

微波辅助萃取-大孔树脂分离纯化芳樟叶黄酮

王先, 杨坤, 王兆守, 何宁, 王远鹏, 孙道华, 李清彪^{*}

(厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 化学生物学福建省重点实验室, 厦门 361005)

摘要: 为了综合利用芳樟叶精油提取过程中产生的大量残渣, 该文利用微波辅助萃取和大孔树脂选择性吸附来分离纯化芳樟叶黄酮。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 考察了萃取剂、微波辐射功率、辐射时间及料液比对黄酮得率的影响, 确定了微波辅助萃取的优化工艺条件: 以60%乙醇做萃取剂, 微波功率320 W, 间歇辐射2次, 每次1 min, 料液质量体积比1:12, 在此条件下, 芳樟叶黄酮的提取得率为2.97%, 与乙醇热回流提取方法相比, 得率提高了6.83%, 时间缩短了98.89%; 为进一步纯化萃取所得的黄酮提取物, 选择6种大孔吸附树脂, 测定芳樟叶黄酮在树脂上的吸附量和解吸率, 筛选出了吸附剂HPD-450, 其对芳樟叶黄酮有较好的静态吸附和解吸效果。经装填有大孔树脂HPD-450的固定床纯化后黄酮纯度由22.49%提高到51.28%, 纯化倍数2.3倍。

关键词: 芳樟叶, 黄酮, 微波萃取, 大孔树脂, 分离, 纯化

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2009.z1.028

中图分类号: TQ028.8

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2009)Supp.1-0138-04

王先, 杨坤, 王兆守, 等. 微波辅助萃取-大孔树脂分离纯化芳樟叶黄酮[J]. 农业工程学报, 2009, 25(Supp. 1): 138-141.

Wang Xian, Yang Kun, Wang Zhaoshou, et al. Separation and purification of flavonoids from *Cinnamomum camphora* leaves via microwave-assisted extraction and macroporous resin adsorption[J]. Transactions of the CSAE, 2009,25(Supp.1): 138-141.(in Chinese with English abstract)

0 引言

芳樟(*Cinnamomum camphora* (Linn.) Pvesl) 为樟科 (*Lauraceae*) 樟属 (*Cinnamomum*Trew) 植物, 是重要的经济树种, 从芳樟叶中提取的芳香油在香料、医药和化工合成方面都有广泛的用途^[1]。现代药理研究表明, 芳樟叶具有抗菌^[2]、抗氧化^[3]、抗炎^[3]、抗癌^[4]等多种生物活性。

黄酮类化合物是一类广泛分布于植物界的低分子量天然成分, 为植物多酚的代谢物, 具有抗氧化、抗癌、抗菌、抗炎、抗病毒、降血糖等多种生物活性^[5]。孙崇鲁等研究表明芳樟叶含有大量的黄酮类化合物^[6]。Chen 等采用高效毛细管电泳电化学检测仪测得芳樟叶中含有黄酮类化合物芦丁和槲皮素^[7]。

黄酮类化合物的一般提取方法有溶剂提取法、超声波法、酶解法等^[5]。微波辅助萃取法是近年发展起来的将微波技术和传统溶剂萃取相结合的一种提取技术, 由于该技术具有操作时间短、提取率高、溶剂用量少、成本低等特点, 在天然产物分离提取方面得到广泛应用^[8-12]。黄酮类化合物的分离纯化方法主要有大孔树脂吸附法、超滤法、柱层析法、铅盐沉淀法、盐析纯化法等。大孔

树脂吸附法具有效率高、工艺简单、生产成本低、不受无机物影响、再生方便等优点, 近年来在中国已广泛用于天然植物有效成分的分离纯化, 如分离纯化皂苷、黄酮、生物碱等^[13-15]。目前还未见微波辅助萃取结合大孔树脂分离纯化芳樟叶黄酮的报道。

芳樟叶提取精油后残留大量的叶渣, 叶渣中还含有具有经济价值的黄酮类化合物。为综合利用芳樟叶精油提取过程中产生的大量残渣, 本文以厦门牡丹香化有限公司人工组培的纯种芳樟叶为研究对象, 对微波萃取结合大孔树脂吸附分离纯化芳樟叶黄酮的工艺进行了研究, 以期确立有效的提取分离工艺, 从而提高纯种芳樟的综合利用价值, 开拓芳樟资源的应用领域。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

原料: 纯种芳樟叶 (品种牡丹 1 号), 由厦门市牡丹香化有限公司提供。

大孔吸附树脂: NKA-9 型、AB-8 型、S-8 型 (天津南开大学); D101 型 (天津海光化工有限公司); HPD-100 型、HPD-450 型 (河北沧州宝恩化工有限公司)。

试剂: 黄酮标准品芦丁, 纯度 95% 以上, (上海生化试剂厂); 其他试剂均为国产分析纯。

仪器: 格兰仕 WP800T 微波炉 (佛山市格兰仕微波炉电器有限公司); RE-52 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 722s 分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); TDL-40 低速离心机 (上海安亭科学仪器厂); GXZ-DH 电热恒温干燥箱 (上海跃进医疗器械厂)。

1.2 试验方法

收稿日期: 2008-02-25 修订日期: 2008-07-23

作者简介: 王先 (1982-), 男, 福建莆田人, 研究方向为天然产物的开发与利用。厦门 厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 化学生物学福建省重点实验室, 361005。Email: wangxian3397560@163.com

*通讯作者: 李清彪, 男, 博士生导师, 教授, 从事生物化工、工业催化、环境工程方面的研究。厦门 厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 化学生物学福建省重点实验室, 361005。Email: kelqb@xmu.edu.cn

1.2.1 芳樟叶预处理

提取精油后的芳樟叶渣在 60℃ 条件下干燥 24 h, 粉碎, 过 65 目筛, 备用。

1.2.2 大孔吸附树脂的预处理

大孔吸附树脂用 95% 的乙醇充分浸泡, 然后用乙醇洗至洗出液加适量水后无白色浑浊, 再用去离子水洗去乙醇, 最后转入酸碱处理, 即用体积分数 5% HCl 溶液浸泡 3 h, 然后用去离子水洗至 pH 值为中性, 接着用质量分数 5% 的 NaOH 溶液浸泡 3 h, 最后用去离子水洗至 pH 值为中性。

1.2.3 微波辅助萃取方法

称取预处理过的芳樟叶干粉 5.0 g, 置于 500 mL 三角瓶中, 再加入一定量的溶剂 (乙醇水溶液), 然后置于微波炉中。为防止溶剂沸腾, 每次微波辐射时间为 1 min, 冷却后再用微波辐射, 依此反复多次后, 冷却后抽滤除去固体杂质收集滤液。将提取液减压蒸馏浓缩, 4000 r/min 离心 10 min 除去固体杂质, 得到粗提液, 置于 250 mL 容量瓶中定容后再移取 1 mL 测定黄酮的含量。

在前人相关单因素试验的基础上^[16], 选择微波辐射时间 (A)、微波功率 (B)、料液比 (C) 和萃取剂乙醇浓度 (D) 4 个影响因素, 每个因素选 3 个水平进行考察, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表 (表 1), 以黄酮的提取得率 (单位质量芳樟叶干粉经提取后获得的黄酮质量, 用质量百分率表示) 作为优化目标进行正交试验。每个试验重复两次。

表1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal design

水平	辐射时间 A/min	微波功率 B/W	固液比 C/g·mL ⁻¹	乙醇浓度 D/%
1	1	136	1/8	50
2	2	320	1/10	60
3	3	528	1/12	70

1.2.4 树脂吸附与脱附试验

在优化的微波辅助萃取条件下浸提芳樟叶黄酮, 将提取液减压回收乙醇后得浓缩水溶液, 作为树脂吸附原液备用。

称取预处理过的大孔树脂各 1.0 g (用滤纸吸干) 装入具塞磨口三角瓶中, 分别各加入初始浓度 1.452 mg/mL (测量值) 的芳樟叶黄酮水溶液 50 mL, 25℃ 振摇 24 h 充分吸附后过滤, 测定滤液中剩余黄酮浓度。吸附平衡后的大孔树脂, 加入 50 mL 一定浓度的乙醇, 25℃ 振摇解吸 24 h, 过滤, 测定滤液中黄酮浓度, 按以下两式分别计算平衡吸附量和解吸率。

$$Q = (C_0 - C_1) \times V_1 / W \quad (1)$$

$$R = C_2 \times V_2 / (Q \times W) \times 100\% \quad (2)$$

式中 Q ——平衡吸附量, mg/g; C_0 ——初始黄酮浓度, mg/mL; C_1 ——吸附达平衡时黄酮浓度, mg/mL; V_1 ——吸附液体积, mL; R ——解吸率, %; C_2 ——解吸液黄酮浓度, mg/mL; V_2 ——解吸液的体积, mL; W ——树脂质量, g。

1.2.5 黄酮的树脂纯化试验

称取 5 g 预处理过的树脂湿法装柱, 层析柱内径 1.6 cm, 柱体体积约 18 mL。将芳樟叶黄酮水溶液连续上样, 至黄酮出现穿透时停止上样。用大量蒸馏水冲洗除去未吸附的水溶性杂质后再用 70% 乙醇洗脱, 将洗脱液浓缩, 真空干燥得纯化后芳樟叶黄酮, 用一定量的 95% 乙醇溶解, 测定黄酮的浓度, 计算出固形物中黄酮的纯度。

1.2.6 黄酮的含量的方法测定

黄酮的含量按文献[6]中的方法测定。

1) 标准方程的建立

用硝酸铝—亚硝酸钠比色法测定不同浓度芦丁标准品溶液吸光度, 绘制标准曲线:

$$A = 12.1C - 0.001 \quad (R^2 = 0.9998) \quad (3)$$

式中 A ——吸光度; C ——芦丁浓度, mg/mL。

2) 样品中黄酮含量的测定

准确吸取 1 mL 的提取液, 按照测定芦丁标准液吸光度的步骤测定吸光度 A , 根据标准曲线可计算出提取液中黄酮的含量。芳樟叶黄酮的提取得率 Y 的计算公式为:

$$Y = V \times C \times 25 / (m \times 1000) \times 100\% \quad (4)$$

式中 V ——提取液体积, mL; C ——测试溶液中黄酮的浓度, mg/mL; m ——芳樟叶渣干粉的质量, g。

树脂吸附解吸及黄酮纯化试验中, 液相黄酮含量均用上述方法测量。

2 结果与分析

2.1 黄酮的微波辅助提取条件与效率

从正交试验结果的极差分析 (表 2) 和方差分析 (表 3) 可知, 微波功率、料液比和乙醇浓度对芳樟叶黄酮提取得率有显著性影响。最佳提取工艺条件组合为 $A_2B_2C_3D_2$, 即微波功率为 320 W, 萃取剂为 60% 乙醇, 原料与萃取剂的质量体积比为 1:12, 微波间歇辐射 2 次, 每次 1 min。影响微波提取效率的显著性顺序为微波功率 > 料液比 > 萃取剂乙醇浓度 > 辐射时间。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果分析

序号	A	B	C	D	提取得率/%
1	1	1	1	1	2.38
2	1	2	2	2	2.82
3	1	3	3	3	2.54
4	2	1	2	3	2.72
5	2	2	3	1	2.84
6	2	3	1	2	2.44
7	3	1	3	2	2.83
8	3	2	1	3	2.75
9	3	3	2	1	2.32
k_1	2.58	2.64	2.52	2.51	
k_2	2.67	2.80	2.62	2.70	
k_3	2.63	2.43	2.74	2.67	
R	0.087	0.370	0.213	0.183	

与乙醇热回流提取方法相比^[6], 微波提取所用的时间为 2 min, 热回流提取所用的时间为 180 min, 前者比后者的提取时间缩短了 98.89%, 而黄酮得率反而提高了

6.83% (见表4)。可见,微波辅助提取具有省时、高效等优点,适用于芳樟叶中黄酮的提取。

表3 各因素方差分析
Table 3 Variance analysis of factors

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	0.0224	2	0.0112	1.31	>0.05
B	0.418	2	0.209	24.51	<0.01
C	0.138	2	0.0691	8.10	<0.05
D	0.119	2	0.0596	6.99	<0.05
误差项	0.0768	9	0.00854		

注: $F_{0.05}(2,9)=4.26$, $F_{0.01}(2,9)=10.6$ 。

2.2 大孔树脂静态吸附量和解吸率

表5 大孔树脂的主要物理性质、平衡吸附量和解吸率

Table 5 Primary properties, equilibrium adsorption quantities and desorption yields for six macroporous resins

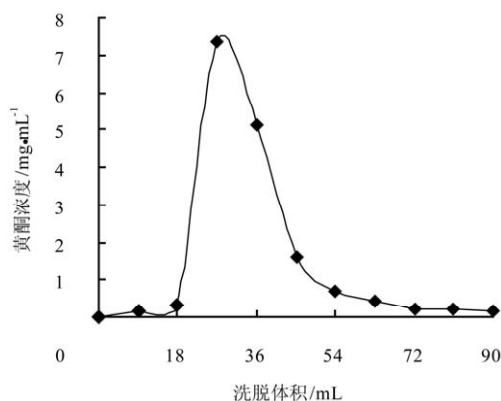
树脂	极性	粒径/mm	孔径/nm	比表面积/ $m^2 \cdot g^{-1}$	平衡吸附量/ $mg \cdot g^{-1}$	70%乙醇洗脱解吸率/%
D101	非极性	0.3~1.25	10.0~12.0	400~600	28.8	82.9
HPD-100	非极性	0.3~1.2	8.5~9.0	650~700	36.3	78.8
AB-8	弱极性	0.3~1.25	13.0~14.0	480~520	32.5	87.0
HPD-450	弱极性	0.3~1.25	9.0~11.0	500~550	39.2	90.9
NKA-9	极性	0.3~1.25	15.5~16.5	250~290	32.1	75.3
S-8	极性	0.3~1.25	28.0~30.0	100~120	40.8	37.2

2.3 乙醇浓度对解吸的影响

洗脱剂具有使大孔树脂溶胀,减弱被吸附物质与树脂之间的亲和力的作用,并可溶解被吸附物质。大孔树脂常用的洗脱剂是低级醇、酮或其水溶液,如甲醇、乙醇、丙醇和丙酮。考虑到实际生产安全性等方面要求,本试验使用乙醇作为洗脱剂^[7]。分别选择了不同浓度的乙醇水溶液作为洗脱剂,测定其解吸率,结果表明:10%和30%乙醇水溶液的解吸率比较低,仅为11.6%和41.7%;50%乙醇水溶液的解吸率有所提高,达到73.4%;70%和95%乙醇水溶液的解吸效果较好,分别为90.7%和96.9%,两者之间无显著差异,从节约试剂用量考虑,选用70%乙醇溶液为解析液。

2.4 芳樟叶黄酮的纯化效果

芳樟叶黄酮水溶液采用装填大孔吸附树脂 HPD-450 的固定床连续上样,检测流出液黄酮浓度,待样品穿透,停止上样。先用5倍柱体积的蒸馏水充分冲洗水溶性杂质,然后用70%乙醇充分洗脱。洗脱曲线如图1所示。



注:柱体积为18 mL

图1 70%乙醇条件下黄酮的洗脱曲线

Fig.1 Elution curve at the eluent (ethanol) concentration of 70%

本试验所考察的6种大孔树脂的物理性质、黄酮的平衡吸附量和解吸率的测定结果见表5。由表5可以看出,S-8和HPD-450吸附量高于其他4种树脂。但S-8吸附量虽然最大,解吸率却不高,只有37.2%,而HPD-450不仅有较大的吸附量,且其解吸率可达90.9%。因此,选用HPD-450作为芳樟叶黄酮吸附剂更有实际意义。

表4 两种提取方法的结果对比

Table 4 Comparison of two extraction methods

提取方法	提取时间/min	提取得率/%
微波辅助提取	2	2.97±0.53
乙醇回流提取	180	2.77±0.60

5倍柱体积的70%乙醇基本上可将芳樟叶黄酮洗脱下来。将收集得到的流出液浓缩、干燥,得到的固形物用一定量95%的乙醇溶解,测定黄酮的浓度,计算得到固形物黄酮纯度为51.3%,而树脂吸附原液(见1.2.4树脂吸附与脱附试验)干燥所得固形物黄酮纯度仅为22.5%,提纯后样品纯度提高了1.3倍。

3 结论

1)微波功率、料液比和乙醇浓度对芳樟叶黄酮提取得率的影响显著。最佳微波提取工艺为:以60%乙醇做萃取剂,微波功率320 W,间歇辐射两次,每次1 min,料液比1:12,芳樟叶黄酮提取得率达2.97%,比乙醇热回流提取提高了6.83%,并且提取时间缩短了98.89%。

2)考察了6种大孔树脂对芳樟叶黄酮的吸附和解吸性能,确定HPD-450型树脂为芳樟叶黄酮的分离纯化材料。用树脂HPD-450纯化芳樟叶黄酮时,宜选用70%乙醇水溶液作为解吸液,用量为5倍柱体积。大孔树脂HPD-450纯化后黄酮纯度由22.5%提高到51.3%,纯化倍数2.3倍。

[参考文献]

- [1] 林翔云,江崇基,林君如,等. 纯种芳樟叶及其组培苗叶油的分析报告[J]. 香料香精化妆品, 2002, (1): 16-19.
- [2] 吴传茂,吴周和,伍业松. 樟叶乙醇提取物的抑菌作用[J]. 氨基酸和生物资源, 2000, 22(2): 41-42.
- [3] Hye Ja Lee, Eun A Hyun, Weon Jong Yoon, et al. In vitro anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Cinnamomum camphora* extracts[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2006, 103: 208-216.
- [4] 苏远波,李清彪,姚传义,等. 芳樟树叶乙醇提取物的抗癌作用[J]. 化工进展, 2006, 25(2): 200-204.

- [5] 裴凌鹏, 惠伯棣, 金宗濂, 等. 黄酮类化合物的生理活性及其制备技术研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 203—207.
- [6] 孙崇鲁, 黄克瀛, 陈丛瑾, 等. 香樟叶黄酮类化合物的提取[J]. 应用化工, 2006, 35(2): 142—143.
- [7] Chen Gang, Zhang Hongwei, Ye Jiannong. Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 423(1): 69—76.
- [8] Brachet A, Christen P, Venthey J L. Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves[J]. *Phytochem Anal*, 2002, 13: 162—169.
- [9] Yang Yi, Chen Lei, Zhang Xinxiang. Microwave-assisted extraction of major active ingredients in *Panax quinquefolium* L. [J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2004, 27(20): 3203—3211.
- [10] 董华强, 宁正祥, 崔志新, 等. 微波辅助提取多穗柯嫩叶黄酮工艺研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(2): 213—217.
- [11] Martino E, Ilariu Ramaiola I, Urbano M. Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1125: 147—151.
- [12] Fishman M L, Chau H K, Hoagland P D. Microwave-assisted extraction of lime pectin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20: 1170—1177.
- [13] Fu Yujie, Zu Yuangang, Liu Wei, et al. Optimization of luteolin separation from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) *Mills* sp.] leaves by macroporous resins[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1137(2): 145—152.
- [14] Zhao Yu, Chen Bo, Yao Shouzhao. Separation of 20(S)-protopanaxdiol type ginsenosides and 20(S)-protopanaxtriol type ginsenosides with the help of macroporous resin adsorption and microwave assisted desorption[J]. *Separation and Purification Technology*, 2007, 52(3): 533—538.
- [15] 李春美, 钟朝辉, 窦宏亮, 等. 大孔树脂分离纯化柚皮黄酮的研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(3): 153—157.
- [16] 艾志录, 郭娟, 王育红, 等. 微波辅助提取苹果渣中苹果多酚的工艺研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(6): 188—191.
- [17] 朱洪梅, 韩永斌, 顾振新, 等. 大孔树脂对紫甘薯色素的吸附与解吸特性研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(5): 153—156.

Separation and purification of flavonoids from *Cinnamomum camphora* leaves via microwave-assisted extraction and macroporous resin adsorption

Wang Xian, Yang Kun, Wang Zhaoshou, He Ning, Wang Yuanpeng,
Sun Daohua, Li Qingbiao^{*}

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Key Lab for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Flavonoids was extracted by the microwave-assisted extraction technology from the residue of *Cinnamomum camphora* leaves during essential oil extraction. Macroporous resin adsorption was used for further purification. With orthogonal designed experiments the optimal extraction conditions were determined: 60% ethanol aqueous solution, microwave power 320 W and treated for 2 min, 1 : 12 (g·mL⁻¹) for the mass to volume ratio of material to extractant. Under such conditions, the yield of the flavonoids reached 2.97%, which is 6.83% higher than that obtained using heat ethanol reflux extraction, and the operation duration of the newly developed extraction technology was significantly reduced by 98.89%. Six kinds of macroporous resin were then examined for further purification of *Cinnamomum camphora* flavonoids. Results showed that HPD-450 resin possessed correspondingly the best absorption and desorption behavior. After an absorption-desorption operation applied upon an HPD-450 resin packed column, the purity of flavonoids could be improved to 51.3% from 22.5%, and the purification fold is 2.3.

Key words: *Cinnamomum camphora* leaves, flavonoids, microwave extraction, macroporous resin, separation, purification