

大叶白麻中总黄酮超临界 CO₂ 萃取工艺优化

Study on extraction of flavonoids from *Poacynum hendersonii* by supercritical CO₂

史俊友 景年华 李彩霞

SHI Jun-you JING Nian-hua LI Cai-xia

(曲靖师范学院, 云南 曲靖 655011)

(Qujing Normal University, Qujing, Yunnan 655011, China)

摘要:采用超临界 CO₂ 流体萃取技术提取大叶白麻叶中的总黄酮,并对其提取工艺进行优化。通过正交试验研究夹带剂用量、萃取压力、萃取温度及萃取时间 4 个因素对总黄酮提取率的影响。结果表明,大叶白麻总黄酮最佳提取工艺为:原料大叶白麻 150 g,夹带剂为 900 mL 70% 乙醇(pH=10),萃取温度 45 °C,萃取压力 20 MPa,萃取时间 2 h。该工艺条件下,大叶白麻中总黄酮的提取率为 5.28%,高于溶剂提取法的提取率。

关键词:大叶白麻;超临界 CO₂ 萃取;黄酮

Abstract: The supercritical CO₂ extraction processing of flavonoids was optimized with *Poacynum hendersonii* leave as raw material. Firstly, the influences of the type and pH value for cosolvent were explored by single factor experiments. And the 70% ethanol with pH value of 10 was fixed as cosolvent. Then, the effects of extracting factors such as extracting pressure, temperature, time and cosolvent dosage, were investigated with orthogonal experiments. According to the researching report, the optimal process conditions were as follows: 150 g raw material, extraction temperature 45 °C, extraction pressure 20 MPa, extraction time of 2 h, 70% ethanol with pH value of 10 as cosolvent, 900 mL cosolvent. Under these conditions, the extraction rate for flavonoids of *Poacynum hendersonii* could reach 5.28%, which is higher than the rate of extraction solvent extraction method.

Keywords: *Poacynum hendersonii*; supercritical carbon dioxide extraction; flavonoids

大叶白麻(*Poacynum hendersonii*),为夹竹桃科白麻属的一种多年生草本植物,与罗布红麻和白麻并称为“罗布麻”^[1,2]。其具有延缓衰老、降压、降脂、抗感冒、镇静安神等作用^[3-5],常与罗布红麻一起被用来制作降压药和保健食品。研究表明,大叶白麻叶中含有酚类、鞣质、多糖、黄酮、强心苷、内酯、香豆素、甾体等物质^[6],其中黄酮含量最高且被认为是其主要药效成分,约占大叶白麻叶总质量的 5%~6%^[7]。目前已确定的黄酮类成分包括异槲皮苷、槲皮素、紫云英苷、三叶豆苷、金丝桃苷、新异芸香甙、异槲皮苷-6'-O-乙酰基、三叶豆苷-6'-O-乙酰基 8 种物质^[8-10]。定量分析表明,异槲皮苷、槲皮素-3-O-槐糖苷和异槲皮苷-6'-O-丙二酸酯为含量最高的 3 种成分^[11],其中异槲皮苷,又称罗布麻甲素,具有良好的降压效果,是罗布麻药材中具有代表性的活性黄酮类化合物^[12]。因此,大叶白麻叶中总黄酮的高效提取对于开发利用大叶白麻资源具有重要的意义。

目前大叶白麻中总黄酮的提取方法有热水提取法、乙醇提取法、丙酮提取法^[13]、碱性稀醇提取法、超声提取法^[14]等,但国内外尚无利用超临界 CO₂ 流体萃取大叶白麻中黄酮的相关报道。超临界 CO₂ 萃取具有能耗小、效率高、无污染、条件温和等优点,同时还可通过改变临界温度和压力达到选择性提取、分离、纯化的目的^[15-17],目前在天然产物有效成分的提取中应用越来越广泛。本试验拟以大叶白麻叶为原料,以乙醇作为夹带剂,采用正交设计方法对大叶白麻中总黄酮的超临界萃取(SCDE)工艺进行优化,旨为大叶白麻总黄酮的开发利用提供理论支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

大叶白麻叶:采摘于青海省格尔木市;
二氧化碳:食品级,云南昆明特种气体厂;
芦丁对照品:纯度 98%,中国药品生物检定所;
无水乙醇:分析纯,天津光复精细化工公司;

基金项目:云南省教育厅科学研究基金项目(编号:2014Y438);曲靖师范学院重点资助项目(编号:2011ZDZC1);曲靖师范学院校级精品课程项目(编号:JPKC2013003, JPKC2014004)

作者简介:史俊友(1981-),男,曲靖师范学院副教授,博士。
E-mail: shijunyou123@126.com

收稿日期:2015-07-05

硝酸铝:分析纯,上海艾比化学试剂有限公司;

亚硝酸钠:分析纯,天津恒兴化学试剂制造有限公司;

超临界流体萃取仪:HA221-40-10+2 型,江苏南通华安超临界萃取有限公司;

紫外分光光度计:TU1810 型,北京普析通用仪器有限责任公司;

电子天平:MSE323S 型,德国赛多利斯公司;

电热鼓风干燥箱:DZF-6050 型,北方利辉试验仪器设备有限公司;

中草药粉碎机:FW177 型,天津泰斯特仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品预处理 将采摘的大叶白麻叶用清水洗净后于阴凉处阴干,在烘箱中于 70 °C 条件下烘烤 4 h,取出,放入中药粉碎机中粉碎,过 20 目筛备用。

1.2.2 大叶白麻总黄酮的提取 称取已粉碎的大叶白麻样品 150 g 装入萃取装置,将超临界萃取仪调节至预定参数后进行超临界萃取,不断加入选定的夹带剂乙醇,并控制夹带剂流速在 6~10 mL/min,后改变夹带剂浓度、夹带剂酸碱度、萃取压力、萃取温度、萃取时间、夹带剂用量等参数,于各不同条件下提取大叶白麻总黄酮^[18,19]。

1.2.3 单因素试验设计

(1) 夹带剂浓度的确定:因 CO₂ 为非极性物质,单纯的超临界 CO₂ 流体很难对极性较大的黄酮类物质进行高效萃取^[20]。根据预试验的结果,充分考虑试验安全性和经济成本因素,本试验选择乙醇作为夹带剂。在夹带剂 pH=7 的条件下,固定夹带剂用量 600 mL,萃取时间 120 min,萃取温度 45 °C,萃取压力 20 MPa,CO₂ 流量 30 L/h 的条件下,分别选择浓度为 50%,60%,70%,80%,90% 的乙醇做夹带剂进行萃取试验。

(2) 夹带剂酸碱度的确定:选定 70% 乙醇为夹带剂,在萃取压力 20 MPa,萃取温度 45 °C,CO₂ 流量 30 L/h,夹带剂用量 600 mL,萃取时间 120 min 的条件下,考察 pH 值^[14] 分别为 6,7,8,9,10,11 时对黄酮提取率的影响。

1.2.4 正交试验 在确定夹带剂的浓度和酸碱度后,在预试验和文献^[17~19]的基础上,本试验以夹带剂的用量、压力、时间、温度等作为影响因素,根据 L₉(3⁴) 的正交表设计正交试验,并进行了四因素三水平的正交试验,以确定最佳工艺,具体设计见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels list of orthogonal tests

水平	A 温度/°C	B 压力/MPa	C 时间/h	D 夹带剂用量/mL
1	45	20	1.5	300
2	50	25	2.5	600
3	55	30	3.5	900

1.2.5 总黄酮含量的测定 根据文献^[21]和^[22],修改如下:准确称取经减压干燥至恒重的芦丁对照品 10.0 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加入 60% 乙醇适量使之完全溶解,用水稀释至刻度并摇匀,即得浓度为 1.0 mg/mL 的芦丁标准品溶液。准确吸取芦丁标准品溶液 0.0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,置于 10 mL 容量瓶中,分别加 30% 乙醇至溶液总体积为 5.0 mL,后加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,再加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,再放置 6 min,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 4 mL,分别用水稀释至刻度,摇匀,静置 15 min 后分别在 510 nm 处测定不同浓度芦丁标准品的吸光度。采用最小二乘法得线性回归方程: $A = 0.032 1c + 0.082 3 (r^2 = 0.999 4)$ 。准确吸取大叶白麻黄酮粗提液 1.0 mL,加入 60% 乙醇溶液 4 mL,后采用与上文相同的显色方法测定大叶白麻叶中总黄酮含量。本试验所涉及样品均平行测试 3 次,后求平均值。

2 结果与讨论

2.1 夹带剂浓度对大叶白麻总黄酮提取率的影响

由图 1 可知,夹带剂乙醇的浓度对大叶白麻总黄酮提取率影响显著,随着乙醇浓度的提高,黄酮类化合物提取率不断增加,当乙醇浓度达到 70% 以后,随着乙醇浓度增大总黄酮得率略有下降,故宜选择 70% 乙醇作为夹带剂。此结果与王宁^[6]、张永秀^[13] 等采用溶剂提取法所得结果一致,其原因是大叶白麻中黄酮类物质多为黄酮苷^[11],极性较大,故中等极性的溶剂更为适合。当乙醇浓度稍低时,溶剂极性过大,黄酮提取率较低,同时存在萃取釜内样品板结的情况;当乙醇浓度较高时,夹带剂极性较小,不适合大叶白麻总黄酮的提取。故采用浓度 70% 左右的乙醇提取大叶白麻总黄酮。

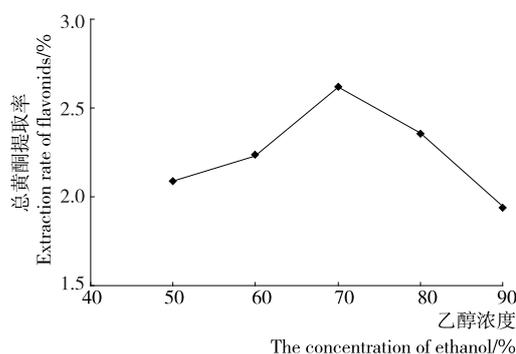


图 1 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

Figure 1 The influence of ethanol's different concentrations on the extraction rate of flavonoids

2.2 夹带剂酸碱度对大叶白麻总黄酮提取率的影响

因黄酮中酚羟基显酸性,故黄酮类物质可溶于碱性溶剂,但难溶于酸性溶剂,选择合适的夹带剂 pH 值对提高黄酮化合物的提取率具有促进作用。由图 2 可知,适当提高 pH 值可提高总黄酮提取率,当 pH 值为 10 时总黄酮的提取率最高,故后续试验中采用 pH 值为 10 的乙醇为夹带剂提取大叶白麻中的总黄酮^[19]。

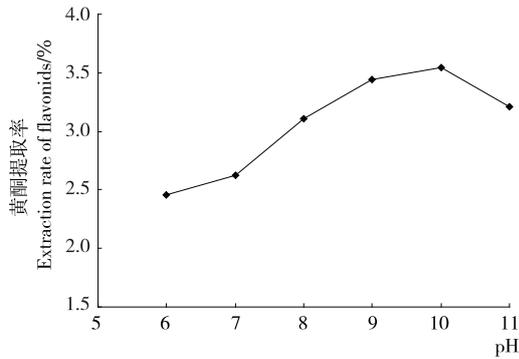


图 2 夹带剂酸碱度对总黄酮提取率的影响

Figure 2 The influence of ethanol's pH value on the extraction rate of flavonoids

2.3 正交试验结果

由表 2 可知,各因素中对大叶白麻总黄酮提取率影响最大的为温度,其余因素的大小程度依次为:夹带剂用量>萃取时间>萃取压力。提取大叶白麻黄酮类化合物最佳工艺条件为:A₁B₁C₂D₃。按照最佳工艺条件进行 3 次验证实验,测得大叶白麻中总黄酮的平均提取率为 5.28%,优于正交设

计中的任意一个组合。另外,该方法的提取率高于前人^[6,13,14]所采用的各种溶剂提取法,详见表 3。

表 2 正交试验结果及数据分析

Table 2 Results of orthogonal tests and data analysis

序号	A	B	C	D	黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	3.174
2	1	2	2	2	3.449
3	1	3	3	3	4.537
4	2	1	2	3	5.093
5	2	2	3	1	2.333
6	2	3	1	2	2.909
7	3	1	3	2	2.182
8	3	2	1	3	2.266
9	3	3	2	1	2.278
k ₁	3.720	3.483	2.783	2.595	
k ₂	3.445	2.683	3.607	2.847	
k ₃	2.242	3.241	3.017	3.965	
R	1.478	0.800	0.824	1.370	

表 3 大叶白麻总黄酮不同提取方法比较

Table 3 The comparison of different extraction methods for total flavonoids from *Poacynum hendersonii*

提取方法	提取溶剂	料液比	温度/℃	提取时间/h	提取率/%
乙醇提取法 ^[6]	70%乙醇	1:40(m:V)	60	1.0	3.52
丙酮提取法 ^[13]	60%丙酮	1:40(m:V)	50~60	5.0	5.13
热水提取法 ^[13]	水	1:40(m:V)	50~60	4.0	3.37
碱液提取法 ^[14]	pH 值为 9 的碱性水溶液	1:40(m:V)	50~60	4.0	4.13
碱性醇溶液提取法 ^[14]	pH 值为 9 的 75%乙醇	1:15(m:V)	50	2.0	3.76
超临界提取法	超临界 CO ₂ 流体, pH 值为 10 的 70%乙醇做夹带剂	夹带剂用量 900 mL	45	2.0	5.28

3 结论

本试验采用超临界 CO₂ 流体萃取技术对大叶白麻中总黄酮的提取工艺进行了优化,确定了超临界 CO₂ 流体法萃取大叶白麻总黄酮的最佳工艺条件:夹带剂为 70%乙醇,在 pH 值为 10 的情况下,提取所需温度为 45℃、压力为 20 MPa、提取时间为 2 h。在此条件下,大叶白麻总黄酮平均提取率为 5.28%。与常规溶剂回流提取法相比,其操作简单、提取率高、活性成分保存好、品质高,是一种很好的大叶白麻总黄酮分离技术。夹带剂的使用虽然提高了萃取率,但同时也导致了样品的溶胀甚至板结的问题,且在使用过程中夹带剂含水量不宜过高,建议在 50%以下。

参考文献

- 张绍武. 我国罗布麻分布区的地理区划[J]. 西北植物学报, 2002, 22(7): 1~5.
- 蔡卿龄, 张勇, 魏原杰, 等. 新疆产大叶白麻不同部位黄酮类成分含量分析[J]. 食品科学, 2014, 35(22): 211~214.
- 曹越. 大叶白麻根中化学成分的预实验及其抗氧化能力探究[J]. 光谱实验室, 2011, 28(4): 1916~1921.

- 马成, 马龙. 大花罗布麻对 MPTP 型小鼠的多巴胺神经保护作用研究[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(3): 397~400.
- 孙江兵, 金星, 周军. 大花罗布麻叶总黄酮对缺氧小鼠脑组织保护作用[J]. 亚太传统医药, 2011(7): 57~59.
- 王宁, 赵明. 柴达木盆地大叶白麻叶化学预试及总黄酮提取研究[J]. 青海科技, 2007, 14(3): 27~30.
- 马敏, 叶菊, 王如峰. 柴达木地区大叶白麻总黄酮含量研究[J]. 江苏农业科学, 2010(1): 272~273.
- 严秀珍, 钱学射. 白麻和红麻化学成分的测定[J]. 中成药研究, 1987(12): 27~29.
- 张云峰, 魏东, 郭祀远. 大花罗布麻的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(6): 954~957.
- 魏锦萍, 刘恩荔, 张立伟. 大叶白麻化学成分研究[J]. 中草药, 2008, 39(9): 1304~1306.
- Shi Jun-you, Li Guo-liang, Zhang Rui, et al. A validated HPLC-DAD-MS method for identifying and determining the bioactive components of two kinds of Luobuma[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2011, 34(7): 537~547.

(下转第 249 页)

度、溶解时间和流动性的测定结果见表 3。由表 3 可知,八月瓜果粉的溶解度为 56.37%,溶解时间为 20.2 s,流动性为 9.25 cm;相比于其他文献^[22-24]报道的果粉溶解特性参数,八月瓜果粉的流动性稍低于雪莲果果粉、桑葚果粉,但差异不大;其溶解时间介于真空冷冻干燥和热风干燥制备的桑葚果粉之间,而远小于刺梨果粉,这可能是由于刺梨果粉中添加的β-环状糊精高达 50%所致。

表 3 八月瓜果粉的溶解度、溶解时间和流动性[†]
Table 3 The detection results of solubility, dissolution time and mobility

名称	工艺	溶解度/%	溶解时间/s	流动性/cm
八月瓜果粉	喷雾干燥	56.37	20.20	9.25
刺梨果粉 ^[23]	喷雾干燥	—	398.00	—
雪莲果果粉 ^[24]	喷雾干燥	—	—	9.40
桑葚果粉 ^[22]	热风干燥	—	24.97	9.53
桑葚果粉 ^[22]	真空冷冻干燥	—	16.90	9.81

† “—”表示无数据或采用的测定方法与本试验不同。

3 结论

以麦芽糊精为助干剂,采用喷雾干燥法制备八月瓜果粉,结果表明进风温度对八月瓜果粉得率的影响最大,其次是果浆固形物含量,出风温度的影响最小,最佳工艺条件为麦芽糊精用量 16%、果浆固形物含量 20%、进风温度 150℃、出风温度 75℃,此条件下八月瓜果粉得率可达 15.52%,喷雾干燥效果最好。制备的八月瓜果粉的溶解度为 56.37%,溶解时间为 20.2 s,流动性为 9.25 cm,具有较好的溶解性,并带有八月瓜天然的香味。但喷雾干燥过程对八月瓜果粉营养成分的影响还有待于进一步的研究。

参考文献

- 曹庸,熊大胜,朱金桃. 八月瓜果果汁饮料加工中褐变及沉淀的研究[J]. 中南林学院学报, 1999, 9(3): 48~50.
- 汪国龙,范玉,刘庆银,等. 八月瓜果实主要营养成分的测定[J]. 湖北农机化, 2008(5): 35.
- 吴莹,张百忍. 八月瓜果实香气的 GC-MS 分析[J]. 中国酿造, 2012, 31(6): 169~170.
- 叶晓青,莫树平,庾文伟,等. 农产品超微干粉加工的现状与应用前景[J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 258~261.
- 张韻慧,任斯嘉,胡文文,等. 喷雾干燥技术对食品微胶囊性质影响的研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(2): 214~217, 222.
- Goula A M, Adamopoulos K G. Spray drying performance of a laboratory spray dryer for tomato powder preparation[J]. Drying Technology, 2003, 21(7): 1 273~1 2891.
- 程丽娜,唐道邦,徐玉娟,等. 荔枝原浆喷雾干燥配方优化研究[J]. 广东农业科学, 2013(3): 71.
- 解红霞,陈相艳,曲静然,等. 杨梅全果制粉喷雾干燥工艺的研究[J]. 山东农业科学, 2014, 46(3): 103~105.
- 郑毅,黄双华,伍斌. 芒果粉加工技术研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 257~261.
- 刘程惠,江洁,王艳影,等. 喷雾干燥条件对樱桃粉出粉率及品质的影响[J]. 食品与机械, 2010, 26(6): 125~128.

- 赵巍,王军,段长青,等. 喷雾干燥法制备微胶囊化山葡萄籽油粉末油脂[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(12): 78~83.
- Milton Cano-Chauca, Stringheta P C, Ramos A M, et al. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray dring and its functional characterization[J]. Innovative Food Science and Emering Technologies, 2005, 6(4): 420~428.
- 宋贤聚. 低吸湿性杨梅粉喷雾干燥工艺的优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 226~229.
- 黄丹,张强,严芳,等. 紫苏提取物喷雾干燥工艺研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(5): 160~162.
- Gong Zhi-qing, Zhang Min, Mujumdar A, et al. Spray drying and agglomeration of instant bayberry powder[J]. Drying Technology, 2008, 26(1):116~121.
- 林弘通(日). 乳粉制造工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1987: 89.
- 辛修锋,余小林,胡卓炎. 杨梅颗粒固体饮料的工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 162~165.
- 许学勤,李丹. 喷雾干燥速溶香蕉粉制备工艺研究[J]. 食品工业科技, 2011, 31(2): 201~204.
- 陈启聪,黄惠华,王娟,等. 香蕉粉喷雾干燥工艺优化[J]. 农业工程学报, 2010, 26(8): 331~337.
- 冷桂华,刘紫英. 火棘果粉加工工艺的研究[J]. 中国调味品, 2011, 7(36): 86~88.
- 刘建学. 全藕粉喷雾干燥工艺试验研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(9): 229~231.
- 叶磊,郜海燕,周拥军,等. 热风干燥与真空冷冻干燥对桑葚果粉品质的影响比较[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(2): 155~159.
- 蒋纬,谭书明,胡颖,等. 刺梨果粉喷雾干燥工艺研究[J]. 食品工业, 2013, 34(10): 25~28.
- 卢亚婷,罗仓学. 雪莲果果粉喷雾干燥工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(7): 97~100.

(上接第 233 页)

- 马成,张烜,堵年生. HPLC 测定大花罗布麻颗粒中罗布麻甲素的含量[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(2): 3~4.
- 张永秀. 大叶白麻叶总黄酮提取方法研究[J]. 青海农林科技, 2009(2): 79~80.
- 滕旭,史俊友,王洪伦,等. 大叶白麻总黄酮超声提取工艺的优化[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(17): 9 204~9 207.
- 于冀勇. 超临界流体萃取技术在油脂化工中的应用[J]. 食品与机械, 2006, 22(2): 109~112.
- 廖传华,黄振仁. 超临界 CO₂ 流体萃取技术—工艺开发及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- 汤芬,付亚平,邓放明. 超临界 CO₂ 流体萃取荷叶总黄酮的工艺优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(4): 149~152.
- 王文渊,唐守勇,龙红萍. 超临界 CO₂ 流体萃取苦瓜叶中黄酮的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(6): 98~101.
- 李志平,尹笃林,胡江宇,等. 超临界二氧化碳萃取茵陈蒿黄酮类化合物的研究[J]. 林业化学与工业, 2006, 26(3): 66~68.
- 翟硕丽. 超临界 CO₂ 萃取马齿苋中总黄酮的工艺研究[J]. 北方园艺, 2012(12): 45~47.
- 王英豪,魏国强,张理平. 马齿苋总黄酮含量测定方法的建立[J]. 福建中医药大学学报, 2012, 22(2): 44~46.
- 刘江,周荣琪. 竹叶提取物总黄酮含量测定方法的改进[J]. 食品科技, 2005(7): 76~79.