

超声波法提取儿茶中总儿茶素工艺研究

郑晓玲, 郑彩虹* (浙江大学医学院附属妇产科医院, 杭州 310006)

摘要: 目的 研究超声波法提取儿茶中儿茶素和表儿茶素的最佳工艺。方法 以儿茶素和表儿茶素的含量总和占儿茶重量的百分比为提取率作为考察指标, 采用正交试验, 考察乙醇浓度、料液比、提取温度和超声时间 4 个因素的影响。结果 超声波提取优化工艺条件为: 乙醇浓度为 50%, 料液比为 1:12, 超声时间为 35 min, 提取温度为 60 °C。结论 超声波提取儿茶中儿茶素和表儿茶素的工艺具有提取率高、时间短、溶剂用量少、能量消耗小等优点, 适用于儿茶素和表儿茶素的提取。

关键词: 儿茶; 儿茶素; 表儿茶素; 超声提取; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)13-1321-03

Study on Extraction of Catechin from Catechu by Ultrasonic Technology

ZHENG Xiaoling, ZHENG Caihong* (Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the extraction technology of catechin from Catechu with ultrasonic process. **METHODS** Using the amount of catechin and epicatechin in dry extract as a major evaluation factor, orthogonal experiment was carried out to investigate four influential factors of the ethanol concentration, the ratio of raw material to solvent, the ultrasonic time and the extraction temperature. **RESULTS** The optimum condition of extraction from Catechu with ultrasonic technology was as follows, the concentration of ethanol, the ratio of raw material to solvent, the ultrasonic time, the extraction temperature were 50%, 1:12, 35 min and 60 °C, respectively. **CONCLUSION** The extraction process with ultrasonic method is fit for the extraction from Catechu with advantage of higher extraction rate and shorter time with less solvent and energy.

KEY WORDS: Catechu; catechin; epicatechin; ultrasonic extraction; orthogonal experimental method

儿茶为豆科植物儿茶 *Acacia catechu* (L.f.) willd. 的去皮枝、干的干燥煎膏, 具有收湿生肌敛疮等功效, 在治疗溃疡不敛、皮肤湿疹、跌扑伤痛、外伤出血等方面得到广泛的应用^[1]。儿茶中含有丰富的儿茶素和表儿茶素, 近年来, 越来越多的研究显示儿茶素和表儿茶素能够清除自由基, 抑制病菌生长, 具有防治心血管疾病、预防癌症等多种功能^[2]。本试验采用超声波法提取儿茶中儿茶素和表儿茶素, 考察提取液中乙醇浓度、料液比、提取温度和超声时间对提取工艺的影响, 以儿茶素和表儿茶素含量总和占儿茶重量的百分比为提取率作为控制指标, 从而确定最佳提取工艺, 为进一步将儿茶开发成为药物制剂提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司); AL204 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有

限公司); 高速离心机(Heraeus 公司)。儿茶素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 877-200001); 表儿茶素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110878-200102); 儿茶(杭州华东中药饮片有限公司); 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品提取

取儿茶适量, 粉碎, 精密称取 5.0 g, 放入具塞瓶中, 加入提取溶剂, 浸泡过夜。在恒温超声仪中超声提取一定时间后, 趁热离心, 收集上清液, 回收上清液中的乙醇, 至无醇味后冷却至室温, 收集浓缩液置 250 mL 量瓶中, 用蒸馏水定容后, 作为供试品溶液, 备用。

2.2 正交试验设计

以儿茶素和表儿茶素的含量总和占儿茶重量的百分比为提取率作为考察指标, 根据文献[3]并结合预试验选用提取溶剂中乙醇的浓度(A)、料液

基金项目: 浙江省中医药科技计划重点项目(2008ZA010)

作者简介: 郑晓玲, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)87061501-2201
主任药师 Tel: (0571)87061501-1730 E-mail: chzheng@zju.edu.cn

E-mail: ekwefi678@sina.com

*通信作者: 郑彩虹, 女, 博士,

比(B)、提取温度(C)和超声时间(D)为考察因素,应用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计进行试验,因素水平安排见表 1。

表 1 正交设计儿茶提取工艺中考察的因素和水平

Tab 1 The factors and levels in the orthogonal design of extraction technology from Catechu

水平	考察因素			
	乙醇浓度 (A)/%	料液比 (B)	提取温度 (C)/°C	超声时间 (D)/min
1	50	1:10	40	15
2	60	1:12	50	25
3	70	1:15	60	35

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Zorbox Extend C_{18} 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 流动相: 0.3%磷酸溶液(含 0.5%三乙胺)-乙腈(87:13), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 35 °C, 检测波长: 280 nm, 进样量: 20 μ L。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取儿茶素对照品 24.0 mg, 表儿茶素对照品 12.8 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相超声溶解定容至 100 mL, 得到含有儿茶素、表儿茶素对照品溶液。

2.3.3 线性关系考察 分别精密量取儿茶素和表儿茶素对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 mL, 置 10 mL 量瓶, 加流动相定容至刻度, 摇匀, 即得。在“2.3.1”色谱条件下, 进样 20 μ L, 记录色谱图, 以峰面积(A)对相应浓度(C)进行线性回归, 儿茶素回归方程为 $A=11.906C+3.5853$, $r=0.9999$, 表儿茶素回归方程为 $A=12.149C-6.7458$, $r=0.9999$, 结果表明儿茶素在 12.0~192.0 μ g·mL⁻¹ 内线性关系良好, 表儿茶素在 6.4~102.4 μ g·mL⁻¹ 内线性关系良好。色谱图见图 1。

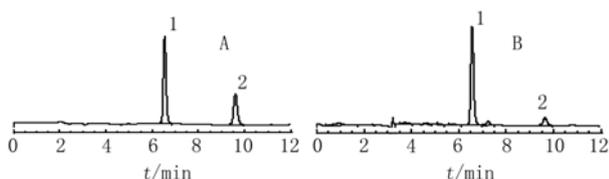


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-供试品; 1-儿茶素; 2-表儿茶素

Fig 1 HPLC chromatogram

A-reference substance; B-sample; 1-catechin; 2-epicatechin

2.3.4 日内精密度试验 精密吸取对照品溶液 1.0, 4.0, 7.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 配成低(含儿茶素 24.0 μ g·mL⁻¹, 表儿茶素 12.8 μ g·mL⁻¹)、中(含儿茶素 96.0 μ g·mL⁻¹, 表儿茶素 51.2 μ g·mL⁻¹)、高

(含儿茶素 168.0 μ g·mL⁻¹, 表儿茶素 89.6 μ g·mL⁻¹)3 种浓度的溶液, 分别在日内重复进样 5 次, 计算儿茶素和表儿茶素浓度。结果儿茶素低、中、高 3 种浓度的日内精密度 RSD 分别为 0.43%, 0.56%, 0.67%; 表儿茶素低、中、高 3 种浓度的日内精密度 RSD 分别为 1.95%, 0.31%, 0.27%, 结果表明日内精密度符合要求。

2.3.5 重复性试验 平行配制 5 份供试品溶液, 按“2.3.1”色谱条件进样测定, 儿茶素和表儿茶素含量的 RSD 为 1.82%, 1.79%。结果表明重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密量取已知含量的儿茶样品溶液至 10 mL 量瓶中, 再分别加入对照品溶液 0.5, 2.0, 5.0 mL, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 进样, 测得儿茶素低、中、高 3 种浓度的回收率($n=3$)分别为 96.31%, 102.34%, 98.47%, 9 份样品的平均回收率为(99.04±3.08)%; 表儿茶素低、中、高 3 种浓度的回收率($n=3$)分别为 102.22%, 96.65%, 97.78%, 9 份样品的平均回收率为(98.86±2.98)%。

2.3.7 稳定性试验 取同一供试品溶液在 0, 2, 4, 6 h 测定, 记录峰面积, 计算儿茶素和表儿茶素浓度。儿茶素和表儿茶素的 RSD 分别为 1.63%和 1.09%, 说明供试液在 6 h 内稳定。

2.3.8 提取工艺的确定 精密量取供试品溶液 2.0 mL, 置 100 mL 量瓶, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 取适量 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 取续滤液进样测定, 记录儿茶素和表儿茶素的峰面积, 计算得到各条件下儿茶素和表儿茶素的提取率, 结果见表 2, 3。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验表和结果

Tab 2 $L_9(3^4)$ arrangement and the results of orthogonal test

试验号	影响因素				提取率/ %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	20.970
2	1	2	2	2	23.459
3	1	3	3	3	24.064
4	2	1	2	3	21.523
5	2	2	3	1	22.593
6	2	3	1	2	21.366
7	3	1	3	2	20.106
8	3	2	1	3	22.700
9	3	3	2	1	20.220
K_1	68.490	62.595	65.032	63.780	
K_2	65.481	68.751	65.201	64.930	
K_3	63.027	65.650	66.763	68.287	
R_j	5.463	6.156	0.607	3.656	

表3 方差分析表

Tab 3 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F	P
A	4.992	2	4.992	<0.05
B	6.317	2	6.317	<0.05
C	1.731	2	1.731	<0.05
D	4.507	2	4.507	<0.05
误差	0.001	2		

由表2直观分析、表3方差分析可知各因素对儿茶素和表儿茶素提取效果影响的主次顺序为料液比、提取溶剂中乙醇浓度、超声时间和提取温度,且在统计学上均有显著性差异($P < 0.05$)。根据试验结果确定儿茶中儿茶素和表儿茶素的最佳提取工艺为:料液比为1:12,乙醇浓度为50%,超声时间为35 min,提取温度为60℃。

2.4 工艺验证试验

进一步考察优选工艺的可靠性及稳定性,取3份药材按“2.3.8”项下优选的最佳工艺进行验证试验,结果儿茶素和表儿茶素总提取率为25.14%,26.78%,26.86%;平均提取率为26.26%,RSD为3.72%。

3 讨论

参考中国药典2010年版一部儿茶项下含量测定色谱条件^[1],发现儿茶素和表儿茶素保留时间长,而且流动相对整体液相系统损坏大,实验中考察了流动相0.3%磷酸溶液(含0.5%三乙胺)-乙腈(80:20),0.3%磷酸溶液(含0.5%三乙胺)-乙腈(90:10),发现前者不能有效的分离儿茶素和表儿茶素,后者能有效的分离儿茶素和表儿茶素,但是表儿茶素保留时间在20 min,在此基础上对流

动相的比例进行微调,发现0.3%磷酸溶液(含0.5%三乙胺)-乙腈(87:13)的流动相既能有效的分离两种有效成分,表儿茶素的保留时间又在10 min以内,具有稳定、高效、经济的优点。儿茶素和表儿茶素稳定性差^[4],在实验中也发现4℃保存的表儿茶素对照品溶液、儿茶供试品溶液均出现颜色逐渐变深,含量下降的现象。因此,儿茶素和表儿茶素对照品溶液、儿茶供试品溶液最好临时用时配制,配好溶液应在24 h内测定。

超声波提取中药材是基于超声波的特殊物理性质,通过压电换能器产生的快速机械振动波来减少目标提取物与样品基体之间的作用力,从而实现固-液分离^[3]。超声波的振动匀化使样品介质各点受到的作用一致,使整个样品提取更均匀,具有提取工艺成本低,综合经济效益明显的优点,正被逐步地应用在中药提取领域中。本试验采用超声波法提取儿茶中儿茶素和表儿茶素,超声时间短,提取率高。

参考文献

- [1] Ch.P(2010) Vol I (中国药典2010年版.一部) [S]. 2010: 9.
- [2] LI C M, DOU H L, CHEN M H, et al. Study on separation, identification and antioxidant activities of tea Catechin oxidation products [J]. Food Sci(食品科学), 2008, 29(12): 141-145.
- [3] YUAN C L, GUO W Y. Circulated extraction of flavonoids from *Glechoma longituba* by ultrasonic wave [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32(5): 385-387.
- [4] FENG Y, LI Y, FU R J, et al. Study on quality standard of catechu and its extract [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2004, 26(4): 325-328.

收稿日期: 2010-12-13