

正交试验优选桂花籽中原花青素的提取工艺

邹登峰¹, 叶妹¹, 窦锡彬^{2*}, 邱玉婷¹, 王非非¹

(1. 桂林医学院药学院, 广西 桂林 541004; 2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000)

[摘要] 目的: 优选桂花籽中原花青素的超声提取工艺。方法: 以原花青素得率为指标, 选取提取时间、提取温度、料液比、乙醇体积分数为考察因素, 在单因素试验基础上, 采用正交试验优选超声提取工艺。结果: 最佳提取工艺为加 8 倍量 50% 乙醇于 50 ℃ 提取 25 min。结论: 优选的提取工艺快速、简单, 为桂花籽的开发利用提供试验依据。

[关键词] 桂花籽; 原花青素; 正交试验

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)23-0028-03

Optimization of Extraction Technology for Procyanidins from Seed of *Osmanthus fragrans* by Orthogonal Test

ZOU Deng-feng¹, YE Mei¹, DOU Xi-bin^{2*}, QIU Yu-ting¹, WANG Fei-fei¹

(1. School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

2. Youjiang Medical University for Nationlities, Baise 533000, China)

[Abstract] Objective: To optimize ultrasonic extraction technology of procyanidins from seed of *Osmanthus fragrans*. Method: With yield of procyanidins as index, extraction time, extraction temperature, solid-liquid ratio and the concentration of ethanol were chosen as factors, based on single factor test, ultrasonic extraction technology was optimized by orthogonal test. Result: Optimum extraction technology was: extracted 25 min with 8 times the amount of 50% ethanol at 50 ℃. Conclusion: This optimized extraction process was quick and simple, and it could provide experimental basis for development and utilization of seed of *O. fragrans*.

[Key words] seed of *Osmanthus fragrans*; procyanidins; orthogonal test

桂花籽为木犀科桂花树的成熟种子, 主产于广西等地, 具有散寒破结、化痰止咳、祛风湿等功效。桂花的根、茎、叶、花均有药用价值, 主要化学成分为原花青素、香豆素、黄酮等, 其中原花青素、黄酮是主要活性成分^[1-2]。研究表明桂花籽中原花青素有较好的抗氧化功能, 且清除自由基的能力分别是 VE、VC 的 50, 20 倍, 同时具有高效抗氧化、抗衰老、抗肿瘤等生物活性^[3]。本文旨在优选桂花籽中原花青

素的提取工艺, 为桂花籽的开发利用提供试验依据。

1 材料

AK-400A 型粉碎机(温岭市奥力中药机械有限公司), DLSB-10/30 型低温冷却循环泵(郑州长城科工贸有限公司), TGL-16C 型台式高速离心机(上海安亭公司), UV-2550 型紫外-可分光光度计(日本岛津), 桂花籽粉末(桂林市桂花树上采集, 经作者本人鉴定为正品, 阴干, 粉碎机粉碎), 原花青素对照品(纯度 ≥ 98%, 日本 Nakahara 科技有限公司提供), 香草醛[中国 ELISA(酶联免疫)代测公司], 试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 精确称取桂花粉末 2 g, 加入一定量乙醇, 超声提取一定时间, 超声功率 100 W, 提取 1 次, 过滤, 减压浓缩加甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 离心 10 min(3 000 r·min⁻¹), 吸取上清液,

[收稿日期] 20120624(004)
[基金项目] 广西中医药管理局中医药科技项目(GZKZ09-52); 桂林市科技局科学技术研究与开发项目(20120105-9)
[第一作者] 邹登峰, 硕士, 副教授, 从事天然药物的开发与研究, E-mail: zdf1226@163.com
[通讯作者] * 窦锡彬, 硕士, 讲师, 从事中药在临床应用的研究, E-mail: 93215828@qq.com

即得。

2.2 原花青素含量测定 采用香草醛-盐酸法测定,其原理为在酸性条件下,原花青素 A 环的化学活性较高,其上的间苯二酚或间苯三酚可与香草醛发生缩合,产物在浓酸(盐酸或硫酸)作用下形成有色的正碳离子^[4]。取 1 g·L⁻¹原花青素对照品甲醇溶液,用香草醛-盐酸法显色,于 200 ~ 800 nm 进行扫描,结果最大吸收峰波长为 500 nm,故确定检测波长 500 nm。取供试品溶液 1 mL,加显色剂 5 mL,摇匀,避光,于 30 ℃ 恒温水浴保持 30 min,取出。于 500 nm 波长处测定吸光度(A),计算样品中原花青素含量^[5]。

2.3 标准曲线的绘制^[6] 准确称取原花青素对照品 25.2 mg,用甲醇溶解并定容至 25 mL,配制成质量浓度 1.008 g·L⁻¹的对照品溶液。分别取 1,2,3,4,5 mL,用甲醇稀释定容至 10 mL,各取 1 mL,分别加入 5 mL 显色剂,摇匀,避光,于 30 ℃ 恒温水浴保持 30 min,取出。以 A 为纵坐标,原花青素质量浓度为横坐标,得标准曲线 $Y = 1.359X - 0.075$ ($r = 0.9994$),线性范围 1.008 ~ 5.04 mg。

2.4 单因素试验考察

2.4.1 提取时间考察 精确称取桂花粉末 3 份,每份 2 g,加 7 倍量 60% 乙醇于 50 ℃ 超声提取,超声功率 100 W,分别提取 10,20,30 min,提取 1 次,测得提取液中原花青素质量浓度分别为 0.237,0.284,0.255 g·L⁻¹。说明提取时间 > 20 min 时原花青素质量浓度逐渐下降,可能因为随提取时间的延长,其他物质溶出增多或原花青素受热时间过长而变性,综合考虑,最适合提取时间 15 ~ 25 min,因此设定提取时间水平分别为 15,20,25 min。

2.4.2 提取温度选择 精密称取桂花粉末 3 份,每份 2 g,加 7 倍量 60% 乙醇分别在 20,40,60 ℃ 超声波提取 20 min,超声功率 100 W,提取 1 次,测得原花青素质量浓度分别为 0.225,0.210,0.196 g·L⁻¹。说明原花青素质量浓度随温度升高而减少,但相差不大。可能是由于原花青素不稳定,随温度升高,结构发生改变。考虑到温度过低和过高均不利于原花青素的提取,最佳提取温度在 30 ~ 50 ℃,因此设定提取温度水平分别为 30,40,50 ℃。

2.4.3 料液比考察 精确称取桂花粉末 3 份,每份 2 g,分别加 4,7,10 倍量 60% 乙醇分别于 50 ℃ 超声波提取 20 min,超声功率 100 W,提取 1 次,测得原花青素质量浓度分别为 0.16,0.24,0.25 g·L⁻¹。说明随乙醇用量增加,原花青素质量浓度增大;当料液

比 < 1:6 后,曲线基本趋于平缓。故设定料液比水平分别为 1:6,1:8,1:10。

2.4.4 乙醇体积分数对提取效果的影响 精确称取桂花粉末 3 份,每份 2 g,分别加 7 倍量体积分数分别为 30%,60%,90% 的乙醇溶液于 50 ℃ 超声波提取 20 min,超声功率 100 W,提取 1 次,测得原花青素质量浓度分别为 0.23,0.24,0.14 g·L⁻¹。说明随乙醇体积分数增加,原花青素质量浓度增大。当乙醇体积分数 > 60% 时,提取液中原花青素质量浓度减少。可能是由于一些醇溶性杂质和亲脂性较强成分溶出增加,导致原花青素提取率有所下降。故设定乙醇体积分数水平分别为 50%,60%,70%。

2.5 正交试验设计^[7] 在单因素试验基础上,以原花青素得率为指标,选取提取时间、提取温度、料液比、乙醇体积分数为考察因素,每个因素 3 个水平,精确称取桂花粉末 2 g,共 9 份,按 L₉(3⁴) 正交表安排试验,优化桂花粉末中原花青素的提取条件。因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 桂花籽中原花青素的提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A 提取时间 /min	B 提取温度 /℃	C 料液比	D 乙醇体积 分数/%
1	15	30	1:6	50
2	20	40	1:8	60
3	25	50	1:10	70

表 2 桂花籽中原花青素的提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	原花青素 得率/%
1	1	1	1	1	0.175
2	1	2	2	2	0.182
3	1	3	3	3	0.053
4	2	1	2	3	0.191
5	2	2	3	1	0.110
6	2	3	1	2	0.203
7	3	1	3	2	0.181
8	3	2	1	3	0.203
9	3	3	2	1	0.304
K ₁	0.137	0.182	0.194	0.196	
K ₂	0.168	0.165	0.226	0.189	
K ₃	0.229	0.187	0.115	0.149	
R	0.092	0.022	0.111	0.047	

表 3 原花青素得率方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0. 013	2	13	>0. 05
B(误差)	0. 001	2		
C	0. 020	2	20	<0. 05
D	0. 004	2	4	>0. 05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

由表 2 可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 $C>A>D>B$,以极值最小的 B 因素为误差项进行方差分析,结果表明 C 因素有显著性影响,其他因素均无显著影响。确定最佳提取工艺为 $A_3B_3C_2D_1$,即加 8 倍量 50% 乙醇于 50℃ 超声提取 25 min。

2.6 验证试验^[8] 准确称取桂花籽粉末 2 g,共 3 份,按优选的提取工艺进行 3 次验证试验,结果原花青素平均得率 0. 304% ,RSD 2. 94% ,说明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

本实验通过单因素和正交实验设计,考虑各因素对原花青素提取效果的影响,得出桂花籽粉末中原花青素超声波提取的最佳工艺条件为:提取溶剂 50% 乙醇,提取温度 50 ℃ ,料液比 1: 8,提取时间 25 min,提取 1 次,得率为 0. 145% 。

因此,本文运用正交实验设计提取桂花籽中原花青素研究,探讨桂花籽中原花青素提取方法,并为桂花籽的开发利用提供实验依据。

[参考文献]

[1] 蔡健,王薇. 桂花中总黄酮含量的测定[J]. 食品科技, 2007,16(4):178.
[2] 刘龙吕,向其柏. 木犀属植物的研究进展[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2003,27(2):84.
[3] 史国富,王新瑞. 天然高效抗氧化剂原花青素提取工艺研究概况[J]. 中国药物与临床,2011,11(5):547.
[4] 毕玲,傅柏平. 葡萄籽原花青素提取物的研究进展[J]. 中国新药杂志,2008,17(17):1478.
[5] 姚开,何强,吕远平,等. 葡萄籽提取物中原花青素含量不同测定方法比较[J]. 化学研究与应用,2002,14(2):230.
[6] 薛平,徐春蕾,李祥,等. 三白草中三白草酮提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):44.
[7] 朱莹,陈婷. 正交设计法优选复方昆丹胶囊的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):66.
[8] 李春阳,许时婴. 香草醛一盐酸法测定葡萄籽、梗中原花青素含量的研究[J]. 食品科学,2004,25(2):157.

[责任编辑 仝燕]

欢迎订阅 2013 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。本刊立足于行业报道的前沿,关注相关的政策动态,跟踪报道中医药重大课题,及时分析报道中医药的新政策、新技术、新发明、新成果、新疗法,努力使信息的选择与表达方式能够充分体现中医药发展水平,为广大读者提供一流的信息服务。

《中国中医药信息杂志》1994 年创刊,2002 年,被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录,成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升,已被波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等国际检索系统收录。

《中国中医药信息杂志》是中医药行业一本独具特色的学术期刊,其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有:中医动态、中医药发展论坛、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、研究与进展、论著、实验研究、流行病学调查、质量标准研究、制剂与工艺、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学等。

《中国中医药信息杂志》为月刊,大 16 开国际开本,112 页,国内外公开发行,每册定价 10 元,全年 120 元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部 邮编:100700 电话:010-64014411-3278 E-mail:Lxx@mail. cintem. ac. cn