

# 澳洲茶树黄酮提取研究

毕荣璐<sup>1</sup>, 朱世旷<sup>1</sup>, 凌清华<sup>2</sup>, 周光召<sup>2</sup>, 刘祥义<sup>1\*</sup>

(1. 西南林业大学, 云南昆明 650224; 2. 云南森源化工有限公司, 云南双柏 675100)

**摘要** [目的]优化澳洲茶树中黄酮类化合物的提取条件。[方法]以澳洲茶树叶的总黄酮提取率为评价指标,通过单因素试验对回流提取澳洲茶树黄酮类化合物的工艺条件进行了研究,再运用正交试验确定最佳提取条件。[结果]常规回流浸提法提取澳洲茶树中黄酮的优化条件为:溶剂使用75% (V/V)乙醇,料液比1:25 g/ml,提取时间为2.0 h,浸提温度80℃,该优化工艺下提取率最高,为6.32%。[结论]回流提取澳洲茶树中的黄酮类物质,此方法设备简单、成本低、操作简单易行,且对环境及人类无毒害,提取率较高,是一种理想的提取方法。

**关键词** 澳洲茶树;黄酮;提取;正交试验

中图分类号 S571 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)07-02126-02

## Reflux Extraction of Flavonoids from the *Melaleuca ahemifolia*

BI Rong-lu, LIU Xiang-yi et al (Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

**Abstract** [Objective] To optimize the extraction conditions for flavonoids from *Melaleuca alternifolia*. [Method] With total flavonoids extraction rate of *Melaleuca alternifolia* as evaluation indexes, the technique for extracting flavonoids from *Melaleuca alternifolia* was studied by single-factor test, the optimal extraction conditions were determined by orthogonal test. [Result] The optimal conditions were 75% (V/V) ethanol, solid-liquid ratio 1:25 (g/ml), extraction time 2.0 h, extraction temperature 80℃, the maximum yield can up to 6.32%. [Conclusion] The method is simple, low cost, simple operation, and non-toxic to the environment and humans with higher extraction rate, which is an ideal extraction method.

**Key words** *Melaleuca alternifolia*; Flavonoids; Extraction; Orthogonal test

澳洲茶树又名互叶白千层 (*Melaleuca ahemifolia*), 是桃金娘科 (Myrtaceae) 白千层属 (*Melaleuca* L.) 植物, 原产于澳洲。该植物的新鲜枝叶经水蒸气蒸馏而得的无色至淡黄色轻油状液体, 植物学上定义为澳洲茶树油, 俗称“茶树精油”。茶树精油属天然油脂, 具有强力的消炎杀菌功效, 现广泛应用于日用卫生制品、皮肤保健品、化妆品、食品香料、药品、有机生物农药等诸多领域<sup>[1-3]</sup>。

目前, 对澳洲茶树的开发利用基本上以其精油为主, 对于除精油外的化学成分的研究与开发利用较少。在生产中, 澳洲茶树枝叶提取精油后剩余部分通常作废弃料处理。有研究表明, 澳洲茶树中含有黄酮类化合物<sup>[4-5]</sup>, 但目前鲜有对澳洲茶树叶中黄酮化合物的提取分离研究。笔者以澳洲茶树叶中总黄酮提取率为指标, 以单因素试验对澳洲茶树总黄酮的溶剂浸提进行研究, 再运用正交试验确定最佳提取条件。通过对澳洲茶树叶黄酮的提取分离的研究, 以期对澳洲茶树叶的二次开发利用提供参考和依据, 同时有助于实现澳洲茶树资源的综合利用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 研究对象: 澳洲茶树树叶, 由云南森源化工有限公司提供, 晾干, 粉碎备用。主要仪器: DZF-6030B 型真空干燥箱, 上海恒科公司; 微型植物组织粉碎机, 北京中兴伟业仪器公司; HH-S 型恒温水浴箱, 郑州长城科工; 722 型可见光分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 微量取液枪, 京青云航空仪表公司; 电子天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司。

主要试剂: 芦丁标准品 98%, 购自南京泽朗植提; 硝酸铝、亚硝酸钠、无水乙醇、石油醚、氢氧化钠, 均为分析纯, 市售。

## 1.2 方法

**1.2.1 线性关系的考察**<sup>[6-9]</sup>。准确称取已于 105℃ 干燥恒重的芦丁标样, 用 30% 乙醇溶解定容于 100 ml 容量瓶, 摇匀备用; 分别取上述芦丁溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 ml 于 6 只 10 ml 容量瓶中, 加入 0.4 ml 亚硝酸钠 (5%), 摇匀。放置 5 min 后加入 0.4 ml 硝酸铝 (10%), 摇匀。6 min 后再加入 5 ml 浓度为 4% 的氢氧化钠, 用 30% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 10 min 后于波长 510 nm 处测定吸光度值  $A$ , 试剂为空白参比。记录数据, 绘制标准曲线, 得到芦丁溶液质量浓度  $C$  与吸光度值  $A$  的回归方程式。

**1.2.2 澳洲茶树样品中黄酮的含量测定。**准确移取澳洲茶树样品待测液于容量瓶中, 按照“1.2.1”项进行显色和吸光度  $A$  的测定, 按照“1.2.1”中得到的回归方程式计算得到待测液中黄酮的浓度  $C$ , 然后按下式计算得到总黄酮含量。

样品的总黄酮含量 (%) =  $(C \times V) / (M \times 1000) \times 100\%$   
式中,  $M$  为样品质量 (g);  $V$  为定容容积 (ml);  $C$  为样品液的总黄酮浓度 (mg/ml)。

## 1.2.3 单因素试验。

**1.2.3.1 乙醇浓度对澳洲茶树黄酮提取率的影响。**准确称取已预处理的澳洲茶树样品于圆底烧瓶中, 分成 6 组, 分别加入乙醇浓度 (V/V) 为 45%、55%、65%、75%、85%、95% 的溶剂, 料液比 1:20 g/ml, 80℃ 水浴中回流 2 h, 提取 2 次。然后将提取液连同样品一起转移至 100 ml 容量瓶中, 蒸馏水定容。然后取上清液部分作为待测液, 按“1.2.1”的方法显色并测定吸光度, 计算澳洲茶树中的总黄酮提取率。

**1.2.3.2 料液比对澳洲茶树黄酮提取率的影响。**准确称取

**作者简介** 毕荣璐 (1990-), 女, 傣族, 云南弥勒人, 硕士研究生, 研究方向: 植物化学。\* 通讯作者, 教授, 博士, 从事天然产物开发研究。

**收稿日期** 2014-02-12

已预处理的澳洲茶树样品于圆底烧瓶中,分成 6 组,加入“1.2.3.1”中得到的最佳乙醇浓度,料液比分别为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 g/ml,80 ℃ 水浴中回流 2 h,提取 2 次。然后将提取液连同样品一起转移至 100 ml 容量瓶中,蒸馏水定容。然后取上清液部分作为待测液,按“1.2.1”的方法显色并测定吸光度,计算澳洲茶树中的总黄酮提取率。

**1.2.3.3 回流时间对澳洲茶树黄酮提取率的影响。**准确称取已预处理的澳洲茶树样品于圆底烧瓶中,分成 6 组,加入“1.2.3.1”中最佳乙醇浓度,料液比参照“1.2.3.2”中最佳料液比,80 ℃ 水浴中分别回流提取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h,提取 2 次。然后将提取液连同样品一起转移至 100 ml 容量瓶中,蒸馏水定容。然后取上清液部分作为待测液,按“1.2.1”的方法显色并测定吸光度,计算澳洲茶树中的总黄酮提取率。

**1.2.4 正交试验。**根据单因素试验结果,以乙醇浓度、料液比、回流时间为考察因素,以澳洲茶树总黄酮提取率为考察指标,设计 3 因素 3 水平  $L_9(3^3)$  正交试验表,各因素水平设计如表 1 所示。

表 1 回流提取  $L_9(3^3)$  正交试验因素水平设计

水平	因素		
	提取时间(A) // h	乙醇浓度(B) // %	料液比(C) // g/ml
1	1.5	65	1:15
2	2.0	75	1:20
3	2.5	85	1:25

**1.2.5 最佳工艺条件验证试验。**在最佳条件组合下,进行 5 次平行验证性试验,以考察最佳条件的合理性和可靠性。

## 2 结果与分析

**2.1 线性关系考察** 以芦丁对照品溶液浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标作图,得到标准曲线。计算得线性回归方程为: $A = 9.7342C + 0.0047$ ,  $R^2 = 0.9998$ 。试验结果表明,当芦丁质量浓度在 10 ~ 90 mg/L 范围内时服从朗伯 - 比尔定律,因此试验所得数据可靠。

### 2.2 单因素试验

**2.2.1 乙醇浓度对澳洲茶树黄酮提取率的影响。**图 1 表明,黄酮类化合物提取率随乙醇浓度的增大而提高,但当乙醇浓度大于 75% (V/V) 以后,得率基本趋于稳定。因此乙醇浓度控制在 65% ~ 85% (V/V) 较好。

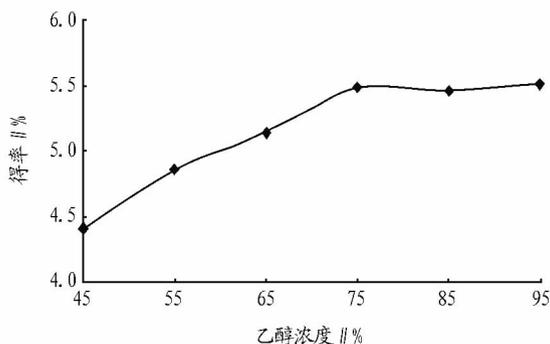


图 1 回流提取乙醇浓度对澳洲茶树黄酮提取率的影响

**2.2.2 料液比对澳洲茶树黄酮提取率的影响。**图 2 表明,当料液比在 1:10 ~ 1:20 g/ml 时,得率随料液比减小而增长较快,当料液比小于 1:25 g/ml 时,得率变化不大。根据萃取理论,黄酮类化合物的溶出与萃取液的浓度梯度有关。料液比越低,梯度越大,溶出率越高。但是料液比低后不便于浓缩处理。料液比 1:20 g/ml 后得率提高趋势减缓,所以料液比选择范围为 1:15 ~ 1:25 g/ml 较好。

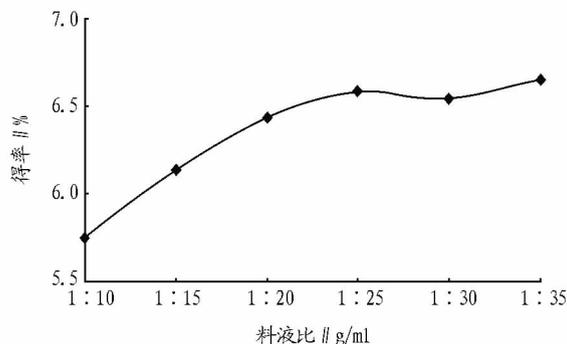


图 2 料液比对澳洲茶树黄酮提取率的影响

**2.2.3 回流时间对澳洲茶树黄酮提取率的影响。**图 3 表明,提取时间在 0.5 ~ 1.0 h 时得率提高速度较快,1.5 h 后变化不大。澳洲茶树叶中黄酮类化合物从细胞内溶解到细胞外,达到浓度平衡需要一定的时间,一般在达到平衡之前,浸提时间越长,溶出的越多,但到溶解平衡以后,继续延长浸提时间对黄酮类化合物的溶出提升不大,反而会增加其他杂质的溶出量。综合考虑,提取时间以 1.5 ~ 2.5 h 为合适。

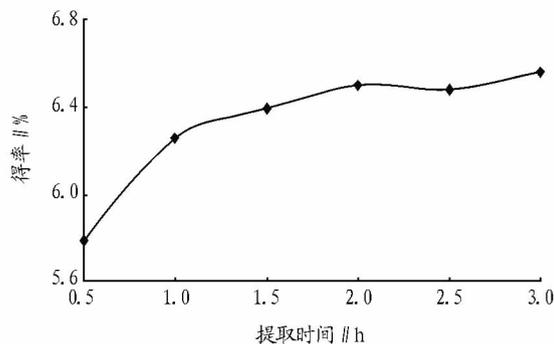


图 3 提取时间对澳洲茶树黄酮提取率的影响

**2.3 正交试验** 在单因素试验的基础上选取 3 因素 3 水平按表 1 的因素水平设计进行正交试验,结果见表 2。

由表 2 可以看出,回流提取的最佳提取条件为  $A_2B_2C_3$ ,即溶剂使用 75% (V/V) 乙醇,料液比为 1:25 g/ml,提取时间为 2.0 h。方差分析显示, $F_{模型} = 16593.312$ ,  $P_{模型} = 0.000$ ;  $F_A = 20.648$ ,  $P_A = 0.046$ ;  $F_B = 1.187$ ,  $P_B = 0.457$ ;  $F_C = 43.066$ ,  $P_C = 0.023$ 。因此说明,C 因素(料液比)对提取率影响最大且显著,A 因素(提取时间)对提取率也影响显著,只有 B 因素(乙醇浓度)影响不显著。极差分析显示,各因素对黄酮提取率的影响的主次顺序依次为料液比 > 提取时间 > 乙醇浓度。

**2.4 最佳工艺条件试验** 按照正交试验所得优化条件进行验证试验。以溶剂使用 75% (V/V) 乙醇,料液比为 1:25

墙堆石坝。在坝体填筑施工过程中,由于石料块径过大,又使用推土机摊平作业,导致左右坝头靠近山体部位集中很大粒径的块石,形成了较多孔隙,如果不进行处理,工程投入使用后,极易出现绕坝渗漏问题,给大坝的安全运行带来隐患。为了解决这一问题,采用了冲填砂浆结石处理方案。无压冲填灌浆施工处理过程历时一个月,消耗水泥 2 299 t,砂料 11 630 t,堆石体体积约 40 000 m<sup>3</sup>,水泥堆积密度按 1.6 × 10<sup>3</sup> kg/m<sup>3</sup>,砂子堆积密度按 1.28 kg/m<sup>3</sup> 计算,则堆石体的孔隙率为 26% 左右,与生产同体积的混凝土材料相比,能节约使用水泥 60% 左右,水泥用量的大幅度减少有效减少了施工过程中水泥释放的水化热,无需再考虑温控措施,因而加快了施工进度,从材料和工期等方面考虑,都实现了成本节约。对坝体进行了钻芯取样,芯样表明筑体密实,筑体强度得到提高。大坝投入运营多年来,状况良好,也没有出现渗漏等问题。因此冲填砂浆结石坝工艺在三座店左右坝头处理工程中获得了较好的工程效益。

## 5 结语

(1) 冲填砂浆结石技术给浆砌石工艺带来的巨大变革,能够实现施工过程机械化,提高工作效率,带来一定的工期效益。

(2) 采用冲填砂浆结石技术建造筑体,能够利用较大粒径的粗骨料,骨料不参与搅拌而直接入仓,实现了多级配骨料综合利用,有效减少单位体积筑体水泥的用量,降低了筑体水泥水化热,有助于简化温控措施,节省大量人力资源和材料资源。

(3) 工艺过程采用的有压浆液冲砂流动方法,有效提高浆砂混合物的流动性,能够将块石空隙填充的更加密实,提高了筑体稳定性和抗渗性能,浆砂混合物拌合后即被利用,流动性较好,又有利于水泥材料强度充分发挥,提高建筑物的工程可靠性。

## 参考文献

- [1] 李千,李珍子,王成山,等. 冲填砂浆结石坝施工方法:中国, CN101581088[P]. 2009-11-18.
- [2] 刚振祥. 浅谈浆砌石大坝的施工技术[J]. 中国新技术新产品, 2011(2):62.
- [3] 张乐家. 试析石坝工程施工工艺和质量管理[J]. 中国新技术新产品, 2013(1):69.
- [4] 金峰,李乐,周虎,等. 堆石混凝土绝热温升性能初步研究[J]. 水利水电技术, 2008(39):59-63.
- [5] 安雪晖,黄绵松,周虎,等. 堆石混凝土施工技术综述[C]//“全国混凝土新技术及其工程应用”技术交流会暨 2007 年年会交流材料. 宁波:中国土木工程学会, 2007:23-31.
- [6] 齐永顺,杨玉红. 自密实混凝土的研究现状及展望[J]. 混凝土, 2007(1):25-28.

(上接第 2127 页)

g/ml,提取时间为 2 h 进行回流提取,测得黄酮提取率平均为 6.32%,RSD 为 0.52%,证明正交试验所得优化条件可靠。

表 2 回流提取正交试验结果

试验号	因素			提取率 %
	提取时间(A)	乙醇浓度(B)	料液比(C)	
1	1	1	1	5.89
2	1	2	2	6.07
3	1	3	3	6.30
4	2	1	2	6.24
5	2	2	3	6.62
6	2	3	1	6.17
7	3	1	3	6.51
8	3	2	1	6.13
9	3	3	2	6.35
K <sub>1</sub>	18.62	18.64	18.19	
K <sub>2</sub>	19.03	18.82	18.66	
K <sub>3</sub>	18.99	18.82	19.43	
极差 R	0.13	0.06	0.42	
较好水平	2.0	75	1:25	
因素主次顺序	2	3	1	

## 3 结论与讨论

试验采用回流提取法探索了乙醇浓度、料液比、回流时间 3 个单因素对澳洲茶树总黄酮提取率的影响,并进行了

L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 正交试验。通过极差分析得到最佳提取工艺条件组合为:乙醇浓度 75%、料液比 1:25 g/ml、提取时间 2.0 h;总黄酮提取率可达 6.32%。此方法设备要求简单、成本低、操作简单易行,且对环境及人类无毒害,提取率较高,是一种理想的提取方法。

## 参考文献

- [1] 陈碧华,吴丽君,李乾振,等. 互叶白千层研究进展[J]. 福建林业科技, 2010,3(4):177-182
- [2] 张燕君,陈利芳. 蒸馏时间与互叶白千层精油主要化学[J]. 林产化学与工业, 2002,22(3):33-35.
- [3] 钟振声,袁裕泉,樊丽妃. 引种互叶白千层茶树油有效抑菌成分分析[J]. 中山大学学报:自然科学版, 2012,51(5):7-13.
- [4] 田玉红,陈志燕,陶明有. 互叶白千层挥发性成分的提取和分析[J]. 广西工学院学报, 2008,22(3):45-48.
- [5] 刘布鸣,董晓敏,黄艳,等. 互叶白千层的化学成分研究[J]. 中草药, 2011,42(7):1282-1284.
- [6] 郭丽冰,王蕾. 降香总黄酮含量测定方法的研究[J]. 中药材, 2008,31(5):694-696.
- [7] 郑媛媛,李辰,封士兰,等. 油橄榄叶中总黄酮含量测定方法探讨[J]. 光谱学与光谱分析, 2011,31(1):547-550.
- [8] LIU J, LUO J G, SUN Y, et al. A simple method for the simultaneous decoloration and deproteinization of crude levan extract from *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 by macroporous resin[J]. Bioresource Technology, 2010, 19(3):1-7.
- [9] KAZUYOSHI YANAGIHARA, AKIHIRO ITO, TETSUYA TOGE, et al. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer celllines established from the gastrointestinal tract[J]. Cancer Research, 1993,53:5815-5821.