

毛冬青根中总黄酮的提取工艺研究

旷春桃 王清华 (中南林业科技大学材料科学与工程学院, 湖南长沙410004)

摘要 [目的] 筛选毛冬青根中总黄酮提取的最佳条件。[方法] 以毛冬青根粉为材料, 选用正交试验, 研究了料液比、提取时间、提取次数和乙醇浓度对总黄酮提取率的影响, 三波长分光光度法测定提取液的吸光度, 计算总黄酮的提取率。对该试验的精密度和回收率也进行了测量。[结果] 料液比为1:8时, 极差最大, 其次是提取时间, 乙醇浓度对黄酮提取率的影响不大, 以50%的乙醇为宜。正交试验结果得到的最佳提取条件为料液比为1:8、用50%乙醇提取2 h、提取次数为2次, 在此条件下的平均提取率0.30%, 用三波长分光光度法进行测定的精密度较高, 相对标准差(RSD)为2.7%, 回收率为93.8%~102.8%, 平均回收率99.2%。[结论] 得到了从毛冬青根中提取总黄酮的最佳工艺。

关键词 毛冬青根; 总黄酮; 三波长分光光度法

中图分类号 S567.1+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)01-00180-02

Study on Extraction Process of Total Flavonoids from Pubescent Holly Root

KUANG Chun-tao et al (College of Material Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004)

Abstract [Objective] The study was to screen the optimum condition for extracting total flavonoids from the Pubescent holly root. [Method] With the root powder of pubescent holly as material, the orthogonal test was taken to investigate the effect of solid-liquid ratio, extraction time, extraction times and ethanol concn. on the total flavonoids extraction rate. The absorbance of extraction solution was measured with three-wavelength spectrophotometry and the extraction rate of total flavonoids was calculated. The precision and recovery of the experiments was also measured. [Result] When the solid-liquid ratio was 1:8, the range was the biggest and the second was extraction time. The effect of ethanol concn. on flavonoids extraction rate was little and 50% ethanol was optimum. The optimum extraction condition obtained by orthogonal test was as follows: the solid-liquid ratio was 1:8, 50% ethanol was used to extract for 2 h, the extraction times was 2. Under the condition, the average extraction rate was 0.30%. The precision of three-wavelength spectrophotometry used to determine was higher. The relative standard deviation(RSD) was 2.7% and the recovery was 93.8%~102.8% with the average recovery of 99.2%. [Conclusion] The optimum extraction process for extracting total flavonoids from the root of Pubescent holly was obtained.

Key words Pubescent holly root; Total flavonoids; Three-wavelength spectrophotometry

毛冬青(Pubescent Holly)是冬青科冬青属植物,为常绿灌木,主要分布在我国南部广东、广西、福建、江西和湖南等省区,药用部分为毛冬青的根或叶子。传统中医药理论认为,毛冬青根具有活血通脉、消肿止痛、清热解毒之功效,临床上广泛应用于治疗心绞痛、心肌梗塞、血栓闭塞性脉管炎、扁桃体炎、咽喉炎、小儿肺炎等,外用治烧、烫伤、冻疮^[1-3]。现代植物化学研究表明,毛冬青根中主要含有黄酮甙、酚类、甾醇、鞣质、木质素、三萜、氨基酸、糖类等化学成分^[1-6]。黄酮类化合物是毛冬青中具有医疗保健作用的主要成分,因此对毛冬青根中黄酮类化合物的研究具有较高的应用价值。

黄酮类化合物是很多中药的活性成分,其分析方法研究报道很多,主要有分光光度法^[7]、荧光光度法^[8]和高效液相色谱法^[9],而对于评价和监测含黄酮类天然产物的总黄酮含量通常采用分光光度法。但采用单波长分光光度法在加入铝盐后吸收带红移,吸光度大大增加,同时干扰成分使吸收峰不对称也给定量分析造成一定影响^[7,10]。笔者利用三氯化铝与黄酮类化合物的显色反应,以三波长分光光度法测定毛冬青根中总黄酮含量,有效地消除了吸收峰不对称给定量分析造成的影响,准确度和精密度均较高。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 UV-1201紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);毛冬青根(购于湖南三湘中药饮片有限公司);芦丁标准品(辽宁省生物医药研发中心);95%乙醇、氯化铝和醋酸钠等均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 三波长的确定。准确吸取芦丁标准品溶液1.0 ml,注入10 ml容量瓶中,加0.1 mol/L氯化铝溶液2.0 ml,1.0 mol/L醋酸钠溶液3.0 ml,用60%乙醇溶液稀释至刻度,摇匀,用1 cm的比色皿在波长200~600 nm范围内扫描,绘制出其吸收曲线。用作图法确定出3个测定波长分别为 $\lambda_1=498$ nm、 $\lambda_2=415$ nm和 $\lambda_3=315$ nm。

1.2.2 毛冬青根中总黄酮的提取。称取毛冬青根粉加入圆底烧瓶中,加入一定量50%~70%乙醇,回流提取,过滤,滤渣在同种条件下再提取1~2次,合并滤液,测定吸光度,计算总黄酮的提取率。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制 准确吸取1.0 ng/ml的芦丁标准溶液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml分别注入10 ml的容量瓶中,加入0.1 mol/L氯化铝溶液2.0 ml、1.0 mol/L醋酸钠溶液3.0 ml,用60%的乙醇溶液稀释至刻度,摇匀,放置15 min后,分别测定上述标准溶液在315、415、498 nm下的吸光度。按公式

$$A = A_2 - \frac{(A_2 - A_3)A_1 + (A_1 - A_2)A_3}{1 - 3}$$

计算^[7],然后以A对浓度C进行线性回归,得回归方程为 $A = 0.0258C + 0.0589$, $R = 0.9970$ 。

2.2 总黄酮提取工艺的优化 参考文献报道及在前期试验基础上,为了考察料液比、提取时间、提取次数和乙醇浓度对总黄酮提取率的影响,选用 $L_9(3^4)$ 进行正交试验(表1)。由表1可知,料液比1:8时,极差最大,其次是提取时间,乙醇浓度对黄酮提取率的影响不大。从经济考虑,采用50%的乙醇为宜,所以适宜提取条件为 $A_2B_1C_1D_2$,即料液比1:8、乙醇浓度50%、提取时间2 h、提取次数2次。适宜条件下平均提取率为0.30%,重现性较好。

基金项目 中南林业科技大学青年科学研究基金资助(06014B)。

作者简介 旷春桃(1973-),男,湖南衡山人,在读博士,副教授,从事天然产物化学和精细化工方面的教学与研究工作。

收稿日期 2008-09-28

表1 正交试验结果

Table 1 The results of the orthogonal experiment

序号 Serial number	A 料液比 g/ml Material- liquid ratio	B 乙醇浓度 % Ethanol concentration	C 时间 h Time	D 提取次数 Extraction times	提取 率 % Extraction rate
1	1 6	50	2	1	0.19
2	1 6	60	3	2	0.18
3	1 6	70	4	3	0.20
4	1 8	50	3	3	0.22
5	1 8	60	4	1	0.23
6	1 8	70	2	2	0.27
7	1 10	50	4	2	0.26
8	1 10	60	2	3	0.25
9	1 10	70	3	1	0.20
K ₁	0.57	0.67	0.71	0.62	
K ₂	0.72	0.66	0.60	0.71	
K ₃	0.71	0.67	0.69	0.67	
R ×3	0.15	0.01	0.11	0.09	

2.3 精密度和回收率 准确吸取芦丁标准品溶液0.1 ml, 分别置于5只10 ml容量瓶中,按标准曲线项下操作,测定吸光度,相对标准差(RSD)为2.7%,说明该法的精密度较高。

准确吸取100 µg/ml芦丁标准品溶液1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml分别置于5只10 ml容量瓶中,然后分别加入1.0 ml样品液,按标准曲线绘制项下操作测定其总黄酮含量(表2)。由表2可知,该测定方法的回收率为93.8%~102.8%,平均回收率为99.2%,说明方法的准确度较高。

3 结论

采用三波长分光光度法测定毛冬青根中总黄酮含量的回收率为93.8%~102.8%,平均回收率为99.2%,相对标准偏差为2.7%,方法的准确度与精密度均较高。

试验表明,毛冬青根中总黄酮提取的适宜工艺条件为:料液比1 8、乙醇浓度50%、提取时间2 h、提取次数2次,提

(上接第139页)

($P > 0.05$);失水率和熟肉率均优于对照组,且差异显著($P < 0.05$)。其原因可能是由于肉中蛋白质的含量差异造成的。试验组日粮中由于发酵作用产生的丙酸能够被动物合成为葡萄糖,从而为蛋白质的合成提供能量,有利于蛋白质的沉积;同时,微生物合成的菌体蛋白也提供了较多合成蛋白质的前体物质,因此试验组肉质中蛋白质的含量应当高于对照组。

失水率降低说明肉质有良好的保鲜能力,同时汁液富含各种营养物质;失水率下降也说明了肉质更能良好保持养分。熟肉率说明肉煮熟以后的损失情况,往往和肉当中蛋白质含量有关系,熟肉率越高蛋白质含量越高。因此,微贮饲料能够在一定程度上提高屠体品质。

3.3 微贮饲料对产肉性能的影响 通过该试验可知,采用微贮饲料饲喂肉羊能够提高羊的产肉性能,主要是由于微贮饲料能够提高饲料的适口性,增加羊摄入饲料量和改善

取率可达0.30%。

表2 回收率试验结果

Table 2 The results of the recovery experiment

序号 Serial number	样品液含量 µg/ml Content of sample solution	加标量 µg/ml Addition of standard substance	测得量 µg/ml Measured amount	回收 率 % Recovery
1	12.14	10.0	21.52	93.8
2	12.14	15.0	27.56	102.8
3	12.14	20.0	31.98	99.2
4	12.14	25.0	37.00	99.4
5	12.14	30.0	42.45	101.0

参考文献

- [1] 熊友香,李昶,罗宪堂.毛冬青的化学成分、药理作用研究进展[J].中药材,25(5):371-374.
- [2] 邓六勤,钟鸣,马志铃.毛冬青化学成分、药理作用及应用研究进展[J].中国中医药现代远程教育,2006,4(10):24-26.
- [3] 陈怡禄,邓六勤,卓仪,等.中药毛冬青的化学成分与药理作用的研究进展[J].2006 第六届中国药学会学术年会论文集,2006.
- [4] 杨鑫,丁怡,张东明.毛冬青中木质素苷类化学成分的研究[J].中国中药杂志,2007,32(13):1303-1305.
- [5] 杨鑫,丁怡,张东明.毛冬青中环烯醚萜苷类化合物的分离与鉴定[J].中国药物化学杂志,2007,17(3):173-177.
- [6] 杨鑫,丁怡,孙志浩,等.毛冬青的化学成分研究[J].中药材,2005,36(8):1146-1147.
- [7] 侯冬岩,回瑞华,杨梅.苦丁茶中总黄酮的三波长-光谱法定量分析[J].分析化学,2004,32(6):783-786.
- [8] 张敏,曹庸,唐纯翼,等. A^{3+} -芦丁二元络合物荧光光度法测定银杏叶中总黄酮的含量[J].分析科学学报,2005,21(2):188-190.
- [9] 李梅青,盛旋,邵学广.反相高效液相色谱法用于葛根黄酮提取物的分离与主要活性成分的测定[J].分析化学,2003,31(2):178-180.
- [10] 肖坤福,张春牛.三波长分光光度法测定芹菜叶中黄酮的含量[J].食品研究与开发,2005,26(4):134-136.
- [11] 周中流,邹节明,王力生,等.毛冬青根中木脂素配糖体提取工艺及纯化鉴定研究[J].时珍国医国药,2008,19(4):868-869.
- [12] ZHOU J Y, HAO H, LI L P, et al. Determination of enodin and chrysoferol contents in callus of *Cassia tora* L. leaf[J]. Agricultural Science & Technology, 2008,9(2):60-62.
- [13] 尹文清,周中流,邹节明,等.毛冬青总皂苷的提取工艺及纯化鉴定研究[J].中药材,2007,30(9):1153-1155.

饲料中其他养分的利用率,从而导致蛋白、脂肪的沉积增加引起的。

综上所述,微贮处理是对粗饲料处理的一种有效形式,其制作简单方便,不仅能够有效保存饲料中的养分,还能提高饲料养分的含量及原有养分的消化率。微贮饲料不仅能够提高肉羊的生产性能,还能大幅度提高肉品品质,因此微贮饲料是饲喂肉羊的良好饲料。

参考文献

- [1] 蒋中海.微贮秸秆饲料试验研究[J].安徽农业科学,2006,34(13):3173-3183.
- [2] 巩蕾.秸秆微贮饲料育肥滩羊试验[J].中国草食动物,2003,23(6):26-27.
- [3] EL-HAFEZ G A A, SOUIMANI A, MOUSA S M, et al. Sugar cane tops silage as ruminants feed stuff: 3 Effect on lambs' growth performance, semen physical properties and blood serum constituents[J]. Assiut Veterinary Medical Journal, 2003,49:73-95.
- [4] DEN Z S, BOLAT D, KAPLAN O, et al. The possibilities of using sugarbeet pulp silage produced by different methods in lamb and dairy cow rations 2. Ruminant degradability[J]. Turk J Vet Anim Sci, 2002,26:765-770.