

均匀设计法优化桦木醇超声波辅助提取工艺



DING Wei-min

丁为民^{1,2}, 周丹³, 于涛¹, 黄靖姝¹, 阎秀峰¹, 王洋^{1*}

(1. 东北林业大学 生命科学学院, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨理工大学 化学与环境工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150080; 3. 黑龙江省森林植物园, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 以95% (体积分数,下同)的乙醇为溶剂,利用均匀设计法优化了超声波辅助提取白桦树皮中桦木醇的工艺,考察了各因素对桦木醇提取率的影响,并以高效液相色谱法测定了萃取物中桦木醇的含量。结果表明,在超声波功率400 W、提取时间70 min、提取温度70 ℃、液固比40:1 (mL:g)的条件下,超声波辅助提取桦木醇提取率可达到83.43% ± 1.89%,纯度71.20% ± 0.74%。与传统回流提取法相比,超声波辅助提取法提取时间短、提取率高,具有一定的应用前景。用5%的碳酸钠水溶液对原料进行预处理,可减少酸性杂质对桦木醇提取的干扰。

关键词: 桦木醇;白桦树皮;均匀设计;超声波辅助提取;高效液相色谱

中图分类号:TQ351;S789.1;R931.71

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2010)03-0078-05

Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of Betulin Using Uniform Design

DING Wei-min^{1,2}, ZHOU Dan³, YU Tao¹, HUANG Jing-shu¹, YAN Xiu-feng¹, WANG Yang¹

(1. Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. School of Chemical and Environmental Engineering, Harbin University of Science and Technology, Harbin 150080, China; 3. Heilongjiang Forest Botanical Garden, Harbin 150040, China)

Abstract: White birch (*Betula platyphylla* Suk.) bark, one of the important biomaterial resources, is the remains after cutting and processing of the tree. Ultrasound-assisted extraction of betulin from white birch bark using uniform design was optimized. The effects of ultrasound power, extraction temperature, extraction time and liquid-solid ratio on betulin yield was discussed, and betulin content was determined by HPLC. Betulin yield could reach up to 83.43% ± 1.89% with the purity of 71.20% ± 0.74% under the conditions of ultrasound power 400 W, extraction time 70 min, extraction temperature 70 ℃, and liquid-solid ratio 40:1 (mL:g). Comparing with the traditional reflux extraction, shorter extraction time and better yield were achieved by ultrasound-assisted extraction. Through pre-treatment with 5% sodium carbonate aqueous solution the interference of acidic impurities on the extraction of betulin could be reduced.

Key words: betulin; white birch bark; uniform design; ultrasound-assisted extraction; HPLC

白桦 (*Betula platyphylla* Suk.) 为桦木科桦木属的落叶阔叶树种,是黑龙江省重要的林木资源^[1]。桦木主要用于制浆造纸、胶合板生产以及卫生筷和牙签生产等。在白桦的采伐和加工过程中,产生树皮、树梢、造材截头等大量剩余物^[2],目前利用程度很低。桦木醇又名桦木脑、白桦酯醇,是桦树皮中的一种羽扇烷类五环三萜化合物,具边缘抗肿瘤活性。桦木醇的衍生物桦木酸基本无毒,具优异的抗 HIV-1 和抗黑色素瘤活性^[3-5]。新近发现的数种桦木醇衍生物,抗 HIV-1 活性大大超过桦木酸,成为桦木酸类抗癌、抗艾滋病药物中一个重要的分支^[6-7]。以往桦木醇的提取主要采用有机溶剂回流提取

收稿日期:2009-09-22

基金项目:引进国际先进林业技术项目(2006-4-119);东北林业大学优秀青年教师创新基金项目(无编号);中央高校基本科研业务费专项资金资助(DL09EA02)

作者简介:丁为民(1971-),男,山东诸城人,副教授,博士生,研究方向为天然产物开发与应用

* 通讯作者:王洋(1971-),女,教授,博士生导师,主要研究方向为植物次生代谢、植物生理生态学;E-mail:ywang1971@hotmail.com。

法^[8-10],常用的溶剂如氯仿、苯、乙醚等毒性大,对操作人员危害较大,而且操作时间长、提取效率低。超声波辅助提取是利用超声波产生的强烈振动、高的加速度、强烈的空化效应和搅拌作用等加速有效成分进入溶剂,从而提高提取率、缩短提取时间^[11-13]。本研究探讨了以白桦树皮为原料、经稀碱预处理后以乙醇为溶剂利用超声波辅助提取白桦树皮中桦木醇的工艺,并以桦木醇提取率为考察指标、采用均匀设计方法对桦木醇的超声波辅助提取工艺进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 原料 白桦树皮,于2007年5月采自佳木斯林业局孟家岗林场,经干燥、粉碎后过筛、备用。

1.1.2 仪器 AZ20500B 超声波清洗器,中国上海苏豪智能系统有限公司;HA120-50-01 超临界萃取装置,江苏南通华安公司;Waters 高效液相色谱仪,2487 型紫外检测器;Biofuge 22R 高速冷冻离心机,德国 Heraeus sepatech 公司;AB104 型电子天平,瑞士。

1.1.3 试剂 乙腈为色谱纯;水为超纯水;其它试剂均为分析纯;桦木醇标准品自制。

1.2 方法

1.2.1 原料的预处理 准确称取一定质量的白桦树皮粉,置于锥形瓶中,加入5%碳酸钠水溶液,加热煮沸1h后趁热过滤,水洗滤渣至滤液pH值呈中性,滤渣自然风干。

1.2.2 超声波辅助提取桦木醇 提取方法:准确称取5.00g白桦树皮粉,经上述方法预处理后置于500mL带回流冷凝器的圆底烧瓶中,加入一定体积的95%(体积分数,下同)乙醇,在一定的超声波功率和提取温度下提取一定时间后,将所得提取液用旋转蒸发仪在40~50℃下减压浓缩至干,真空干燥24h后称质量待测。试验设计:分别以提取时间(X_1 ,水平数为10)、超声波功率(X_2 ,水平数为10)、提取温度(X_3 ,水平数为5)、液固比(X_4 ,水平数为5)为影响因素,选择混合水平均匀设计 $U_{10}(10^2 \times 5^2)$ 表^[14]安排试验(偏差为0.26690),试验方案见表1。

1.2.3 桦木醇标准品的测定

1.2.3.1 色谱条件 色谱柱为KYA HIQ sil C_{18} 柱(4.6mm×25cm×5 μ m),检测波长210nm,流动相为乙腈-水(体积比8:2),流速1mL/min,进样量10 μ L。

1.2.3.2 标准溶液配制 准确称取桦木醇标准品125mg,置于25mL容量瓶中,乙醇溶解并定容,作为标准品母液备用。

1.2.3.3 标准曲线绘制 依次准确吸取0.50、1.00、1.50、2.50和4.00mL上述标准品母液置于5mL容量瓶中,乙醇定容,制成质量浓度分别为0.50、1.00、1.50、2.50、4.00g/L的标准溶液。按照选定的色谱条件,分别对不同质量浓度的标准溶液进样分析,每样重复测定3次。以桦木醇质量浓度(x ,g/L)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,得回归方程 $y = 376\ 641x - 16\ 073$,相关系数 $R = 0.999\ 9$,桦木醇质量浓度在0.50~4.00g/L范围内与峰面积具有良好的线性关系。

1.2.3.4 精密度试验 取0.50、1.50、4.00g/L的桦木醇标准品溶液,重复进样5次,测得桦木醇峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为1.71%、2.07%、0.85%($n = 5$)。

1.2.4 白桦树皮中桦木醇含量的测定 准确称取1.00g白桦树皮粉3份,分别加入索氏提取器中,以100mL无水乙醇为溶剂连续提取24h,提取液转入250mL容量瓶,稀释至刻度,混匀。取1mL定容的提取液,离心(12000r/min)5min,10 μ L上清液,按1.2.3节方法测定并计算样品中桦木醇质量浓度(g/L),按式(1)计算桦木醇质量分数(w_1)。测得白桦树皮样品中桦木醇的质量分数为25.34%±0.32%。

$$w_1 = \frac{c_1 \times V_1}{m_1} \quad (1)$$

式中: m_1 —白桦树皮样品质量,g; c_1 —样品中桦木醇质量浓度,g/L; V_1 —样品提取液体积,0.25L。

1.2.5 提取率的测定

1.2.5.1 测定方法 精密称取上述白桦树皮提取物10mg,乙醇定容至50mL,摇匀,吸取1.0mL至离

心管中,离心(12 000 r/min)5 min,取 10 μ L 上清液进样测定。桦木醇提取率(w_2)按式(2)计算。标准品及白桦树皮提取物的 HPLC 图谱见图 1。

$$w_2 = \frac{c_2 \times V_2 \times m_1}{m_1 \times w_1 \times w_2} \quad (2)$$

式中: m_2 —白桦树皮质量,g; m_1 —质量为 m_2 的白桦树皮经提取所得提取物的质量,g; m_2 —提取物样品质量,0.01 g; c_2 —提取物样品中桦木醇质量浓度,g/L; V_2 —提取物样品溶液体积,0.05 L; w_1 —白桦树皮中桦木醇质量分数,25.34 %。

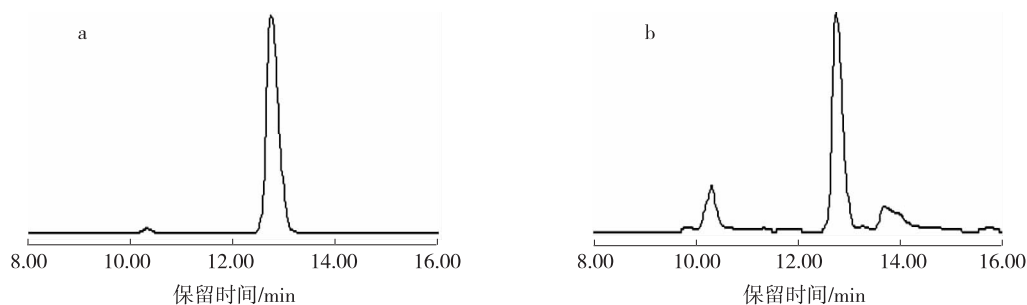


图 1 桦木醇标准品(a)、白桦树皮提取物(b)的 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatograms of betulin standard (a) and white birch bark extract (b)

1.2.5.2 加标回收率试验 精密称取 3 份已测定桦木醇含量的白桦树皮提取物各 5 mg,分别加入桦木醇标准品 5 mg,乙醇定容至 50 mL,按上述方法测定桦木醇含量,测得加样回收率和 RSD 分别为 96.19 % 和 3.32 %。

2 结果与讨论

2.1 超声波辅助提取工艺优化

2.1.1 回归模型 超声波辅助提取均匀设计试验结果见表 1。以桦木醇提取率(Y)为考察指标,用 DPS 数据处理系统对试验结果进行回归分析,得到如下回归方程:

$$Y = -147.4995000 + 0.0230521X_1 + 0.2822875X_2 + 4.0787000X_3 + 0.4413599X_4 - 0.0000289X_1^2 - 0.0019830X_2^2 - 0.0292399X_3^2 - 0.0044079X_4^2$$

其中相关系数 $R = 0.9993$, F 值为 91.5275,作 F 检验, $F > F(0.01)(4,6) = 9.15$,极为显著。观测值与拟合值误差非常小,准确度高。

根据回归方程计算,最佳超声波功率 400 W,提取时间 70 min,提取温度 70 $^{\circ}$ C,液固比 45:1(mL:g,下同)。

表 1 超声波辅助提取均匀设计试验方案及分析结果

Table 1 Experimental conditions and results of ultrasound-assisted extraction using uniform design

试验号 No.	超声波功率/W ultrasound power	提取时间/min extraction time	提取温度/ $^{\circ}$ C extraction temp.	液固比(mL:g) liquid-solid ratio	提取物得率/% extract yield	桦木醇质量分数/% betulin mass fraction	桦木醇提取率/% betulin yield
1	50	30	60	35:1	16.23	65.11	41.71
2	100	60	70	45:1	26.92	68.16	72.24
3	150	90	55	30:1	16.14	66.42	42.30
4	200	10	65	45:1	19.27	68.08	51.78
5	250	40	75	30:1	24.83	67.19	65.82
6	300	70	55	40:1	20.81	69.52	57.10
7	350	100	65	25:1	24.24	66.50	63.61
8	400	20	75	40:1	22.24	71.27	62.40
9	450	50	60	25:1	21.33	70.00	58.78
10	500	80	70	35:1	30.03	67.34	79.79

2.1.2 单因素效应分析 各因素对桦木醇提取率影响的效应分析见图2。结果表明,随着超声波功率提高、提取时间的延长、提取温度的升高,桦木醇的提取率呈先上升后下降的趋势,而随着乙醇加入量的增加,桦木醇的提取率虽逐渐增加,但当液固比值增至40:1后,桦木醇提取率的增幅变缓。各单因素对桦木醇提取率影响的通径分析结果表明,各因素影响权重顺序为提取温度(9.708 58) > 提取时间(2.490 19) > 超声波功率(1.367 09) > 液固比(1.327 68),即提取温度影响最大、液固比值影响最小。

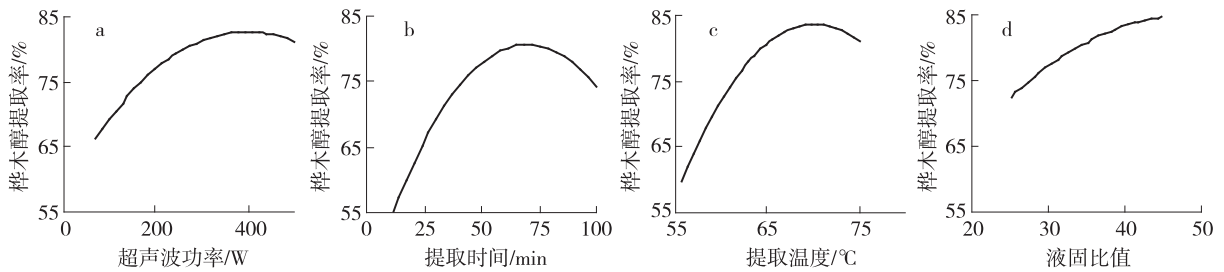


图2 桦木醇提取率与各影响因素的效应分析

Fig. 2 Effects of single factors on betulin yield

为了考察液固比超过40:1后进一步增加对桦木醇提取率的影响,选择液固比为40:1、41:1、42:1、43:1、44:1、45:1,超声波功率400 W,提取时间70 min,提取温度70 °C,进行桦木醇提取,重复3次,取平均值。实验结果表明,随着液固比的增加桦木醇提取率小幅增加,但当液固比大于41:1时,提取物中桦木醇的含量却开始降低。考虑到提取成本和桦木醇的纯度,选定桦木醇最优提取条件为超声波功率400 W、提取时间70 min、提取温度70 °C、液固比为40:1 (mL:g)。按此条件提取桦木醇,平均提取率可达到83.43%,纯度达到71.20% (见图3)。

2.2 原料预处理的效果

准确称取一定质量白桦树皮粉末,原料分别经预处理或直接按超声波辅助提取的最优条件提取桦木醇,试验重复3次,取平均值(见表2)。

白桦树皮中含有一定的酚酸类、多糖类、软木脂类物质,这些物质也可以溶于乙醇,以乙醇为溶剂提取桦木醇时,会引入大量的杂质,导致提取物中桦木醇的纯度降低。由于这些物质可溶于热稀碱中^[15],因此设计选择碱水溶液进行预处理。对比原料经预处理和不经预处理的结果可见,用5%的碳酸钠水溶液对原料进行预处理,提取物的得率减少约16%,但桦木醇的纯度远高于未经预处理的(分别为47.44% ± 1.01%和71.20% ± 0.74%),桦木醇的最终提取率二者无显著差异,可见预处理中减少的主要是非桦木醇物质,该预处理方法能减少一些酸性杂质对桦木醇提取的干扰。

2.3 不同提取方法的比较

以均匀设计试验优选出的最佳工艺条件为实验组,以超临界CO₂萃取法^[16]、回流提取法(95%乙醇为溶剂、液固比40:1、回流时间6 h)为对照组进行实验,结果见表2。从桦木醇的提取率看,超声波辅助提取法优于回流提取法和超临界CO₂萃取法。从所得样品中桦木醇纯度看,超声波辅助提取法略低于超临界CO₂萃取法。可见,与回流提取法、超临界CO₂萃取法相比,超声波辅助提取法不仅提取时间短,而且提取率高,具有一定的应用前景。

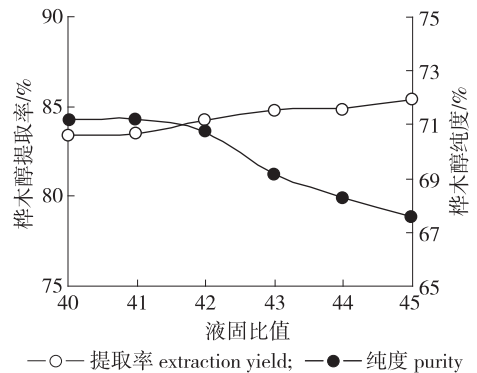


图3 液固比值对桦木醇提取率和纯度的影响

Fig. 3 Effects of liquid-to-solid ratio on yield and purity of betulin

表2 不同提取法的比较

Table 2 Comparison on different extraction methods

方法 methods	提取物得率/% extract yield	桦木醇纯度/% betulin purity	桦木醇提取率/% betulin yield
超声波辅助提取 supersound-assisted extraction	不经预处理 non-pretreated	46.33 ± 0.79	47.44 ± 1.01
	经预处理 pretreated	29.69 ± 0.68	71.20 ± 0.74
回流提取 reflux extraction	不经预处理 non-pretreated	47.75 ± 0.72	40.21 ± 1.37
	经预处理 pretreated	32.22 ± 0.64	58.98 ± 0.87
超临界 CO ₂ 萃取 supercritical CO ₂ extraction		20.62 ± 2.00	74.54 ± 0.49
			60.66 ± 6.31

3 结论

运用均匀设计法优化了桦木醇的超声波辅助提取工艺,确定了桦木醇的超声波辅助提取的最佳工艺条件:超声波功率 400 W,提取时间 70 min,提取温度 70 ℃,液固比 40:1(mL:g)。利用此条件提取桦木醇,提取率达到 83.43% ± 1.89%,纯度达到 71.20% ± 0.74%。与传统回流提取法相比,超声波辅助提取法提取时间短、提取率高、选择性好,具有一定的应用前景。用 5% 的碳酸钠水溶液对原料进行预处理,可减少酸性杂质对桦木醇提取的干扰。

参考文献:

- [1] 郑万钧. 中国树木志[M]. 北京:中国林业出版社,1998:2024-2026.
- [2] 苏位和,庞煜. 对桦树资源充分利用的探讨[J]. 林业月报,1997(5):18.
- [3] 李薇,李岩,金雄杰. 白桦三萜类物质的抗肿瘤作用及其对免疫功能的增强效应[J]. 中国免疫学杂志,2000,16(9):485-487.
- [4] PATOČKA J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification[J]. Journal of Applied Biomedicine,2003,12(1):9-12.
- [5] RENE C, KIANGA S, RENATE S. A practical synthesis of betulinic acid[J]. Tetrahedron Letters,2006,47:8769-8770.
- [6] DOMINIC T, CHARLES G, JEAN L, et al. Synthesis and structure-activity relationship study of cytotoxic germanicane and lupane-type 3β-O-monodesmosidic saponins starting from betulin[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry,2007,15:6144-6157.
- [7] PIOTR C, ZBIGNIEW P, JANA S, et al. Synthesis of lupane-type saponins bearing mannosyl and 3,6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents[J]. Carbohydrate Research,2008,343:995-1003.
- [8] 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,1999:53-54.
- [9] 韩世岩,方桂珍,李珊珊,等. 四氢呋喃-苯混合溶剂法分离纯化桦木醇[J]. 林产化学与工业,2005,25(增刊):129-132.
- [10] 王石发,张明光,李艳苹. 桦木醇提取及纯化工艺的研究[J]. 林产化学与工业,2007,27(6):22-26.
- [11] 王秋芬,宋湛谦,赵淑英,等. 超声波用于强化有机溶剂提取印楝素[J]. 林产化学与工业,2004,24(1):25-28.
- [12] 邓红,仇农学,孙俊,等. 超声波辅助提取文冠果籽油的工艺条件优化[J]. 农业工程学报,2007,23(11):249-254.
- [13] 周泉城,申德超,区颖刚. 超声波辅助提取经膨化大豆粕中低聚糖工艺[J]. 农业工程学报,2008,24(5):245-249.
- [14] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京:科学出版社,1994:151.
- [15] 崔艳霞,郑志方. 白桦皮化学组成的研究[J]. 东北林业大学学报,1994,22(4):53-54.
- [16] 丁为民,王洋,阎秀峰,等. 均匀设计法优化桦木醇的超临界二氧化碳萃取工艺[J]. 林产化学与工业,2007,27(3):63-66.