

组织破碎法提取牡丹皮中有效成分的研究[△]

王 玥*, 杜守颖#, 袁 航, 戎 堃, 陆显进, 魏长玲, 李慧云, 黎 迎(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

中图分类号 R284.2; R282.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2529-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.12

摘要 目的:探索以组织破碎法提取牡丹皮中的有效成分。方法:以提取的丹皮酚和芍药苷质量分数的综合评分为指标,以乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间为考察因素,采用正交试验优选提取工艺。结果:优选的工艺为用15倍量65%乙醇,以组织破碎法提取1 min。结论:所选工艺简单、可行、提取率高,可用于牡丹皮中丹皮酚和芍药苷的提取。

关键词 组织破碎法; 闪式提取; 牡丹皮; 丹皮酚; 芍药苷; 正交试验

Study on Extraction of Effective Components from *Paeonia suffruticosa* by Tissue-breaking Method

WANG Yue, DU Shou-ying, YUAN Hang, RONG Kun, LU Xian-jin, WEI Chang-ling, LI Hui-yun, LI Ying (School of TCM, Beijing University of TCM, Beijing 100102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore effective components from *Paeonia suffruticosa*. METHODS: The extraction technology was optimized by orthogonal design with mass fraction of paeonol and paeoniflorin as index using the concentration and volume of ethanol, extraction time as factors. RESULTS: The optimized technology was as follows: 15-folds 65% ethanol and extracting for 1 min by tissue-breaking method. CONCLUSIONS: Optimized technology is simple, feasible and high extraction, which is suitable for the extraction of paeonol and paeoniflorin from *P. suffruticosa*.

KEY WORDS Tissue-breaking method; Smashing tissue extraction; *Paeonia suffruticosa*; Paeonol; Paeoniflorin; Orthogonal test

牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮,性微寒,味苦、辛^[1]。现代中药化学和药理研究表明,牡丹皮含有丹皮酚、芍药苷等多种活性成分,其中丹皮酚有抑制动脉粥样硬化、抗心律失常等作用^[2];芍药苷具有降血糖及保护心、脑血管等功能^[3],因此牡丹皮具有广泛的应用前景。已报道的丹皮酚的提取方法有渗漉法、水蒸气蒸馏法、回流法、超临界流体萃取法等^[4-8];芍药苷的提取方法有回流法、煎煮法^[9-10];如兼顾丹皮酚和芍药苷两种有效成分的提取率,需采用双提法^[11]。但以上方法不同程度地存在提取时间长,操作烦琐等问题,且均需加热,这会造成热不稳定性成分芍药苷的降解及挥发性成分丹皮酚的损失^[10]。

组织破碎法的一个核心优势就是提取有效物质的速度非常快,且可在常温下进行。这种方法是在适当溶剂存在下,利用闪式提取器将物料高速粉碎至适当粒度,同时伴有高速搅拌、振动、负压渗滤等外力,一般在几十秒至几分钟即可提取完全^[12]。本研究中,笔者以牡丹皮中丹皮酚和芍药苷为指标成分,利用闪式提取器优化提取工艺,为牡丹皮中丹皮酚和芍药苷的提取方法建立提供思路和数据支持。

1 材料

1.1 仪器

JHBE-50S型中草药闪式提取器(河南金鼎科技发展有限公司)

[△]基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81073057/H2806);教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(No.20090013110007);中药制药过程新技术国家重点实验室开放基金资助课题(No.SK12010Z0304);北京中医药大学自主选题项目(No.0100604034)

* 实验师, 硕士。研究方向: 中药新剂型与新技术。E-mail: angelaaa312312@yahoo.com.cn

通信作者: 教授, 博士研究生导师, 博士。研究方向: 中药新剂型与新技术。E-mail: dushouying@263.net

公司); 1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司); UV-2000型紫外-可见分光光度计(日本日立公司); CX-300型超声波清洗器(北京医疗设备厂, 功率: 300 W, 频率: 40 kHz); DZ-2BC型真空干燥箱(天津泰斯特仪器有限公司); AEG-220型电子分析天平(日本岛津公司)。

1.2 药材

牡丹皮饮片, 购于河北安国以岭中药饮片有限公司(批号: 100902)。

1.3 试剂

丹皮酚、芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为110708-200505、110736-200526); 甲醇、乙腈、磷酸(色谱纯, 美国Fisher公司); 乙醇(分析纯, 北京化学试剂公司); 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 丹皮酚的含量测定

2.1.1 色谱条件^[1] 色谱柱: Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(60:40, V/V); 检测波长: 274 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 室温; 进样量: 10 μl。色谱见图1A、B。

2.1.2 标准曲线的制备 称取丹皮酚对照品适量, 以甲醇稀释成质量浓度为100 μg/ml的对照品溶液。精密移取此对照品溶液2、4、5、8、10 ml, 分别置10 ml量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 分别取续滤液10 μl, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标, 丹皮酚质量浓度(x)为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $y=64.2860x+26.4710$ ($r=0.9995, n=5$)。

2.1.3 供试品溶液的制备 按2010年版《中国药典》(一部)牡丹皮中丹皮酚含量测定项下供试品溶液制备方法操作。

2.1.4 精密度试验 取“2.1.2”项下丹皮酚对照品溶液适量,

按上述色谱条件重复进样测定6次。结果,RSD=0.33% (n=6),表明仪器精密度良好。

2.1.5 加样回收率试验 取已知质量浓度(8.25 μg/ml)的丹皮酚样品1 ml,共6份,分别加入质量浓度为10 μg/ml的丹皮酚对照品溶液1 ml,照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,并按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果,丹皮酚的平均回收率为100.5%,RSD=1.99% (n=6)。

2.2 芍药苷的含量测定

2.2.1 色谱条件^[13] 色谱柱: Grace Smart RP18(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸水(14:86, V/V); 检测波长: 230 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 室温; 进样量: 10 μl。色谱见图1C、D。

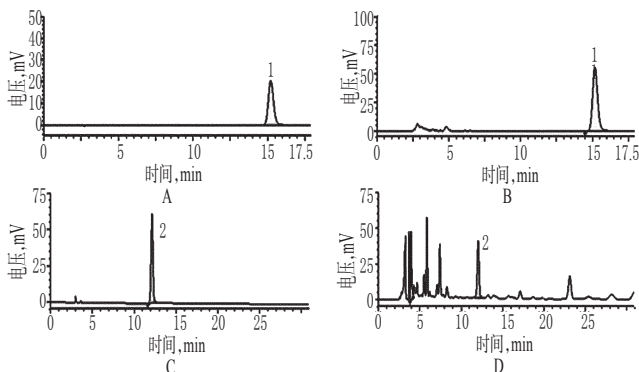


图1 高效液相色谱图

A. 丹皮酚对照品; B. 丹皮酚供试品; C. 芍药苷对照品; D. 芍药苷供试品; 1. 丹皮酚; 2. 芍药苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. paeonol control; B. test sample of paeonol; C. paeoniflorin control; D. test sample of paeoniflorin; 1. paeonol; 2. paeoniflorin

2.2.2 芍药苷标准曲线的制备 称取芍药苷对照品适量,同“2.1.2”项下方法操作,制备质量浓度为100 μg/ml的对照品溶液,并绘制芍药苷标准曲线,得回归方程为 $y=5.741 1x+1.568 6$ ($r=0.999 7, n=5$)。

2.2.3 供试品溶液的制备 由于2010年版《中国药典》未收录牡丹皮中芍药苷含量测定的供试品溶液制备方法,故笔者对芍药苷提取工艺进行了研究。

(1) 提取溶剂的选择: 取牡丹皮饮片适量,粉碎过60目筛,取粉末7份,每份约0.5 g,分别加入水、甲醇与20%、30%、50%、60%、75%乙醇各50 ml,超声处理30 min,放冷,补足失质量,摇匀,滤过,并分别测定其中丹皮酚质量分数。结果,芍药苷的质量分数依次为0.124%、0.167%、0.346%、0.363%、0.336%、0.337%、0.311%,RSD=1.69% (n=7),表明用乙醇作溶剂的提取率明显高于水与甲醇,而不同体积分数乙醇的提取率基本一致,当其体积分数过高时提取率略有下降,但不明显。故单独提取牡丹皮中的芍药苷时,采用30%乙醇为溶剂,而笔者提取芍药苷的同时也需要提取丹皮酚,故在后续试验中采用高体积分数的乙醇为提取溶剂。

(2) 浸泡时间的选择: 取牡丹皮饮片适量,粉碎过60目筛,取粉末3份,每份约0.5 g,分别加入30%乙醇50 ml,再分别采取不浸泡、浸泡2 h、浸泡4 h的处理方式,其余操作同“2.2.3(1)”项下方法进行。结果,芍药苷的质量分数依次为0.358%、0.346%、0.348%,RSD=1.95% (n=3),表明不同浸泡时间对提取液中芍药苷的质量分数没有显著性影响,故选择不浸泡

直接超声提取。

(3) 超声时间的选择: 取牡丹皮饮片适量,粉碎过60目筛,取粉末4份,每份约0.5 g,分别超声处理10、20、30、40 min,其余操作同“2.2.3(1)”项下方法进行。结果,芍药苷的质量分数分别为0.344%、0.353%、0.358%、0.355%,表明超声10 min的提取率比较低,而超声20、30、40 min的提取率没有显著性差异,RSD=0.79% (n=4),故选择超声时间为20 min。

2.2.4 精密度试验 取芍药苷对照品适量,以甲醇稀释为质量浓度为100 μg/ml的对照品溶液,按上述条件重复进样测定6次。结果,RSD=0.73% (n=6),表明仪器精密度良好。

2.2.5 加样回收率试验 精密量取已知质量浓度(0.358 μg/ml)的芍药苷样品1 ml,共6份,分别加入质量浓度为0.541 μg/ml的对照品溶液1 ml,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果,芍药苷的平均回收率为103.1%,RSD=1.95% (n=6)。

2.3 正交试验优选丹皮酚和芍药苷的提取工艺

2.3.1 试验设计 牡丹皮中含有大量淀粉,水提液较为黏稠,不利于后续处理;丹皮酚为小分子化合物,水溶性差^[2]。因此,为兼顾提取两种有效成分,欲选取高体积分数的乙醇作为提取溶剂。根据笔者经验和预试验结果,选取乙醇体积分数(A)、乙醇用量(B)、提取时间(C)为考察因素,每个因素选取3个水平。因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A, %	B, 倍	C, min	D(误差)
1	65	15	1.0	1
2	75	20	1.5	2
3	85	25	2.0	3

2.3.2 试验方法与结果 称取牡丹皮饮片40 g,按表1安排进行提取,滤过,滤液定容至1 000 ml量瓶中,测定提取液中芍药苷、丹皮酚的质量分数和转移率(丹皮酚转移率=提取液中丹皮酚质量分数/药材中丹皮酚质量分数;芍药苷转移率=提取液中芍药苷质量分数/药材中芍药苷质量分数),并以芍药苷、丹皮酚质量分数的综合评分(综合评分=丹皮酚质量分数×50%/1.182 3+芍药苷质量分数×50%/0.809 6)为评价指标优选工艺。每份试验平行操作2次,取平均值。正交试验结果见表2;方差分析结果见表3。

由表2、表3可知,各因素对芍药苷和丹皮酚质量分数的影响大小为B>A>C。其中,乙醇体积分数、乙醇用量对有效成分质量分数有显著性影响($P<0.05$),最佳提取工艺为A₁B₁C₁,即用65%乙醇15倍量,提取1 min。

2.3.3 工艺验证试验 取牡丹皮饮片40 g,共3份,分别按上述最佳提取工艺提取,并测定提取液中丹皮酚和芍药苷质量分数。结果,丹皮酚的平均质量分数为1.185%,RSD=1.030% (n=3);芍药苷的平均质量分数为0.811%,RSD=0.655% (n=3),与正交试验最高值相当,表明选取的工艺合理、可行。

2.4 提取方法的比较

参照文献方法^[11],采用双提法提取牡丹皮,并与组织破碎法进行比较。结果,采用双提法得到的丹皮酚质量分数为0.971%,芍药苷质量分数为0.354%,表明组织破碎法提取牡丹皮中芍药苷的效果明显优于双提法,转移率约为双提法的

表2 正交试验结果

Tab 2 Result of orthogonal design

试验号	A	B	C	D(误差)	丹皮酚		芍药苷		丹皮酚权重	芍药苷权重	综合评分
					质量分数, %	转移率, %	质量分数, %	转移率, %			
1	1	1	1	1	1.182 2	88.704	0.809 6	220.600	0.500 0	0.500 0	1.000 0
2	1	2	2	2	0.744 5	55.856	0.440 9	120.132	0.314 8	0.272 3	0.587 1
3	1	3	3	3	0.644 5	48.356	0.461 9	125.860	0.272 6	0.285 3	0.557 8
4	2	1	2	3	0.978 0	73.380	0.787 9	214.675	0.413 6	0.486 6	0.900 2
5	2	2	3	1	0.875 5	65.690	0.650 3	177.187	0.370 3	0.401 6	0.771 9
6	2	3	1	2	0.473 4	35.521	0.326 5	88.962	0.200 2	0.201 6	0.401 9
7	3	1	3	2	1.031 1	77.365	0.451 8	123.095	0.436 1	0.279 0	0.715 1
8	3	2	1	3	0.598 2	44.885	0.307 3	83.727	0.253 0	0.189 8	0.442 8
9	3	3	2	1	0.513 9	38.559	0.253 2	69.003	0.217 4	0.156 4	0.373 7
I _{丹皮酚}	2.571	3.191	2.254								
II _{丹皮酚}	2.326	2.218	2.236								
III _{丹皮酚}	2.143	1.632	2.551								
R _{丹皮酚}	16.619	17.768	16.590								
I _{芍药苷}	1.712	2.049	1.443								
II _{芍药苷}	1.765	1.398	1.229								
III _{芍药苷}	1.012	1.042	1.564								
R _{芍药苷}	7.070	7.240	6.039								
I _{综合}	2.145	2.615	1.845								
II _{综合}	2.074	1.802	1.800								
III _{综合}	1.532	1.333	1.487								
R _{综合}	11.250	11.862	8.855								

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.150	2	0.075	12.651	<0.01
B	0.561	2	0.280	47.285	<0.01
C	0.016	2	0.008	1.388	
D(误差)	0.065	9	0.006		

注: $F_{0.05}(2, 9) = 14.26$ note: $F_{0.05}(2, 9) = 14.26$

2.3倍;提取丹皮酚的效果虽然也要优于双提法,但转移率仅为88%,笔者推测可能是丹皮酚在甲醇中的提取效果要优于乙醇造成的。

为证明该观点,笔者选取同一批牡丹皮饮片,将制备丹皮酚供试品溶液的溶剂分别替换为35%、65%、75%、85%乙醇,其余工艺流程与2010年版《中国药典》中牡丹皮项下丹皮酚提取方法一致,得到丹皮酚质量分数分别为0.554%、0.929%、0.972%、0.891%的溶液,其中以65%、75%、85%乙醇为溶剂,丹皮酚质量分数无统计学差异($RSD=4.35\%$),平均值为0.931%。同样采用超声法,以甲醇为溶剂制备的提取液中丹皮酚质量分数作基准,高体积分数乙醇为溶剂制备得到的提取液中丹皮酚的平均转移率为70.0%。由此可知,丹皮酚在甲醇中的提取效果要优于乙醇。但是甲醇有毒,制备时不适于作溶剂。由于一些文献^[7,9]报道采用乙醇为溶剂,同时考虑到芍药苷采用乙醇提取效果较好,为了同时提取芍药苷与丹皮酚,本研究采用乙醇为溶剂。

同样以65%乙醇为溶剂,采用超声法得到的提取液中丹皮酚转移率为70%,而采用组织破碎法提取丹皮酚的转移率为88%,可见组织破碎法提取牡丹皮的效果也要优于超声法。

3 讨论

2010年版《中国药典》中未收录牡丹皮中芍药苷供试品溶液的制备方法,无法求算提取液中芍药苷的转移率,故本研究

借鉴2010年版《中国药典》白芍项下芍药苷的提取方法,也采用超声处理作为含量测定基准,最优工艺为:取牡丹皮粉末(过60目筛)约0.5g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入30%乙醇50ml,密塞,摇匀,称定质量,超声处理20min,放冷,用30%乙醇补足失质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。本研究所采用的牡丹皮饮片按照此法进行处理,芍药苷质量分数为0.367%。

丹皮酚为小分子物质,微溶于水,故设计因素水平时,将乙醇体积分数设定为65%、75%、85%不同的3个水平。通过方差分析表明,65%乙醇提取丹皮酚效果最好,故并非乙醇体积分数越高,提取率越高,原因可能是丹皮酚即2-羟基-4-甲氧基苯乙酮,其结构中既有亲水基团,又有亲酯基团造成的^[13]。

组织破碎法提取牡丹皮中芍药苷的效果明显优于双提法,转移率约为双提法的2.3倍。这可能是由于芍药苷属于单萜糖苷类化合物,具有热不稳定性,双提法受热时间过长,导致芍药苷转移率不高,且操作烦琐、耗电量高^[10]。

双提法需先进行水蒸气蒸馏,药渣滤过后再进行水提,故分别采用500W的电热套和800W的电磁炉为热源,共需6.5h,耗电量为4.6kW;而采用本研究所选方法进行牡丹皮提取仅需1min,按照800W功率计算,耗电量为0.013kW,提取时间仅为双提法的1/390,耗电量为双提法的1/345。

为了闪式提取器的安全使用,提取电压不宜超过200V,单次提取时间不宜超过2min。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:160-161, 96-97.
- [2] 张旃, 李明昌. 丹皮酚的药理作用及机制[J]. 中医药信息, 2006, 23(2):21.
- [3] 胡南, 许惠玉, 陈志伟, 等. 芍药苷的药理学研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2007, 28(9):1 093.

正交试验优选芩榆烧伤凝胶中黄芩、关黄柏、地榆的提取工艺^Δ

康雨彤^{1*}, 贺金华¹, 毛艳¹, 戎晓娟¹, 蔡晓翠¹, 李维强² (1.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004; 2.解放军69220部队医院药剂科, 新疆库车 842000)

中图分类号 R284.2;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2532-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.13

摘要 目的: 优选芩榆烧伤凝胶中黄芩、关黄柏、地榆的提取工艺。方法: 以乙醇体积分数、乙醇用量和渗漉速度为考察因素, 以浸膏得率和黄芩苷、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀质量分数的综合评分为指标, 采用正交试验优选黄芩、关黄柏的提取工艺; 选取相同的考察因素, 以没食子酸质量分数和浸膏得率的综合评分为指标, 采用正交试验优选地榆提取工艺。结果: 最佳提取工艺分别为黄芩、关黄柏用40倍量70%乙醇, 以4 ml/min的流速渗漉; 地榆用30倍量5%乙醇, 以3 ml/min的流速渗漉。结论: 优选的提取工艺合理、可行, 可用于芩榆烧伤凝胶中黄芩、关黄柏、地榆的提取。

关键词 芩榆烧伤凝胶; 提取工艺; 正交试验; 黄芩; 关黄柏; 地榆

Optimization of Extraction Process for *Scutellaria baicalensis*, *Phellodendron amurense* and *Sanguisorba officinalis* in Qinyu Burns Gel by Orthogonal Test

KANG Yu-tong¹, HE Jin-hua¹, MAO Yan¹, RONG Xiao-juan¹, CAI Xiao-cui¹, LI Wei-qiang² (1.Xinjiang Institute of Material Medica, Urumqi 830004, China; 2.Dept. of Pharmacy, No. 69220 Military Hospital of PLA, Xinjiang Kuche 842000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize extraction technology of *Scutellaria baicalensis*, *Phellodendron amurense* and *Sanguisorba officinalis* in Qinyu burns gel. METHODS: The extraction technology of *S. baicalensis* and *P. amurense* were optimized by orthogonal design with the concentration and amount of ethanol and percolation speed as factors taking extract yield and the contents of baicalin, berberine hydrochloride and palmatine chloride as index. The extraction technology of *S. officinalis* was optimized by orthogonal design with same factors using the content of gallic acid and extract yield as index. RESULTS: The extraction process was as follows: *S. baicalensis* and *P. amurense* was extracted with 40-fold 70% ethanol at the percolation speed of 4 ml/min; *S. officinalis* was extracted with 30-fold 5% ethanol at the percolation speed of 3 ml/min. CONCLUSIONS: Optimized extraction process is reasonable and feasible, and it can be used for the extraction of *S. baicalensis*, *P. amurense* and *S. officinalis* in Qinyu burns gel.

KEY WORDS Qinyu burns gel; Extraction process; Orthogonal test; *Scutellaria baicalensis*; *Phellodendron amurense*; *Sanguisorba officinalis*

芩榆烧伤凝胶是在芩榆烧伤液的研究基础上, 针对烧伤液易产生皮肤刺激、作用于病灶部位的药物浓度较低会制约其疗效等问题, 结合凝胶剂易于涂布使用、局部给药后易吸

收、不污染衣物、稳定性较好等特点, 进一步研发的治疗烧、烫伤的中药制剂^[1-2]。处方中黄芩具有清热、解毒、止血的功效, 在临床上主要用于抗菌消炎和抗感染^[3]; 关黄柏具有清热燥

- [4] 聂晓玉, 王雅亮. 丹皮酚的提取分离工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(4): 225.
- [5] 王立, 侯世祥. 牡丹皮药材的最适提取工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(8): 569.
- [6] 李利红, 张晓静. 正交试验法优选丹皮酚提取工艺[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(14): 5 707.
- [7] 狄留庆, 谢辉. 牡丹皮中丹皮酚提取方法及工艺参数的优化[J]. 中药材, 1998, 21(1): 34.
- [8] 王立红, 周丽莉. 超临界CO₂萃取徐长卿中丹皮酚的工艺[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(1): 53.

- [9] 王留兴. 牡丹皮乙醇提取工艺研究[J]. 长春中医药大学学报, 2008, 24(1): 35.
- [10] 张晓东, 唐进法, 李学林. 不同煎煮时间牡丹皮汤液中丹皮酚和芍药苷含量变化分析[J]. 中医研究, 2009, 22(6): 18.
- [11] 吴铁, 崔燎, 于琼. 由丹参、牡丹皮组成的双丹制剂防治骨质疏松症的新用途[P]. 中国专利: CN101032556, 2007-09-12.
- [12] 刘延泽. 植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践[J]. 中国天然药物, 2007, 5(6): 401.
- [13] 王森, 朱卫丰, 欧水平, 等. 丹皮酚理化性质及体外经皮渗透性的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(2): 215.

(收稿日期: 2012-07-15 修回日期: 2012-09-02)

^Δ 基金项目: 新疆维吾尔自治区科技计划项目(No. 201110105)
* 助理研究员, 硕士。研究方向: 中药制剂与质量标准。电话: 0991-2326572。E-mail: 526749931@qq.com