

## 正交试验优选广枣提取工艺

黎瑞汝, 苏智斌, 陈曦, 王淑美, 梁生旺\*

(广东药学院中药学院, 广州 510006)

**[摘要]** 目的: 优选广枣药材的最佳提取工艺。方法: 通过正交试验考察乙醇体积分数、加乙醇量、提取时间、提取次数 4 个因素, 采用反相高效液相色谱法测定没食子酸含量, 紫外-分光光度法测定总黄酮。结果: 最佳的提取工艺是加 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 60 min。结论: 该提取工艺经济、可行、可控。

**[关键词]** 广枣; 总黄酮; 没食子酸

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0047-03

## Optimization of Extraction Technology of Fructus Choerospondiatis by Orthogonal Test

LI Rui-ru, SU Zhi-bing, CHEN Xi, WANG Shu-mei, LIANG Sheng-wang\*

(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the extraction technology for traditional Mongolian medicine Fructus Choerospondiatis. **Method:** The extraction technology was optimized by orthogonal design with concentration of alcohol, amount of alcohol, extraction time and extraction times as factors. A RP-HPLC. **Result:** was established for determination of gallic acid; An UV-Spectrophotometer method was adopted to determine the content of total flavonoids. **Result:** The optimum extracting condition was as follows: adding eight times amount of 70% alcohol and

**[收稿日期]** 20110106(008)

**[第一作者]** 黎瑞汝, 硕士研究生, 研究方向: 新药开发与质量控制, Tel: 13560168564, E-mail: liruiru@126.com

**[通讯作者]** \* 梁生旺, 教授, 从事中药分析的研究与教学, Tel: 13798028258, E-mail: Swliang371@163.com

表 5 祛风通络胶囊乙醇提取最佳工艺验证 %

No.	青藤碱转移率	干浸膏得率
1	74.39	21.35
2	74.02	21.12
3	73.94	19.99

### 3 讨论

祛风通络胶囊主治风湿性、类风湿性关节炎, 为了提高其疗效改进该制剂, 在本研究中我们通过正交试验筛选其提取工艺。青风藤中主要药效成分青藤碱在有机溶剂中的溶解度较大, 结合预试验结果, 我们选择乙醇为溶剂, 采用加热回流提取的方法进行提取。该制剂为中药复方制剂, 某些单一成分或几个有效成分浸出量的多少并不代表总有效成分浸

出量的多少, 故将浸膏得率作为正交试验评价指标, 能更全面地反映提取工艺的优劣。选择有效成分青藤碱的转移率以及总固体物提取率作为筛选指标对于指导实际生产有着现实的意义, 通过对优化出的工艺验证结果表明该提取工艺具有较好的稳定性, 且操作简单, 生产成本低, 适合产业化生产, 为今后应用开发打下了良好基础。

### [参考文献]

- [1] 王有志, 李春荣, 莫志贤. 青风藤化学成分与药理研究进展[J]. 医药导报, 2004, 23(3): 177.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2005: 135.

[责任编辑 全燕]

refluxing and extracting for 1h (totally extracting for 2 times). **Conclusion:** The extraction technology was economic, feasible and controllable.

[ **Key words** ] Fructus Choerospondiatis; total flavonoids; gallic acid

广枣为漆树科植物南酸枣 *Choerospondias axillaris* (Roxb.) Burt et Hill 的干燥成熟果实,系蒙古族习用药材,具有行气活血、养心安神的功效<sup>[1]</sup>。对广枣的成分分析表明,广枣中含有糖、氨基酸、有机酸、鞣质、甾醇、黄酮类及酚性成分等。现代研究表明总黄酮具有明显的治疗心血管疾病的作用,酚酸类成分如没食子酸也有明显的抗氧化、清除自由基、抑制血小板聚集作用和抗缺氧活性<sup>[2]</sup>。

文献对于广枣总黄酮含量测定的报道较多<sup>[3]</sup>,也有采用薄层扫描法<sup>[4]</sup>、高效液相法测定其没食子酸含量<sup>[2]</sup>,但未见在广枣中同时测定总黄酮和没食子酸含量。本研究采用稀乙醇作为提取溶剂,通过反相高效液相色谱法和紫外-分光光度法分别测定了广枣提取液中的没食子酸的含量及总黄酮含量,建立了藏药广枣及其制剂的质量控制标准。

### 1 仪器与试剂

紫外-可见分光光度计(日本岛津), Waters2996 高效液相色谱仪,迪马色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

芦丁对照品(批号 100080-200306),没食子酸对照品(批号 0831-9501)均由中国药品生物制品检定所提供。广枣购自安徽药材市场,经广东药学院中药鉴定教研室刘基柱教授鉴定。液相用试剂均为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 提取工艺的设计** 广枣主要有效部位是总黄酮及酚酸类,据文献报导乙醇对其提取率较高,为探索广枣的提取条件,以总黄酮及没食子酸的含量为考察指标,采用正交实验设计,选用乙醇体积分数、加醇倍数、提取时间、提取次数 4 个因素,每个因素选择 3 个水平,用  $L_9(3^4)$  正交表进行实验优选,因素水平见表 1。具体制备方法如下:广枣药材粉碎,过四号筛,备用。取广枣药材 9 份,20 g/份,按下表条件回流提取,过滤,滤液浓缩并定容至 250 mL。

#### 2.2 考察指标的测定

**2.2.1 总黄酮含量测定线性关系** 精密称量 7.540 0 g 芦丁,定容至 25 mL 量瓶中,即得。精密

表 1 广枣提取工艺因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 乙醇 用量/倍	C 提取 时间/min	D 提取 次数/次
1	50	6	30	2
2	60	8	60	2
3	70	10	90	3

量取对照品溶液 1,2,3,4,5,6 mL 分别置于 25 mL 量瓶中,各加水至 6 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 10%  $Al(NO_3)_3$  溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加氢氧化钠试液 10 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应试剂为空白,立即照紫外-可见分光光度法(附录 VA),在 487 nm 波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程为  $Y = 10.974X + 0.005$  ( $R^2 = 0.9998$ )。

供试品含量测定:分别精密量取上述 9 个广枣正交醇提液 1 mL 于 25 mL 量瓶中,按芦丁对照品的显色方法显色后,在 487 nm 波长下测定吸光度,结果见表 2,3。

**2.2.2 没食子酸含量测定** 流动相甲醇-水-冰醋酸(2:98:0.3),检测波长 270 nm,流速  $1 mL \cdot min^{-1}$ ,柱温为 30 °C。

线性关系:精密吸取浓度为  $70 mg \cdot L^{-1}$  的没食子酸对照品溶液 2,5,10,15,20 μL,以对照品进样量为横坐标,峰面积平均积分值为纵坐标绘制标准曲线,结果显示没食子酸在 0.14 ~ 1.4 μg 呈良好的线性关系,回归方程为  $Y = 81711X - 3747.3$  ( $R^2 = 0.9995$ )。

含量测定:取广枣去核粉末(过二号筛)约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 20 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得对照药材溶液。分别精密吸取没食子酸对照品溶液、广枣对照药材及各试验号供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,即得。分别测定没食子酸的含量,结果见表 2,3。

表2 广枣提取工艺正交试验优选

No	A	B	C	D	总黄酮/mg·g <sup>-1</sup>	评分1	没食子酸/mg·g <sup>-1</sup>	评分2	综合评分
1	1	1	1	1	6.86	0	0.40	0	0
2	1	2	2	2	11.20	7.5	0.45	1.4	4.5
3	1	3	3	3	12.50	9.8	0.51	3.1	6.5
4	2	1	2	3	12.55	9.9	0.57	4.7	7.3
5	2	2	3	1	12.62	10.0	0.58	5.0	7.5
6	2	3	1	2	9.28	4.2	0.59	5.3	4.8
7	3	1	3	2	11.18	7.5	0.71	8.6	8.1
8	3	2	1	3	10.78	6.8	0.76	10.0	8.4
9	3	3	2	1	12.60	9.9	0.73	9.2	9.6
K <sub>1</sub>	3.667	5.133	4.400	5.700					
K <sub>2</sub>	6.533	6.800	7.133	5.800					
K <sub>3</sub>	8.700	6.967	7.367	7.400					
R	5.033	1.834	2.967	1.700					

注:综合评分设总黄酮、没食子酸含量分别为  $x_1, x_2$ , 总黄酮含量最高者、最低者分别为  $x_{1max}, x_{1min}$ , 没食子酸含量最高者、最低者分别为  $x_{2max}, x_{2min}$ , 综合评分用  $y$  表示, 计算公式为  $y = \frac{x_1 - x_{1min}}{2 \times 10 \times (x_{1max} - x_{1min})} + \frac{x_2 - x_{2min}}{2 \times 10 \times (x_{2max} - x_{2min})}$ , 即  $y = \frac{x_1 - 6.86}{2 \times 10 \times (12.62 - 6.86)} + \frac{x_2 - 0.40}{2 \times 10 \times (0.76 - 0.40)}$ , 其中 10 分为最高分, 0 分为最低分。

表3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F
A	38.247	2	19.12	7.005
B	6.167	2	3.08	1.129
C	16.327	2	8.16	2.990
D(误差)	5.46	2	2.73	1.000

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ ,  $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

结果表明随着乙醇体积分数的升高, 广枣总黄酮和没食子酸的含量也升高, 但 4 个考察因素均没有显著性差异, 因此采用最节省溶剂的提取方案, 考虑到 6 倍溶剂量可能无法完全浸泡药材, 以致影响成分的提取率, 故选用 8 倍溶剂量, 最终确定各因素最佳的水平为  $A_1B_2C_1D_1$ , 即广枣药材最佳的提取工艺为加 8 倍量 50% 的乙醇回流提取 2 次, 每次 30 min。

**2.4 正交验证试验** 取广枣药材 3 份, 20 g/份, 按照上述的最佳提取工艺  $A_1B_2C_1D_1$  进行正交验证实验, 得到总黄酮和没食子酸平均含量为 12.586, 0.72 mg·g<sup>-1</sup>, 可见, 按最佳提取工艺提取广枣药材, 总黄酮和没食子酸含量得到较理想的结果。说明了该提取工艺的经济性、可行性、可靠性。

### 3 讨论

2005 年版《中国药典》只记载了广枣的薄层定性鉴别, 2010 年版《中国药典》新增了对其没食子酸的含量测定项目, 本文采用多指标综合分析法对其总黄酮和没食子酸含量进行了考察。在本文色谱条件下, 经过紫外扫描发现, 广枣样品在 487 nm 波长处有最大吸收, 同时芦丁对照品在此波长处也有较大吸收, 故确定 487 nm 为检测波长。

建立了 50% 乙醇提取广枣药材的方法, 总黄酮和没食子酸的提取率较高, 符合标准, 具有经济、环保、易于大规模生产的优点。

### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005:29.
- [2] 邓科君, 张艺, 王平, 等. 反相高效液相色谱法同时测定藏药广枣中没食子酸和原儿茶酸的含量[J]. 色谱, 2006, 24(6):652.
- [3] 易跃能, 杨华, 赵勇, 等. 渗漉法提取广枣中黄酮类成分的工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14):1806.
- [4] 刘莲英, 杨瑞瑞, 李维凤. 广枣中没食子酸的含量测定[J]. 西北药学杂志, 2002, 17(5):204.

[责任编辑 全燕]