

· 中药工业 ·

正交设计优化拟缺香茶菜总黄酮提取工艺[△]

陈慧平^{1*}, 李晓宁², 罗含希¹, 邹敏¹

(1. 郑州大学医药科学研究所, 河南 郑州 450052; 2. 云南中医学院, 云南 昆明 650500)

[摘要] 目的: 优化拟缺香茶菜总黄酮提取工艺。方法: 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以拟缺香茶菜总黄酮的含量为综合指标, 采取加热回流方法, 考察提取温度(A)、液料比(B)、提取时间(C)、乙醇浓度(D)4个因素对提取效果的影响。结果: 最佳提取工艺为温度 90 ℃、液料比 40:1、提取 2.0 h、60%乙醇, 平均得率为 5.668 6%。结论: 该工艺简便合理, 稳定可行, 可为拟缺香茶菜总黄酮提取工艺的确定提供依据。

[关键词] 拟缺香茶菜; 总黄酮; 正交试验; 提取工艺

Optimization of the Extraction Technology of Total Flavonoids from *Isodon excisoides* by Orthogonal Experiment

CHEN Huiping^{1*}, LI Xiaoning², LUO Hanxi¹, ZOU Min¹

(1. Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;

2. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** The optimal conditions of total flavonoids from *Isodon excisoides* were investigated by orthogonal array design. **Methods:** The content of total flavonoids was determined spectrometrically using rutin as the reference substance. The effects of extraction temperature, extraction time, liquid/material ratio, ethanol concentration on the content of total flavonoids in extracts were investigated by one-factor-at-a-time method, and the extraction conditions were optimized by orthogonal array design. **Results:** Ethanol concentration and liquid/material ratio were the key factors that affected the extraction of total flavonoids. The optimal extractive conditions were obtained as follows: temperature 90 ℃, treatment time 120 min, liquid/material ratio 50:1 and ethanol concentration 50%. Under these conditions, the extraction yield of total flavonoids from *I. excisoides* was 5.668 6%. **Conclusion:** The optimized process remarkably increases the extraction yield of total flavonoids from *I. excisoides* and has a promising prospect for practical applications.

[Keywords] *Isodon excisoides*; total flavonoids; orthogonal array design; extraction

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.6.021

拟缺香茶菜别名野紫苏, 为唇形科香茶菜属植物的干燥地上部分, 治疗慢性咽炎及食管癌疗效确切^[1]。在我国分布范围相当广泛, 是民间广泛使用的草药, 具有清热解毒、活血化瘀、抗菌消炎及抗肿瘤等功能^[2]。根据系统预实验可知, 拟缺香茶菜的化学成分主要含有二萜、三萜、黄酮等活性成分, 其中黄酮含量比较高。黄酮类物质是一类在植物界中分布广泛、具有多种生物活性的多酚类化合物, 具有抑菌、降压、保肝、美白、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、抗辐射等多种药理作用^[3]。目前未见有关拟缺香茶菜总黄酮含量测定及提取工艺研

究的报道。本实验采用回流热浸法进行正交试验设计, 探究拟缺香茶菜总黄酮含量的最佳提取工艺, 以期待为拟缺香茶菜的质量控制及其总黄酮的开发利用提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

lambda 35 紫外可见分光光度计(perkin elmer); AR1530 型电子天平(梅特勒-托利多有限公司); DFY-400 摇摆式高速中药粉碎机(温岭市林大机械)。

[△] [基金项目] 河南省自然科学基金(152300410159); 河南省高等学校重点科研项目(16A350011)

* [通信作者] 陈慧平, 助理研究员, 研究方向: 天然药化及药理; Email: baihe7879@126.com

1.2 试剂与药材

植物药拟缺香茶菜采自河南龙浴湾,经郑州大学药学院李继成教授鉴定为唇形科拟缺香茶菜。将采集的拟缺香茶菜地上部分自然阴干,磨碎,装入塑料袋密封,置于干燥阴凉处备用。芦丁对照品(批号:1d150822-17,Stanford analytical chemicals inc.);硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠、乙醇均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 拟缺香茶菜总黄酮含量测定

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取拟缺香茶菜药材粉末2.000 g,加入一定的乙醇和水混合溶液于加热套中加热回流提取,过滤,滤渣再加一定量乙醇和水混合溶液回流,回流提取3次,合并滤液转至200 mL容量瓶中,加相应的水和乙醇至刻度定容,摇匀,作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取在120℃减压干燥至恒重的芦丁对照品0.012 26 g置50 mL容量瓶中,加70%乙醇适量,水浴加热,完全溶解,放冷,加70%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液(含无水芦丁 $0.245\ 2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2.1.3 测量波长的选择 吸取对照品溶液和供试品溶液各1.0 mL置25 mL的容量瓶中,先加5%亚硝酸钠溶液0.4 mL,摇匀,6 min后,加入10%的硝酸铝溶液0.4 mL,摇匀,6 min后,再加入4%氢氧化钠溶液4 mL,加水稀释至刻度,摇匀后,静置15 min,置紫外分光光度计lambda 35进行全波长扫描,得出在357 nm处有最大特征吸收峰,因此将357 nm定为最大吸收波长。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液0.0、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 mL分别置于标号为0、1、2、3、4、5的25 mL容量瓶中,按2.1.3项下操作。以试剂为空白参比液,将所有的待测溶液置紫外分光光度计lambda 35,在357 nm处测吸光度值,以芦丁浓度(X)作为横坐标,以吸光度值(Y)作为纵坐标,作图,回归处理后得标准曲线方程: $Y = 42.466X - 0.138\ 02$,相关系数 $r = 0.999\ 5$ 。结果表明,芦丁对照品在 $0.00 \sim 0.015\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与吸光度值呈良好线性关系。

2.1.5 精密密度试验 取芦丁对照品6份,按2.1.3项下方法显色测定,结果RSD为0.16%,表明精密密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取适宜浓度的芦丁对照品溶液1.0 mL置25 mL容量瓶中,按2.1.3项下操作。以试剂为空白参比液,置紫外分光光度计lambda 35,在357 nm处测得吸光度值,以显色15 min后的时刻设为0时刻,在0、15、30、45、60、90、120 min测其吸光度,得出结果RSD为0.18%,说明芦丁的显色反应的稳定性良好,样品溶液应在显色后2 h内完成含量测定。

2.2 橘叶总黄酮提取工艺优化

根据预实验结果,影响拟缺香茶菜中总黄酮提取效率的因素主要有乙醇浓度、提取时间、液料比和提取温度,正交试验设计中每个因素选择3个水平值,因素水平值通过单因素考察来确定。

2.2.1 单因素考察

2.2.1.1 提取时间的考察 取样品粉末5份,每份2.000 g,精密称定,加入60%乙醇40 mL,温度为80℃,分别加热回流提取1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h,趁热过滤,共提取3次,合并3次滤液,用60%乙醇定容至200 mL,测定总黄酮含量,结果见图1。

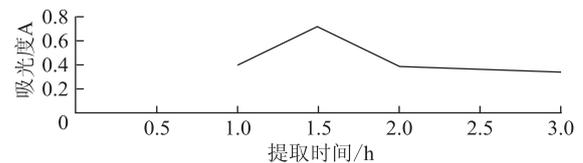


图1 提取时间考察折线图

由图1可知,提取1.5 h能达到较好的效果,所以选取提取时间考察的水平值为1.0、1.5、2.0 h。

2.2.1.2 乙醇浓度的考察 取样品粉末5份,每份2.000 g,精密称定,分别加入40%、50%、60%、70%、80%乙醇40 mL,80℃加热提取1.5 h,趁热过滤,滤液另器保存,共提取3次,合并3次滤液,用对应浓度的乙醇定容至200 mL,测定总黄酮含量,结果见图2。

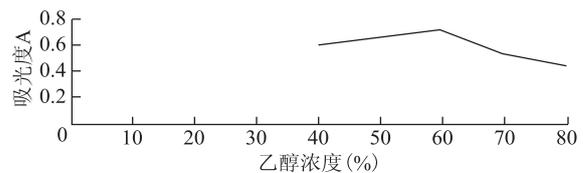


图2 乙醇浓度考察折线图

由图2可知,60%乙醇具有较好的提取效果,所以确定乙醇浓度考察的水平值为50%、60%和70%。

2.2.1.3 液料比考察 取样品粉末5份,每份2.000 g,精密称定,分别加入60%乙醇40、60、80、100、120 mL,80℃加热提取1.5 h,趁热过滤,滤液另器保存,提取3次,合并3次滤液,用对应浓度的乙醇定容至500 mL,测定总黄酮含量,结果见图3。

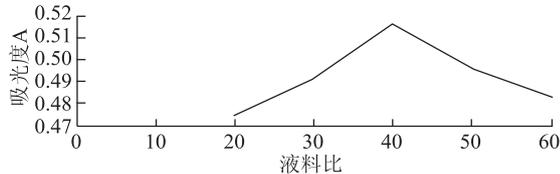


图3 液料比考察折线图

由图3可知,液料比40:1具有较好的提取效果,所以确定液料比考察的水平值为30:1、40:1和50:1。

2.2.1.4 提取温度考察 取样品粉末5份,每份2.000 g,精密称定,分别加入60%乙醇80 mL,加热提取1.5 h,分别在60、70、80、90、100℃下水浴加热提取,冷却至室温过滤,滤液另器保存,分别提取3次,合并3次滤液,用60%乙醇定容至250 mL,测定总黄酮含量,结果见图4。

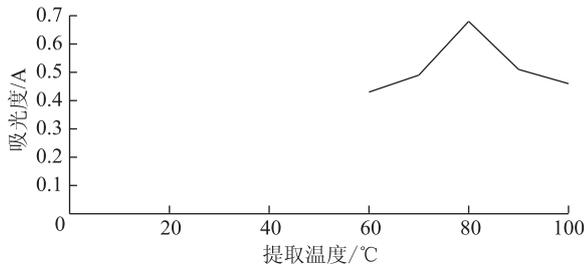


图4 温度考察折线图

由图4可知,温度80℃具有较好的提取效果,所以确定提取温度考察的水平值为70、80、90℃。

2.2.2 正交试验 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验表安排试验,并按2.1中方法,按各工艺提取条件对总黄酮量进行考察,具体因素水平和实验结果及对结果的方差分析,见表1~3。

因素及水平:考察温度(A)、提取时间(B)、液料比(C)、乙醇浓度(D)四个因素三水平进行正交试验,优选拟缺香茶菜黄酮的最佳提取工艺,以拟缺香茶菜总黄酮的含量为考察指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表1。

由表2和表3可知,4个因素对总黄酮提取率的影响从大到小依次是:乙醇浓度>液料比>温度>提取时间。且由表3方差分析结果可知,乙醇浓度和液料比对提取率有显著性影响,提取时间和次数、

温度对提取率没有显著性影响。由直观分析可知,总黄酮提取率最高的工艺应为 $A_3B_3C_3D_1$,即用50%乙醇提取,液料比为50:1,提取时间为2 h,提取温度90℃。

表1 因素水平表

水平	因素			
	A 提取温度/℃	B 提取时间/h	C 液料比	D 乙醇浓度(%)
1	70	1.0	30:1	50
2	80	1.5	40:1	60
3	90	2.0	50:1	70

表2 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	总黄酮含量(%)
1	1	1	1	1	4.163 4
2	1	2	2	2	4.936 2
3	1	3	3	3	4.216 8
4	2	1	2	3	4.134 5
5	2	2	3	1	5.242 6
6	2	3	1	2	4.168 1
7	3	1	3	2	5.376 1
8	3	2	1	3	3.732 0
9	3	3	3	1	5.677 5
K1	4.438 8	4.558 0	4.021 2	5.027 8	
K2	4.515 0	4.636 9	4.916 0	4.826 8	
K3	4.928 5	4.687 4	4.945 2	4.027 7	
R	0.489 7	0.129 4	0.924 0	1.000 1	

注:A.提取温度;B.提取时间;C.液料比;D.乙醇浓度。

表3 方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	0.410	2	0.205	2.179	$P>0.1$
B	0.094	2	0.047	0.500	$P>0.1$
C	5.636	2	2.818	29.975	$0.05<P<0.1$
D	3.772	2	1.886	20.059	$0.05<P<0.1$

2.2.3 验证试验 精密称取拟缺香茶菜药材粗粉2.000 g,按最佳提取工艺条件 $A_3B_3C_3D_1$ 平行操作,测定吸光度并计算黄酮含量,结果见表4。

表4 工艺验证试验

验证试验	拟缺香茶菜黄酮含量	平均含量	RSD
1	5.589 6		
2	5.723 5	5.668 6	1.23
3	5.692 8		

3 讨论

黄酮类化合物已被证明具有抗肝脏毒性、抗炎、抗菌、抗病毒、解痉、清除自由基、降血压、软化血管等生理活性。近年的研究发现,某些黄酮类化合物具有良好的体内外抗肿瘤活性,且对正常细胞毒性较小^[4]。

根据“相似相溶”原则,黄酮类物质属于中等极性物质,易溶于中等或中等偏极性的溶剂中。乙醇水溶液由于引入了羟基,乙醇分子之间不但彼此以氢结合,而且和水分子也形成氢键,降低了水的极性,故黄酮类物质的溶解度增加。本工艺充分考虑到总黄酮和多糖溶解性的差异,在总黄酮提取过程中选择最适体积分数的乙醇作为溶剂,除了能最大限度地提取总黄酮外,还能尽量减少多糖的溶出,使测定结果更准确^[5]。

总黄酮含量测定研究中,稳定性考察时随着时间的延长供试溶液的吸光度呈下降趋势,虽然在120 min内,数值变化RSD值仅为0.18%,较稳定,但最好能在显色后60 min内完成测定工作,以减小测量误差。

本实验优选的提取工艺稳定、合理、可行性较

高,适用于拟缺香茶菜总黄酮的提取。综上所述,采用正交设计优化拟缺香茶菜总黄酮的提取工艺,能优选最佳工艺提取拟缺香茶菜中的总黄酮,为拟缺香茶菜的深入研究和开发利用提供实验依据,也有利于拟缺香茶菜药材的优劣鉴别,此外,本实验结果显示,拟缺香茶菜药材总黄酮含量较高,具有很好的开发潜力。

参考文献

- [1] 李火云,焦珂,张鹏,等.拟缺香茶菜化学成分研究[J].中草药,2014,45(2):154-160.
- [2] 陈慧平,马方,邹敏,等.拟缺香茶菜提取物体外对3种肿瘤细胞增殖的抑制作用[J].郑州大学学报(医学版),2015,50(5):624-626.
- [3] 陈文龙,陈燕芬,卢传坚,等.土茯苓总黄酮提取工艺的正交设计优化[J].时珍国医国药,2014,25(3):544-546.
- [4] 张志东,林少珠,吴晓松.正交试验优化桑寄生黄酮的提取工艺[J].中药材,2012,35(5):810-812.
- [5] 付亮,袁璟亚,杨瑞武,等.正交试验优化淫羊藿总黄酮和多糖的分步提取工艺优化[J].食品科学,2012,33(24):56-60.

(收稿日期 2016-10-12)

(上接第832页)

- [9] 戴军,朱松,汤坚,等.PMP柱前衍生高效液相色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成[J].分析测试学报,2007,26(2):206-210.
- [10] 钱韵旭,刘裴,李莉,等.白花蛇舌草多糖的分离纯化及PMP柱前衍生高效液相分析[J].云南中药学院学报,2010,33(3):43-46.
- [11] 吴松,秦军.Maillard反应的机理研究[J].贵州工业大学

学报(自然科学版),2005,34(4):17-20.

- [12] 梁勤.我国银耳种质资源遗传多样性分析及木质素、纤维素酶活性测定[D].雅安:四川农业大学,2010.
- [13] Alline R. Pacheco, Meredith M. Curtis, Jennifer M. Ritchie, et al. Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization[J]. Nature,2012,492(7427):113-117.
- [14] 刘颖,张敏,吴茜茜,等.岩藻多糖的研究进展[J].食品与发酵工业,2011,37(6):146-151.

(收稿日期 2016-11-10)