

牡丹皮中丹皮酚提取工艺优化研究

邵作敏¹, 修效友², 汪维云^{1*}

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 安徽德昌药业饮片有限公司, 亳州 236800)

摘要: 比较牡丹皮中丹皮酚的 2 种不同提取方法, 即水蒸气蒸馏法和超临界 CO₂ 萃取法, 并研究所提丹皮酚的抗菌作用。以丹皮酚提取率为指标, 通过 L₉ (3⁴) 正交试验法比较 2 种提取方法, 并通过响应面和等高线图观察各因素对提取率的影响。结果表明, 超临界 CO₂ 萃取法的提取率较高, 最佳条件为萃取温度为 50℃, 萃取压力为 23 Mpa, CO₂ 流量为 16 L·h⁻¹, 分离温度为 40℃, 丹皮酚得率为 1.95%。且所提丹皮酚有显著的抗菌作用。超临界 CO₂ 萃取法比水蒸气蒸馏法操作简单, 提取率高, 适合工业上大批量生产。

关键词: 丹皮酚; 水蒸气蒸馏法; 超临界 CO₂ 萃取法; 响应面法; 抗菌作用

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)02-0299-06

Optimization of the paeonol extraction process from cortex moutan

SHAO Zuomin¹, XIU Xiaoyou², WANG Weiyun¹

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Anhui Dechang pharmaceutical industry Ltd., Co., Bozhou 236800)

Abstract: Two different extraction methods, steam distillation and supercritical fluid extraction, were compared. Using the extraction rate as an index, conditions for paeonol extraction from cortex moutan were optimized using the orthogonal test L₉ (3⁴). The antibacterial activity of paeonol was further studied. Effects of various factors on the paeonol extraction yield were observed through the response surfaces and contour lines. As a result, the supercritical fluid extraction was better than the steam distillation method. The optimal conditions for paeonol extraction from cortex moutan were: extraction at 50℃ under the pressure of 23 Mpa, with the CO₂ flux of 16 L/h, and separation at 40℃. The extraction rate was 1.95% and the extracted paeonol showed the significant antibacterial activity. In conclusion, the supercritical fluid extraction method is of simple operation, high extraction efficiency and suitable for industrial mass production.

Key words: paeonol; steam distillation; supercritical fluid extraction; orthogonal test; antibacterial activity

牡丹皮 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 为毛茛科植物牡丹的干燥根皮, 具有清热凉血、抗炎、抗菌、活血化瘀之功效。牡丹皮中的主要成分丹皮酚具有镇痛、止血、消炎、抗菌、降压等多种药理作用; 丹皮酚体外还对多种人体致病菌有明显的抑制作用^[1-3]。丹皮酚熔点较低 (49.5~50℃), 具有挥发性^[4]。因此, 丹皮酚提取工艺的优劣直接影响丹皮酚的提取率。本文旨在研究牡丹皮中丹皮酚的 2 种提取工艺, 即水蒸气蒸馏法^[5-9]与超临界 CO₂ 萃取法^[10-13], 并结合实际工业生产要求确定最佳提取工艺条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

丹皮酚标准品购自于中国药品生物制品检定所, 牡丹皮购自于安徽省亳州市德昌药业股份有限公司, 大肠杆菌, 枯草芽孢杆菌, 黑曲霉。仪器包括 HA421-40-96 型超临界 CO₂ 萃取仪, 水浴锅, 干燥箱, 紫外分光光度计, 电子天平, 加热套, 抽滤机, 三用紫外分析仪。

收稿日期: 2014-04-17

基金项目: 2012 年安徽省试验区和试点省专项 (12z0101035) 资助。

作者简介: 邵作敏, 硕士研究生。E-mail: 907834011@qq.com

* 通信作者: 汪维云, 博士, 教授。E-mail: weiyunw@126.com

1.2 提取工艺的选择

1.2.1 水蒸气蒸馏法提取工艺和因素水平安排 水蒸气蒸馏法是牡丹皮中丹皮酚最常用的提取方法。丹皮酚溶解度低，在热水中易溶，但在冷水中有较低的溶解度，因此，可以用冷藏法使蒸馏液中的丹

皮酚晶体析出。溶液中加入适当的盐^[14-16]可以降低丹皮酚在水中的溶解度使丹皮酚易随水蒸气蒸出。因此，本实验考察温浸时间、温浸温度、料液比及加盐量4个因素对丹皮酚提取率的影响，考察水平见表1。

表1 水蒸气蒸馏法提取工艺因素水平

Table 1 Extraction factors and levels using steam distillation method

水平 Level	A 温浸时间/h Warm-soaking time	B 温浸温度/°C Warm-soaking temperature	C 料液比 Solid-liquid ratio	D 加盐量/% Salt added amount
1	1	30	1:4	1
2	3	40	1:6	2
3	5	50	1:8	3

表2 超临界CO₂萃取法提取工艺和因素水平

Table 2 Extraction factors and levels using supercritical fluid extraction method

水平 Level	A 萃取温度/°C Extraction temperature	B 萃取压力/MPa Extraction pressure	C CO ₂ 流量/L·h ⁻¹ Flux of CO ₂	D 分离温度/°C Separation temperature
1	45	17	16	35
2	50	20	20	40
3	55	23	24	45

表3 试验设计因素水平

Table 3 Experimental design of RSM with three factors and three levels

水平 Level	因素 Factor		
	A (萃取温度/°C) Extraction temperature	B (萃取压力/MPa) Extraction pressure	C (CO ₂ 流量/L·h ⁻¹) Flux of CO ₂
-1	45	19	16
0	50	21	20
1	55	23	24

1.2.2 水蒸气蒸馏法正交试验设计 准确称取牡丹皮粉末(过40目筛)20.00 g,按L₉(3⁴)正交表的分布要求加入适量盐水,在一定温度下温浸一定时间后加热蒸馏,收集蒸馏液500 mL。取1 mL蒸馏液加水定容至100 mL摇匀,在274 nm波长处测吸光度,根据标准曲线计算丹皮酚含量,每组试验3次平行。

1.2.3 超临界CO₂萃取法提取工艺和因素水平 超临界CO₂萃取法是工业生产中较常用的提取方法,具有高效,快速等特点。利用压力和温度来调节CO₂的溶解能力进而有选择性的将待分离的物质按照极性大小依次分离出来。因此,本实验将考察萃取温度,萃取压力,CO₂流量及分离温度4个因素的影响,考察水平见表2。

1.2.4 超临界CO₂萃取法正交试验设计 准确称取牡丹皮粉末(过60目筛)250.00 g,按L₉(3⁴)正交表的分布要求设定相应的萃取温度,萃取压力,CO₂流量及分离温度。取0.05 g丹皮酚粗提物加1 mL

甲醇溶解定容至250 mL容量瓶中,摇匀后取4 mL溶液定容至100 mL,在274 nm波长处测量吸光度,根据标准曲线计算丹皮酚含量,平行试验3次。

1.3 标准曲线的绘制

精确称取丹皮酚标准品4.72 mg,置于100 mL容量瓶中,加入1 mL乙醇溶解后加水定容至刻度线,摇匀即得丹皮酚对照品溶液,浓度为0.0472 mg·mL⁻¹。分别吸取上述对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5和4.0 mL置于25 mL容量瓶中定容至刻度线摇匀,在波长274 nm处测吸光度。以丹皮酚浓度为横坐标,吸光度A为纵坐标绘制标准曲线。

经测定各组不同浓度的丹皮酚标准品溶液吸光度,平行实验3次,取品均值后得标准曲线方程式为: $y=0.0933x-0.0025$, $R^2=0.9998$

1.4 综合分析超临界CO₂萃取法单因素试验及正交试验

分离温度对产物提取率的影响较小,参与响应

面优化的意义不大, 故选择萃取温度、萃取压力及 CO₂ 流量 3 个因素绘制响应面及等高线图。试验设计因素水平见表 3。

1.5 丹皮酚的抗菌作用

将所提丹皮酚分别配置成浓度为 0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 和 0.6% 溶液, 采用琼脂平板打孔法检测丹皮酚对细菌(大肠杆菌、枯草芽孢杆菌)和真菌(黑曲霉)的抑制作用。分别吸取各菌悬液 200 μL 分别与 50 °C 预热成液态的培养基混合后, 制成平板。用直径 6 mm 的无菌打孔器

在冷却的固体培养基平板表面打孔, 制成直径 6 mm 的加样孔, 细菌各孔分别标号 0、1、2、3、4、5 和 6, 真菌各孔分别标号 1、2、3、4 和 5。吸取 200 μL 各浓度的丹皮酚溶液依编号加入到加样孔中, 每个菌种重复 3 次, 细菌 37 °C 恒温培养 24 h, 真菌 28 °C 下培养 48 h, 观察并记录抑菌圈的大小。

2 结果与分析

2.1 水蒸气蒸馏法各因素对提取丹皮酚的影响

水蒸气蒸馏法正交实验结果见表 4。

表 4 水蒸气蒸馏法正交试验结果

Table 4 The results of orthogonal tests using steam distillation method

试验号 Test No.	A	B	C	D	提取率/% Extraction rate
1	1	1	1	1	1.34
2	1	2	2	2	1.58
3	1	3	3	3	1.40
4	2	1	2	3	1.50
5	2	2	3	1	1.75
6	2	3	1	2	1.63
7	3	1	3	2	1.36
8	3	2	1	3	1.32
9	3	3	2	1	1.45
K1	1.440	1.400	1.430	1.513	
K2	1.627	1.550	1.510	1.523	
K3	1.377	1.493	1.503	1.407	
R	0.250	0.150	1.080	1.116	

表 5 水蒸气蒸馏法的方差分析

Table 5 Analysis of variance from steam distillation

因素 Factor	偏差平方和 SD	自由度 DF	F 临界值 F threshold	F 比值 F specific value	显著性 Significance
A	0.101	2	4.460	2.349	*
B	0.034	2	4.460	0.791	
C	0.012	2	4.460	0.279	
D	0.025	2	4.460	0.581	

表 6 超临界 CO₂ 萃取法正交试验结果

Table 6 The results of orthogonal tests using supercritical fluid extraction method

试验号 Test No.	A	B	C	D	提取率/% Extraction rate
1	1	1	1	1	1.69
2	1	2	2	2	1.83
3	1	3	3	3	1.75
4	2	1	2	3	1.88
5	2	2	3	1	1.81
6	2	3	1	2	1.95
7	3	1	3	2	1.65
8	3	2	1	3	1.74
9	3	3	2	1	1.79
K1	1.757	1.740	1.793	1.763	
K2	1.880	1.793	1.833	1.810	
K3	1.727	1.830	1.737	1.790	
R	0.153	0.090	0.096	0.047	

表7 超临界CO₂萃取法的方差分析

Table 7 Analysis of variance from supercritical fluid extraction

因素 Factor	偏差平方和 SD	自由度 DF	F 临界值 F threshold	F 比值 F specific value	显著性 Significance
A	0.043	2	4.460	2.606	*
B	0.007	2	4.460	0.424	
C	0.012	2	4.460	0.727	
D	0.004	2	4.460	0.242	

表8 响应面设计和结果

Table 8 Design and results of RSM

组号 No.	因素 Factor			提取率/% Extraction rate
	A	B	C	
1	-1	-1	0	0.79
2	1	-1	0	0.70
3	-1	1	0	0.85
4	1	1	0	0.82
5	-1	0	-1	0.95
6	1	0	-1	0.78
7	-1	0	1	1.02
8	1	0	1	0.95
9	0	-1	-1	0.61
10	0	1	-1	0.81
11	0	-1	1	0.71
12	0	1	1	0.89
13	0	0	0	0.99
14	0	0	0	0.98
15	0	0	0	0.97
16	0	0	0	2.15
17	0	0	0	1.01

以丹皮酚得率为试验指标进行方差分析, 结果见表5。

正交试验结果表明, 最佳组合为 A₂B₂C₃D₁, 即温浸时间为 3 h, 温浸温度为 40℃, 料液比为 1:8, 加盐量为 1%时牡丹皮中丹皮酚提取率最高达 1.75%。由方差分析可知各因素对提取率影响力大小为 D>C>A>B。

2.2 超临界 CO₂ 萃取法各因素对提取丹皮酚影响

超临界 CO₂ 萃取法正交试验结果见表 6。

以丹皮酚得率为试验指标进行方差分析, 结果见表 7。

正交试验结果表明, 最佳组合为 A₂B₃C₁D₂, 最佳提取条件为萃取温度 50℃, 萃取压力 23 Mpa, CO₂ 流量 16 L·h⁻¹, 分离温度 40℃, 提取率最高达 1.95%。由方差分析可知各因素对提取率影响力大小为 A>C>B>D。

2.3 响应面方法分析超临界萃取各因素对萃取率的影响

按照响应面优化设计的试验因素进行实验安排, 结果见表 8。

由表 8 可知, 第 16 组丹皮酚提取率最高, 可达 2.15%。通过 Design Expert 软件对上述结果进行二次多项式分析得到一个提取率 (%) Y 对 3 个因素 A (萃取温度)、B (萃取压力)、C (CO₂ 流量) 的二次多项式方程, 方程为:

$$Y=1.91-0.083A+0.13B+0.100C+0.035AB+0.050AC-0.010BC-0.039A^2-0.36B^2-0.10C^2, R^2=0.9537$$

为更直观地反映各因素对提取率的影响, 将一个因素设为中心值, 描绘出相对应两因素的三维响应面图, 结果见图 1。

2.4 丹皮酚对细菌和真菌的抑制作用

分别取出 37℃ 恒温培养 24 h 的细菌和 28℃ 下培养 48 h 平板, 观察抑菌圈大小, 结果表明丹皮

酚对真菌和细菌均有一定的抑制作用, 且抑制作用与丹皮酚的浓度成正相关性, 随着丹皮酚浓度的增

加抑制作用越显著, 结果见下图 2A、2B 和 2C。

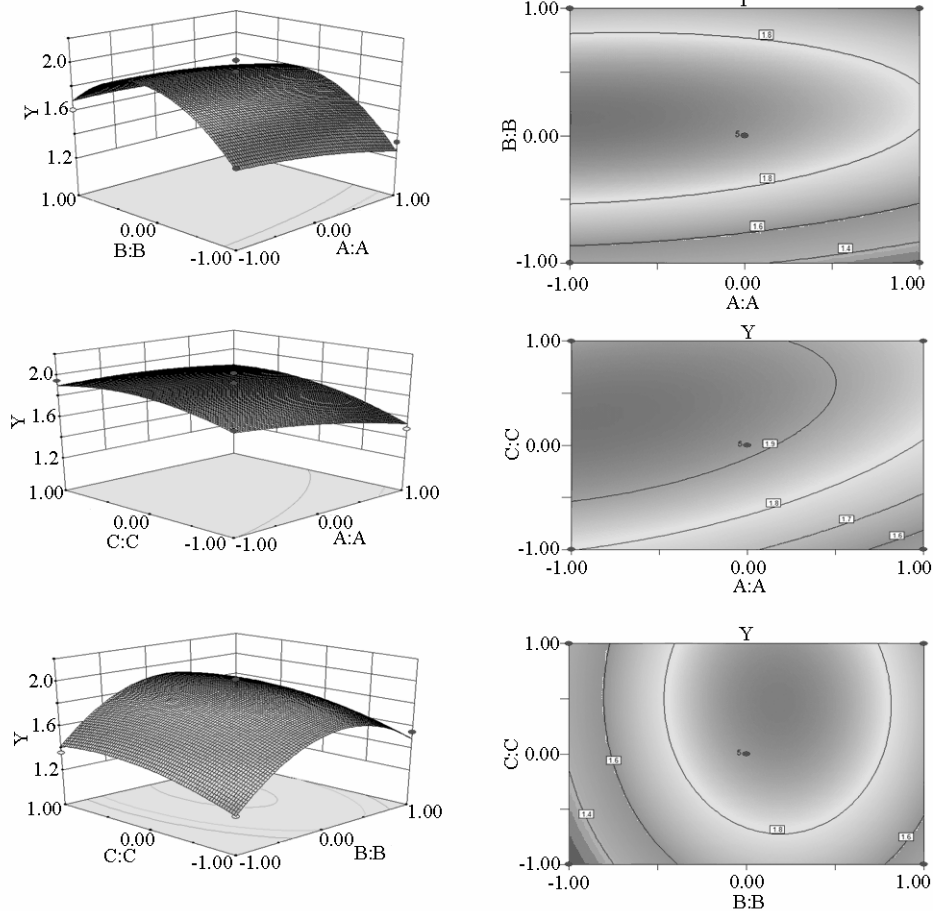


图 1 响应面和等高线图

Figure 1 Pictures of RSM and contour lines



A. 大肠杆菌 *E. coli*

B. 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*

C. 黑曲霉 *Aspergillus niger*

图 2 丹皮酚对细菌和真菌的抑制作用

Figure 2 Inhibition effects of paeonol on bacteria and fungal

3 小结与讨论

本研究表明超临界 CO_2 萃取法较水蒸气蒸馏法提取率高, 且快速方便, 易操作, 适合工业上大批量生产, 最佳提取条件为萃取温度为 50°C , 萃取压力为 23 Mpa , CO_2 流量为 $16\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 分离温度为 40°C , 丹皮酚得率可达 1.95% 。

丹皮酚溶解度低, 在冷水中易结晶, 但水蒸汽

蒸馏法所得蒸馏液中丹皮酚往往不易析出, 可以向蒸馏液中加入少许丹皮酚晶体放 4°C 冰箱中冷藏 24 h 。

通过响应面和等高线图, 可以直观的观测出超临界 CO_2 萃取法中各因素对提取率的影响。响应面越陡峭, 等高线越密集, 则说明该因素对提取率影响越大。由图可以看出萃取压力对丹皮酚提取率影响最大, 可能原因是压力可调节 CO_2 流体极性的大

小,因而更有效的将牡丹皮中丹皮酚萃取出来。

经 CO₂ 超临界萃取法提取的丹皮酚保持了牡丹皮提取物原有的药理活性,具有明显的抗菌作用。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典:一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 160-161.
- [2] 刘雁丽, 韦柳成, 沈振国, 等. 丹皮酚的药理作用、提取及含量测定方法研究进展[J]. 安徽医药, 2011, 15(7): 896-898.
- [3] 杨小龙, 张珂, 许俊锋, 等. 牡丹皮药理作用的研究进展[J]. 河南科技大学学报, 2012, 30(2): 157-158.
- [4] 杨正生, 彭振辉, 姚青海, 等. 丹皮的药理作用研究进展[J]. 中国药物与临床, 2011, 11(5): 545-547.
- [5] 高丽丽, 朱文娟, 罗晓健. 水蒸气蒸馏法提取丹皮酚工艺的研究[J]. 中国医学创新, 2009, 6(14): 18-19.
- [6] 付起凤, 孟凡佳, 苗青, 等. 牡丹皮中丹皮酚提取工艺的研究进展[J]. 中医药信息, 2010, 27(6): 108-109.
- [7] 李玉贤, 左静静. 丹皮酚的提取工艺及荧光性质[J]. 光谱实验室, 2011, 28(5): 2626-2630.
- [8] 刘媛, 夏超, 石金城, 等. 牡丹皮中丹皮酚提取工艺的研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2012, 37(6): 725-726.
- [9] 彭玲, 李成网, 张洁. 蒸馏法提取丹皮中丹皮酚的工艺研究[J]. 安徽医药, 2012, 16(4): 446-447.
- [10] Yang F, Liu CG, Wei Y J. Fluorimetric analysis of paeonol in Chinese herbal medicine *Cynanchi Paniculati Radix* by aluminum-sensitized fluorescence[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2012, 2(3): 294-299.
- [11] Song W T, Cai H R, Du L P. Fast Determination of paeonol from cortex moutan by microwave-assisted steam extraction followed by HPLC[J]. Chromatographia, 2012, 75: 747-753.
- [12] Liu B, Chang Y L, Jiang H L, et al. Extraction of paeonol from Jisheng Shenqi Wan using supercritical fluid extraction[J]. Biomedical Chromatography, 2007, 21: 79-83.
- [13] 谢华通, 梁晓原. 温度和压力对超临界 CO₂ 萃取丹皮中丹皮酚影响的研究[J]. 云南中医学院学报, 2007, 30(5): 25-29.
- [14] 龚明贵, 张巧明, 秦翠丽, 等. 牡丹中丹皮酚含量及其提取检测方法研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 709-710.
- [15] 曹春泉. 牡丹皮的化学成分分析研究概况[J]. 广州化工, 2013, 41(13): 35-36.
- [16] 宫春博, 康怀兴. 加酸加盐水蒸气蒸馏法提取牡丹皮中丹皮酚的工艺研究[J]. 山东中医药大学学报, 2013, 29(5): 162-163.