

正交试验优选藏药独一味提取工艺^Δ

邱建国*,李茂星,张泉龙,尉丽力,贾正平#,张汝学,周 珺,邱宜农,王春英,陶 锐(兰州军区兰州总医院药材科/全军高原环境损伤防治重点实验室,兰州 730050)

中图分类号 R283.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)19-1760-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.10

摘要 目的:优选独一味的提取工艺。方法:以总环烯醚萜苷、总黄酮质量浓度和干浸膏得率为指标,以加水量、提取次数、提取时间为考察因素,采用正交试验优选独一味的提取工艺。同时采用冷藏除去杂质、低温减压干燥等工艺制备干浸膏。结果:优选工艺为加26倍量水量(初次补加4倍量的水),提取3次,每次1.5 h,水提取物在2~4℃下冷藏除去杂质,80℃减压干燥;该工艺条件下,总环烯醚萜苷质量浓度为45.35 μg/ml,总黄酮质量浓度为37.89 μg/ml,干浸膏得率为39.29%。结论:所选工艺稳定、可靠,有助于提高独一味水提取工艺及以水提物为原料生产的相关制剂的质量。

关键词 独一味;总黄酮;总环烯醚萜苷;干浸膏得率;提取工艺;正交试验

Optimization of the Extraction Process of Tibetan Medicine *Lamiophlomis rotata* by Orthogonal Test

QIU Jian-guo, LI Mao-xing, ZHANG Quan-long, WEI Li-li, JIA Zheng-ping, ZHANG Ru-xue, ZHOU Jun, QIU Yi-nong, WANG Chun-ying, TAO Rui (Dept. of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Key Lab of Prevention and Cure for Plateau Environment Damage of PLA, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction process of *Lamiophlomis rotata*. METHODS: The optimum extraction process was selected by orthogonal test with the yield of total iridoid glycoside, total flavonoids and dry extract as index using the amount of water, extraction times and extraction time as factor. The dry extract was prepared by cold storage, dust removal, dried under reduced pressure and low temperature. RESULTS: The optimum technology was as follows: adding 26-folds of water (4-folds of water at the first time), extracting for 3 times, 1.5 h per time, removing impurity at 2-4 °C, reducing pressure and drying at 80 °C; under the condition, the concentration of total iridoid glycoside was 45.35 μg/ml, the concentration of total flavonoids was 37.89 μg/ml, and the yield of dry extract was 39.29%. CONCLUSIONS: The optimum technology is stable and reliable, contributes to improve water extraction technology of *L. rotata* and the quality of related prepared.

KEYWORDS *Lamiophlomis rotata*; Total flavonoids; Total iridoid glycoside; Yield of dry extract; Extraction technology; Orthogonal experiment

藏药独一味来源于唇形科独一味属植物独一味 *Lamiophlomis Rotata* (Benth)。Kudo 的地上部分,具有活血、止血镇痛等功效^[1],其主要化学成分有黄酮类化合物木犀草素、芹菜素和

槲皮素等,环烯醚萜苷类化合物山柰苷甲酯、番木鳖苷、8-O-乙酰山柰苷甲酯等,苯乙醇苷类化合物麦角甾苷、连翘酯苷B等,此外还含有偏诺皂苷元、β-谷甾醇等^[2]。采用正交试验法研究

- [2] 丁晨旭,纪兰菊.香薷化学成分及药理作用研究进展[J].上海中医药杂志,2005,39(5):63.
- [3] 吴伟,崔光华,陆彬.试验设计中多指标的优化:星点设计和总评“归一值”的应用[J].中国药学杂志,2000,35(8):532.
- [4] Hassan EE, Parish RC, Gallo JM. Optimized formulation of magnetic chitosan microspheres containing the anti cancer agent, oxantrazole[J]. *Pharm Res*, 1992, 9(3):390.
- [5] 辛秀,袁琳,雷磊,等.星点设计-效应面法优化赶黄草提

- 取工艺[J].中国药房,2009,20(24):1872.
- [6] 黄家卫,盛振华,吴巧凤.香薷挥发油的提取工艺研究[J].中华中医药杂志,2010,25(12):2136.
- [7] 贾连群,杨关林,陈阳,等.中心组合设计-效应面法优选化痰祛痰颗粒的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(13):22.
- [8] 陈学智,谢志军,温成平,等.中心组合设计优化小香勾总黄酮提取工艺研究[J].中华中医药杂志,2013,28(4):1122.
- [9] 金达明,吴俊,赵岩,等.中心组合设计-响应面分析法优选人参中总皂苷的超声提取工艺[J].时珍国医国药,2012,23(9):2148.
- [10] 孙鹏,裴国亮,孙先锋.中心组合设计优化酶法提取胖大海多糖工艺[J].食品工业科技,2013,34(2):268.

(收稿日期:2013-07-09 修回日期:2014-03-23)

Δ 基金项目:甘肃省科技重大专项计划项目(No.1102FKDA012)
* 副主任药师。研究方向:高原植物药。电话:0931-8994676。
E-mail:qjianguo@163.com
通信作者:主任药师,博士研究生导师,博士。研究方向:医院药学。电话:0931-8994652

独一味的水提取工艺已有较多报道^[3-4],但是主要以木犀草素、总黄酮等^[5]为检测指标优选提取工艺。本课题组前期大量研究表明,独一味经水提取、聚酰胺去黄酮、大孔吸附树脂富集处理后所得总环烯醚萜苷具有止血、镇痛、抗炎的作用^[6-9]。2010年版《中国药典》(一部)已经将独一味药材及其制剂质量标准中“木犀草素含量测定”项,修订为山柽苷甲酯和8-O-乙酰山柽苷甲酯的含量测定^[1]。本研究首次以总环烯醚萜苷和总黄酮以及干浸膏得率为评价指标,采用正交试验法优选独一味水提取工艺。

1 材料

1.1 仪器

HP8453型紫外-可见分光光度计(美国惠普公司);真空干燥柜(武汉制药机械厂);KQ-250 B型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);800型离心机(上海手术器械厂);HTN-0.3/0.2型提取罐、HTN-3型真空浓缩罐(陕西三原宏达实业公司)。

1.2 药材

独一味购自甘肃省玛曲县黄河首曲药源开发有限公司(批号:20081001、20091001、20110801),经兰州军区兰州总医院副主任药师李茂星鉴定为真品。

1.3 试剂

芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-200707);8-O-乙酰山柽苷甲酯(全军高原环境损伤防治重点实验室,纯度:≥97.5%);亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、乙醇、甲醇为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 吸水率考察

称取药材10 g,共3份,加200 ml水浸至透心,滤过,称定质量,计算吸水率(吸水质量/药材干质量×100%),药材吸水质量约为药材质量的4倍。吸水率测定结果见表1。

表1 吸水率测定结果

Tab 1 Results of water absorption

试验次数	药材干质量,g	药材湿质量,g	吸水质量,g	吸水率,%	吸水率平均值,%
1	10	42.8	32.8	328	
2	10	43.8	33.8	338	331
3	10	42.7	32.7	327	

2.2 紫外-可见分光光度法测定总黄酮质量浓度^[1]

2.2.1 对照品溶液的制备 取于120℃减压干燥至恒质量的芦丁对照品0.2 g,精密称定,置100 ml量瓶中,加70%乙醇70 ml,置水浴上微热,使溶解,放冷,以70%乙醇定容至刻度,摇匀,即得(每1 ml中含芦丁0.2 mg)。

2.2.2 标准曲线的制备 精密量取“2.2.1”项下对照品溶液1、2、3、4、5、6、7 ml,分别置25 ml量瓶中,加水至6 ml,加5%亚硝酸钠溶液1 ml,摇匀,放置6 min,加氢氧化钠溶液10 ml,再加水定容至刻度,摇匀,放置15 min;以相应溶液为空白对照。在500 nm波长处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标,质量浓度(c)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $A=0.011c+0.0087$ ($r=0.9994$)。结果表明,芦丁质量浓度在8~56 μg/ml范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.2.3 供试品溶液的制备 取正交试验提取样品0.4 g,精密称定,置100 ml量瓶中,加70%乙醇70 ml,置水浴上微热并时时振摇30 min,放冷,加70%乙醇定容至刻度,摇匀,放置4 h,精密量取上清液1 ml,置25 ml量瓶中,按“2.2.2”项下方法取样测定,计算芦丁质量浓度。

2.3 一阶导数紫外分光光度法测定总环烯醚萜苷含量^[9]

2.3.1 对照品溶液的制备 取独一味提取物中分离得到的8-O-乙酰山柽苷甲酯40 mg,精密称定,置100 ml量瓶中,加水定容至刻度,得对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液5 ml,置25 ml量瓶中,加水定容至刻度,得对照品溶液。

2.3.2 标准曲线的制备 精密吸取8-O-乙酰山柽苷甲酯对照品溶液1、2、3、4、5、6、7 ml,分别置10 ml量瓶中,加水定容至刻度,以一阶导数紫外分光光度法在252 nm波长处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标,质量浓度(c)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $A=-0.001c-0.0002$ ($r=0.9995$)。结果表明,8-O-乙酰山柽苷甲酯质量浓度在8~56 μg/ml范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.3.3 供试品溶液的制备 取正交试验提取样品0.15 g,精密称定,置10 ml量瓶中,用水溶解并定容至刻度,精密吸取上述溶液2 ml,用20 ml水稀释,将20 ml稀释液加于聚酰胺柱,并以5 ml/min流速用水洗脱并定容至100 ml量瓶中,得供试品溶液,以一阶导数紫外分光光度法在252 nm波长处测定吸光度,计算总环烯醚萜苷含量。

2.4 正交试验法优选提取工艺

2.4.1 正交试验 称取独一味500 g,以影响提取率的加水量(倍数)、提取次数、提取时间为因素,每因素取3个水平,选用 $L_9(3^4)$ 正交设计表。以总黄酮质量浓度、总环烯醚萜苷质量浓度、干浸膏得率为指标进行测定考察。[干浸膏得率(%)=提取干燥物质量/药材质量×100%;综合评分^[10]=总环烯醚萜苷质量浓度/总环烯醚萜苷最大质量浓度×40%+总黄酮质量浓度/总黄酮最大质量浓度×30%+干浸膏得率/干浸膏最大得率×30%]。因素水平见表2;正交试验结果见表3。

表2 因素水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素		
	A,倍	B,次	C,h
1	18	1	1.0
2	22	2	1.5
3	26	3	2.0

表3 正交试验结果

Tab 3 Results of orthogonal experiments

序号	A	B	C	总环烯醚萜苷, μg/ml	总黄酮, μg/ml	干浸膏得率,%	综合评分
1	18	1	1.0	26.19	30.26	23.73	43.28
2	18	2	1.5	37.53	47.12	32.06	61.21
3	18	3	2.0	33.68	52.38	36.57	65.76
4	22	1	1.5	30.18	33.06	30.20	52.19
5	22	2	2.0	31.70	28.53	31.10	52.34
6	22	3	1.0	39.00	49.84	36.40	66.95
7	26	1	2.0	28.78	33.66	26.39	48.00
8	26	2	1.0	34.94	34.87	33.14	57.58
9	26	3	1.5	45.35	37.89	39.29	68.80
K_1	56.75	47.82	55.94				
K_2	57.16	57.04	60.73				
K_3	58.13	67.17	55.37				
R	1.38	19.35	5.37				

2.4.2 方差分析 以总环烯醚萜苷含量占40%、总黄酮含量和干浸膏得率分别占30%的比例进行综合评分评价,极差分析与方差分析结论一致,即 $B>C>A$,提取次数有统计学意义,最优工艺为 $B_3C_2A_3$,即加26倍量水,每次提取1.5 h,提取3次。方差分析结果见表4。

表4 方差分析结果

Tab 4 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	2.995	2	1.498	0.103	>0.05
B	561.757	2	280.879	19.320	<0.05
C	52.123	2	26.062	1.793	>0.05
误差(D)	29.08	2	14.540		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ note: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

2.5 除去杂质

精密量取8 ml水提取液,以离心半径为8 cm、4 000 r/min离心5 min,将上清液置10 ml量瓶中,加水定容至刻度,按“2.2”“2.3”项下方法测定总黄酮和总环烯醚萜苷质量浓度,比较离心前后差异。离心前、后总黄酮和环烯醚萜苷质量浓度差异无统计学意义($P > 0.05$)。由于离心后上清液取样不均匀导致离心后总环烯醚萜苷和总黄酮含量个别略有增加,所以在以后的试验中应精密量取,以减少操作所致的误差。为尽可能除去无效物质,保留有效物质,可以将工艺进一步优选为提取、滤过(粗滤)、沉淀(静置或离心)。总黄酮、环烯醚萜苷离心前、后含量测定结果比较见表5。

表5 总黄酮、环烯醚萜苷离心前后含量测定结果比较

Tab 5 Comparison of total flavonoids and total iridoid glycoside before and after centrifugalization

序号	总环烯醚萜苷, $\mu\text{g/ml}$		总黄酮, $\mu\text{g/ml}$	
	离心前	离心后	离心前	离心后
1	35.50	35.00	41.61	43.27
2	19.20	19.50	23.22	23.54
3	36.30	36.00	47.39	48.10
4	39.53	40.64	47.59	49.93
5	43.67	45.28	36.42	35.30
\bar{x}	38.75	39.23	43.25	44.15
s	± 3.71	± 4.72	± 5.33	± 6.53

2.6 工艺验证

称取药材500 g,按照正交试验最优水平组合 $A_3B_3C_2$,即每次加26倍量水,首次补加4倍量水,每次提取1.5 h,提取3次,合并3次提取液,离心除去杂质,进行5批提取工艺试验的验证。工艺验证测得结果与正交试验测得结果中的最高值相近,则正交试验优选工艺可行。所以,按正交试验优选工艺进行水提取生产,验证试验结果见表6。

表6 验证试验结果

Tab 6 Results of validation test

试验号	总环烯醚萜苷质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	总黄酮质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	备注(批号)
1	35.00	43.27	20091001
2	29.50	33.54	20081001
3	36.00	48.10	20110801
4	40.64	49.93	20110801
5	45.28	45.30	20110801
\bar{x}	37.28	42.03	
s	± 5.97	± 7.39	

2.7 中试生产

根据上述正交试验优选研究结果,以批号20110801药材扩大10倍投料进行中试,三批投料量分别为10.4、10.6、12.1 kg,于压力0.1 Mpa水煎煮提取,提取液经过2~4 °C冷藏、静置、除去杂质,上清液减压浓缩,真空干燥得干浸膏,干浸膏粉碎,取适量置五氧化二磷干燥器中干燥至恒质量,按“2.2”

“2.3”项目下方法测定。中试生产中总环烯醚萜苷质量浓度与小试和工艺验证比较差异无统计学意义,总黄酮质量和干浸膏得率有所降低,初步分析可能是由低温静置除杂质造成一定损失,有待进一步研究。中试生产试验结果见表7。

表7 中试生产试验结果

Tab 7 Results of the batches of pilot scale production

批号	投料质量, kg	干浸膏质量, kg	总黄酮, $\mu\text{g/ml}$	总环烯醚萜苷, $\mu\text{g/ml}$	干浸膏得率, %
20130501	10.40	2.40	22.24	45.086	23.10
20130502	10.60	2.50	22.10	44.364	23.60
20130503	12.10	3.00	23.06	40.941	24.80
\bar{x}	11.03	2.63	22.47	43.460	23.83
s	0.93	0.32	0.52	2.210	0.87

3 讨论

2010年版《中国药典》(一部)中独一味药材及其制剂以比色法测定总黄酮(芦丁为代表),高效液相色谱法测定环烯醚萜苷类成分山梔苷甲酯和8-O-乙酰山梔苷甲酯含量。本课题组目前研究结果表明,总环烯醚萜苷具有止血、镇痛、抗炎的药效,山梔苷甲酯和8-O-乙酰山梔苷甲酯虽然在总环烯醚萜苷类成分中含量较高,但其是否具有该药效,本课题组正在进一步研究。综合考虑,本课题组认为目前采用总环烯醚萜苷、总黄酮、干浸膏得率为检测指标进行正交试验优选提取工艺较为合理,所以本文以总环烯醚萜苷和总黄酮为含量检测指标,并根据二者极性较大的性质,采用水作为提取溶剂进行正交试验优选提取工艺,对干浸膏得率及总黄酮、总环烯醚萜苷含量进行综合评分、极差分析和t检验。

加水量试验结果表明,药材在首次煎煮时对溶剂有一定的吸附性,所以根据吸水率在首次煎煮时补加吸水率的水,否则药材不能保证充分浸泡。

在除去杂质试验中,本研究中试试验可以采取离心方式,中试及工业化生产中除去杂质因不具备离心设备,经过反复试验考察,采用低温(2~4 °C)静置沉淀除去杂质成本最低,效果最好。本方法可为工业化提取溶液除去杂质提供了一定的依据和参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:938.
- [2] 王瑞冬. 独一味的生药学研究[D]. 上海:第二军医大学, 2005.
- [3] 刘晔玮, 赵亮, 邸多隆, 等. 藏药独一味提取工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1594.
- [4] 唐坤, 蔡应繁, 李标, 等. 独一味提取方法的优化研究[J]. 中药材, 2008, 31(5): 756.
- [5] 唐坤, 王文全, 李标. 正交试验法优选醋炙独一味炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 10.
- [6] Li MX, Shang XF, Zhang RX, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of iridoid glycosides extract of *Lamiophlomis rotata* (Benth) Kudo[J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(2): 167.
- [7] Li MX, Zhang RX, Jia ZP, et al. Isolation and identification of hemostatic ingredients from *Lamiophlomis rotata* (Benth) Kudo[J]. *Phytother Res*, 2009, 23(6): 816.
- [8] 李茂星, 贾正平, 胡之德, 等. 藏药独一味止血有效部位总

正交试验优选黑面神枝叶中总黄酮水提工艺^Δ

彭伟文*,王英晶,梅全喜,戴卫波,吴飞(广州中医药大学附属中山医院,广东中山 528400)

中图分类号 R284.2;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)19-1763-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.11

摘要 目的:优选黑面神枝叶中总黄酮的水提工艺。方法:采用单因素试验考察提取方法、提取温度、提取时间、加水量及提取次数对总黄酮提取率的影响。在此基础上,以总黄酮含量为评价指标,采用正交试验优选提取时间、提取次数和加水量对总黄酮提取率的影响。结果:最佳总黄酮水提工艺为100℃下加热提取,加20倍量水,提取2次,每次1h。该条件下,黑面神枝叶中提取的总黄酮含量为79.16 mg/g。结论:所选工艺合理、可行,可用于黑面神枝叶中总黄酮的提取。

关键词 黑面神;总黄酮;提取工艺;单因素试验;正交试验

Optimization of Water Extraction Technology of Total Flavonoids from the Leaves of *Breynia fruticosa*

PENG Wei-wen, WANG Ying-jing, MEI Quan-xi, DAI Wei-bo, WU Fei (The Affiliated Zhongshan Hospital, Guangzhou University of TCM, Guangdong Zhongshan 528400, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the water extraction technology of total flavonoids from the leaves of *Breynia fruticosa*. METHODS: Single factor test was adopted to investigate the effects of extraction method, extraction temperature, extraction time, water amount and extraction times on extraction rate of total flavonoids. Using the content of total flavonoids as index, the effects of extraction time, extraction times and water amount on the extraction rate of total flavonoids were optimized by orthogonal design. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows: extraction temperature of 100℃, 20 folds of water, extracting for 2 times, 1 h for each time. Under above conditions, the content of total flavonoids from the leaves of *B. fruticosa* was 79.16 mg/g. CONCLUSIONS: The technology is reasonable and feasible, and can be used for the extraction of total flavonoids from the leaves of *B. fruticosa*.

KEYWORDS *Breynia fruticosa*; Total flavonoids; Extraction technology; Single factor test; Orthogonal experiment

黑面神系属大戟科黑面神属植物 *Breynia fruticosa* (L.) Hook. f. 的干燥嫩枝叶,主产于广东、广西等地,具有清湿热、化痰滞之功效。黑面神可用于皮炎、湿疹、皮肤瘙痒等多种皮肤病及慢性支气管炎的治疗,还作为“湛江蛇药”的一种重要成分治疗毒蛇咬伤^[1]。黑面神主要含有三萜类、黄酮类^[2-4]、酚类和鞣质等成分^[5]。黄酮类成分广泛存在于自然界中,且具有广泛的生物活性,如抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗氧化、调节心血管等^[6-7]。本试验采用紫外分光光度法首次对黑面神枝叶总黄酮水提工艺进行优化,以为有效利用黄酮类成分提供依据^[8-9]。

1 材料

1.1 仪器

BS224S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);UV-2550型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);KQ3200E医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH-S4数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);RE-2000B型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III型循环水真空泵(巩义市英峪华中仪器厂)。

1.2 药材

黑面神枝叶,购自广州致信药业有限公司,经笔者鉴定为大戟科黑面神属植物 *B. fruticosa* (L.) Hook. f. 的干燥嫩枝叶。

1.3 试剂

芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:0080-9705);硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠、无水乙醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取芦丁对照品0.0109g,置25ml量瓶中,加入适量70%乙醇,超声处理(功率:250W,频率:20kHz),使溶解,放冷,加70%乙醇至刻度,摇匀,即得(每1ml含芦丁0.436mg)。

2.2 标准曲线的制备

精密量取芦丁对照品溶液0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0ml,分别置25ml量瓶中,各加水至6ml,分别加5%NaNO₂溶液1ml,摇匀,静置6min,再加10%Al(NO₃)₃溶液1ml,摇匀,静

环烯醚萜苷对大鼠血液凝集参数的影响[J].中国药房,2007,18(03):231.

Δ 基金项目:广东省建设中医药强省立项资助课题(No.2010073);中山市科技计划项目(No.20102A033)

*主任中药师,教授,硕士研究生导师。研究方向:中药制剂研发。电话:0760-88815106。E-mail:pww200688@21cn.com

[9] 李茂星,贾正平,胡之德,等.藏药独一味中总环烯醚萜苷的含量测定[J].华西药学杂志,2007,22(2):208.

[10] 孙振球.医学统计学[M].北京:人民卫生出版社,2005:405.

(收稿日期:2013-07-02 修回日期:2013-08-17)