密脉鹅掌柴提取纯化工艺研究Δ

彭玲芳*,夏伟军,崔　涛#(云南省药物研究所,昆明　650111)

中图分类号　R284.2;R283　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2013)11-0987-03
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.10

摘　要　目的:研究密脉鹅掌柴的提取纯化工艺。方法:以提取次数、提取时间和加乙醇量为考察因素,以绿原酸、槲皮素、齐墩果酸含量的综合评分为指标,采用正交试验优选提取工艺;以总皂苷含量为指标,采用大孔吸附树脂柱层析法纯化提取溶液。结果:最佳提取工艺为加入9、7、7倍65%的乙醇,回流提取3次,分别提取2、1.5、1.5 h;纯化工艺为采用D101型大孔吸附树脂,以70%的乙醇为洗脱溶剂,流速为750 ml/h,洗脱体积为2柱体积。结论:优选的工艺可得到提取率较高的密脉鹅掌柴有效部位。
关键词　密脉鹅掌柴;工艺研究;大孔吸附树脂

Study on Extraction and Purification Technology of *Schefflera venulosa*

PENG Ling-fang, XIA Wei-jun, CUI Tao (Yunnan Institute of Meteria Medica, Kunming 650111, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To optimize the extraction and purification procedure for the extracts of *Schefflera venulosa*. METHODS: The extraction technology was optimized by orthogonal test with extraction times, extraction time and amount of ethanol as factors using the contents of chlorogenic acid, quercetin and oleanolic acid as index; the extraction solution was purified through D101 macroporous resin column chromatography using the content of total saponins as index. RESULTS: The optimum extraction conditions as follows: 65 % ethanol (9, 7, 7 times), reflux extracting 3 times for 2, 1.5, 1.5 h; purification technology was as follows: D101 macroporous resin, eluanting with 70% ethanol, flow rate of 750 ml/h, eluted volume of 2 BV. CONCLUSION: Optimal technology can extract the effective components of *S. venulosa*.
KEY WORDS　*Schefflera venulosa*; Technology study; Macroporous adsorption resin

密脉鹅掌柴提取物是云南省药物研究所研制的某一中药新药的原料药,为五加科鹅掌柴属植物密脉鹅掌柴*Schefflera venulosa*(Wight et Arn.)Harms的地上部分提取的有效部位。密脉鹅掌柴(*S. venulosa*)在云南习称七叶莲,在民间使用广泛,始载于《云南中草药选》,并收载于2005年版《云南省中药材标准》(第二册)彝族药部分,其分布于云南中部、西南部、东南部、南部和西北部以及贵州、湖南西部等地区[1]。其性温,味甘,具有止痛消肿、舒筋活络的功效,用于治疗风湿骨痛、头痛。鹅掌柴属植物在临床应用的种类较少,为了更好地开发利用这一资源,笔者对密脉鹅掌柴提取纯化工艺进行优选,以为进一步研究提供参考。

1　材料

1.1　仪器

UV-2501 PC紫外分光光度计(日本Shimadzu公司);1100 series高效液相色谱(HPLC)仪,包括光电二极管阵列检测器、色谱工作站(美国Agilent公司)。

1.2　药材

密脉鹅掌柴(*S. Venulosa*),云南省药物研究所自行种植,采摘后经云南省药物研究所高丽高级工程师鉴定为真品。

1.3　试剂

绿原酸、槲皮素、齐墩果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110753-200212、100081-200406、110709-200304);D101型大孔吸附树脂(天津市海光化工有限公司);甲醇、乙腈(色谱纯,美国Merck公司);其他试剂均为分析纯。

2　正交试验优选提取工艺

2.1　提取工艺设计

密脉鹅掌柴含有绿原酸、槲皮素衍生物及齐墩果酸衍生物等化合物[2-4]。因此,根据经验,拟用65%乙醇回流提取药材,以绿原酸、槲皮素、齐墩果酸含量为评价指标,以提取次数(A)、提取时间(B)、加乙醇量(C)为考察因素,采用正交试验优选工艺。因素与水平见表1。

表1　因素与水平

Tab 1　Factors and levels

水平	A,次	因素					
		B,h			C,倍		
		1次	2次	3次	1次	2次	3次
1	1	2.0	1.5,0.5	1.0,0.5,0.5	20	14,6	8,6,6
2	2	3.5	2.5,1.0	1.5,1.0,1.0	23	16,7	9,7,7
3	3	5.0	3.5,1.5	2.0,1.5,1.5	26	18,8	10,8,8

2.2　药材提取物干浸膏的制备

称取1 000 g药材粗粉,共9份,按正交试验的安排进行回流提取,合并提取液,减压回收乙醇,浓缩,水浴蒸干成稠膏

Δ 基金项目:云南省科技计划项目资助(No.2006KFZX-01)
* 高级工程师,硕士。研究方向:天然药物研发。E-mail:penglf428@126.com
# 通信作者:高级工程师。研究方向:天然药物研发。E-mail:ctao-10@163.com

后，真空干燥，得提取物干浸膏，备用。

2.3 绿原酸的含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱：Agilent ZORBAX ODS（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-0.4 %磷酸溶液（8∶92，*V*/*V*）；检测波长：327 nm；进样量：10 μl。理论板数按绿原酸峰计算应不低于2 500。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥24 h的绿原酸对照品适量，加甲醇制成每1 ml含绿原酸0.04 mg的溶液，作为对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取提取物干浸膏50 mg，置10 ml量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，用0.45 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.3.4 测定方法 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各10 μl，注入液相色谱仪测定，用外标两点法计算绿原酸含量。

2.4 槲皮素的含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱：Agilent ZORBAX ODS（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-0.4%磷酸溶液（32∶68，*V*/*V*）；检测波长：254 nm。理论板数按槲皮素峰计算应不低于2 500。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥24 h的槲皮素对照品适量，加甲醇制成每1 ml含槲皮素0.03 mg的溶液，作为对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密称取提取物干浸膏250 mg，加甲醇-25%盐酸溶液（4∶1，*V*/*V*）的混合溶液25 ml，摇匀，置水浴中加热回流30 min，迅速冷却至室温，转移至50 ml量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，用0.45 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.4.4 测定方法 分别精密吸取对照品溶液5 μl，供试品溶液10 μl，注入液相色谱仪测定，用外标两点法计算槲皮素含量。

2.5 齐墩果酸的含量测定

2.5.1 色谱条件 色谱柱：Agilent ZORBAX ODS（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-水（84∶16，*V*/*V*）；检测波长：203 nm；进样量：10 μl。理论板数按齐墩果酸峰计算应不低于2 500。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥24 h的齐墩果酸对照品适量，加甲醇制成每1 ml含齐墩果酸0.22 mg的溶液，作为对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液的制备 精密称取提取物干浸膏300 mg，加10%硫酸溶液50 ml，沸水回流水解4 h后，加氯仿15 ml再回流15 min，冷却后分液，用50 ml氯仿萃取，合并氯仿液，减压回收氯仿至干，残渣加甲醇溶解，移入10 ml量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，用0.45 μm微孔滤膜滤过，取滤液，即得。

2.5.4 测定方法 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各10 μl，注入液相色谱仪测定，用外标两点法计算齐墩果酸含量。

2.6 正交试验结果

按“2.3”、“2.4”、“2.5”项下方法分别测定正交试验下各干浸膏中绿原酸、槲皮素、齐墩果酸的含量，对各含量进行评分（评分＝100×各成分含量/各成分最高含量），并进行综合评分[综合评分＝（绿原酸评分+槲皮素评分+齐墩果酸评分）/3]。正交试验结果见表2；方差分析结果见表3。

表2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D(误差)	绿原酸含量，mg/g生药	槲皮素含量，mg/g生药	齐墩果酸含量，mg/g生药	绿原酸含量评分	槲皮素含量评分	齐墩果酸含量评分	综合评分
1	1	1	1	1	1.265	0.081	0.994	65.48	58.40	56.56	60.15
2	1	2	2	2	1.391	0.094	1.150	72.02	67.98	65.44	68.48
3	1	3	3	3	1.302	0.087	0.916	67.39	63.29	52.15	60.95
4	2	1	2	3	1.726	0.125	1.757	89.36	90.60	100.00	93.32
5	2	2	3	1	1.714	0.113	1.346	88.72	81.71	76.59	82.34
6	2	3	1	2	1.749	0.132	1.465	90.54	95.63	83.35	89.84
7	3	1	3	2	1.932	0.132	1.461	100.00	95.78	83.15	92.98
8	3	2	1	3	1.785	0.131	1.566	92.41	94.70	89.10	92.07
9	3	3	2	1	1.813	0.138	1.705	93.84	100.00	97.05	96.96
k_1	63.19	82.15	80.69	79.82							
k_2	88.50	80.96	86.25	83.77							
k_3	94.00	82.58	78.75	82.11							
R	30.81	1.62	7.50	3.95							

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

因素	离差平方和	自由度	均方	*F*	*P*
A	1 619.970	2	809.985	68.611	<0.05
B	4.220	2	2.110	0.179	
C	90.913	2	45.456	3.850	
D(误差)	23.61	2	11.805	1.000	

注：$F_{0.05}(2,2)=19.00$

note：$F_{0.05}(2,2)=19.00$

由表2、表3可知，各因素对工艺影响大小为提取次数＞加乙醇量＞提取时间。其中，提取次数对工艺有显著性影响（$P<0.05$），而提取时间、加乙醇量对工艺无显著性影响。最佳提取工艺为$A_3B_3C_2$，即加入65%的乙醇，回流提取3次，第1次加入9倍量回流2 h，第2次加入7倍量回流1.5 h，第3次加入7倍量回流1.5 h。

2.7 工艺验证试验

根据“2.6”项下最佳提取工艺，按“2.2”项下方法制备提取物干浸膏3份，并测定其中绿原酸、槲皮素、齐墩果酸的含量。结果，3份按最佳提取工艺提取的溶液中，绿原酸、槲皮素、齐墩果酸的平均含量分别为2.010、0.115 2、1.741 mg/g生药，与正交试验最高值相当，说明优选的工艺合理、可行。

3 大孔吸附树脂纯化工艺研究

经药效筛选实验证明，选用D101大孔吸附树脂纯化上述提取液，即样品溶液经过大孔吸附树脂，经水洗除去糖类、无机盐、黏液质等成分，再用乙醇洗脱，可得到密脉鹅掌柴有效

部位。

3.1 样品溶液的制备

称取密脉鹅掌柴药材8 000 g，按“2.6”项下最佳提取工艺操作，收集提取液，减压回收乙醇至8 L（无醇味），作为样品溶液，备用。

3.2 泄露点监测方法

根据多次试验摸索，发现绿原酸为最先被洗脱下来的成分，因此以绿原酸为对照，依次点样于硅胶G板上，以乙酸丁酯-甲酸-水（4∶3∶3，*V*/*V*/*V*）的上层液为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外光灯（365 nm）下检视，当对应位置出现与绿原酸对照品一致斑点时，即达泄露点。

3.3 上样量的确定

取样品溶液适量，通过500 g D101大孔吸附树脂柱，动态吸附，当通过树脂的样品溶液量为700 ml后，可检测到溶液中绿原酸含量急增，可计算得其最大上样量为大孔吸附树脂（湿）量-生药量为1∶1.4。考虑到大孔吸附树脂再次使用时上样量有所下降，故确定上样量为树脂（湿）量-生药量为1∶1.2。

3.4 水洗液用量的确定

取样品溶液500 ml，通过D101大孔吸附树脂柱，用水冲洗，收集流出液。以绿原酸为对照，按“3.2”项下方法进行检测，当检测到有绿原酸被洗脱出来时，即停止水洗脱，以免损失绿原酸。结果表明，用水洗脱达到1.3柱体积（BV）时，流出液出现与绿原酸对照品相应的斑点，故确定用1.3 BV水洗脱。

3.5 乙醇洗脱液浓度的确定

根据多次试验摸索和药效学实验，发现用25%乙醇可洗脱出绿原酸，用25%～45%乙醇可洗脱出黄酮类成分，而60%乙醇可洗脱出大部分皂苷类成分，且皂苷类成分为最后被洗脱下来的有效部位。因此，要得到理想的有效部位应以总皂苷含量为指标筛选乙醇洗脱浓度。

3.5.1 试验方法 分别取3份样品溶液，各500 ml，通过D101大孔吸附树脂柱，先用1.3 BV水冲洗，再分别用3 BV 60%、70%、80%乙醇充分洗脱，收集洗脱液。将各份洗脱液回收乙醇后，浓缩，干燥后记录干浸膏质量，并采用紫外分光光度法，以齐墩果酸为对照测定总皂苷含量。

3.5.2 总皂苷的含量测定 精密称取“3.5.1”项下干浸膏10 mg，置10 ml量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，精密吸取此溶液20 μl，置5 ml具塞试管中，挥干溶剂，加入5 %香草醛-冰乙酸液0.2 ml、高氯酸0.8 ml，加塞摇匀，于70 ℃水浴中加热20 min，取出，冷却至室温后，加乙酸乙酯至刻度，摇匀，在552 nm波长处测定吸光度（*A*），根据回归方程（$c=6.079\ 4A+0.067\ 8$，式中c为齐墩果酸质量浓度）计算总皂苷含量。结果，当乙醇洗脱浓度分别为60%、70%、80%时，总皂苷含量分别为19.8%、22.7%、19.3%，表明用70%的乙醇洗脱时总皂苷含量最高，故确定乙醇洗脱浓度为70%。

3.6 洗脱流速和洗脱体积的确定

取4份样品溶液，各600 ml，通过500 g D101大孔吸附树脂柱，待吸附完全后，先用1.3 BV水冲洗，再分别以250、500、750、1 000 ml/h的速度用70%乙醇洗脱，每瓶收集200 ml洗脱液，分别回收乙醇并干燥后，按“3.5.2”项下方法测定总皂苷含量，以总皂苷含量为纵坐标，洗脱体积为横坐标，绘制洗脱曲线。结果，当流速为250 ml/h时，用约1 000 ml 70%乙醇，基本洗脱完全；当流速为500 ml/h时，用约1 400 ml 70%乙醇，基本洗脱完全；当流速为750 ml/h时，用约1 600 ml 70%乙醇，基本洗脱完全；当流速为1 000 ml/h时，用约1 800 ml 70%乙醇基本洗脱完全。从耗醇量与洗脱时间综合考虑，确定流速为750 ml/h，用约1 600 ml（相当于2.0 BV）70%乙醇进行洗脱。

4 讨论

本文采用稀乙醇提取法，通过正交试验筛选出最佳提取工艺。在此提取工艺条件下，其有效成分的提取率较高。

大孔吸附树脂在中药有效成分的纯化方面适用范围广，不仅可以提高中药制剂中有效成分的相对含量，解决传统中药剂量大的难题，还能除去大量糖类、无机盐、黏液质等强吸潮性成分，提高产品的稳定性。可以相信，随着基础研究和应用研究的不断深入，大孔吸附树脂规格将向标准化发展，树脂生产工艺日趋成熟，大孔吸附树脂吸附层析技术也将进一步发展，这必然对中药制剂工艺改革和中药现代化发展起积极的推动作用[5]。本试验经HPLC法检测及药效实验证明，选用D101大孔吸附树脂进行纯化，可显著降低总固体得率，能得到密脉鹅掌柴有效部位，同时吸湿性降低，有利于将密脉鹅掌柴有效部位制成现代剂型的中药。

参考文献

[1] 陈蕾，朱雾虹，林瑞超.鹅掌柴属植物化学成分及生理活性研究概况[J].中药材，2002，25(5)：363.

[2] 彭玲芳，夏伟军，王京昆，等.密脉鹅掌柴的化学成分研究（Ⅰ）[J].云南大学学报：自然科学版，2009，31(5)：513.

[3] 崔涛，彭玲芳，丁中涛，等.密脉鹅掌柴的化学成分研究（Ⅱ）[J].云南大学学报：自然科学版，2011，33(1)：89.

[4] 崔涛，夏伟军，彭玲芳，等.七叶莲提取物中总黄酮和槲皮素的含量测定[J].药物分析杂志，2011，31(11)：32.

[5] 徐小燕，潘林梅.影响大孔树脂吸附分离的因素及其在中药制备工艺中的应用[J].中国药房，2007，18(9)：719.

（收稿日期：2012-03-28 修回日期：2012-05-09）

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊，欢迎投稿、订阅