闪式提取赤芍总苷的工艺研究

刘玉峰[1]，王程程[1]，刘洋[1]，王永杰[1]，卢晓丹[2]，陈立江[1]
（1.辽宁大学药学院，辽宁沈阳 110036）（2.沈阳市第120中学，辽宁沈阳 110031）

摘要：以总苷提取量为评价指标，采用闪式提取器提取赤芍总苷，并利用正交试验法对影响赤芍总苷提取量的因素进行条件优化。结果显示，闪式提取赤芍总苷的最佳提取工艺为：液料比30:1（以水为提取溶剂），浸泡6 h，提取电压为70 V，提取时间2 min，在此条件下经过3次提取所得赤芍总苷的平均提取率为4.84%。

关键词：赤芍总苷；闪式提取；正交试验
文章篇号：1673-9078(2012)4-416-419

Study on the Tissue-smashing Extraction Process of Total Paeony Glycoside

LIU Yu-feng[1], WANG Cheng-cheng[1], LIU Yang[1], WANG Yong-jie[1], LU Xiao-dan[2], CHEN Li-jiang[1]
(1.College of Pharmacy, Liaoning University, Shenyang 110036, China)
(2. Shenyang 120 Middle School, Shenyang 110031, China)

Abstract: Total paeony glycoside was extracted by tissue-smashing extraction and the extraction conditions were optimized by orthogonal test using the content of total paeony glycoside as main indices. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: liquid-solid ratio 30:1, soaking time 6 h, extraction time 2 minutes and extraction voltage 70 V, under which the total paeony glycoside yield was up to 4.84%.

Key words: total paeony glycoside; smashing tissue extraction; orthogonal design

赤芍为毛茛科植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)或川赤芍(*Paeonia veitchii* Lynch.)的干燥根[1]，其主要有效成分有芍药苷、芍药内酯苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、没食子酰芍药苷等单萜苷类化合物（统称为赤芍总苷），具有清热凉血、散瘀止痛之功效[2]。现代药理学研究表明[3,4]，赤芍总苷在治疗心血管疾病及抗肿瘤方面具有很好的疗效。黄海兰等[5]利用DPPH法、β-胡萝卜素法和还原力法评估赤芍提取物的抗氧化活性，试验证明赤芍及其提取物是一种高效价廉的天然抗氧化剂，可用作食品添加剂。因此，探讨从赤芍中提取赤芍总苷的工艺具有十分重要的意义。

关于赤芍总苷提取工艺的研究近几年的报道较多[6,7]，但文献报道多采用不同浓度的乙醇或水加热回流提取的方法，此方法存在能耗高、耗时长、有效成分损失大等不足。闪式提取[8]是一种依靠高速机械剪切力和超动力分子渗滤的技术，在室温及较少溶剂存在下，数秒内可使有效成分达到组织内外平衡，再通过过滤达到提取的目的。整个过程可节约大量时间、溶剂和能源，具有快速、完全、高效等特点[9]。

本研究首次尝试采用闪式提取方法从赤芍中提取赤芍总苷，通过正交试验设计确定提取的最佳工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

赤芍，购自辽宁大连普兰店，经辽宁省药品检验所王维宁副主任药师鉴定为毛茛科植物芍药的干燥根，凭证标本（20090301）存于辽宁大学药学院药物化学二室；芍药苷标准品，中国药品生物制品检定所，批号：110736-200934；芍药苷对照品，本实验室自制，经HPLC测定，纯度>98%；甲醇，色谱纯，山东禹王实业有限公司化工分公司；苯酚、硫酸、正丁醇等其他试剂均为分析纯；蒸馏水。

1.2 仪器与设备

UV-2550紫外/可见分光光度计，日本岛津仪器公

收稿日期：2011-12-14
基金项目：辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2011005)；辽宁省自然科学基金项目(20092015)；沈阳市科技项目(F10-205-1-28)；辽宁大学青年科研基金项目(2009LDQN-KJ-11)
作者简介：刘玉峰(1979-)，男，博士，副教授，主要从事天然产物活性化学成分的研究
通讯作者：陈立江(1969-)，女，教授，主要从事中药新剂型及其机理研究

司；JMF-320系列多级闪蒸器，JHBE-50T闪式提取器，河南金鼎科技发展有限公司；TB-114精密电子天平，北京赛多利斯仪器系统有限公司；RE 52-99旋转蒸发仪，上海亚荣生化仪器厂；KQ5200DB数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；DZF-6020型真空干燥箱，巩义市予华仪器有限责任公司；GZX-9246 MBE电热恒温鼓风干燥箱，上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.3 试验方法

1.3.1 闪式提取赤芍总苷

称取赤芍药材 50 g，以水为溶剂，进行闪式提取，破碎提取后静置 30 min，减压抽滤除去滤渣，滤液用闪式蒸发器浓缩后，加蒸馏水定容到 100 mL，再用同体积正丁醇萃取 3 次，合并正丁醇层，旋干，用甲醇溶解并定容至 10 mL，精密量取溶液 0.2 mL，置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，从中精密量取 1 mL，置 50 mL 量瓶中，用甲醇定容至刻度，摇匀，制备得到供试品溶液。

1.3.2 最大吸收波长的确定

用苯酚-浓硫酸试剂与芍药苷对照品和所提取样品（赤芍总苷）分别进行反应，于200~800 nm波长范围内进行扫描，测定二者的最大吸收波长。

1.3.3 赤芍总苷的含量测定

1.3.3.1 标准曲线的绘制

精密称取干燥至恒重的芍药苷标准品20.1 mg，置50 mL量瓶中，加甲醇溶解并定容，摇匀后精密量取10 mL置25 mL量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，得到芍药苷对照品溶液。精密吸取芍药苷对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL分别置于5 mL量瓶中，加甲醇定容，摇匀，分别取2.0 mL置于具塞试管中，加6%苯酚试液1.0 mL，并迅速滴加浓硫酸5.0 mL，摇匀后，放置5 min，置沸水浴中加热15 min，冷却至室温。同时另取甲醇2.0 mL按上述步骤同法操作，作为空白对照，分别对其进行吸光度测定，以浓度（x）为横坐标，吸光度（y）为纵坐标，绘制标准曲线，同时进行回归分析。

1.3.3.2 样品含量的测定

精密吸取供试品溶液2.0 mL，按“1.3.3.1”项下同法操作，样品经苯酚-浓硫酸试剂反应后用紫外分光光度计分别测定其吸光度，代入标准曲线中，以赤芍总苷的提取量为考察指标，计算50 g赤芍中赤芍总苷的提取量。

1.3.4 赤芍总苷最佳提取条件的确定

根据相关文献资料和预试验，选取不同的液料比（A）、浸泡时间（B）、提取电压（C）、提取时间（D）为考察因素，以紫外分光光度法测得赤芍总苷的提取量为考察指标，进行单因素试验和正交试验，优化最佳提取条件。

2 结果与讨论

2.1 最大吸收波长的确定

苯酚-浓硫酸试剂与芍药苷对照品、所提取样品（赤芍总苷）进行显色反应，分光光度法测定二者的最大吸收波长均在489 nm处，结果见图1。

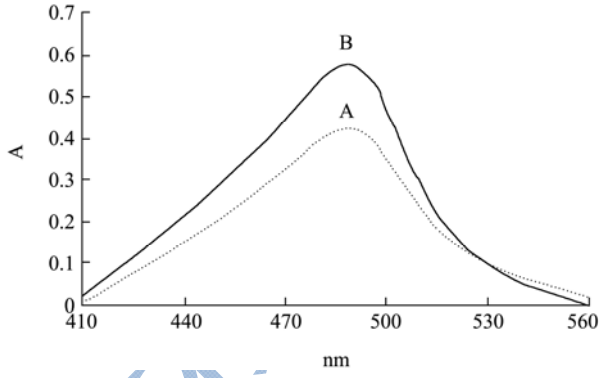


图1 芍药苷对照品(A)与所提取样品(B)显色反应的最大吸收波长

Fig.1 Maximum absorption wavelength of paeoniflorin reference substance (A) and sample (B) reacted with benzene-phenol and concentrated sulfuric acid

2.2 赤芍总苷的含量测定

由“1.3.3.1”的试验操作，于489 nm处以浓度（x）为横坐标，吸光度（y）为纵坐标作标准曲线，得回归方程：y=8.9732x-0.0063，r=0.9995，浓度在0.01608~0.09648 mg/mL范围内与吸光度呈线性关系。

2.3 单因素试验

2.3.1 液料比对提取的影响

固定试验条件：选取浸泡时间12 h、提取电压70 V、提取时间1 min，设计液料比（mL/g）分别为10:1、20:1、30:1、40:1、50:1，考察液料比对赤芍总苷提取率的影响，结果如图2所示。

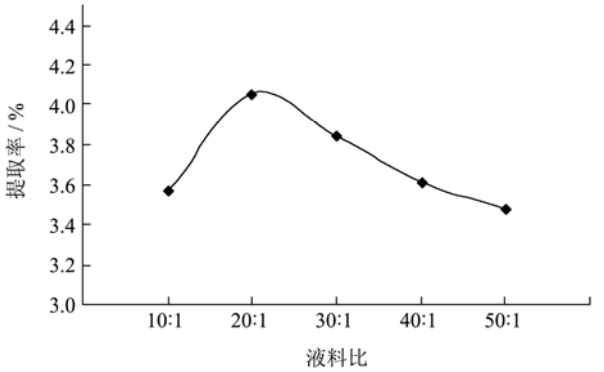


图2 液料比对赤芍总苷提取率的影响

Fig.2 Effects of liquid-solid ratio on the extraction yield of total paeony glycoside

由图2可以得到，液料比为20:1时，赤芍总苷提取率最大，再加大溶剂用量，提取率反而降低。故以液料比20:1为中间点，选取10:1、20:1、30:1作为正交试验水平。

2.3.2 浸泡时间对提取的影响

固定试验条件：选取液料比20:1、提取电压70 V、提取时间1 min，设计浸泡时间分别为0、6、12、18、24、30 h考察浸泡时间对赤芍总苷提取率的影响，结果如图3所示。

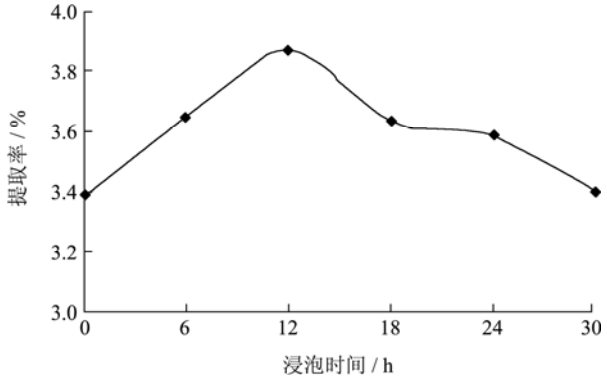


图3 浸泡时间对赤芍总苷提取率的影响

Fig.3 Effects of soaked time on the extraction yield of total paeony glycoside

由图3可以得到，浸泡时间为12 h时，赤芍总苷提取率最大，18 h后提取率随浸泡时间延长而降低，这可能是由于长时间浸泡在水中受微生物等影响所致。故选取0、6、12 h作为正交试验水平。

2.3.3 闪式提取电压对提取的影响

固定试验条件：选取液料比20:1、浸泡时间12 h、提取时间1 min，设计提取电压分别为30、50、70、100、120、150 V考察闪提电压对赤芍总苷提取率的影响，结果如图4所示。

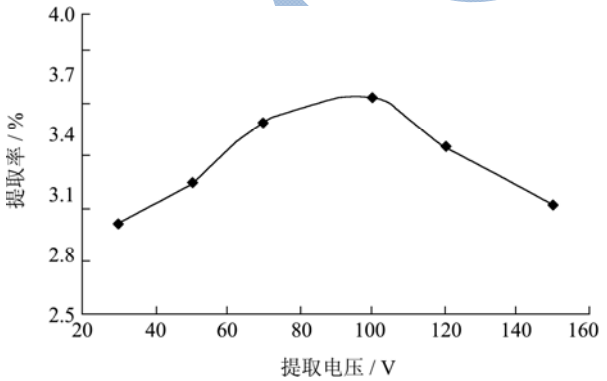


图4 提取电压对赤芍总苷提取率的影响

Fig.4 Effects of extracted voltage on the extraction yield of total paeony glycoside

由图4可以得到，提取电压为100 V时，赤芍总苷提取率最大，在30~100 V时，随闪式提取电压的增大，赤芍总苷提取率呈升高趋势，当闪提电压超过100 V后，提取率则呈明显下降趋势。从节约能源角度考虑，选取50、70、100 V作为正交试验水平。

2.3.4 闪式提取时间对提取的影响

固定试验条件：选取液料比20:1、浸泡时间12 h、提取电压70 V，设计闪式提取时间分别为0.5、1、2、4、6、8 min考察提取时间对赤芍总苷提取率的影响，结果如图5所示。

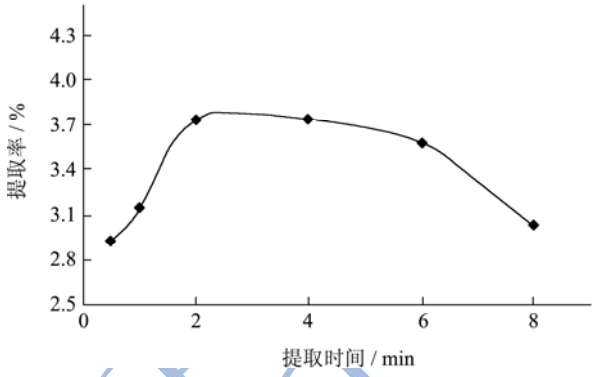


图5 提取时间对赤芍总苷提取率的影响

Fig.5 Effects of extracted time on the extraction yield of total paeony glycoside

由图5可以得到，在0.5~2.0 min时，赤芍总苷提取率随时间而增大，在2.0~6.0 min时提取率基本保持不变，6.0 min之后提取率呈明显下降趋势，因此确定提取时间2、4、6 min作为正交试验水平。

2.4 正交试验结果

2.4.1 正交试验设计

在单因素试验的基础上，选取液料比（A）、浸泡时间（B）、提取电压（C）、提取时间（D）为考察因素，按$L_9(3^4)$正交试验表安排试验，其试验因素水平见表1。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

水平	A [液料比/(mL/g)]	B (浸泡时间/h)	C (提取电压/V)	D (提取时间/min)
1	10:1	0	50	2
2	20:1	6	70	4
3	30:1	12	100	6

2.4.2 正交试验结果及分析

在$L_9(3^4)$正交试验中各因素和水平共组建9种组合方式，每组试验结果及分析见表2和表3。

由表2数据中极差可以看出，影响提取效果的各因素作用主次为：浸泡时间>提取电压>提取时间>液料比。方差及显著性分析见表3：以A因素为误差项进行方差估算表明，当显著性水平为0.1时，因素B、C对试验结果有显著影响，而因素A、D的影响不显著。在交互作用可以忽略时，把各主要因素的最优水平组合起

来，即$A_3B_2C_2D_1$，就是赤芍总苷最佳的制备工艺条件。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果表

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

序号	A	B	C	D	赤芍总苷提取量/mg
1	1	1	1	1	1684.62
2	1	2	2	2	1943.72
3	1	3	3	3	1364.22
4	2	1	2	3	1932.58
5	2	2	3	1	1876.86
6	2	3	1	2	1408.80
7	3	1	3	2	1601.04
8	3	2	1	3	1840.64
9	3	3	2	1	1862.93
K1	1664.19	1739.41	1644.69	1808.14	
K2	1739.41	1887.07	1913.08	1651.19	
K3	1768.20	1545.32	1614.04	1712.48	
R	104.01	341.76	299.04	156.95	

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	*F* 比	显著性 *P*
A	17306.130	2	1.000	
B	176276.895	2	10.186	*
C	162397.450	2	9.384	*
D	37539.845	2	2.169	
误差	17306.13	2		

注：$F_{0.1}$=9.000。

2.4.3 验证性试验

表4 验证试验结果

Table 4 Results of verification test

序号	赤芍总苷提取量/mg	平均提取量/mg	平均提取率/%	RSD /%
1	2475.71			
2	2392.12	2421.84	4.84	1.96
3	2397.70			

由于$A_3B_2C_2D_1$是正交试验中没有的组合，为了保证提取工艺的重现性和可行性，对优选的方案进行验证试验，按最佳提取条件进行3次平行提取，测定赤芍总苷提取量的平均值、平均提取率及RSD，试验数据见表4，验证试验结果明显高于试验组中的最大值，试验表明，该工艺稳定可行，重现性较好。

3 结论

3.1 中药提取纯化关键技术的研究已成为热点。闪式提取器是根据组织破碎原理设计而成的一种操作简便、效率高、节约能源的新型提取器，可用于植物软、硬材料快速提取。该仪器提取时间短，其所用时间仅为常规回流提取的数十至数百分之一。同时可使溶剂快速蒸发并与浓缩液分离，能最大限度保护植物有效成分不会因受热破坏，因此以水为溶剂时，特别适合单萜苷类强极性成分的提取，为快速高效获得赤芍总苷提供了新方法。

3.2 赤芍总苷为赤芍中主要活性物质，易溶于水、甲醇、乙醇、正丁醇等强极性溶剂，利用闪式提取法提取赤芍总苷，具有快速、高效、节源、操作简便等优点，是传统回流提取法无法相比的。本试验以水作为提取溶剂，对赤芍进行提取，可避免传统醇水加热回流法中溶剂量消耗大、耗时长、回收困难、且易燃等缺点，从而达到安全、绿色、环保、经济的目的。

3.3 在赤芍总苷提取工艺的研究中，多采用HPLC法，以芍药苷为指标来测定总苷含量，但样品前处理及流动相的配制较繁琐；另有文献报道[10]，赤芍总苷的指纹图谱分析中，特征峰达22个之多，仅以芍药苷作为指标，并不能完全、真实地反映赤芍总苷的提取量。而用紫外分光光度法测定总苷含量，操作方便，简单易行，可行性强，因此可用来对赤芍总苷进行定量分析。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中国药典一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010

[2] 冀兰鑫,黄浩,李长志,等.赤芍药理作用的研究进展[J].药物评价研究,2010,33(3):233-236

[3] 阮金兰,赵钟祥,曾庆忠,等.赤芍化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中国药理学通报,2003,19(9):965-970

[4] Dhalla N S, Elmoselhi A B, Hata T, et al. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury [J]. Cardiovasc Res, 2000, 47(3): 446-456

[5] 黄海兰,王国明,徐波,等.赤芍抗氧化活性及其成分研究[J].食品科学,2007,28(7):76-82

[6] 彭晓霞,张振巍.二次正交旋转组合设计法优化赤芍醇提工艺[J].中药材,2010,33(6):991-994

[7] 周洪伟,许文博,王玉蓉.赤芍总苷提取与大孔树脂纯化工艺研究[J].中医药学报,2011,39(1):48-51

[8] 刘娟,徐倩,赵旭伟.闪式提取法提取龙牙楤木中总皂苷的工艺研究[J].现代食品科技,2010,26(6):622-624

[9] 林琎,杜磊,罗万春.几种常用分离提取设备的分离提取技术[J].实验科学与技术,2010,8(3):4-6

[10] 邹忠梅,徐丽珍,杨世林.芍药总苷高效液相色谱指纹图谱研究[J].药学学报,2003,38(1):46-49