

杜衡挥发油的超声波协同 微波辅助提取及其 GC/MS 分析

商学兵, 王乃馨

(徐州工程学院食品工程学院, 徐州 221008)

摘要: 在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 设计对杜衡挥发油超声波协同微波提取工艺中的液料比、微波功率和微波时间 3 因素的最优化组合进行了定量研究, 建立并分析了各因素与得率关系的数学模型。结果表明: 最佳的工艺条件为液料比 10mL/g, 微波功率 234W 和提取时间 131s。经试验验证, 在此条件下得率为 8.29%, 与理论计算值 8.32% 基本一致。说明回归模型能较好地预测杜衡挥发油的提取得率。并采用气相色谱-质谱联用技术对杜衡挥发油成分进行了分离鉴定, 分离出 30 种成分, 确认了其中 21 种, 采用峰面积归一化法确定了各成分的相对含量。

关键词: 超声波协同微波提取; 杜衡; 挥发油; 响应曲面法; GC/MS

中图分类号: TS202.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-2513(2011)02-xx-xx-06

Ultrasonic-microwave synergistic extraction and GC/MS analysis of volatile oil from *Asarum forbesii* Maxim

SHANG Xue-bing WANG Nai-xin

(College of Food Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008)

Abstract The influences of solvent to material ratio, microwave power and extraction time on the extraction yield of volatile oil from *Asarum forbesii* Maxim with the ultrasonic-microwave synergistic extraction (UMSE) technique were studied. Box-Behnken experimental design was based on the single factor experiments. One mathematical model established and analyzed by response surface methodology (RSM) was adequate to describe the relationships between the studied factors and the response of volatile oil extraction yield. Based on the canonical analysis, the optimum extraction conditions were obtained as follows: solvent to material ratio 10mL/g, microwave power 234W and extraction time 131s. Under the optimized extraction conditions, the extraction yield is 8.29%, which is close to the estimated value 8.32% attained by using regression model. This model can well predict the experiment results. Then the chemical components of the volatile oil were examined by GC-MS. Finally 30 kinds of compounds were separated, 21 kinds of compounds were identified, and the relative contents of these components were determined by peak area normalization method.

Key words ultrasonic-microwave synergistic extraction; *Asarum forbesii* Maxim; volatile oil; response surface methodology; GC/MS

收稿日期: 2010-11-10

基金项目: 徐州工程学院青年项目 (XKY2009121)。

作者简介: 商学兵 (1963-), 男, 学士, 经济师, 中国烹饪大师, 研究方向为食用资源利用及烹饪加工。

杜衡 (Asarum forbesii Maxim.) 为马兜铃科细辛属植物杜衡的根茎及草或全草, 又名马辛、南细辛、马蹄香、马蹄细辛, 为多年生草本植物, 产于江苏、安徽、浙江、江西、河南南部、湖北及四川东部。本品全草入药, 具有驱风逐寒、消痰引水、活血平喘、定痛等作用^[1]。杜衡主要有效成分为挥发油, 其常用提取方法有水蒸气蒸馏法、热回流提取等, 但都存在提取时间长等缺点。而超声波协同微波提取作为一种优良的提取方法, 具有操作简便快捷、提取时间短及提出率高等特点, 目前已广泛应用在生物活性物质的提取方面^[2~4]。但运用微波辅助提取杜衡挥发油的工艺及其成分分析还未见有报道, 因此, 本实验在单因素的基础上运用响应曲面法探索超声波协同微波提取其挥发油的最佳工艺参数, 同时通过 GC/MS 对挥发油成分进行分析, 具有较为重要的生产应用指导意义。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

杜衡, 安徽亳州市三义堂药业有限责任公司; 石油醚 (30~60℃)、乙醚、正己烷、乙酸乙酯和无水 Na₂SO₄ 皆为分析纯, 水为去离子水。

1.2 仪器与设备

标准检验筛, 浙江上虞华美仪器纱筛厂; 风选中药粉碎机, 山东省青州市精诚机械制造有限公司; FA2104N 电子分析天平, 上海精密科学仪器有限公司; SENCO R201L 旋转蒸发器, 上海申生科技有限公司; CW-2000 型超声-微波协同萃取仪 (超声波频率 40 KHz, 功率 50W; 微波频率 2450MHz, 功率 50~800W, 可微调) 上海新拓分析仪器科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 超声波协同微波提取

杜衡粉碎后过 80 目筛, 精确称取约 5g 置于 100mL 特制三角瓶中, 加入一定体积的提取剂后, 按照试验设计提取一定时间后, 在提取液加入无水 Na₂SO₄ 后过滤, 旋转蒸发后称重。根据 CW-2000 型超声-微波协同萃取仪的特点, 提取时将超声波处于运行状态。

1.3.2 工艺优化设计

1.3.2.1 单因素试验

分别以提取剂种类、液料比、微波功率和提取时间为影响因素考察其对得率的影响。

1.3.2.2 Box-Behnken 试验设计

根据 Box-Behnken 试验设计原理, 在单因素试验的基础上, 选取液料比、微波功率和提取时间 3 个影响因素, 采用 3 因素 3 水平的响应曲面分析方法, 试验因素与水平设计见表 1。共 15 个试验点: 其中 12 个为析因点, 3 个为中心点。

表 1 因素水平表
Table 1 The design table of factors and levels

因素	代码	水 平		
		- 1	0	1
液料比 (mL/g)	x ₁	8	10	12
微波功率 (W)	x ₂	100	200	300
提取时间 (s)	x ₃	90	120	150

设该模型通过最小二乘法拟合的二次多项方程为:

$$EY = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i < j=1}^3 \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon$$

式中, EY 为预测响应值, x_i 和 x_j 为自变量代码值, β₀ 为常数项, β_i 为线性系数, β_{ij} 为交互项系数, β_{ii} 为二次项系数, ε 为随机误差。按照 Box-Behnken 试验设计的统计学要求, 对上述方程的各项回归系数进行回归拟合。

1.3.3 得率的计算

得率 (%) = $\frac{\text{挥发油的质量}}{\text{杜衡的质量}} \times 100$

1.4 分析条件

GC 条件: 色谱柱: HP-5 (30m × 0.25mm × 0.25μm); 进样温度: 260℃; 升温程序为初始温度 60℃ 保持 1min, 程序升温 20℃/min 至 100℃, 10℃/min 升温至 250℃, 20℃/min 升温至 290℃、保持 5min。载气 He 流量为 1.0mL/min, 溶剂延迟时间: 3min, 分流比为 50:1; 进样量为 0.2μL。

MS 条件: EI 离子源, 离子源温度 230℃, 电子能量 70eV, 质量扫描范围 33~500amu, 四级

杆温度 150℃, 接口温度 280℃。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取剂种类的影响

为考察提取剂种类对杜衡挥发油得率的影响, 试验设定液料比 8mL/g 微波功率 200W 和提取时间 90s, 在不同提取剂的条件下对得率进行研究, 结果见图 1。

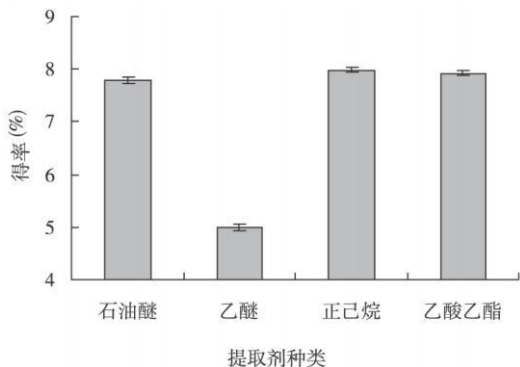


图 1 提取剂种类对得率的影响

Fig 1 Effects of different extractants on extraction yield

作为提取杜衡挥发油的理想溶剂应具有以下特性: 对杜衡挥发油的溶解性好、选择性好, 性质稳定、价格低廉、来源广泛。杜衡挥发油的提取属于固-液萃取过程, 提取效果主要由原料颗粒度和溶剂的性质决定。从图 1 可知, 4种溶剂中得率最高的乙酸乙酯为 7.99%, 同时注意到采用正己烷和乙酸乙酯的得率相差不大, 但乙酸乙酯的价格却是正己烷的 1/2。因此选择乙酸乙酯作为杜衡挥发油的提取剂。

2.1.2 液料比的影响

为考察液料比对杜衡挥发油得率的影响, 试验选择乙酸乙酯作为提取剂, 同时设定微波功率 200W 和提取时间 90s, 在不同液料比的条件下对得率进行研究, 结果见图 2。

由图 2可知, 乙酸乙酯的增加, 更有利于杜衡挥发油的溶出, 这是因为溶剂和原料间的浓度差越大, 其提取效率就越高, 目标物质就越容易溶出, 然而在液料比增加到 10mL/g 之后, 杜衡挥发油得率有下降的趋势, 这是因为当溶剂过大

时, 超声波协同微波的能量对沉滞低层的杜衡颗粒的热效应 (相同时间提供的热量被提取剂吸收的比例增加)、空化效应和机械效应等效应的强度减弱, 影响提取的效果, 同时会造成溶剂和能源的浪费, 并给后序的浓缩工作带来困难。因此选择液料比为 10mL/g 作为后面的试验继续考察。

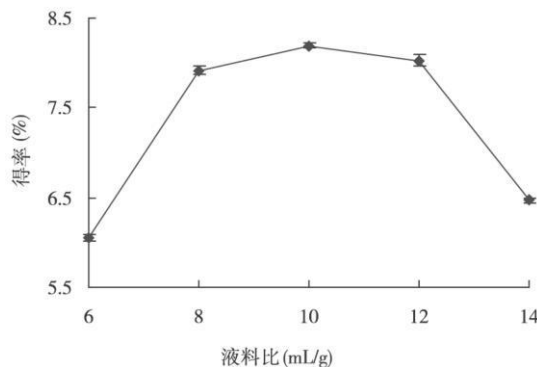


图 2 料液比对得率的影响

Fig 2 Effects of solvent to material ratio on extraction yield

2.1.3 微波功率的影响

为考察微波功率对杜衡挥发油得率的影响, 试验选择乙酸乙酯作为提取剂, 同时设定液料比 10mL/g 和提取时间 90s, 在不同微波功率的条件下对得率进行研究, 结果见图 3。

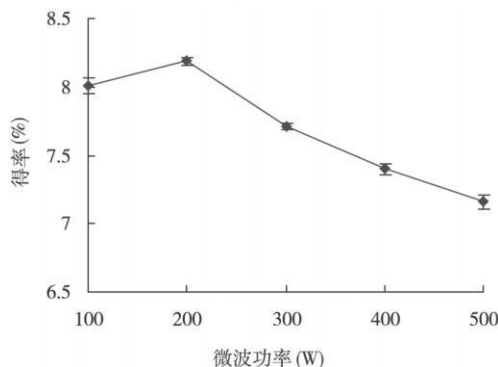


图 3 微波功率对得率的影响

Fig 3 Effects of microwave power on extraction yield

由图 3可知, 随着微波功率的增加, 物质的加热程度也随着增加, 使杜衡挥发油能够容易被提取出来, 即得率增加; 在微波功率达到 200W 之后, 杜衡挥发油得率有减少趋势, 这可

能是由于较长时间的超声波空化效应和高微波功率导致的热效应导致杜衡挥发油分解或挥发所致^[5]。因此选择 200W 作为后面的试验继续考察。

2.1.4 提取时间的影响

为考察微波时间对杜衡挥发油得率的影响，试验选择乙酸乙酯作为提取剂，同时设定液料比 10mL/g 和微波功率 200W，在不同微波功率的条件下对得率进行研究，结果见图 4

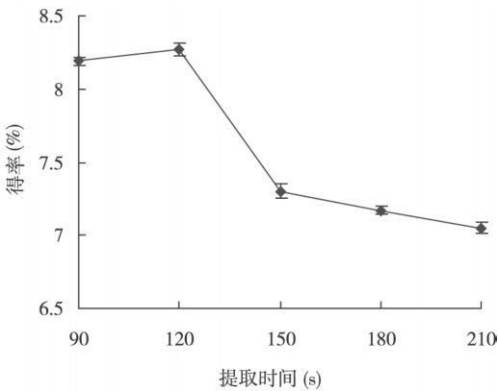


图 4 提取时间对得率的影响

Fig 4 Effects of extraction time on extraction yield

由图 4 可知，在提取时间为 120s 之前，杜衡挥发油不能充分的转移到溶液中，随着提取时间的增加，杜衡挥发油的含量增加，在 120s 时达到峰值，之后，继续增加时间，杜衡挥发油得率有所下降，这可能是因为随着提取时间的增加，温度急剧升高，导致杜衡挥发油分解或挥发所致^[5]。因此 120s 为最佳提取时间。

2.2 Box- Behnken 试验

2.2.1 模型的建立及其显著性检验

利用 Design expert V7.0.0 统计软件通过逐步回归对表 2 试验数据进行回归拟合，得到杜衡挥发油得率对以上三个因素的二次多项回归模型为：

$$EY(\%) = -9.14 + 1.106x_1 + 0.0287x_2 + 0.1334x_3 - 6 \times 10^{-4}x_1x_2 - 3.75 \times 10^{-4}x_1x_3 - 1.417 \times 10^{-5}x_2x_3 - 0.0471x_{12} - 4.483 \times 10^{-5}x_{22} - 4.843 \times 10^{-4}x_{32}$$

对该模型进行方差分析，结果见表 3

表 2 Box- Behnken 试验结果

Table 2 The experiment results of Box- Behnken

Na	液料比 (mL/g)	微波功率 (W)	提取时间 (s)	得率 (%)
1	8	100	120	7.10
2	12	100	120	7.31
3	8	300	120	8.07
4	12	300	120	7.80
5	8	200	90	7.12
6	12	200	90	7.19
7	8	200	150	8.02
8	12	200	150	8.00
9	10	100	90	6.82
10	10	300	90	7.41
11	10	100	150	7.32
12	10	300	150	7.74
13	10	200	120	8.15
14	10	200	120	8.21
15	10	200	120	8.26

由该模型的方差分析表 3 可见：模型具有高度的显著性 ($p < 0.01$)，失拟项 ($p > 0.05$) 不显著以及 $R^{2Adj} = 0.8852$ 和 S/N (信噪比) 为 11.809 远大于 4 可知回归方程拟合度和可信度均很高，实验误差较小，故可用此模型对超声波协同微波提取杜衡挥发油的工艺结果进行分析和预测。又由表 3 中 p 可知：模型的一次项 x_2 和 x_3 ($p < 0.05$) 都极显著、 x_1 不显著；交互项都不显著；二次项 x_{22} 和 x_{32} ($p < 0.05$) 都极显著， x_{12} 不显著；表明各影响因素对杜衡挥发油得率的影响不是简单的线性关系。为进一步确定最佳提取工艺参数，对所得方程进行逐步回归，删除不显著项，然后求一阶偏导，并令其为 0 可得最佳工艺参数为液料比 10mL/g 微波功率 234W 和提取时间 131s，此时得率为 8.32%。

表 3 响应曲面二次回归方程模型方差分析结果

Table 3 ANOVA results of quadratic regression model for response surface

变异来源	SS	df	M S	F值	p	
模型	3. 03	9	0. 34	13. 00	0. 0057	* *
x_1	$1. 25 \times 10^{-5}$	1	$1. 25 \times 10^{-5}$	$4. 82 \times 10^{-4}$	0. 9833	
x_2	0. 76	1	0. 76	29. 40	0. 0029	* *
x_3	0. 81	1	0. 81	31. 09	0. 0026	* *
$x_1 x_2$	0. 058	1	0. 058	2. 22	0. 1964	
$x_2 x_3$	$2. 025 \times 10^{-3}$	1	$2. 025 \times 10^{-3}$	0. 078	0. 7911	
$x_1 x_3$	$7. 225 \times 10^{-3}$	1	$7. 225 \times 10^{-3}$	0. 28	0. 6202	
x_1^2	0. 13	1	0. 13	5. 05	0. 0746	
x_2^2	0. 74	1	0. 74	28. 61	0. 0031	* *
x_3^2	0. 70	1	0. 70	27. 04	0. 0035	* *
残差	0. 13	5	0. 026			
失拟项	0. 12	3	0. 041	13. 59	0. 0693	
误差项	$6. 067 \times 10^{-3}$	2	$3. 033 \times 10^{-3}$			
总和	3. 16	14				
$R^2 = 0. 9590$			$R_{adj}^2 = 0. 8852$		$S/N = 11. 809$	

注：* * 表示极显著，即 0. 01水平显著

2. 2. 2 验证实验

为检验 Box – Behnken试验设计所得结果的可靠性，采用上述优化出的工艺参数提取 3 次，实际测得的平均得率为 8. 29%，与理论预测值相比，其相对误差约为 0. 36%。因此，基于 Box – Behnken 试验设计所得的最佳工艺参数准确可靠，具有实用价值。

2. 3 杜衡挥发油化学成分的 GC/MS 分析

取最佳提取工艺参数下的杜衡挥发油适量按上述 GC/MS 分析条件，通过气质联用仪对杜衡挥发油化学成分进行分析，各分离组分利用计算机谱库（NIST05）进行检索和有关文献进行人工谱图解析，采用色谱峰面积归一化法进行相对定量^[6-8]。从杜衡挥发油中共分离出 30 个峰，确定了其中的 21 种化合物，所鉴定成分占总挥发油的 93. 97%，经气相色谱面积归一化法测定了各组分的相对百分含量，分析鉴定结果见表 4。相对含量在 1% 以上的有 12 种化合物，含量占总化合物

的 88. 43%，其中含量最高的是甲基丁香酚，占 31. 80%；其次是橄榄香素，占 22. 08%；居第三位的是细辛脂素，占 12. 87%。

3 结论

（1）在单因素试验的基础上建立了一个以杜衡挥发油提取得率为目标值，以液料比、微波功率和提取时间为因素的数学模型，方差分析表明拟合较好。通过对回归方程优化计算，得到超声波协同微波提取的最佳工艺条件为液料比 10mL/g 微波功率 234W 和提取时间 131s。对所建立的数学模型进行了试验验证。在最优条件下，得到的提取得率为 8. 29%，与理论值 8. 32% 基本一致。

（2）从杜衡挥发油中共分离出 30 个峰，确定了其中的 21 种化合物，所鉴定成分占总挥发油的 93. 97%，经气相色谱面积归一化法测定了各组分的相对百分含量，其中含量最高的是甲基丁香酚，占 31. 80%；其次是橄榄香素，占 22. 08%；

居第三位的是细辛脂素，占 12.87%。

表 4 杜衡挥发油化学成分的分析结果

Table 4 Analytical results of main components of volatile oil from *Asarum forbesii* Maxim.

保留时间 (min)		化合物名称	分子式	相对含量 (%)
1	5.675	2,6,6-三甲基-2,4-环庚二烯-1-酮	C ₁₀ H ₁₄ O	0.29
2	5.847	L-龙脑	C ₁₀ H ₁₈ O	0.44
3	7.689	2-叔丁基对甲苯酚	C ₁₁ H ₁₆ O	2.32
4	8.639	甲基丁香酚	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	31.80
5	8.736	3,4,5-三甲氧基甲苯	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	0.90
6	9.273	(Z)-β-金合欢烯	C ₁₅ H ₂₄	0.62
7	9.751	十五烷	C ₁₅ H ₃₂	1.10
8	9.810	肉豆蔻醚	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	2.57
9	10.438	茴香素	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	22.08
10	11.023	4-烯丙基-2,6-二甲氧基苯酚	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	1.09
11	11.131	芥子酸	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	0.48
12	11.297	2-氰基-3-(2-噻吩基)-丙烯硫羧胺	C ₈ H ₆ N ₂ S ₂	9.98
13	11.861	β-细辛脑	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	0.78
14	13.521	[2,7] 萘啶-1,3,6,8-四醇	C ₁₂ H ₁₆ O ₄ N ₂	0.47
15	14.723	3-甲氧基-4-三甲基硅氧基-苯甲醚	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O	0.32
16	14.793	邻苯二甲酸二异丁酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	1.22
17	16.882	(E,E)-2,4-癸二烯醛	C ₁₀ H ₁₆ O	1.36
18	19.836	卡巴胆碱	C ₆ H ₁₅ N ₂ O ₂	1.25
19	20.496	1-二甲基(苯基)甲硅烷基氧戊烷	C ₁₃ H ₂₆ OSi	1.26
20	22.247	二乙基双(三甲基硅烷基)硅酯	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃	0.77
21	23.911	细辛脂素	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	12.87

参考文献:

[1] 吴贻谷. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 1034.

[2] Zhang L F, Liu Z L. Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2008, 15: 731-737.

[3] 汪河滨, 郭志愿, 赵小亮, 等. 超声-微波协同萃取灰叶胡杨花粉中总黄酮的工艺研究 [J]. 食品科学, 2009, 30 (2): 61-64.

[4] 马利华, 秦卫东, 戴晓娟. 超声波-微波协同提取牛蒡中类胡萝卜素 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28 (1): 81-85.

[5] 蔡友华, 范文霞, 刘学铭. 超声-微波协同萃取巴西虫草菌丝体中甘露醇的研究 [J]. 江西农业大学学报, 2008, 30 (4): 348-354.

[6] 陈健, 潘艺, 林庆生. CO₂超临界流体萃取法提取杜衡挥发油化学成分的分析 [J]. 中国药房, 2007, 18 (36): 2841-2843.

[7] 潘炯光, 徐植灵, 王光辉, 等. 中国细辛属植物挥发油的气相色谱-质谱分析汉城细辛、杜衡、灯笼细辛、鼎湖细辛和花叶尾花细辛 [J]. 中药通报, 1984, 9 (4): 31-33.

[8] 张峰, 徐青, 付绍平, 等. 杜衡挥发油的化学成分研究 [J]. 中草药, 2004, 35 (11): 1215-1217.