

正交试验法优选云南松松塔总黄酮的提取工艺

李冬梅*, 李莉, 吴五谊, 刀志琪, 刘光明
(大理学院药化学院, 云南 大理 671000)

[摘要] 目的: 优选云南松松塔总黄酮的提取工艺。方法: 采用超声波辅助法提取云南松松塔总黄酮, 以总黄酮提取率为指标, 考察料液比、提取温度、乙醇体积分数和提取时间对总黄酮提取率的影响, 通过正交试验法优选总黄酮的提取工艺。结果: 最佳提取工艺为加 30 倍量 60% 乙醇于 60 °C 超声辅助提取 30 min, 云南松松塔总黄酮质量分数 3.23%。结论: 优选的提取工艺省时、稳定、提取率高。

[关键词] 云南松; 松塔; 总黄酮; 正交试验; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0037-03

Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoids from Pinecone of *Pinus yunnanensis* by Orthogonal Test

LI Dong-mei*, LI Li, WU Wu-yi, DAO Zhi-qi, LIU Guang-ming
(College of Pharmacology and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total flavonoids in pinecone of *Pinus yunnanensis*. **Method:** Total flavonoids in pinecone of *P. yunnanensis* were extracted by ultrasonic assisted extraction method, with extraction rate of total flavonoids as index, orthogonal test was applied to investigate influence of four factors (including ratio of material-liquid, ultrasonic extraction temperature, ethanol concentration and extraction time) on extraction technology of total flavonoids from pinecone of *P. yunnanensis*. **Result:** Optimum extraction technology was as following: ultrasonic assisted extracted 30 min with 30 times the amount of 60% ethanol at 60 °C, the content of total flavonoids in pinecone of *P. yunnanensis* was 3.23%. **Conclusion:** Optimized extraction technology was simple and stable with high extraction rate of total flavonoids.

[Key words] *Pinus Yunnanensis*; pinecone; total flavonoids; orthogonal test; extraction technology

云南松别名青松、飞松、长毛松等, 是我国西南林区的主要树种之一。松塔是松树的球果, 又名松实、松元、松果、松球^[1]。据《中华本草》记载, 松塔具有祛风除痹、化痰、止咳平喘、利尿、通便等功效^[2]。主要化学成分有氨基酸、皂苷、萜烯、黄酮、香豆素、萜类、糖及木质素等^[3-9], 提取物具有抗肿瘤、抗 HIV、抗氧化、抗炎及抑突变等作用^[10-16]。

常用的黄酮类化合物的提取方法有回流提取

法、超声辅助提取法、微波辅助提取法等, 超声辅助提取法具有耗时少、提取效率高等优点, 近年来被广泛用于天然产物成分的提取^[17-19]。黄酮单体类化合物的含量测定常用 HPLC, 而总黄酮的含量测定多采用在碱性介质中加入铝盐显色的分光光度法, Al(NO₃)₃ 比色法是最常用的总黄酮含量测定方法, 此方法主要以 Al(NO₃)₃ 为显色剂, 在碱性条件下利用其与黄酮类化合物形成有色络合物, 以芦丁为对照品测定总黄酮含量^[20-25]。本试验利用超声回流法提取云南松松塔中的总黄酮, NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 方法显色, 以芦丁为对照品测定云南松松塔总黄酮的含量, 采用 L₉(3⁴) 正交设计法优选云南松松塔总黄酮的提取工艺。

[收稿日期] 20120809(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860365)

[通讯作者] * 李冬梅, 硕士, 讲师, 从事天然药物化学成分研究, Tel: 0872-2257418, E-mail: ldm200805@163.com

1 材料

AL204-IC 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), XFB-200 型中药材料粉碎机(湖南科技机械厂), DHG9120A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司), 60 目筛(浙江上虞市华丰五金仪器有限公司), 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 纯度 95%, 批号 100080-200707), 其他试剂均为分析纯。

云南松松塔采自云南省漾濞县, 经大理学院生药教研室周浓副教授鉴定为松科松属植物云南松 *Pinus yunnanensis* Faranch 的球果, 即云南松松塔, 样品标本保存于大理学院有机药化教研室。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 0.010 70 g, 置 50 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇溶解, 定容, 摇匀, 即得 0.214 g·L⁻¹ 的芦丁对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 云南松松塔干燥后粉碎, 过 60 目筛, 精密称取 2.008 1 g 粉末置于 100 mL 圆底烧瓶, 加 50% 乙醇溶液 50 mL, 50 °C 超声回流提取 0.5 h, 冷却后抽滤, 即得, 备用。

2.3 检测波长的选择 吸取上述对照品溶液和供试品溶液各 1.0 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加 5% NaNO₂ 溶液 0.5 mL, 摇匀, 室温放置 5 min, 加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.5 mL, 摇匀, 室温放置 5 min, 加 4% NaOH 溶液 5 mL, 摇匀, 室温放置 5 min, 加 50% 乙醇溶液定容, 摇匀, 室温放置 10 min 显色, 同法对空白对照溶液显色。紫外-可见分光光度计 200 ~ 700 nm 全波长扫描, 结果显示在 510 nm 处有最大吸收, 故确定检测波长 510 nm。

2.4 标准曲线的绘制 精密吸取 2.1 项下对照品溶液 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 同 2.3 项下方法显色, 加 50% 乙醇定容, 以空白溶液作对照, 于 510 nm 处测定吸光度(A)。以 A 为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得到回归方程 $A = 12.597C + 0.0069$ ($r = 0.9998$), 线性范围 0.010 7 ~ 0.642 g·L⁻¹。

2.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 1.0 mL 置于 25 mL 量瓶中, 同 2.3 项下方法显色, 用 50% 乙醇定容。分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 测定 A, 每份样品平行测定 3 次, RSD 0.93%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.6 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 1.0 mL 于 25 mL 量瓶中, 同 2.3 项下方法显色, 加 50%

乙醇定容, 于 510 nm 处测定 A, 平行测定 5 次, RSD 0.40%, 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 精密称取同一批云南松松塔粉末 5 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液。精密吸取上述供试品溶液各 1.0 mL 于 25 mL 量瓶中, 同 2.3 项下方法显色, 加 50% 乙醇定容, 于 510 nm 测定 A, 每份样品平行测定 3 次, RSD 0.48%, 说明该方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验 精密吸取 5 份已知质量浓度的同一供试品溶液 1.0 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 分别精密加入 2.1 项下对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 同 2.3 项下方法显色, 加 50% 乙醇定容, 于 510 nm 测定 A, 结果见表 1。

表 1 云南松松塔总黄酮加样回收率试验

No.	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.214	0.215 6	100.75	99.81	0.41
2	0.428	0.426 2	99.58		
3	0.642	0.641 9	99.98		
4	0.856	0.851 8	99.51		
5	1.070	1.061 8	99.23		

2.9 提取工艺优选 在单因素试验基础上, 选取料液比、提取温度、乙醇体积分数和提取时间为考察因素, 以总黄酮提取率为指标, 精密称取 9 份干燥云南松松塔粉末, 每份 5.0 g, 按 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 因素水平见表 2, 试验安排及结果见表 3, 方差分析见表 4。

表 2 云南松松塔总黄酮的提取工艺正交试验因素水平

水平	A 料液比	B 提取温度/°C	C 乙醇体积分数/%	D 提取时间/min
1	1:10	50	50	30
2	1:20	60	60	40
3	1:30	70	70	50

由表 3 可知, 各提取因素对总黄酮提取率的影响为提取温度 > 料液比 > 乙醇体积分数 > 提取时间; 以极值最小的 D 因素为误差项进行方差分析, 表明因素 A, B 对提取工艺有显著影响, C 因素无显著影响, 确定最佳提取工艺为 A₃B₂C₂D₁, 即料液比 1:30, 提取温度 60 °C, 乙醇体积分数 60%, 提取时间 30 min。

2.10 验证试验 精密称取 5 份不同批次的干燥云南松松塔粉末各 5.0 g, 按优选的提取工艺进行 3 次验证试验, 分别测定吸光度 (n = 3) 次求平均值, 计

表3 云南松松塔总黄酮的提取工艺正交试验

No.	A	B	C	D	总黄酮质量 分数/%
1	1	1	1	1	2.41
2	1	2	2	2	2.98
3	1	3	3	3	2.61
4	2	1	2	3	2.59
5	2	2	3	1	3.07
6	2	3	1	2	2.70
7	3	1	3	2	2.73
8	3	2	1	3	3.14
9	3	3	2	1	3.05
K_1	2.670	2.577	2.750	2.843	
K_2	2.787	3.067	2.877	2.807	
K_3	2.973	2.787	2.803	2.780	
R	0.303	0.490	0.127	0.063	

表4 提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.140	2	23.333	<0.05
B	0.363	2	60.500	<0.05
C	0.024	2	4.000	>0.05
D(误差)	0.006	2	1.000	

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

算总黄酮平均质量分数 3.23%, RSD 0.48%, 说明优选工艺稳定可行。

3 讨论

本实验利用超声波辅助法提取云南松松塔总黄酮, 该法操作简单、稳定性好, 适合云南松松塔总黄酮的提取。超声波提取法现已广泛用于化学成分的提取工作中, 它具有提取率高、提取时间短、有效成分易于溶出等优点, 节省溶剂, 同时简化了提取操作步骤。

[参考文献]

- [1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 255.
- [2] 国家中药管理局. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 306.
- [3] 王莉, 张宇, 赵艳. 樟子松松塔化学成分初步研究[J]. 黑龙江医药科学, 2008, 12(6): 10.
- [5] 杨鑫, 丁怡, 孙志浩, 等. 松塔化学成分的研究[J]. 药学学报, 2005, 40(5): 435.
- [6] 李好枝, 袁晓斌, 吕永俊. 松果有效成分的研究 V. TLC-UV 法测定红松果多糖中木质素含量[J]. 中草药, 1996, 27(3): 147.
- [7] Feng T, Cai X H, Tan Q G, et al. Abietane diterpenoids a lignan from *Pinus yunnanensis* [J]. J Chem Sci, 2010, 65(6): 765.
- [8] Wang B, Ju J, He X F, et al. Three new terpenoids

from *Pinus yunnanensis* [J]. Helv Chim Acta, 2010, 93(3): 490.

- [9] 李寅珊, 李冬梅, 蒋凌云, 等. 云南松松塔的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 119.
- [10] Hiroshi S, Tatsuya K, Takaaki O, et al. Distribution of lignin-carbohydrate complex in plant kingdom and its functionality as alternative medicine [J]. Pharmacol Ther, 2010, 128(1): 91.
- [11] An W W, Kanazawa Y, Ozawa M, et al. Dendritic cell differentiation and tumor cell apoptosis induced by components of a poly-phenylpropanoid polysaccharide complex [J]. Anticancer Res, 2010, 30(2): 613.
- [12] 李艳省, 谢芳钦, 金新文, 等. 红松球果鳞片多糖抗肿瘤作用[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(4): 390.
- [13] Lai P K, Donovan J, Takayama H, et al. Modification of human immunodeficiency viral replication by pine cone extracts [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1990, 6(2): 205.
- [14] 刘光明, 吕永俊, 李好枝, 等. 云南松松塔中抗 HIV 活性成分的研究初报[J]. 大理学院学报, 2009, 8(2): 69.
- [15] 张宇, 王莉, 傅宇明, 等. 樟子松松塔抗氧化及抗炎作用研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1549.
- [16] 昌思思, 马志敏, 宋正蕊, 等. 松塔球提取物的抑突变性研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2010, 22(1): 59.
- [17] 郭孝武. 超声技术在中药有效成分提取中的应用[J]. 中草药, 1993, 10(24): 548.
- [18] 苏秀芳, 秦健梅. 超声辅助发提取剑叶龙血树根总黄酮的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 97.
- [19] 涂华, 陈碧琼, 张燕军. 天然类黄酮物质的提取工艺研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 277.
- [20] 周兰香, 黄阿根, 谢凯舟, 等. 分光光度与 HPLC 法测定荷叶总黄酮的研究[J]. 中草药, 2002, 33(1): 35.
- [21] 王新雯, 海洪, 金文英, 等. 黄酮类化合物含量测定方法的研究进展[J]. 辽宁化工, 2008, 37(12): 857.
- [22] 魏永生, 王永宁, 王石平, 等. 分光光度法测定总黄酮含量的实验条件研究[J]. 青海大学学报: 自然科学版, 2003, 23(3): 61.
- [23] 陈静, 梅广, 范昌雨. 分光光度法测定总黄酮含量中存在问题的研究[J]. 食品科技, 2007, 33(3): 230.
- [24] 王雷, 杨新建, 寇新. 紫外分光光度法在中药分析中的应用进展[J]. 天津药学, 2003, 15(5): 62.
- [25] 马陶陶, 张群, 李俊. 中药总黄酮的含量测定[J]. 安徽医药, 2007, 11(11): 1030.

[责任编辑 仝燕]