

· 工艺与制剂 ·

槐米中槲皮素的双相动态提取工艺优选

李除夕,丁菲,贾树田,胡正芳*

(南京海陵中药制药工艺技术研究有限公司,南京 210049)

[摘要] 目的:优选槐米中槲皮素的双相动态提取工艺。方法:以槲皮素提取量为评价指标,在单因素试验基础上,通过正交试验考察提取时间、提取温度、提取次数、硫酸体积分数对槲皮素双相动态提取工艺的影响。采用 HPLC 测定槲皮素含量,色谱条件为 Agilent ZORBAX C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.02% H₃PO₄(45:55),检测波长 254 nm,进样量 10 μL。结果:槐米中槲皮素的最佳提取工艺为加 2% 硫酸于 85 ℃ 提取 2 次,每次 2.5 h;槲皮素提取量达 5.22 mg·g⁻¹,远高于乙醇回流提取法的 3.26 mg·g⁻¹。结论:优选的提取工艺稳定可行,采用双相动态工艺提取槲皮素具有提取率高的优势。

[关键词] 槐米;槲皮素;提取工艺;双相动态提取;正交试验;单因素试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0001-03

[doi] 10.11653/syfy2013230001

Optimization of Diphasic Dynamic Extraction Technology for Quercetin from Flos Sophorae Immaturus

LI Chu-xi, DING Fei, JIA Shu-tian, HU Zheng-fang*

(Nanjing Hailing Research and Development of Traditional Chinese Medicine
Pharmaceutical Technology Co. Ltd, Nanjing 210049, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize diphasic dynamic extraction technology of quercetin from Flos Sophorae Immaturus. **Method:** With the content of quercetin as index, based on single factor tests, L₉(3⁴) orthogonal test was adopted to optimize diphasic dynamic extraction technology of quercetin by taking extraction time, extraction temperature, extraction times and sulfuric acid concentration as factors. The content of quercetin was determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: Agilent ZORBAX C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of methanol-0.02% H₃PO₄ (45:55), detection wavelength 254 nm, injection volume 10 μL. **Result:** Optimal extraction technology was as following: extracted 2 times with 2% sulfuric acid at 85 ℃, 2.5 hours per time; Yield of quercetin was up to 5.22 mg·g⁻¹, which was more than ethanol extraction method of 3.26 mg·g⁻¹. **Conclusion:** This optimized extraction technology was feasible and stable with high yield of quercetin.

[Key words] Flos Sophorae Immaturus; quercetin; extraction technology; diphasic dynamic extraction; orthogonal test; single factor test

槲皮素及其衍生物是自然界分布最广的黄酮类

化合物,具有清除自由基、降低血压、保护心肌缺血再灌注损伤等作用^[1],是一种强有力的抗氧化剂,能防止低密度脂蛋白氧化,防止动脉粥样硬化,可用于治疗冠心病。植物界中约有 100 种中草药含有槲皮素,其中以槐米中含量最高。天然药物中黄酮类化合物的传统提取方法主要有渗漉法、冷浸法、加热回流法、索氏提取法、酶法等。近年来随着新分离技术的引入,黄酮类化合物的提取方法扩展了超滤法、

[收稿日期] 20130521(013)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划课题
(2006BAI06A00)

[第一作者] 李除夕,硕士,中级工程师,从事新药开发研究,
Tel:025-83505999, E-mail:chuxi1231@sohu.com

[通讯作者] *胡正芳,博士,中级工程师,从事中药新药开发
研究, Tel:025-83505999, E-mail:njhlyy@163.com

超声波法、超临界二氧化碳萃取法、微波法及微波超声波共聚协调萃取法等^[2-7]。中药动态提取工艺是在增加药材比表面积的情况下,利用机械手段,采用强制循环方式,以增加固-液相接触的方法。在动态提取过程中,药材与溶剂间始终保持相对浓度差,提高了药材中溶质向溶剂的溶出效率^[8-10]。本实验通过双相动态提取法提取槐米中槲皮素,即在同一提取设备中通过酸水解,使成分以苷元形式释放到药材的细胞外,同时结合双相溶剂的特点使有机溶剂将其从水相中分配过来,该提取工艺不仅可以显著提高生产效率,提高有效成分稳定性,还能简化后续纯化工艺,易得到高纯度的中间体,为中药有效成分的提取提供新思路。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦),JJ-1 型定时电动搅拌器(江苏金坛市医疗仪器厂),AX205 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100081-200406),槐米(购自山东潍坊,经南京海陵中药制药研究有限公司胡正芳工程师鉴定为豆科植物槐 *Sophora japonica* L. 的干燥花蕾),甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 槲皮素的含量测定

2.1.1 色谱条件^[11] Agilent ZORBAX C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.02% H₃PO₄(45:55),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 254 nm,进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素对照品 2.03 mg,置于 50 mL 量瓶中,加 95% 乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液的配制 精密吸取适量样品溶液,置 100 mL 量瓶中,加 95% 乙醇稀释至刻度,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 标准曲线的制备 精密称取槲皮素对照品,用 95% 乙醇配制成质量浓度分别为 51.64, 25.82, 12.91, 6.45, 3.22 mg·L⁻¹ 的对照品溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液进样测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 38.369X - 40.892$ ($r = 0.9999$),表明槲皮素在 3.22 ~ 51.64 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取对槲皮素对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,按 2.1.1 项下方法测定,结果槲皮素峰面积的 RSD 0.85%,表示仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样,按 2.1.1 项下方法测定,结果槲皮素峰面积的 RSD 1.69%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一供试品溶液 6 份,按 2.1.1 项下方法测定,结果槲皮素平均提取量 4.603 mg·g⁻¹, RSD 1.51%,表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密移取已知含量的样品溶液 1 mL,共 9 份,分别精密加入对照品溶液适量,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下方法测定,结果槲皮素平均回收率 100.52%, RSD 1.87%。

2.2 提取溶剂的筛选 取槐米 4 份,每份 100 g,分别置于 2 L 三口瓶内,各加入 2% 硫酸水 500 mL 浸泡 1 h,依次加入正丁醇、乙酸乙酯、乙醚、二氯甲烷各 500 mL,打开搅拌桨,分别于水浴锅内回流动态提取 2 h,放冷,提取液于分液漏斗内过滤,分离出有机相,取适量稀释进样,按 2.1.1 项下方法测定,结果槲皮素提取量分别为 4.098, 4.630, 0.401, 1.597 mg·g⁻¹。同时在提取过程中,发现乙醚、二氯甲烷易挥发;正丁醇提取温度高,乳化比乙酸乙酯严重,且不易分层,故选择乙酸乙酯为提取溶剂。

2.3 萃取酸度的确定 取槐米 4 份,每份 100 g,分别置于 2 L 三口瓶内,分别加入体积分数为 1%, 2%, 3%, 4% 的硫酸水溶液 500 mL 浸泡 1 h,各加入乙酸乙酯 500 mL,打开搅拌桨,于 80 ℃ 水浴锅内回流动态提取 2 h,放冷后将提取液过滤于分液漏斗内,分离出有机相,按 2.1.1 项下方法测定,结果加入 1%, 2% 硫酸水溶液的提取量分别为 4.312, 4.863 mg·g⁻¹,而用 3%, 4% 硫酸水提取时,提取液颜色较深,静置不分层,故确定选用 2% 硫酸水溶液。

2.4 水相与有机相比比例的确定 取槐米 4 份,每份 100 g,分别置于 2 L 三口瓶内,加入 2% 硫酸水 500 mL 浸泡 1 h,分别加入乙酸乙酯 250, 500, 750, 1 000 mL,打开搅拌桨(固定转数),于 85 ℃ 水浴锅内回流动态提取 2 h,放冷后将提取液过滤于分液漏斗内,分离出有机相,按 2.1.1 项下方法测定,结果提取量分别为 3.090, 4.870, 4.439, 3.594 mg·g⁻¹,故确定水相-乙酸乙酯(1:1)。

2.5 正交试验优选 在单因素试验基础上,选取提取温度、提取时间、提取次数、硫酸体积分数为考察因素,称取槐米药材 100 g,共 9 份,加入硫酸水 500 mL 浸泡 1 h,加入乙酸乙酯 500 mL,按正交表安排

进行提取,按 2.1.1 项下方法测定,以槲皮素提取量为考察指标,确定最佳提取工艺,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 槐米中槲皮素双相动态提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取时间 /h	B 提取温度 /℃	C 提取数 /次	D 硫酸体积 分数/%
1	1.5	80	1	1.0
2	2.0	85	2	1.5
3	2.5	90	3	2.0

表 2 槐米中槲皮素双相动态提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	槲皮素取量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	4.228
2	1	2	2	2	4.634
3	1	3	3	3	4.863
4	2	1	2	3	4.905
5	2	2	3	1	4.601
6	2	3	1	2	4.601
7	3	1	3	2	4.645
8	3	2	1	3	5.127
9	3	3	2	1	4.698
K_1	4.575	4.593	4.652	4.509	
K_2	4.702	4.787	4.746	4.627	
K_3	4.823	4.721	4.703	4.965	
R	0.248	0.194	0.094	0.456	

表 3 双相提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.093	2	7.154	>0.05
B	0.059	2	4.538	>0.05
C(误差)	0.013	2	1.000	
D	0.336	2	25.846	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

由直观分析可知,各因素对槲皮素提取率的影响顺序为硫酸体积分数 > 提取时间 > 提取温度 > 提取次数。以极值最小的 C 因素为误差项进行方差分析,结果显示 D 因素对提取工艺影响显著,因素 A, B 则无显著性影响,确定最佳提取工艺为 $A_3B_2C_2D_3$,即硫酸体积分数 2%,提取时间 2.5 h,提取温度 85℃,提取数 2 次。

2.6 验证试验 称取 3 份槐米,每份 100 g,按最佳工艺条件重复提取 3 次,按 2.1.1 项下方法测定,结果槲皮素提取量分别为 5.22,5.19,5.25 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,表明优选的提取工艺稳定可行。称取槐米 2 份,每份

100 g,加入 80% 乙醇 800 mL,水浴加热回流提取 2 h,过滤,减压浓缩,按 2.1.1 项下方法测定,结果槲皮素提取量分别为 3.30,3.21 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,表明动态提取法明显优于乙醇提取法。

3 讨论

药材中苷类有效成分具有极高的药用价值,如黄酮苷、蒽醌苷、三萜皂苷、甾体皂苷等物质的苷元。传统提取工艺操作较为复杂,有效成分提取量低,且不易纯化;而采用双相动态直接酸水解法对槐米中有效成分槲皮素进行提取,使水相提取出的有效成分可以迅速转移至有机层,在提高槲皮素稳定性的同时增加了有效成分的提取率及提取物纯度。

在对带有酸性或碱性基团的有效成分提取时,可采用酸碱离子抑制、相萃取为一体的多相动态提取,同时即使是水或醇的单相溶液提取,亦可在酸碱条件下动态提取,以提高目的产物在提取环节的有效富集,减少杂质的带入,显著提高有效成分提取效率,降低后续分离纯化难度。

[参考文献]

- [1] 宋玉乔,姚凌云,曹蔚,等.槲皮素的药理作用研究近况[J].西北药学杂志,2002,17(1):40.
- [2] 刘可越,高文远,张铁军,等.垂柳总黄酮的微波萃取及其含量的动态变化研究[J].中国中药杂志,2007,32(3):263.
- [3] 郭乃妮,杨建洲.超声条件下碱提取酸沉淀法从槐米中提取芦丁的研究[J].应用化工,2009,28(2):207.
- [4] 郭维图.微波中药提取的研究与开发[J].医药工程设计,2008,29(2):57.
- [5] 蒙松年,陈代武.微波辅助提取槐米中的槲皮素[J].华西药学杂志,2005,20(6):561.
- [6] 陈燕芬,陈丽娟,杨柳.微波技术提取槐米中芦丁的研究[J].中药材,2007,30(7):866.
- [7] 宫静静,王娟,沈平女.微波辅助萃取技术在不同药用部位的工艺研究[J].中国中药杂志,2007,32(16):
- [8] 卢晓江.中药提取工艺与设备[J].北京:化学工业出版社,2007:15.
- [9] 王晓武,赵明,高瑞华.中药动态提取及产业化研究进展[J].北方药学,2011,8(2):49.
- [10] 杨瑛,罗新建,刘璇,等.粉碎及动态提取对浸膏得率及主成分溶出量的影响研究[J].湖南中医杂志,2005,21(5):66.
- [11] 伍世清,陈代武.利用 HPLC 法测定槐米中槲皮素含量及意义[J].医学理论与实践,2005,18(6):730.

[责任编辑 全燕]