

龙血竭中黄酮类成分提取工艺研究

屠鹏飞<sup>1</sup>,王钰芳<sup>2,3</sup>,邵杰<sup>2,3</sup>,杨璐<sup>2,3</sup>,肖伟<sup>2,3\*</sup>

- (1. 北京大学药学院 天然药物与仿生药物国家重点实验室,北京 100191;
2. 江苏康缘药业股份有限公司,江苏 连云港 222001;
3. 中药制药过程新技术国家重点实验室(筹),连云港 222001)

[摘要] 目的:确定龙血竭中黄酮类成分的提取工艺。方法:采用单因素考察及正交试验设计,以总黄酮的含量为考察指标优选提取工艺。结果:龙血竭中黄酮类成分提取的优选工艺为加药材 8 倍量的乙酸乙酯提取 2 次,每次 1 h;碱溶精制用提取物 30 倍量的 0.35% NaOH 溶液。结论:采用优选工艺,龙血竭中总黄酮提取效率高且稳定。

[关键词] 龙血竭;总黄酮;正交设计;提取工艺

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0030-03

Study on Optimum Extraction Process of Total  
Flavonoids in Resina Draconis

TU Peng-fei<sup>1</sup>,WANG Yu-fang<sup>2,3</sup>,SHAO Jie<sup>2,3</sup>,YANG Lu<sup>2,3</sup>,XIAO We<sup>2,3\*</sup>

- (1. State Key Laboratory of Natural and Biominetic Drugs, Pharmaceutical Sciences, Peking University Health  
Science Center, Beijing 100191, China;
2. Jiangsu Kanion Pharmaceuticals Co. , Ltd. , Lianyungang 222001, China;
3. Traditional Chinese Medicine Pharmacy Process New Technique  
Country Priority Laboratory( Organize) , Lianyungang 222001,China)

[Abstract] Objective:To optimize the extraction process of total flavonoids in Resina Draconis. Method: The extraction of total flavonoids was chosen as the assessment index. The extraction process was optimized with the orthogonal design using spectrophotometer to determine total flavonoids content at 508 nm wavelength. Result: The optimum ethnol extracting process conditions were as follows adding 8 fold of ethyl acetate, extracted two times, heating for 1 hour. Conclusion: The optimum extraction process of total flavonoids in Resina Draconis was reliable and efficient.

[Key words] Resina Draconis; total flavones; orthogonal test; extraction process

龙血竭是百合科龙血树属植物剑叶龙血树  
*Dracaena cochinchinensis*( Lour. ) S. C. Chen 的含脂

木材经提取得到的树脂,具有活血散瘀、定痛止血、  
敛疮生肌等功效<sup>[1]</sup>。龙血竭主要含有黄酮类、皂昔  
类、酚类、有机酸、酯类和挥发油等成分;具有抗炎、  
镇痛,活血、止血,抗细菌、真菌,改变血液流变学等  
药理作用<sup>[2]</sup>。其中黄酮类成分是其有效成分,  
为了充分提取并使之更好地发挥作用,本试验采用  
单因素考察及正交试验设计,对龙血竭中黄酮类成  
分的提取工艺进行了研究,确定了适合大生产的提  
取工艺。

1 仪器与试药

[收稿日期] 2010-09-20

[基金项目] 国家科技部重大新药创制项目(2009ZX09313-032)

[第一作者] 屠鹏飞,教授,研究方向为天然药物活性成分及新药研究, Tel: 010-82802750, E-mail: pengfeitu @bjmu. edu. cn

[通讯作者] \* 肖伟,高级工程师,博士, Tel:0518-85521933, E-mail: fang-yu520@ 126. com

日本岛津 UV-2550PC 紫外-可见分光光度计; AE240 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

龙血竭(广西中医学院制药厂,批号 20070606);芦丁对照品(中国药品生物制品检定所)。

2 方法与结果

总黄酮的提取工艺一般为药材粉碎、溶剂提取、碱溶解、酸沉淀,因此我们以总黄酮的含量为检测指标,对工艺中的提取溶剂、碱种类和浓度、pH 等进行试验考察;确定上述条件后,再对溶剂的用量、提取次数、提取时间和碱的用量进行 3 水平 4 因素  $L_9(3^4)$  的正交试验,经统计分析,确定最佳工艺。

2.1 总黄酮测定方法

2.1.1 标准曲线绘制 精密称取干燥至恒重的芦丁对照品 10 mg,置于 50 mL 量瓶中,加入 40% 乙醇溶解并稀释至刻度。量取芦丁对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中,各加入 40% 乙醇至 8.0 mL,加入 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液 1.2 mL,摇匀,静置 6 min;加入 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液 1.2 mL,摇匀,静置 6 min;加入 4%  $\text{NaOH}$  溶液 10 mL,40% 乙醇定容至刻度,摇匀,静置 15 min 后,在 508 nm 处测定各标准溶液的吸光度,以芦丁质量浓度( $C$ )对其吸光度( $A$ )作回归处理,计算回归方程,  $A = 10.264C + 0.0036$ ,  $R^2 = 0.9996$ 。式中  $A$  为吸光度,  $C$  为芦丁质量浓度( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

2.1.2 不同方法提取物中黄酮的测定 精密称取 30 mg 提取物粉,加乙酸乙酯 20 mL 回流提取 2 次,每次 1 h,合并提取液,减压回收溶剂至干,残渣加乙醇使溶解并定容至 10 mL,作为供试品溶液。量取 3 mL 供试品溶液置 25 mL 量瓶中,按照 2.1.1 的方法进行反应,测定吸光度。计算总黄酮提取量(以芦丁计),取 3 次重复的平均值作为该条件下提取物中总黄酮的提取量。

$$Y = \frac{(A - 0.0036) \times 2.778}{10.264}$$

式中  $Y$  为总黄酮提取量( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ),  $A$  为吸光度。

2.2 单因素考察

2.2.1 提取溶剂考察 黄酮类成分为极性较小的化合物,根据其化学性质并考虑工业化生产的可行性和安全性,我们采用回流提取方法,以三氯甲烷、丙酮、70% 乙醇和乙酸乙酯为提取溶剂,选用 5% 碳酸钠溶液进行考察。龙血竭药材粉碎成粗粉 100 g,

分别加上述 4 种溶剂回流提取 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,减压回收溶剂,蒸干。提取物粉碎后,以 10 倍提取物量的 5% 碳酸钠溶液搅拌使溶解,滤过;滤液用 10%  $\text{HCl}$  调 pH 1~2,静置 12 h,倾去上清液,滤过,沉淀物用去离子水洗至 pH 试纸检测为中性,60℃ 以下真空干燥,即得样品。测定各样品中总黄酮含量,计算其相对于药材中总黄酮的质量分数。

结果,样品中总黄酮含量大小顺序为乙酸乙酯 > 三氯甲烷 > 70% 乙醇 > 丙酮,且采用乙酸乙酯回流提取可使总黄酮提取率达到 50% 以上,其他溶剂提取率都小于 50%。因此我们选用乙酸乙酯为溶剂回流提取。

2.2.2 碱种类和浓度及酸化时 pH 的考察 龙血竭药材粉碎成粗粉 100 g,加乙酸乙酯回流提取 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,回收乙酸乙酯并浓缩至干。提取物粉碎后以不同浓度的氢氧化钠溶液搅拌使溶解,滤过;滤液用 10%  $\text{HCl}$  调 pH,静置 12 h,倾出上清液,沉淀离心滤过,沉淀物用去离子水洗至 pH 中性,60℃ 以下真空干燥。测定各样品中总黄酮含量,计算 10 g 龙血竭中提取出来的总黄酮量,结果,样品中总黄酮含量大小顺序为 0.35%  $\text{NaOH}$  > 0.1%  $\text{NaOH}$  > 0.5%  $\text{NaOH}$  > 5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  > 1%  $\text{NaOH}$ ,其中以 0.35%  $\text{NaOH}$  溶液溶解乙酸乙酯提取物得到的总黄酮提取率最高,故确定选用 0.35% 氢氧化钠溶液;对不同 pH 进行考察时发现,pH 由 7 降到 2 的过程中,碱溶液中黄酮沉淀不断产生,当 pH 1~2 时,溶液中不再产生沉淀,因此应选择 pH 1~2。

2.3 正交试验

2.3.1 正交设计 以溶剂的用量、0.35%  $\text{NaOH}$  的用量、提取次数和提取时间为考察因素,以总黄酮的量为考察指标,依次进行试验,其因素水平见表 1。

表 1 提取工艺考察的因素水平

| 水平 | A 溶剂用量<br>/ 倍 | B 碱用量<br>/ 倍 | C 提取次数<br>/ 次 | D 提取时间<br>/ h |
|----|---------------|--------------|---------------|---------------|
| 1  | 4             | 20           | 1             | 1             |
| 2  | 6             | 30           | 2             | 2             |
| 3  | 8             | 40           | 3             | 3             |

2.3.2 方法与结果 按表 2,用 10 g 龙血竭进行试验,即龙血竭药材粉碎成粗粉 10 g,加乙酸乙酯回流提取,滤过;合并滤液,回收乙酸乙酯并浓缩至干。提取物粉碎后用 0.35%  $\text{NaOH}$  溶液搅拌使溶解,滤

过;滤液用 10% HCl 调 pH 1 ~ 2,静置 12 h,倾出上清液,沉淀离心滤过,沉淀物用去离子水洗至 pH 中性,60 ℃ 以下真空干燥,即得。测定各样品中总黄酮含量,计算各条件下 10 g 龙血竭中提取出来的总黄酮的量,结果见表 2。

表 2 提取工艺研究  $L_9(3^4)$  正交试验

| No.   | A      | B      | C      | D      | 总黄酮量/g |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1     | 1      | 1      | 1      | 1      | 0. 828 |
| 2     | 1      | 2      | 2      | 2      | 1. 939 |
| 3     | 1      | 3      | 3      | 3      | 1. 872 |
| 4     | 2      | 1      | 3      | 3      | 1. 599 |
| 5     | 2      | 2      | 2      | 1      | 2. 043 |
| 6     | 2      | 3      | 1      | 2      | 1. 368 |
| 7     | 3      | 1      | 3      | 2      | 2. 011 |
| 8     | 3      | 2      | 1      | 3      | 1. 918 |
| 9     | 3      | 3      | 2      | 1      | 2. 249 |
| $K_1$ | 4. 64  | 4. 44  | 4. 11  | 5. 12  |        |
| $K_2$ | 5. 01  | 5. 90  | 6. 23  | 5. 32  |        |
| $K_3$ | 6. 18  | 5. 49  | 5. 48  | 5. 39  |        |
| R     | 0. 513 | 0. 487 | 0. 604 | 0. 090 |        |

表 3 方差分析

| 方差来源  | MS     | f | SS     | F       | P      |
|-------|--------|---|--------|---------|--------|
| A     | 0. 430 | 2 | 0. 215 | 33. 192 | <0. 05 |
| B     | 0. 379 | 2 | 0. 189 | 29. 252 | <0. 05 |
| C     | 0. 678 | 2 | 0. 339 | 52. 327 | <0. 05 |
| D(误差) | 0. 013 | 2 | 0. 006 |         |        |

$F_{0.01}(2,2) = 99, F_{0.05}(2,2) = 19$

直观分析:由表 2,3 可知,影响总黄酮得率的主要因素是提取次数,其次是乙酸乙酯量和 0. 35% NaOH 的用量,而提取时间对其没有明显的影响。随着提取次数的增加,总黄酮的提取率有明显增加,但  $C_2$  与  $C_3$  没有明显区别,说明通过 2 次提取后,黄酮类成分基本上全部溶解,因此,选择  $C_2$ 。随着乙酸乙酯用量的增加,总黄酮的得率增加,因此,选择  $A_3$ 。随着 0. 35% NaOH 用量的增加,总黄酮提取率增加,但  $B_2$  与  $B_3$  没有明显的区别,因此,选择  $B_2$ 。因此,最佳工艺为  $A_3B_2C_2D_3$ ,为了节省时间和能源,我们选择工艺为  $A_3B_2C_2D_1$ 。

方差分析:在所选水平范围内, A, B, C 3 个因素都起显著作用,有 95% 以上的把握说明  $A_3 > A_2, B_2 > B_1, C_2 > C_1$ 。因素 D 各水平没有差异,选择任何一个水平影响都不大。因此,最佳工艺和直观分析

结果相同为  $A_3B_2C_2D_1$ 。

3 验证试验

以总黄酮质量分数(相对于药材中总黄酮)为考察指标,对最佳工艺  $A_3B_2C_2D_3$  和选定工艺  $A_3B_2C_2D_1$  进行重复验证对比试验,结果见表 4。可见,总黄酮的提取量在 2 个工艺条件下相比差别不大,但  $A_3B_2C_2D_1$  缩短了生产周期,降低了成本。因此提取工艺确定为  $A_3B_2C_2D_1$ ,即加 8 倍量乙酸乙酯回流提取 2 次,每次 1 h;碱溶精制用 30 倍提取物量的 0. 35% NaOH 溶液。

表 4 正交试验最佳工艺验证试验结果

| 条件             | 批次 | 总黄酮质量分数/% | 平均值/%  |
|----------------|----|-----------|--------|
| $A_3B_2C_2D_3$ | 1  | 56. 82    | 57. 00 |
|                | 2  | 57. 13    |        |
|                | 3  | 57. 06    |        |
| $A_3B_2C_2D_1$ | 1  | 56. 50    | 56. 50 |
|                | 2  | 56. 76    |        |
|                | 3  | 56. 23    |        |

4 讨论

传统的龙血竭有效成分的提取是用乙醇作溶剂,本试验在此基础上,通过单因素试验分别考察了 70% 乙醇、三氯甲烷、丙酮、乙酸乙酯作提取溶剂,结果显示用乙酸乙酯提取时黄酮类成分提取率最高,可达 50% 以上;试验中考虑黄酮为弱酸性物质,故碱溶解选择用 5% 碳酸钠溶液,但在酸化时发现产生大量的 CO<sub>2</sub> 气体,工业生产时将会产生大量的气泡。为避免此现象发生,我们选择不同质量浓度的氢氧化钠溶液对乙酸乙酯提取物的溶解状况进行考察;确定基本工艺后,采用正交试验对各工艺参数进行了优化,并用中试放大试验对优选出的工艺进行验证,最终确定了龙血竭中总黄酮的提取工艺为加 8 倍量乙酸乙酯回流提取 2 次,每次 1 h;乙酸乙酯提取物用 30 倍提取物量的 0. 35% 的 NaOH 溶液进行碱溶精制。

[参考文献]

[1] 文东旭. 龙血竭的研究进展[J]. 中草药,2001,32(11):1053.  
[2] 张庆云,朱辉,陈红英,等. 龙血竭研究进展[J]. 武警医学院学报,2003,13(01): 69.

[责任编辑 全燕]