

正交试验优选南山茶花中总黄酮的提取工艺^Δ

尚志春*,王宝昌,张微微,彭倩,唐玲,王永奇,史丽颖[#](大连大学药物研究所,辽宁大连 116622)

中图分类号 R284.2;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2526-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.11

摘要 目的:优选南山茶花中总黄酮的提取工艺。方法:采用乙醇-水提取法从南山茶花中提取总黄酮,在单因素试验基础上,选取乙醇体积分数、提取时间、提取温度、料液比为考察因素,以总黄酮收率为评价指标,采用正交试验优选工艺。结果:总黄酮的最佳提取工艺为用20倍量的85%乙醇,95℃下提取2次,每次3h。在此条件下,总黄酮收率为1.52%。结论:优选的提取工艺合理、可行,可用于南山茶花中总黄酮的提取。

关键词 南山茶花;总黄酮;提取工艺;正交试验

Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoids from the Flowers of *Camellia semiserrata* by Orthogonal Test

SHANG Zhi-chun, WANG Bao-chang, ZHANG Wei-wei, PENG Qian, TANG Ling, WANG Yong-qi, SHI Li-ying (Institute of Materia Medica of Dalian University, Liaoning Dalian 116622, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology for total flavonoids from the flowers of *Camellia semiserrata*. METHODS: The total flavonoids were extracted from the flowers with EtOH-H₂O. The extraction technology was optimized by orthogonal test with ethanol concentration, extraction time, extraction temperature and ratio of material to liquid as factor using yield of total flavonoids as index. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows: 20-fold 85% ethanol, extracting 2 times at 95℃ for 3 hours. By this technology, the yield of total flavonoids was 1.52%. CONCLUSIONS: Optimized technology was reasonable and feasible, which can be applied for the extraction of total flavonoids from the flowers of *C. semiserrata*.

KEY WORDS *Camellia semiserrata*; Total flavonoids; Extraction technology; Orthogonal test

南山茶为山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia*)植物,分布于广西东南部至广东西南部海拔250~500m的山地,资源丰富^[1]。笔者前期的实验研究表明,南山茶种子中的黄酮类化合物为抗骨质疏松的有效成分^[2],因此本研究在单因素试验的基础上,以南山茶中总黄酮收率为指标,利用正交试验优选总黄酮的提取工艺。

1 材料

1.1 仪器

Unico720可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]; Laborata4000旋转蒸发仪(德国Heidolph公司);BP210S十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);HH24水浴锅(常州国华电器有限公司);DZF26021真空干燥箱(上海精宏实验设备

Drug Dev Ind Pharm, 1999, 25(5):685.

- [3] Alur HH, Beal JD, Pather SI, et al. Evaluation of a novel, natural oligosaccharide gum as a sustained and mucoadhesive component of calcitonin buccal tablets[J]. *J Pharm Sci*, 1999, 88(12):1313.
- [4] 周寅琦,张文玉,周翔.替硝唑口腔黏附片的生物黏附性和体外释药研究[J]. *中国药科大学学报*, 2001, 32(2):102.
- [5] 丁劲松,蒋学华,程泽能.萘哌地尔生物黏附性缓释胶囊处方及体外黏附力测定[J]. *中国医药工业杂志*, 2003, 34

- (9):448.
- [6] 史中,侯惠民.重组人表皮生长因子生物黏附剂的体外黏附力评价[J]. *中国医药工业杂志*, 2000, 31(2):82.
- [7] 陆伟跃,潘俊,刘敏.阿昔洛韦生物黏附微球的动物胃黏膜表面黏附能力和体外释放效果[J]. *中国药学杂志*, 2000, 35(5):313.
- [8] 王健,毕殿洲.生物黏附材料的研究进展[J]. *沈阳药科大学学报*, 2002, 19(5):373.
- [9] 芦金清,张亚东.白及胶的实验研究[J]. *中成药*, 1996, 18(12):2.
- [10] 高俊德.白及成分葡聚糖的研究[J]. *中药通报*, 1982, 7(5):30.
- [11] 葛勤,刘同华,黄林清,等.中药白及作为血管栓塞剂及药物载体的研究概况[J]. *中国药房*, 2003, 14(5):305.

(收稿日期:2012-08-06 修回日期:2013-01-06)

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30772714)

* 硕士研究生。研究方向:天然活性物质。E-mail: shang8102016@163.com

[#] 通信作者:副教授,博士。研究方向:天然活性物质。E-mail: shiliying@dlu.edu.cn

有限公司);SHZ2D循环水真空泵(巩义市英峪生化仪器厂)。

1.2 药材

南山茶花于2010年3月采集于广西平南县六陈镇,经中国科学院昆明植物研究所裴盛基教授鉴定为南山茶花,标本存放于大连大学生物工程学院标本室(标本号:2010031503)。

1.3 试剂

芦丁对照品(东京化成工业株式会社,纯度:98%);水为蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量的测定^[8]

2.1.1 最大吸收波长的确定 准确称取芦丁对照品10 mg,以甲醇溶解并定容于100 ml量瓶中,制成芦丁对照品溶液。量取该溶液0.5 ml于试管内,加甲醇至4.0 ml,再加入0.3 ml 5% NaNO₂溶液,摇匀,室温放置6 min,再加10% AlCl₃溶液0.3 ml,摇匀,室温放置10 min,显色完毕。显色后立刻通过可见分光光度计,在不同的检测波长下测定其吸光度。结果发现,在400 nm波长处,芦丁对照品溶液有最大吸收。

2.1.2 标准曲线的制备^[4] 精确吸取芦丁对照品溶液0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 ml,分别置于试管内,各加甲醇至4.0 ml,加入0.3 ml 5% NaNO₂溶液,摇匀,室温放置6 min,再加0.3 ml 10% AlCl₃溶液,摇匀,室温放置10 min,在400 nm波长处测定吸光度(A),以空白试剂作参比。以A为纵坐标,芦丁质量浓度(c)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $A=21.044c-0.0474$ ($r=0.9994, n=6$)。结果表明,芦丁的质量浓度在0.0043~0.0348 mg/ml范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.1.3 样品溶液中总黄酮含量的测定 准确称取10.0 g南山茶花,粉碎,置500 ml圆底烧瓶中,按试验设置的条件下提取,在旋转蒸发器上浓缩成膏状后于60℃真空干燥箱中干燥至恒质量。准确称取干燥粉末20 mg,用甲醇溶解并定容至10 ml量瓶中,准确吸取一定量的溶液,置于具塞试管中,照“2.1.2”项下自“加甲醇至4.0 ml”起同法操作,测定A。代入回归方程中计算总黄酮的含量,并按下式计算总黄酮的收率:总黄酮收率(%)=提取液中总黄酮质量/南山茶花质量×100%。

2.2 单因素试验^[9]

2.2.1 料液比对总黄酮收率的影响 准确称取干燥后的南山茶花10 g,置于干净的500 ml圆底烧瓶中。在恒定浸提时间2 h、浸提温度80℃、浸提3次的条件下,加入95%乙醇100、150、200、250 ml进行提取,回收溶剂。取续滤液适量,按“2.1”项下方法测定总黄酮含量,并计算总黄酮收率。结果,随着提取溶剂的用量增加,总黄酮收率呈现先增加后降低再增加的趋势,当料液比为1:15(g/ml)时,总黄酮收率最高,故选定料液比为1:15(g/ml)。料液比对总黄酮收率的影响见图1。

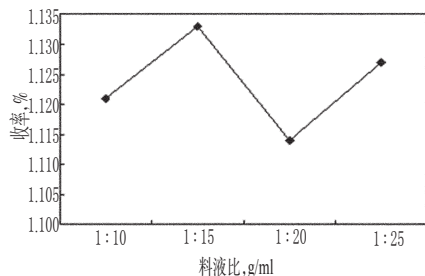


图1 料液比对总黄酮收率的影响

Fig 1 Effects of ratio of material to liquid on the yield of total flavonoids

2.2.2 乙醇体积分数对总黄酮收率的影响 准确称取干燥后的南山茶花10 g,置于干净的500 ml圆底烧瓶中。在恒定浸提时间2 h、浸提温度85℃、提取3次、料液比1:15的条件下,分别用75%、80%、85%、90%的乙醇进行提取,回收溶剂。取续滤液适量,按“2.1”项下方法测定总黄酮含量,并计算总黄酮收率。结果,总黄酮收率随着乙醇体积分数的增加呈现先降低后增加的趋势,当使用85%乙醇时,总黄酮收率达到最大值,故选取85%乙醇为提取溶剂。乙醇体积分数对总黄酮收率的影响见图2。

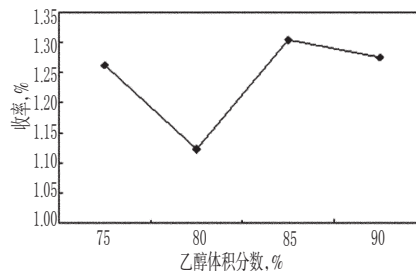


图2 乙醇体积分数对总黄酮收率的影响

Fig 2 Effects of ethanol concentration on the yield of total flavonoids

2.2.3 提取温度对总黄酮收率的影响 准确称取干燥后的南山茶花10 g,置于干净的500 ml圆底烧瓶中。在恒定提取时间2 h、提取3次、固液比1:15、提取溶剂为85%乙醇的条件下,分别于75、80、85、90、95℃进行提取,回收溶剂。取续滤液适量,按“2.1”项下方法测定总黄酮含量,并计算总黄酮收率。结果,总黄酮收率随提取温度的升高而增加,温度高于90℃后,总黄酮收率趋于平稳且有下降趋势,故选取提取温度为90℃。提取温度对总黄酮收率的影响见图3。

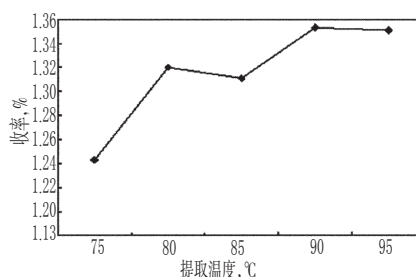


图3 提取温度对总黄酮收率的影响

Fig 3 Effects of extracting temperature on the yield of total flavonoids

2.2.4 提取时间对总黄酮收率的影响 准确称取干燥后的南山茶花10 g,置于干净的500 ml圆底烧瓶中。在恒定浸提温度90℃、提取3次、料液比1:15、提取溶剂为85%乙醇的条件下,分别提取1.5、2.0、2.5、3.0 h,回收溶剂。取续滤液适量,按“2.1”项下方法测定总黄酮含量,并计算总黄酮收率。结果,随着提取时间的延长,总黄酮收率呈现先增加后降低的趋势,当提取时间为2.5 h时,总黄酮收率达到最大值,故选取提取时间为2.5 h。提取时间对总黄酮收率的影响见图4。

2.2.5 提取次数对总黄酮收率的影响 准确称取干燥后的南山茶花10 g,置于干净的500 ml圆底烧瓶中。在恒定浸提时间2.5 h、浸提温度90℃、料液比1:15、提取溶剂为85%乙醇的条件下,分别提取1、2、3、4次,回收溶剂。取续滤液适量,按“2.1”项下方法测定总黄酮含量,并计算总黄酮收率。结果,随

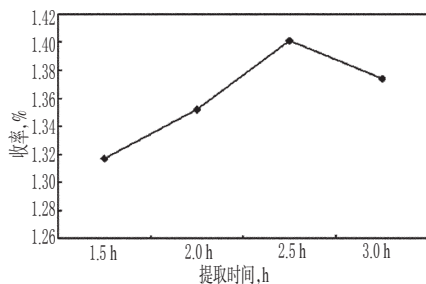


图4 提取时间对总黄酮收率的影响

Fig 4 Effects of extracting time on the yield of total flavonoids

随着提取次数的增加,总黄酮收率逐渐增加,但提取2次后,增加的趋势渐缓。因为增加提取次数会增加能耗,且2次提取可以基本将南山茶花中的总黄酮提取完全,故选择提取次数为2次。提取次数对总黄酮收率的影响见图5。

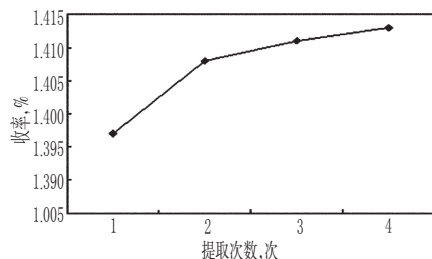


图5 提取次数对总黄酮收率的影响

Fig 5 Effects of extracting times on the yield of total flavonoids

2.3 正交试验优选提取工艺^[6]

在单因素试验基础上,根据笔者经验,选取乙醇体积分数(A)、提取时间(B)、提取温度(C)、料液比(D)为考察因素,每个因素选取3个水平,以总黄酮收率为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验表优选提取工艺。因素与水平见表1;正交试验结果见表2;方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factor and level

水平	因素			
	A, %	B, h	C, °C	D, g/ml
1	80	2.0	85	1:10
2	85	2.5	90	1:15
3	90	3.0	95	1:20

由表2、表3可知,各因素对工艺的影响程度依次为 $A > B > C > D$,即乙醇体积分数 $>$ 提取时间 $>$ 提取温度 $>$ 料液比。最佳提取工艺为 $A_2B_3C_3D_3$,即用20倍量的85%乙醇,95 °C下提取2次,每次3 h。

2.4 工艺验证试验

取南山茶花适量,按“2.3”项下优选的工艺对总黄酮进行提取,平行提取3份,并按“2.1”项下方法测定总黄酮含量,计算总黄酮收率。结果,南山茶花总黄酮的平均收率为1.52%, $RSD=3.16\%$ ($n=3$),与正交试验结果最高值相当,表明优选

表2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	总黄酮收率, %
1	1	1	1	1	1.31
2	1	2	2	2	1.33
3	1	3	3	3	1.51
4	2	1	2	3	1.45
5	2	2	3	1	1.41
6	2	3	1	2	1.49
7	3	1	3	2	1.38
8	3	2	1	3	1.26
9	3	3	2	1	1.29
K_1	4.15	4.14	4.06	4.01	
K_2	4.35	4.00	4.07	4.20	
K_3	3.93	4.29	4.30	4.22	
k_1	1.38	1.38	1.35	1.34	
k_2	1.45	1.33	1.36	1.40	
k_3	1.31	1.43	1.43	1.41	
R	0.14	0.10	0.08	0.07	

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F	P
A	0.029 4	2	0.014 7	3.27	>0.05
B	0.014 0	2	0.007 0	1.56	>0.05
C	0.012 3	2	0.006 2	1.38	>0.05
D(误差)	0.009 0	2	0.004 5		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

的工艺合理、可行。

3 讨论

在最大吸收波长的确定试验中,显色时取芦丁对照品溶液的量不能太多也不能太少,溶液太浓或太稀都会引起试验误差增大,取0.5 ml较为合适。另外,调节可见分光光度计检测波长时应从小到大,且反复至少3次,取平均值,以减小误差。

参考文献

- [1] 高继银,帕克斯.山茶属植物主要原种彩色图集[M].杭州:浙江科学技术出版社,2005:15.
- [2] 唐玲,冯宝民,史丽颖,等.山茶属植物的抗骨质疏松作用[J].中药材,2008,31(10):1540.
- [3] 史丽颖,周旭东,石海峰,等.葫芦茶根中总多酚提取富集工艺研究[J].时珍国医国药,2010,21(7):1690.
- [4] Walsh GM. Eosinophil-epithelial cell interactions: a special relationship [J]. *Clin Exp Allergy*, 2001, 31(3):351.
- [5] 唐前,罗燕英,唐玲,等.正交试验优选金花茶种子总多酚的最佳提取工艺[J].时珍国医国药,2010,21(4):792.
- [6] 贺红军,邱宗荫.正交试验优选茅莓总皂苷的提取工艺[J].中国药房,2012,23(7):611.

(收稿日期:2012-08-18 修回日期:2012-09-28)