

# 正交试验优选枸骨果实中总黄酮的提取工艺<sup>△</sup>

李艳芝\*,付英杰,于婷(济宁医学院药学院,山东日照 276826)

中图分类号 R284.2;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)03-0238-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.03.15

**摘要** 目的:优选枸骨果实中总黄酮的提取工艺。方法:以提取时间、乙醇体积分数、料液比、提取次数为考察因素,以总黄酮含量为评价指标,采用单因素试验、正交试验优选枸骨果实中总黄酮的提取工艺。结果:最佳提取工艺为用12倍量的75%乙醇,超声提取60 min。结论:该提取工艺简便、快捷,可用于提取枸骨果实中的总黄酮。

**关键词** 枸骨果实;总黄酮;超声提取;正交设计

## Optimization of the Extraction Technology of Total Flavonoids from the Fruits of *Ilex cornuta*

LI Yan-zhi, FU Ying-jie, YU Ting (College of Pharmacy, Jining Medical College, Shandong Rizhao 276826, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of total flavonoids from the fruits of *Ilex cornuta*. METHODS: The extraction technology of the total flavonoids from the fruits of *I. cornuta* was optimized by single test and orthogonal design with extraction time, ethanol concentration, ratio of drug to liquid and extraction times as factors with total flavonoids content as index. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows: 12-folds 75% ethanol, ultrasonic extraction for 60 min. CONCLUSIONS: The extraction method is simple, rapid and applicable for the extraction of total flavonoids from the fruits of *I. cornuta*.  
**KEYWORDS** The fruits of *Ilex cornuta*; Total flavonoids; Ultrasonic extraction; Orthogonal design

枸骨(*Ilex cornuta* Lindl. et Paxt.)为冬青科冬青属植物,主要分布于我国长江中下游地区,其叶为常用中药,始载于《本草拾遗》,2010年版《中国药典》(一部)亦有收载。其具有清热养阴、益肾平肝等功效,用于治疗肺癆咯血、骨蒸潮热、头暈目眩等证<sup>[1]</sup>。枸骨叶为苦丁茶的主要来源之一,含有黄酮类、三萜类化合物,有散风热、清头目、解烦闷、活血脉、抗菌、抗氧化、降血压、降血脂、降血糖的功能,可用于治疗冠心病、心绞痛和高血压,是减肥及预防动脉粥样硬化的良好饮品<sup>[2-4]</sup>。可见,枸骨具有良好的药用价值和经济价值。近年来,枸骨引起了国内、外学者的广泛关注,但主要集中在对叶的研究<sup>[5-8]</sup>,对枸骨果实的研究鲜有报道<sup>[9]</sup>。同一植物的不同部位往往具有相似的化学成分及药理作用,为更好地开发利用枸骨药材资源,并扩大具有抗菌、抗氧化、抗癌、抗病毒等广泛生物活性的黄酮类化合物<sup>[9]</sup>来源,笔者采用正交试验对枸骨果实中总黄酮超声提取工艺进行研究,旨在为开发利用枸骨果实提供参考依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BS224S电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);TU-1901双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);KQ3200B超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司,功率:400 W,频率:40 kHz);RE-52AA旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

### 1.2 药材

枸骨成熟果实,采于济宁医学院日照校区本草园,经济宁

医学院中药学教研室鉴定为冬青科冬青属植物枸骨 *Ilex cornuta* Lindl. et Paxt.的果实,烘干,粉碎,过40目筛,备用。

### 1.3 试剂

芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:F20020428);无水乙醇(分析纯,莱阳经济技术开发区精细化工厂)。

## 2 方法与结果

### 2.1 枸骨果实中总黄酮的提取方法

准确称取枸骨果实粉末50 g,按要求加入一定量的提取溶剂,超声提取一定时间,抽滤,减压回收溶剂,定容于500 ml量瓶中,作为样品溶液。

### 2.2 枸骨果实中总黄酮的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取于105℃干燥至恒质量的芦丁对照品10.7 mg,置100 ml量瓶中,加60%乙醇适量溶解并定容,摇匀,得0.107 mg/ml的对照品溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取“2.1”项下样品溶液1 ml,置25 ml量瓶中,以60%乙醇定容,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 ml,置10 ml量瓶中,分别精密加入5%亚硝酸钠溶液0.1 ml,摇匀,放置6 min,加入10%硝酸铝溶液0.3 ml,摇匀,放置6 min,加入4%氢氧化钠溶液4 ml,加60%乙醇至刻度,摇匀,放置15 min,以第1份为空白,在510 nm波长处测定吸光度(A)。以芦丁对照品质量浓度(c)为横坐标,A为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $A=11.655c+0.0019$ ( $r=0.9995$ )。结果表明,芦丁对照品的质量浓度在5.35~42.80 μg/ml范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.2.4 测定波长的确定 分别取对照品溶液和供试品溶液适

<sup>△</sup> 基金项目:济宁医学院青年基金重点项目(No.JYQ2011KZ003)  
\* 讲师,硕士。研究方向:中药化学成分的提取、分离、结构鉴定及药理活性。电话:0633-32983695。E-mail: yz-li1980@tom.com

量,按“2.2.3”项下方法操作,于200~600 nm波长范围内扫描。结果表明,两者均在510 nm波长处有最大吸收,故选择510 nm为测定波长。

2.2.5 样品含量测定 取“2.2.2”项下供试品溶液适量,按“2.2.3”项下方法操作,在510 nm波长处测定吸光度,根据回归方程计算各样品中总黄酮含量。

2.2.6 精密度试验 量取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.2.3”项下方法操作,测定吸光度,平行测定6次。结果显示,RSD=0.08% (n=6),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 量取“2.2.2”项下供试品溶液适量,按“2.2.3”项下方法操作,分别在0、20、40、60、80、100、120 min测定吸光度。结果显示,RSD=1.10% (n=7),表明供试品溶液在120 min内稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 称取同一批次药材样品适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.3”项下方法操作,测定吸光度。结果显示,RSD=1.87% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 精密吸取已知总黄酮含量的样品溶液适量,共9份,分为3组,分别精密加入低、中、高质量浓度的芦丁对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.3”项下方法操作,测定吸光度,并计算加样回收率。结果显示,平均加样回收率为98.44%,RSD=2.4% (n=9)。

### 2.3 单因素试验

由于乙醇作为提取溶剂具有选择性好、渗透性强、浸出率较高的优点,因此笔者选择一定体积分数的乙醇溶液作为提取溶剂,分别考察了乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数等因素对总黄酮含量的影响。

2.3.1 乙醇体积分数对总黄酮含量的影响 准确称取枸骨果实粉末50 g,共5份,分别加入12倍量的55%、65%、75%、85%、95%的乙醇,超声提取40 min,共提取3次,分别按“2.2”项下方法测定总黄酮含量。结果显示,当加入85%乙醇时,总黄酮含量最高。乙醇体积分数对总黄酮含量的影响见图1。

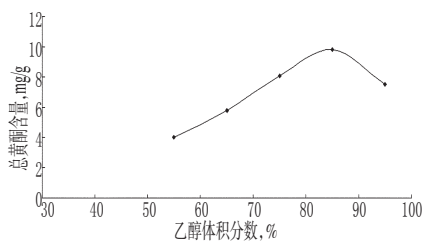


图1 乙醇体积分数对总黄酮含量的影响

Fig 1 The influence of ethanol concentration to total flavonoids content

2.3.2 料液比对总黄酮含量的影响 准确称取枸骨果实粉末50 g,共5份,分别加入4、8、10、12、16倍量85%乙醇,超声提取40 min,共提取3次,分别按“2.2”项下方法测定总黄酮含量。结果显示,加入10倍量的乙醇时,总黄酮含量最高。料液比对总黄酮含量的影响见图2。

2.3.3 提取时间对总黄酮含量的影响 准确称取枸骨果实粉末50 g,共5份,分别加入10倍量的85%乙醇超声提取,共提取3次,提取时间分别为15、25、40、50、60 min,分别按“2.2”项下方法测定总黄酮含量。结果显示,当提取50 min时,总黄酮含量最高。提取时间对总黄酮含量的影响见图3。

2.3.4 提取次数对总黄酮含量的影响 准确称取枸骨果实粉末50 g,共4份,分别加入10倍量的85%乙醇超声提取1、2、3、4次,每次50 min,分别按“2.2”项下方法测定总黄酮含量。结

果显示,提取2次时总黄酮含量最高。提取次数对总黄酮含量的影响见图4。

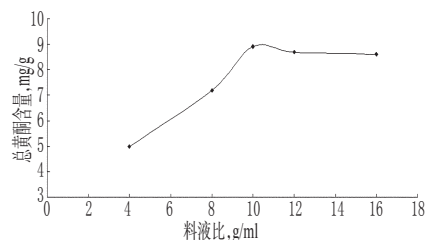


图2 料液比对总黄酮含量的影响

Fig 2 The influence of ratio to drug to liquid of total flavonoids content

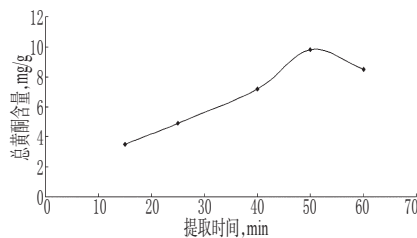


图3 提取时间对总黄酮含量的影响

Fig 3 The influence of extraction time to total flavonoids content

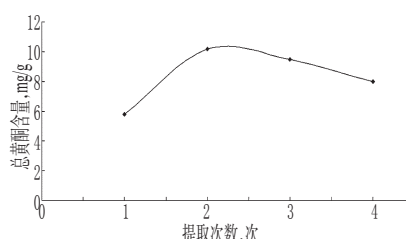


图4 提取次数对总黄酮含量的影响

Fig 4 The influence of extraction times to total flavonoids content

### 2.4 正交试验优选提取工艺

为系统考察超声提取枸骨果实中总黄酮的工艺参数,根据单因素试验结果,选取提取时间(A)、乙醇体积分数(B)、料液比(C)、提取次数(D)为考察因素,以总黄酮含量为评价指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。因素与水平见表1;正交试验结果见表3;方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

| 水平 | 因素     |      |         |      |
|----|--------|------|---------|------|
|    | A, min | B, % | C, g/ml | D, 次 |
| 1  | 40     | 75   | 1:8     | 1    |
| 2  | 50     | 85   | 1:10    | 2    |
| 3  | 60     | 95   | 1:12    | 3    |

由表3、表4可知,各因素影响提取工艺的大小顺序为乙醇体积分数>提取时间>料液比>提取次数,其中乙醇体积分数、提取时间和料液比对提取工艺的影响有统计学意义( $P < 0.05$ )。最佳提取工艺条件为 $A_3B_1C_3D_1$ ,即用12倍量的75%乙醇超声提取60 min。

### 2.5 工艺验证试验

取3批枸骨果实药材各适量,按上述优选的最佳提取工艺进行提取,并测定总黄酮含量。结果显示,3批药材每1 g中含总黄酮分别为10.88、10.72、10.90 mg,平均每1 g药材中含总黄

# 正交试验优选四叶参中四叶参皂苷的提取工艺

张 朦\*, 史彩云, 宋学硕, 黄亦琼, 李萌萌, 武 佳<sup>#</sup>(首都医科大学燕京医学院, 北京 101300)

中图分类号 R284.2;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)03-0240-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.03.16

**摘要** 目的: 优选四叶参中四叶参皂苷的提取工艺。方法: 采用单因素试验考察提取溶剂、提取时间、溶剂用量对四叶参皂苷溶出的影响; 以溶剂用量、提取次数、提取时间为考察因素, 以四叶参皂苷提取率为评价指标, 采用正交试验优选提取工艺。结果: 最佳提取工艺为加30倍量的甲醇, 超声提取3次, 每次40 min。结论: 所选工艺合理、可行, 可用于四叶参中四叶参皂苷的提取。

**关键词** 四叶参; 四叶参皂苷; 提取工艺

## Optimization of the Extraction Technology of Codonoposide in *Codonopsis lanceolata* by Orthogonal Test

ZHANG Meng, SHI Cai-yun, SONG Xue-shuo, HUANG Yi-qiong, LI Meng-meng, WU Jia (Yanjing Medical College, Capital Medical University, Beijing 101300, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of codonoposide in *Codonopsis lanceolata*. METHODS: The effects of extraction solvent, extraction time and the amount of solvent on the dissolution of *C. lanceolata* were investigated by single factor test; the extraction technology of *C. lanceolata* was optimized by orthogonal test with the amount of solvent, extraction times and extraction time as factors using the yield of codonoposide as index. RESULTS: The optimum extraction process was methanol reflux extraction as follows: 30 folds ethanol, extracting for 3 times, 40 min each time. CONCLUSIONS: The technology is reasonable and feasible, which is suitable for the extraction of codonoposide in *C. lanceolata*.

**KEYWORDS** *Codonopsis lanceolata*; Codonoposide; Extraction technology

表2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal test

| 试验号   | A, min | B, %  | C, g/ml | D, 次  | 总黄酮含量, mg/g |
|-------|--------|-------|---------|-------|-------------|
| 1     | 1      | 1     | 1       | 1     | 7.2         |
| 2     | 1      | 2     | 2       | 2     | 4.4         |
| 3     | 1      | 3     | 3       | 3     | 6.8         |
| 4     | 2      | 1     | 2       | 3     | 6.2         |
| 5     | 2      | 2     | 3       | 1     | 5.5         |
| 6     | 2      | 3     | 1       | 2     | 4.2         |
| 7     | 3      | 1     | 3       | 2     | 10.6        |
| 8     | 3      | 2     | 1       | 3     | 5.4         |
| 9     | 3      | 3     | 2       | 1     | 6.5         |
| $K_1$ | 6.133  | 8.000 | 5.600   | 6.400 |             |
| $K_2$ | 5.300  | 5.100 | 5.700   | 6.400 |             |
| $K_3$ | 7.500  | 5.833 | 7.633   | 6.133 |             |
| R     | 2.200  | 2.900 | 2.033   | 0.267 |             |

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

| 因素    | 偏差平方和  | 自由度 | 均方    | F      | P     |
|-------|--------|-----|-------|--------|-------|
| A     | 7.402  | 2   | 3.701 | 52.127 | <0.05 |
| B     | 13.642 | 2   | 6.821 | 96.070 | <0.05 |
| C     | 7.882  | 2   | 3.941 | 55.507 | <0.05 |
| D(误差) | 0.142  | 2   | 0.071 | 1.000  |       |

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

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

酮10.83 mg, 与正交试验最高值相当, 表明所选工艺稳定、可行, 重现性好, 可用于枸骨果实中总黄酮的提取。

\* 药士。研究方向: 药房管理。E-mail: pharmzhangmeng@126.com

<sup>#</sup> 通信作者: 讲师, 硕士。研究方向: 天然药物的教学及科研。电话: 010-69426761。E-mail: wujia026@126.com

## 3 讨论

笔者曾分别考察超声提取法、回流提取法、索氏提取法对枸骨果实中总黄酮提取率的影响, 结果超声提取法的提取率较高, 故选用此法。笔者也曾分别考察水、甲醇、乙醇对提取率的影响, 结果乙醇为溶剂时的提取率高于水和甲醇, 故选用乙醇为提取溶剂。

笔者通过预试验发现, 药材浸泡时间、粉碎粒度和超声功率对提取率影响较小, 故以对提取率影响较大的提取时间、乙醇体积分数、料液比、提取次数为考察因素。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 233.
- [2] 祝晨陈, 杨金燕, 林朝展. 冬青属植物化学成分及药理活性的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 759.
- [3] 李维林, 吴菊兰, 任冰如, 等. 枸骨的化学成分[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(2): 1.
- [4] 陈强. 苦丁茶中槲皮素成分分析[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(2): 1.
- [5] 张凤礼, 曾超珍, 刘志祥. 枸骨叶总皂苷提取工艺的研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(9): 194.
- [6] 张洁, 喻蓉, 吴霞, 等. 枸骨叶的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(5): 821.
- [7] Zhou SX, Yao ZR, Li J, et al. Flavonoids from the leaves of *Ilex cornuta*[J]. *Chin J Nat Med*, 2012, 10(2): 84.
- [8] 范志英. RP-HPLC测定无刺枸骨不同部位中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 浙江中医杂志, 2010, 45(2): 144.
- [9] 陈丛瑾, 王琪, 李欣. 黄酮类化合物抗氧化和抑菌生物活性研究进展[J]. 中国药房, 2011, 22(35): 3 346.

(收稿日期: 2013-03-01 修回日期: 2013-06-02)