

正交试验结合 HPLC 法筛选太白洋参提取工艺*

颜永刚** 吴玲 马妮 李博 王玉 薛泉

(陕西中医学院药学院, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 筛选太白洋参中化学成分提取的最佳工艺条件。方法 采用 HPLC 法,以太白洋参中桃叶珊瑚苷相对含量为评判指标,通过正交试验设计,考察乙醇浓度、提取时间、提取次数、温度等因素对太白洋参中桃叶珊瑚苷化学成分的影响,确定最佳提取条件。结果 用水提取:温度 80℃;提取次数 3 次;提取时间 90 min 的效果最好。用乙醇提取:乙醇浓度 60%;提取次数 2 次;提取时间 120 min 的效果最好。结论 经综合分析提取最佳工艺为乙醇浓度 60%,溶媒用量为 6 倍,回流时间 120 min,提取次数 2 次。该研究方法综合中药化学整体特征,为提取工艺评价方法提供借鉴。太白洋参中桃叶珊瑚苷提取工艺的优化,为太白洋参中桃叶珊瑚苷进一步研究提供参考。

关键词:太白洋参;正交试验;HPLC;桃叶珊瑚苷;提取工艺

中图分类号: R 284.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-168X(2015)02-0074-04

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2015.02.029

Extraction Techniques for Pedicularis Decora Franch Screening by Orthogonal Test and HPLC

YAN Yonggang, WU Ling, MA Ni, LI Bo, WANG Yu, XUE Quan

(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

Abstract Objective: To screen the optimum technological conditions for extracting the chemical compositions in pedicularis decora franch. **Methods:** The comparative contents of aucubin in screened pedicularis decora franch as the evaluation indexes by HPLC, the influence of the factors like ethanol concentrations, extraction time, extraction frequencies and temperatures over the chemical composition of aucubin in pedicularis decora franch were observed by orthogonal test to determine the optimum conditions. **Results:** The optimum conditions of extraction by water: 80℃, 3 times and 90 minutes; the optimum conditions of extraction by ethanol: 60% concentration, twice and 120 minutes. **Conclusion:** Through comprehensive analysis, the optimum extraction conditions are that the concentration of ethanol is 60%, solvent volume is 6 times, the reflux hour is 120 minutes and the extraction frequency is twice. The research method provides a lesson for evaluation of the extraction technologies, combined the overall features of Chinese medical chemistry. The optimum techniques of extracting aucubin from pedicularis decora franch provide references for its further research.

Keywords pedicularis decora franch; orthogonal test; HPLC; aucubin; extraction techniques

太白洋参为玄参科植物美观马先蒿 *Pedicularis decora Franch.* 的干燥根,被民间视为珍贵补

品,是有名的“太白七药”之一。别名有太白参,黑参。其味甘,微苦;性温;归脾、肾经。具有滋阴补

* 基金项目:陕西省科技厅(2011JQ4011);国家级大学生创新创业训练计划项目:太白洋参抗衰老性痴呆活性物质基础指纹图谱研究;陕西省药品监督管理局项目:太白洋参药材质量标准研究

** 通讯作者:颜永刚,(1978-),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事中药品种、品种与资源开发研究,以及中药物质基础和质量标准研究工作。E-mail:yunfeng828@163.com.

肾,补中益气,健脾和胃,消炎止痛等功效^[1]。现代药理表明太白洋参具有提高机体免疫能力、健脑益智、抗疲劳、增强机体对有害刺激的抵抗力和延缓衰老的作用,可以用于老年性痴呆的预防和治疗^[2-4]。目前对太白洋参提取工艺的研究报道主要以水提和总浸膏量为评价指标进行研究。由于总浸膏量为评价指标缺乏专属性、准确性,鉴于此,本实验从化学成分角度,采用正交试验设计,结合 HPLC 法,以桃叶珊瑚苷成分的含量为控制指标考察太白洋参的提取工艺,筛选太白洋参提取工艺。以便为太白洋参提取分离提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 日本岛津 LC-2010A HT 高效液相色谱仪、UV-VIS 检测器、LC solution 工作站(日本岛津公司),GB2042 电子天平(瑞典)0.1 mg);ZDHW 型调温电热套(河北省中兴仪器有限公司);连续回流提取器(上海洪纪仪器设备有限公司);旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);HWS28 型电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司)。

1.2 样品来源 太白洋参药材,采自太白县石沟,经雷国莲教授鉴定,为太白洋参为玄参科植物美观马先蒿 *Pedicularis decora* Franch. 的干燥根。

1.3 试剂 无水乙醇、甲醇(天津市致远化学试剂有限公司);其他试剂均为分析纯,95 % 乙醇。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS₂ C₁₈ (4.6 mm×150 mm,5 μm);检测波长 203 nm;柱温: 25 ℃。流动相: 乙腈 - 水 (5 : 95), 体积流量: 0.5 ml/min。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定桃叶珊瑚苷对照品 5.000 mg,置 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解定容,制成 0.5 mg/mL 对照品溶液,避光冰箱保存,备用。

2.1.3 供试品(样品)溶液的制备 精确称量太白洋参粉末各 0.5002 g,置三角瓶中,加入乙醚 20 mL 提取 2 小时,经乙醚脱脂处理后,残渣用甲醇 25 mL 冷浸超声提取 2 次,每次 30 min,然后定容

至 20 mL 容量瓶,0.45 微米微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.1.4 标准曲线绘制 精密吸取 1、2、4、6、8、10、20 μL 的对照品溶液,注入高效液相色谱仪,测定峰面积,以对照品溶液进样量的体积为横坐标(X),色谱峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程为: Y=739.69X+2.77 (R²=0.9999)。线性关系良好,线性范围: 0.50 μg-10.0 μg。

2.1.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL,连续进样 5 次,测定桃叶珊瑚苷峰面积,结果其 RSD 为 1.26 %,表明仪器的精密度良好。

2.1.6 重现性试验 取同一样品,按“2.1.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,测定,计算桃叶珊瑚苷质量分数,RSD 为 2.32 %,表明该条件重现性良好。

2.1.7 稳定性试验 将供试品溶液在室温放置 0、2、4、6、8、12 h 后分别进样 10 μL,进行测定,结果桃叶珊瑚苷峰面积 RSD 为 0.82 %,表明在本实验条件下供试品溶液在室温下放置 12 h 内基本稳定。

2.1.8 回收率试验 取自采于太白县石沟太白洋参粉末 6 份,精密称定。分别按其含量的 80 %、100 %、120 % 精密加入桃叶珊瑚苷对照品适量,按照“2.1.3”项方法制备供试品溶液,测定,计算加样回收率,结果平均回收率为 99.75 %,RSD 为 2.81 %,表明本法回收率较好。结果见表 1。

表 1 加样回收率

编号	样品质量(g)	加入桃叶珊瑚苷的质量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均值(%)	RSD(%)
1	0.1005	2.08	4.62	96.5	99.75	2.81
2	0.1003	2.07	4.64	97.6		
3	0.1000	2.60	5.17	98.9		
4	0.0998	2.61	5.19	99.9		
5	0.0999	3.12	5.82	103.4		
6	0.1001	3.11	5.99	102.2		

2.2 提取工艺考察 通过正交实验考察不同提取条件对桃叶珊瑚苷含量的影响,最后确定出太白洋参的最佳提取工艺^[5-9]。

2.2.1 单因素考察

2.2.1.1 提取溶媒考察 精密称取太白洋参药材粉末约 5.00 g,分别以水、甲醇、乙醇为提取溶媒,溶媒用量为 8 倍,超声 30 min,滤过,以相应溶媒定容于 20 mL 量瓶中,制备样品,精密吸取药液 5 μL,测定,以标准曲线法计算含量,结果以水、乙醇为溶媒时提取率较高。结果见表 2。

表 2 溶媒考察结果分析

溶媒名称	水	甲醇	乙醇
桃叶珊瑚苷含量(%)	2.61	2.51	2.62

2.2.1.2 提取方法考察 精密称取太白洋参药材粉末约 5.00 g,以乙醇为提取溶媒,溶媒用量为 8 倍,分别超声和回流 30 min,滤过,以相应溶媒定容于 20 mL 量瓶中,制备样品,精密吸取药液 5 μL,测定,以标准曲线法计算含量,结果以乙醇回流提取时提取率较高。

2.2.1.3 溶媒用量考察 精密称取太白洋参药材粉末约 5.00 g,以乙醇为提取溶媒,溶媒用量分别为 6、8、10 倍,回流 30 min,滤过,以相应用量的溶媒定容于 20 mL 量瓶中,制备样品,精密吸取药液 5 μL,测定,以标准曲线法计算含量,结果乙醇用量为 6、8、10 倍时提取率无显著差异,故以 6 倍量为溶剂用量。

2.2.2 正交实验 选取提取时间,乙醇浓度,提取次数中的 3 个因素,以桃叶珊瑚苷含量作为评价指标,选用 L₉(3³) 正交表进行实验。水平因素见表 3。

表 3 乙醇提取工艺因素水平表

水平	因素		
	A 乙醇浓度/%	B 提取时间/min	C 提取次数
1	60	60	1
2	70	90	2
3	100	120	3

2.2.3 结果分析

2.2.3.1 乙醇提取工艺 结果见表 4、表 5。直观分析可以看出,试验因素的主次顺序为提取次数>提取时间>乙醇浓度,最优水平为 A₁B₃C₃。方差分析说明提取次数对试验影响差异达到显著水平。

表 4 乙醇提取工艺正交实验方案和结果

试验号	A	B	C	桃叶珊瑚苷含量/%
1	1	1	1	2.46
2	2	1	2	2.48
3	3	1	3	2.59
4	1	2	2	2.68
5	2	2	3	2.64
6	3	2	1	2.49
7	1	3	3	2.72
8	2	3	1	2.51
9	3	3	2	2.60
K ₁	1.800	1.657	1.470	
K ₂	1.770	1.862	1.889	
R	1.912	1.963	2.123	
K _R	0.142	0.306	0.653	

表 5 乙醇提取工艺方差分析表

方差来源	方差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	0.0037343	2	0.001867	1.13	
B	0.016210	2	0.008105	4.93	
C	0.072970	2	0.036480	22.02	P<0.05
误差	0.003286	2	0.001643		

$F_{0.05}(2,2)=19.0$ $F_{0.01}(2,2)=99.0$

2.3 验证试验 根据正交试验结果对 A₁B₃C₃ 工艺条件重复 3 次试验,以验证该工艺的合理性和稳定性,结果 RSD=2.32%,最后,经过综合分析,确定的最佳提取工艺为乙醇浓度 60%,溶媒用量为 6 倍,回流时间 120 min,提取次数 2 次。

3 讨论

3.1 桃叶珊瑚苷具有止痛、抗炎、抗病毒、保肝等多种生理活性^[10],是其中的药效成分。本研究从太白洋参中分离得到了桃叶珊瑚苷,有助于进一步了解太白洋参的药理作用机制,也有助于太白洋参药材质量标准的制定。

3.2 桃叶珊瑚苷属环烯醚萜苷类化合物,化学性质活泼,在加热、有酸或碱存在的条件下不稳定^[11]。本实验结果显示在乙醇提取工艺试验中,提取次数是最主要因素,试验中最优水平为 A₁B₃C₃,但在实际提取中,考虑到经济因素,建议采用 A₁B₂C₃ 或 A₁B₂C₂。在采用 60% 乙醇提取

时,可避免用水作溶剂时提取杂质多,过滤操作困难等不利因素,也可提取出较多的水溶组份,保证药效物质的充分溶出,是一种比较适合大量提取的方法,此法适用大量药材工业提取法;而实验室小量提取法应用乙醚脱脂后用甲醇或乙醇超声提取。

参考文献

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典. [M]. 上海:上海人民出版社,1977:376.

[2] 雷国莲,王薇,颜永刚. 太白洋参健脑益智作用机理的研究[J]. 中医药学刊,2004,22(2):238-240.

[3] 杨文娟,颜永刚,邓肿,等. 太白洋参对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护研究[J]. 陕西中医学院学报,2005,28(3):56-57.

[4] 杨文娟,颜永刚,雷国莲. 太白洋参颗粒治疗老年性痴呆的临床研究[J]. 时珍国医国药,2009,22(6):1452-1453.

[5] 邓肿,冯改利,杨乖利,等. 正交试验设计优化杜仲总黄酮提取工艺[J]. 中华中医药杂志,2011,26(11):2695

-2697.

[6] 邓肿,颜永刚,杨乖利,等. 正交试验设计优化杜仲木脂素提取工艺[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(8):45-46.

[7] 邓肿,颜永刚,姚天鹅. 正交试验结合指纹图谱筛选白鲜皮提取工艺[J]. 云南中医学院学报,2011,34(4):25-28.

[8] 王莉,郑洁,邓肿,等. 正交试验设计优化大血藤总皂苷提取工艺[J]. 现代中医药,2013,33(1):82-83.

[9] 王莉,邓肿. 正交试验设计结合综合评分研究生精补血胶囊醇提工艺[J]. 陕西中医学院学报,2011,34(6):67-68.

[10] Lee D H, Cho I G, Park M S, et al. Studies on the possible mechanisms of protective activity against alpha-amanitin poisoning by aucubin [J]. Arch Pharm Res, 2001, 24(1):55-63.

[11] 刘静,雷国莲,颜永刚,等. 太白洋参药材稳定性研究[J]. 现代中医药,2012,32(1):60-63.

(收稿日期:2014-09-14 编辑:文颖娟)

(上接第73页)

止血作用与其细粉状态有关,6 g 生药/kg 灌胃给药的止血作用较弱,其止血作用的可靠性仍需重复实验予以证明。

参考文献

[1] 蒲清荣,税丕先. 三七药理作用研究概述[J]. 现代医药卫生,2007,23(24):3704-3705.

[2] 孟志云,窦桂芳,刘敏霞,等. 纤维蛋白胶干粉对大鼠出血模型的止血作用[J]. 军事医学院院刊,2002,26(1):51-53.

[3] 王斐,沈夕坤,王玳珠. 三七药材中三七总皂苷的含量比较[J]. 辽宁中医杂志,2009,36(4):602-603.

[4] 董婷霞,赵奎君,崔秀明,等. HPLC 法测定三七中三七素的含量[J]. 中国药杂志,2005,13(15):217-221.

[5] 王振义. 蛋白 C 系统的研究进展[J]. 国外医学输血及血液学分册,1986,(9):104.

[6] 苏雅,赵益桂,张宗鹏,等. 三七三醇皂甙对动物血小板功能及血栓形成的影响[J]. 中草药,1996,27(11):666-668.

[7] Ling-Fang Huang, Hai-Lian Shi, Bo Gao, et al. Decichine enhances hemostasis of activated platelets via AMPA receptors [J]. Thrombosis Research, 2014, 133(5):848-854.

[8] 郑璐,郑健,刘庆荣,等. 红参中水溶性成分三七素的生理活性研究[J]. 中成药,2001,23(12):905-906.

[9] 张思户,侯建平,胡锐,等. 中药药理作用的文献再评价[J]. 中药药理与临床,2012,28(5):242-243.

[10] 张婉. 蒙药阿给(小白蒿)炮制前后化学成分变化及止血作用机制研究[D]. 北京:中央民族大学,2010.

[11] 孙劲,徐元宏. SD 大鼠常见血液学检测指标参考范围的建立[J]. 临床输血与检验,2008,10(3):253-255.

(收稿日期:2014-10-15 编辑:文颖娟)