

双频超声强化对三七总皂苷提取的影响

贲永光¹, 丘泰球¹, 李金华²

(1. 华南理工大学 轻工与食品学院, 广东 广州 510640; 2. 广州汉方现代中药研究开发有限公司, 广东 广州 510240)

摘要: 采用双频超声 (40 kHz/25 kHz) 技术对三七总皂苷提取进行强化, 选择乙醇质量分数、料液比、超声作用时间及提取温度因素进行正交试验, 得出影响总三七总皂苷提取率的大小次序先后为: 乙醇质量分数 > 超声作用时间 > 料液比 > 提取温度, 优选出双频超声提取最佳工艺条件: 质量分数为 80% 的乙醇, 超声作用时间为 30 min, 料液比为 1:20, 提取温度为 40℃。在这个最佳条件下试验, 三七总皂苷提取率为 82.41%。采用碘化钾溶液中碘的释放量来研究超声空化事件, 结果表明: 在相同的超声电功率下, 双频超声释放碘的量远大于单频 25 kHz 超声和单频 40 kHz 超声释放的碘。

关键词: 双频超声; 单频超声; 三七总皂苷; 提取; 空化效应

中图分类号: TQ649.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7775(2007)01-0012-05

Effects on extracting saponin from *panax notoginseng* assisted by dual-frequency ultrasound

BEN Yong-guang¹, QIU Tai-qiu¹, LI Jin-hua²

(1. College of Light Chemistry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 2. Guangzhou HanFang Natural Medicine Research and Development Co. Ltd., Guangzhou, Guangdong 510240, China)

Abstract: A novel extraction process of saponins from *panax notoginseng* by dual-frequency ultrasound wave was tested. The optimum extracting conditions of the total saponins were investigated by using orthogonal experimental design. The significance of these factors affecting the total saponins was in the following order: ethanol concentration > ultrasound time > solid/liquid ratio > extraction temperature. The optimal parameters were: solvent amount 30 mL, ethanol concentration 80%, ultrasound time 30 min, solid/liquid ratio 1:20, extraction temperature 40℃. Under this optimal condition, the extraction rate of total saponins was 82.41%. The iodine released from potassium iodide was determined to study the cavitation yield in dual-frequency ultrasound, 40 kHz ultrasound and 25 kHz ultrasound. The results show that under the same ultrasound power input, the iodine content and the cavitation yield in dual-frequency ultrasound were more than those in the 40 kHz ultrasound or 25 kHz ultrasound condition.

Key words: dual-frequency ultrasound; single-frequency ultrasound; total saponins of *panax notoginseng*; extraction; cavitation effect

从植物中提取有效成分的传统方法为通过水或有机溶剂浸取, 这些方法耗时长、得率低、有效成分易被破坏且环境污染严重。超声作用于媒质的热力

学、机械作用和空化机制是超声技术提取植物药有效成分的三个物理原理。由于超声的空化效应与机械效应对生物细胞具有破壁作用, 强化传质传热的

收稿日期: 2006-09-21

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划重大项目 (2004BA721A39); 广州市科技计划项目 (2005Z3-E5071)

作者简介: 贲永光 (1978-), 男, 广西宜州人, 博士研究生 (biyongguang2002@163.com), 主要从事天然产物声化学技术研究。
丘泰球 (1941-), 男, 广东梅县人, 教授, 博士生导师 (tqiu@scut.edu.cn), 主要从事声化学技术研究。

功能,因此,用它强化天然产物的提取已成为当前研究的一个热点.所有这些研究的结果均表明:超声强化提取的温度低,时间短,提取率高,但这些研究全采用单频超声辐照.1997年,冯若等首次将 28 kHz 与 0.87 MHz 超声组合成 X-Z 轴向双频正交辐照系统,并用电化学法与碘释放法对该辐照系统的声化学效应进行了试验研究,结果发现,该辐照系统给出的声化学产额远远超出两个单独辐照产额之和^[1].然而,由于进行此项研究的时间不长,许多研究有待深入.有关双频超声强化在提取及相关领域的应用研究报道较少.

三七为五加科植物三七 (*panax notoginseng*) 的干燥根,有散瘀止血、消肿定痛的功效,总皂苷 (total saponins of *panax notoginseng*) 为三七主要有效成分^[2].据报道^[3],三七总皂苷的常规提取方法有煎煮法、回流法、渗漉法等,采用溶剂多为乙醇或甲醇,这些方法具有传统溶剂提取的缺点.作者首次采用双频超声强化提取三七总皂苷,并将它与单频超声强化进行对比,从工艺的角度研究双频超声同时传播对植物药有效成分提取的强化情况.

1 试 验

1.1 材料

三七药材 (广州汉方现代中药研究开发有限公司提供),人参总皂苷和人参皂苷 R_g 对照品 (中国药品生物制品检定所购买);乙醇、甲醇、乙醚均为分析纯.

1.2 装置

超声波清洗槽 (槽式超声, 40 kHz, 功率可调); 探头式超声波处理机 (25 kHz, 功率可调); 双频声化学反应器 (自制, 见图 1); 双频超声装置为探头式超声与槽式超声组合而成, 25 kHz 和 40 kHz 超声同时开启并作用于提取对象.

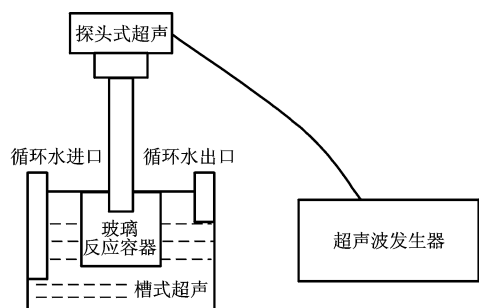


图 1 双频超声提取试验装置

Fig 1 Dual-frequency ultrasound extraction of experiment and equipment

1.3 分析方法

1.3.1 标准品溶液的制备

人参皂苷 R_g 对照品溶液的制备: 精密称取人参皂苷 R_g 对照品 5 mg, 置于 100 mL 容量瓶中, 加乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液.

1.3.2 标准曲线制备

分别精密吸取对照品溶液 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 置于 25 mL 量瓶中, 置水浴中挥尽溶剂, 取出, 加浓硫酸 0.6 mL, 摇匀, 置 80 °C 水浴中加热 1 h, 取出, 置冰浴中加质量分数为 95% 乙醇至刻度, 摇匀, 照分光光度法^[2], 以第 1 管为空白, 在 268 nm 波长处测定吸光度. 以吸光度 A 为纵坐标, 质量浓度 C 为横坐标, 绘制标准曲线. 经回归统计, 得标准曲线方程和相关系数 $rA = 40.8C - 0.0040$, $r = 0.9997$. 质量浓度在 2.00 ~ 10.00 mg/L 范围内, 与吸光度呈线性关系.

1.3.3 样品含量测定

取三七粉末约 0.5 g 精密称定, 置索氏提取器中, 加乙醚 80 mL, 水浴上提取 2 h, 取出, 弃去乙醚液, 再加甲醇 80 mL 提取 4 h, 提取液抽滤定容, 按上述方法测定 A, 计算提取液三七总皂苷的含量, 并以此计算各处理的三七总皂苷提取率.

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇质量分数对提取率的影响

称取 0.5 g 三七粉末 (过 80 目筛), 加入 10 mL 质量分数分别为 50%, 60%, 70%, 80% 的乙醇溶液, 采用 40 kHz, 25 kHz 的单频超声和双频超声 (40 kHz/25 kHz) 分别处理 20 min. 结果见图 2.

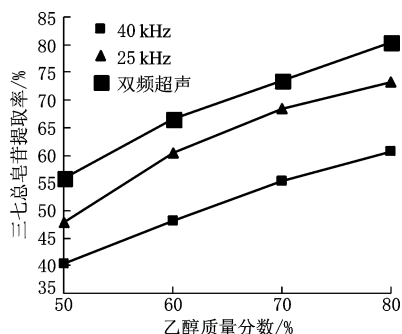


图 2 乙醇质量分数对三七总皂苷提取率的影响

Fig 2 Effect of ethanol concentration on total saponins of panax notoginseng yield

当溶剂加到中草药原料中时, 溶剂由于扩散、渗

透作用逐渐通过细胞壁透入到细胞内,溶解了可溶性物质,而造成细胞内外的溶液浓度差,于是细胞内的浓溶液不断向外扩散,溶剂又不断进入药材组织细胞中,如此多次往返,直至细胞内外溶液浓度达到动态平衡时,将此饱和溶液滤出.由图 2 可以看出,随着试验范围内的乙醇质量分数升高,双频超声提取和单频超声提取的三七总皂苷提取率呈上升趋势.在乙醇质量分数为 80% 时,双频超声提取的三七总皂苷提取率为 80.54%,高于 25 kHz 超声提取的 73.21%,和 40 kHz 超声提取的 60.56%.

2.1.2 料液比对三七总皂苷提取率的影响

称取 0.5 g 三七粉末(过 80 目筛),分别加入料液比为 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 质量分数为 80% 的乙醇溶液,采用 40 kHz, 25 kHz 的单频超声和双频超声(40 kHz/25 kHz)分别处理 20 min. 结果见图 3.

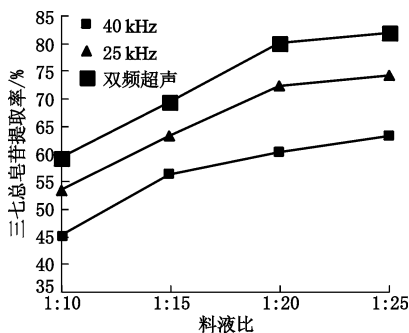


图 3 料液比对三七总皂苷提取率的影响

Fig 3 Effect of solid/liquid ratio on total saponins of panax notoginseng yield

图 3 中双频超声和单频超声强化提取的结果表明,随着溶剂量的增大,三七总皂苷提取率呈增加的趋势.这是由于溶剂量大,溶剂中的有效成分浓度低,与物料及溶剂边界层的有效成分浓度差大,扩散推动力较大,所以提取率高;相反,溶剂中有效成分浓度高,扩散推动力小,不利于扩散,有效成分提取率低.但是,如果溶剂用量太大,在经济上不合算,由于有效成分的提取率并不是随着溶剂量的增大而无限量的增大的,当溶剂量增大到一定值后,有效成分的提取率增加的幅度会降低到一个很小的值.另外,溶剂用量增大会引起一系列如蒸发浓缩等问题的出现.所以,试验中要选择合适的料液比.

在双频和单频超声作用下,溶剂量的适当增大也有利于三七总皂苷提取率的提高.当料液比达到 1:20 以后,再提高提取料液比,三七总皂苷提取率增加不是那么明显.双频超声在料液比为 1:20 时,三

七总皂苷提取率为 80.32%,而 25 kHz 超声在料液比为 1:20 时,提取率为 74.33%.由此可见,双频超声在同样的条件下,可以减少溶剂量.

2.1.3 超声作用时间对三七总皂苷提取率的影响

称取 0.5 g 三七粉末(过 80 目筛),加入 10 mL 质量分数为 80% 的乙醇溶液,采用 40 kHz, 25 kHz 的单频超声和双频超声(40 kHz/25 kHz)分别处理 10, 20, 30, 40 min. 结果见图 4.

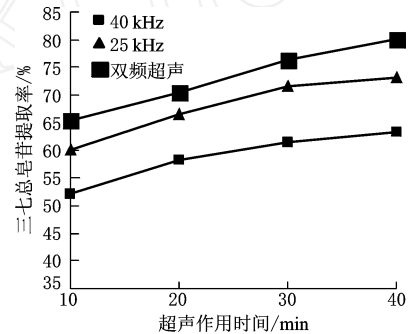


图 4 超声作用时间对三七总皂苷提取率的影响

Fig 4 Effect of ultrasound time on total saponins of panax notoginseng yield

从三七有效成分的提取结果(图 4)看,由于有效成分浓度差是双频超声和单频超声提取的主要推动力,在提取初期,有效成分浓度差大,因此提取速率快,提取率增加明显,随着提取时间的延长,溶剂中有效成分浓度逐渐增大,和固相中的浓度差逐渐变小,也就是推动力变小,所以提取速率逐渐减慢,提取率增加不明显,直至推动力为零,有效成分不再溶解.双频超声提取 10 min,三七总皂苷提取率为 65.39%,而 25 kHz 超声提取 20 min,提取率是 66.56%,对于 40 kHz 超声提取 40 min,提取率才达到 63.26%.由此看出,双频超声与单频超声相比,在相同的时间里,双频超声提取植物药有效成分的提取率高.

2.1.4 提取温度对三七总皂苷提取率的影响

称取 0.5 g 三七粉末(过 80 目筛),加入 10 mL 质量分数为 80% 乙醇溶液,考察 20, 30, 40, 50 的 40 kHz, 25 kHz 的单频超声和(40 kHz/25 kHz)双频超声作用时间 20 min 时对三七总皂苷提取率的影响,结果见图 5.

图 5 表明,对于单频超声提取和双频超声提取,升高温度有利于提取速率变大,有效成分提取率高.提取率的提高不完全归因于温度的升高,超声作用可能引起超声的空化效应、机械效应等也有一定的贡献,甚至使通过升高温度来提高提取率的方法不是很有效.一般来说,温度升高,溶剂的表面张力系

数及粘滞系数下降,蒸汽压升高,超声空化阈值下降,有利于空化泡的产生,但是另一方面,由于蒸汽压的增大,导致空化强度或空化效应下降,从而不利于提取过程的强化.从超声空化引起对提取率提高的角度来说,应该在较低的温度条件下工作.温度越高,物质分子平均运动速率越大,扩散速率越大,另外温度升高对植物组织的浸润和对有效成分的溶解也有促进作用,能够使蛋白质凝固,破坏酶类有利于物质的浸出;但温度过高会加速活性成分的分解,另外,高温下各种杂质溶解量增加,给后续纯化工作带来一定的困难.所以,当其他条件不变时,超声作用下溶剂提取率的变化是溶剂温度效应和超声效应共同作用的结果.图 5 表明,双频超声的三七总皂苷提取率明显高于单频超声的相应值,在 30 双频超声提取三七总皂苷提取率为 75.44%,比 40 kHz 超声提取在 50 的提取率(64.55%)要高,和 25 kHz 超声提取在 50 的提取率 74.32%差不多.

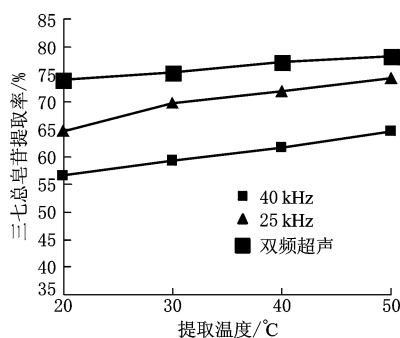


图 5 提取温度对三七总皂苷提取率的影响
Fig 5 Effect of solution temperature on total saponins of *panax notoginseng* yield

2.2 双频超声正交试验确定提取最佳条件

上面讨论了各单因子的影响,但是在实际的操作中,各因素是相互交叉影响的.因此,为全面考查影响因素,设计了四因素三水平正交试验 ($L_9(3^4)$),结果见表 1 和表 2

表 1 试验的因素及水平

Tab 1 Factors and levels of experiment

水平	A 超声作用时间 /min	B 料液比	C 乙醇质量分数 /%	D 提取温度 /
1	10	1:10	60	20
2	20	1:15	70	30
3	30	1:20	80	40

通过对乙醇质量分数、固液比、超声作用时间及提取温度的综合评价,对提取率影响的主次顺序为 $C > A > B > D$,上述结果表明:乙醇质量分数对三七总皂苷的提取结果影响最大,提取温度影响最小.根

据试验结果与分析,最佳的提取工艺条件为 $C_3A_3B_3D_3$ 即以质量分数为 80% 的乙醇,超声作用时间为 30 min,料液比为 1:20,提取温度为 40.在这个最佳条件下试验,三七总皂苷提取率 82.41%.

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果与分析

Tab 2 $L_9(3^4)$ orthogonal experiment results and analysis

编号	A	B	C	D	总皂苷提取 / %
1	1	1	1	1	60.23
2	1	2	2	2	69.14
3	1	3	3	3	76.25
4	2	1	2	1	70.02
5	2	2	3	1	74.65
6	2	3	1	2	65.34
7	3	1	3	2	71.51
8	3	2	1	3	75.41
9	3	3	2	1	77.72
K_1	205.62	201.76	200.98	212.60	
K_2	210.01	219.20	216.88	205.99	
K_3	224.64	219.31	222.41	221.68	
K_1 均值	68.54	67.25	66.99	70.87	
K_2 均值	70.00	73.07	72.29	68.66	
K_3 均值	74.88	73.10	74.14	73.89	
R	6.34	5.85	7.15	5.23	

3 用碘释放量研究超声的空化效应

早期研究已知:含有一定量溶解空气的碘化钾溶液经超声辐照后,碘离子会形成碘分子析出.如在溶液中加入少量四氯化碳,其效果更好.如在溶液中加入少量淀粉,当碘遇到淀粉呈蓝色,再采用硫代硫酸钠溶液滴定,当滴定完成时,溶液恢复为无色.这样由 $Na_2S_2O_3$ 的滴定消耗量即可确定 I_2 的释放量,并把它作为声化学反应的产额.试验采用分光光度计来检测碘(波长为 354 nm)的吸光度,通过测定反应释放的 I_2 量来考察超声空化效应的强弱.

由图 6 可知,随着时间的延长,声化学产额逐渐增加,双频超声(40 kHz/25 kHz)的协同效应也明显地高于两个单频单独辐照时的代数和(40 kHz + 25 kHz),最高可达到两倍.这一现象可能是双频超声的协同作用增强了样品的机械扰动,使更多的空气能从样品表面进入而使空化核增多,以致空化效应增强,或者是双频超声可以增大振幅,扩大传质面积,使声场比较均匀,产生比单频大的空化泡,使参与空化的空化核数量增加,从而产生比单频更强烈的空化效应.使得双频超声的声化学产额大于单频超声的声化学产额.

从目前已经进行的双频试验和收集的文獻

看^[4-7],双频超声正交辐照能增强声化学的产额原因有两个:声化学产额源于超声空化效应,而超声空化的强弱以空化核数量的多少为前提.双频超声同时正交辐照时对样品的机械扰动较单超声独立作用明显增大,这就使得更多的空气从样品表面进入样品,从而导致样品中空化核数量增强,这就为获得强超声空化提供了机会.声化学产额的提高依赖于有较多的空化核能产生内爆.双频超声束正交同时作用时,各自产生空化过程.当各自空化泡内爆时,会产生许多新的空化核,这些空化核不仅可供该超声束的自身再空化,同时也会为另一束超声作用提供新的空化核.

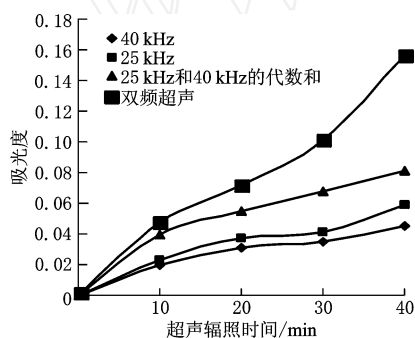


图 6 碘化钾溶液中碘释放量的曲线图

Fig 6 Curve of iodine liberated from KI solution

4 结 论

(1)运用双频超声波技术,对三七总皂苷进行提取和测定,并将它与单频超声强化进行对比.试验结果表明:影响总三七总皂苷提取率的大小次序先后为:乙醇质量分数 > 超声作用时间 > 料液比 > 提取温度,优选出双频超声提取最佳工艺条件:乙醇质量分数为 80%,超声作用时间为 30 min,料液比为 1:20,提取温度为 40℃.在这个最佳条件下试验,三七总皂苷提取率为 82.41%.在相同的条件下,双频超声提取三七总皂苷相比单频超声而言,可以节省溶剂用量、省时、高效及有效成分提取率高,适于推广应用.

(2)采用碘化钾溶液中钾的释放量来考察超声

的空化产额,试验结果表明:在同样的输入功率和条件下,双频超声的空化产额远高于单频超声的空化产额,即在同样的条件下,双频超声(40 kHz/25 kHz)对三七总皂苷的提取率高于单频超声 40 kHz和 25 kHz的提取率.

参考文献 (References)

- [1] 冯若,朱昌平,赵逸云,等.双频正交辐照的声化学效应研究[J].科学通报,1997,42(9):925-928.
FENG Ruo, ZHU Chang-ping, ZHAO Yi-yun, et al. Research of sonochemistry effect of bifrequency ultrasonic orthogonal irradiation [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1997, 42(9): 925 - 928 (in Chinese)
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(D)[M].北京:化学工业出版社,2005:68-69.
- [3] 陈中坚,孙玉琴,柯金虎,等.三七总皂苷的含量测定方法研究[J].特产研究,2002(3):37-39.
CHEN Zhong-jian, SUN Yu-qin, KE Jin-hu, et al. Studies on determination method of saponins content in *panax notoginseng* [J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2002 (3): 37 - 39. (in Chinese)
- [4] Sivakumar Manickam, Tatak Prashant A, Pandit Aniruddha B. Kinetics of p-nitrophenol degradation: effect of reaction conditions and cavitation parameters for a multiple frequency system [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2002, 85: 327 - 338
- [5] Gogate Parag R, Mujumdar Sukti, Pandit Aniruddha B. Sonochemical reactors for waste water treatment: comparison using formic acid degradation as a model reaction [J]. *Advances in Environmental Research*, 2003, 7: 283 - 299.
- [6] Swamy M, Narayana K L. Intensification of leaching process by dual-frequency ultrasound [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2001, 8: 341 - 346
- [7] Tatak Prashant A, Pandit Aniruddha B. Modelling and experimental investigation into cavity dynamics and cavitation yield: influence of dual frequency ultrasound sources [J]. *Chemical Engineering Science*, 2002, 57: 4987 - 4995.

(责任编辑 徐云峰)