用[J].中成药,2000,23(11):717-720
- [6] 陈荣,廖晓峰.富含熊果酸药材的分布及加工[J].现代食品科技,2006,22(1):203-204
- [7] 于明明,周富强,刘军海.熊果酸提取工艺的研究进展[J].氨基酸和生物资源,2009,31(1):33-36
- [8] 李国章,于华忠,卜晓英,等.分光光度法测定湘产苦茶中熊果酸含量[J].光谱实验室,2006,23(2):401-404
- [9] 孙文基.天然药物成分提取分离与制备[M].北京:中国医药科技出版社,1999
- [10] 姚新生.天然药物化学[M].北京:人民卫生出版社,1988
- [11] 任秀莲,钟世安,魏琦峰,等.苦茶中熊果酸的提取工艺[J].中南大学学报:自然科学版,2004,35(1):70-74

Process Study of Extraction Ursolic Acid from Selfheal by Assistance of Microwave and Ultrasonic

LUO Rong-zhen^{1,2}, DU Huaiming², ZHANG Li¹, LI Zai-xin¹

(1. School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

(2. School of Material and Chemical Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract By the assistance of microwave and ultrasonic, the effects of ethanol concentration, mass ratio of Selfheal and ethanol, extraction temperature, extraction time on the extraction of ursolic acid from Selfheal were studied. The optimum extraction conditions for extraction efficiency of ursolic acid were found to be ethanol concentration of 95% (volume), mass ratio of ethanol and Selfheal of 12:1, extraction temperature of 70℃, extraction time of 240s respectively and extraction efficiency of 98.84% was obtained.

Key words assistance of microwave and ultrasonic; Selfheal; ursolic acid; extraction process