

正交实验法优选川西獐牙菜的提取工艺

邹小艳^{1,2,3}, 魏立新^{1,3*}, 杜玉枝^{1,3}, 韩青^{1,2,3}, 赵旭东^{1,2,3} (1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 青海西宁 810008)

摘要 [目的] 以芒果苷和浸膏收率为指标, 优化川西獐牙菜的提取工艺。[方法] 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交法设计实验, 考察乙醇浓度、溶媒比、提取时间、提取次数 4 个因素对指标值的影响。[结果] 最优提取工艺为 75%乙醇 15 倍量回流提取 4 次, 每次 60 min。[结论] 正交实验法用于优化川西獐牙菜的提取, 简便易行, 预测性好。

关键词 川西獐牙菜; 芒果苷; 浸膏收率; 正交实验

中图分类号 Q949.776.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)03-00851-02

Optimum Extracting Technology of *Swertia mussotii* F. with Orthogonal Test

ZOU Xiao-yan et al (Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Science, Xining, Qinghai 810008)

Abstract To optimize the process of extracting mangiferin and extract content from *Swertia mussotii* Franch, the effect of ethanol concentration, solvent fold, reflux time and extract times was investigated with the four-factor at four-level orthogonal test. Results: the analysis result indicated the optimum conditions of was 75% ethanol, 60 minutes for reflux, 15-fold solvent and 4 times for extraction. Conclusion: It was showed that the optimum model was highly predictive.

Key words *Swertia mussotii* Franch.; Extract content; Orthogonal test

川西獐牙菜 (*Swertia mussotii* Franch.) 为龙胆科 (Gentianaceae) 獐牙菜属 (*Swertia*) 植物, 其味苦、性寒, 清肝胆之热^[1], 现代药理研究证明其乙醇提取物具有保护肝脏的作用^[2]。川西獐牙菜是民间藏医用于治疗肝炎的单方草药, 另外还用其治疗胆囊炎、急性骨髓炎、急性结膜炎、急性咽喉炎、消化不良及烫伤, 也用于风火牙痛、热淋等症^[3]。《中华人民共和国药典》中关于川西獐牙菜药材的质量控制以龙胆苦苷的含量作指标^[4], 而单一的指标不能全面反映药材质量的优劣。笔者选择川西獐牙菜中有代表性的山酮类化合物中的高含量成分——芒果苷作为药材效用指标, 并结合醇浸膏收率这一工业生产产量指标综合考虑, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验筛选提取工艺条件, 为《药典》制定药材的质量控制标准提供参考, 并为川西獐牙菜从药材到初提物这一工艺步骤提供较佳的提取条件。

1 材料与方法

1.1 材料 Agilent 1100 型高效液相色谱仪, G1312A 二元泵, G1315B DAD 检测器, G1379A 在线脱气机, Agilent Chem 色谱工作站, Millipore 超纯水器, AG135 分析天平 (METTLER TOLDO), Heidolph Laborota 4000-efficient 旋转蒸发仪, KQ-250DE 型数据超声波清洗器。

獐牙菜药材为栽培于青海省平安县的川西獐牙菜的全草, 2002 年采于盛花期, 由中国科学院西北高原生物研究所卢学峰博士鉴定。川西獐牙菜全草采收后, 去除泥沙, 阴干, 用粉碎机粉碎成 1~2 cm 的段; 芒果苷 (批号为 111607-200301) 对照品购于中国药品生物制品检定所; 甲醇为色谱纯 (山东禹王), 乙醇为食用乙醇, Millipore 超纯水 (自制)。

1.2 方法

1.2.1 川西獐牙菜提取流程。取川西獐牙菜 50.0 g, 置 1 000 ml 圆底烧瓶中, 加入一定浓度的乙醇溶液数倍, 密塞, 浸泡过夜后, 于 85℃ 水浴中回流提取一定次数, 每次数分钟。提取

液过滤, 合并滤液。

用容量瓶精密量取滤液 100 ml, 置 105℃ 已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105℃ 干燥 10 h, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速称重, 按滤液总体积换算醇浸膏得率。

1.2.2 芒果苷含量测定方法的建立。

1.2.2.1 样品溶液制备。取川西獐牙菜段 (1~2 cm) 约 50 g, 粉碎机粉碎, 过 60 目筛。精密称定川西獐牙菜细粉 1 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 95% 乙醇 50 ml, 称重, 80% 功率超声提取 60 min, 放冷, 称重补足。提取液过滤, 得样品溶液。

1.2.2.2 色谱条件。色谱柱: phenomenex Luna C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.04% (V/V) 乙酸溶液与甲醇, 梯度洗脱: 0 min, 甲醇 25%; 17 min, 甲醇 35%; 20 min, 甲醇 90%; 25 min, 甲醇 90%; 30 min, 甲醇 20%。体积流量为 1.0 ml/min; 色谱峰采集范围: 190~400 nm; 检测波长: 260 nm; 柱温 25℃; 进样量: 10 μl。

1.2.2.3 标准曲线制备。精密称取芒果苷对照品适量, 加甲醇、乙醇和水溶解成 0.233 mg/ml, 精密吸取对照品溶液一定量按倍数关系稀释成 6 种不同质量浓度的溶液, 分别吸取 10 μl, 依“2.2.2”条件进行 HPLC 分析。以峰面积与对照品溶液的浓度进行线性拟合, 得线性方程: $y = 21\,986x + 504\,104$, $r = 0.9999$ 。线性范围: 0.0073~0.2330 mg/ml。

1.2.3 因素水平的确定。以乙醇浓度 (A)、溶媒比 (B)、提取时间 (C)、提取次数 (D) 进行 4 因素 4 水平的正交实验, 以浸膏收率和芒果苷的质量分数为提取条件的优化指标, 从而进行最佳水平的组合。因素水平设计见表 1。

2 结果与分析

2.1 正交实验结果与分析 实验结果见表 2。以浸膏收率作指标, 方差分析结果表明: A、B、D 因素对考察指标的影响具有极显著意义, C 的影响没有显著意义。极差值显示因素作用主次为 B > C > D > A; 最佳组合为 A₃B₃C₃D₄。以芒果苷质量分数为考察指标, 方差分析结果显示: B 因素对考察指标的影响有显著意义, A、C、D 的影响没有显著意义。极差值显示因素作用主次为 B > C > A > D; 最佳组合为 A₃B₃C₃D₄。综合考虑两个指标, 得最佳组合为 A₃B₃C₃D₄, 即 15 倍量 75%

作者简介 邹小艳 (1983 -), 女, 湖南祁东人, 硕士研究生, 研究方向: 植物化学。* 通讯作者, E-mail: lxwei@nwpb.ac.cn。

收稿日期 2007-09-19

乙醇回流提取 4 次,每次 60 min。

表 1 川西獐牙菜提取正交设计因素水平

Table 1 Factors and levels in orthogonal design on extraction of *Swertia mus-sotii* Franch

水平 Levels	因素 Factors			
	A 乙醇 浓度 % Ethanol solution	B 溶媒 比 倍 Solvent ratio	C 提取时 间 min Extraction time	D 提取次 数 次 Extraction times
	1	0	5	0
2	50	10	30	2
3	75	15	60	3
4	95	20	90	4

表 2 川西獐牙菜提取正交设计结果

Table 2 Results of orthogonal design on extraction of *Swertia mus-sotii* Franch

实验号 Test number	A	B	C	D	浸膏收	芒果苷质
					率 %	量分数 %
					Extract	Quality score
					yield	of mangiferin
1	1	1	1	1	19.11	0.92
2	1	2	2	2	28.16	1.44
3	1	3	3	3	31.94	1.70
4	1	4	4	4	16.91	0.84
5	2	1	2	3	30.44	1.52
6	2	2	1	4	33.45	1.73
7	2	3	4	1	28.45	1.38
8	2	4	3	2	18.24	1.04
9	3	1	3	4	34.37	1.86
10	3	2	4	3	36.60	2.16
11	3	3	1	2	31.44	1.88
12	3	4	2	1	14.36	0.82
13	4	1	4	2	23.36	1.35
14	4	2	3	1	21.52	1.31
15	4	3	2	4	30.88	1.83
16	4	4	1	3	10.61	0.60
浸膏收率	K_1	96.13	107.28	94.61	83.45	
	K_2	110.58	119.73	70.98	101.21	
Extract yield	K_3	116.77	122.72	106.07	109.59	
	K_4	86.37	60.13	105.33	115.61	
	R	30.40	62.59	35.09	32.16	
芒果苷质量分数	K_1	4.90	5.64	5.12	4.44	
	K_2	5.67	6.63	3.65	5.71	
	K_3	6.72	6.79	5.90	5.97	
	K_4	5.08	3.30	5.73	6.26	
Quality score of mangiferin	R	1.82	3.49	2.25	1.82	

2.2 验证实验 根据实验结果,按最佳优化条件:15 倍量 75%乙醇回流提取 4 次,每次 60 min,进行 3 次实验,测得提取物中浸膏收率为 36.72%,芒果苷质量分数为 1.91%,与正交实验最佳值非常接近,证明该方法可行。

(上接第 848 页)

2.5 样品测定 对市售烟草开片肥抽样测定 ($n=5$),分离结果表明(图 2),DA-6 含量为 (1.154 ± 0.419) g/kg。

3 讨论

以甲醇-水体系作流动相不能分离 DA-6,与用甲醇作溶剂溶解后不能分离 DA-6 有相似性,可能是在甲醇作用下发生了反应。以纯水作溶剂溶解样品,用 pH 值 3.0 磷酸溶液

3 讨论

文献报道^[5],以獐牙菜山酮苷为指标的抱茎獐牙菜的最佳提取工艺为 8 倍量 80%乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,而笔者以川西獐牙菜中山酮类有效成分和高含量成分——芒果苷作指标,得最佳提取条件为 15 倍量 75%乙醇回流提取 4 次,每次 60 min,实验结果接近。在工业应用中,75%乙醇不仅可降低工业生产成本,还可有效抑制细菌的生长;有效地缩短提取时间,增加提取次数,更有利于有效成分的溶出。

黄秀梅等^[6]回流提取川西獐牙菜,单独以芒果苷为指标,得出最佳工艺为 6 倍量 75%乙醇回流提取 3 次,每次 2 h。在实验过程中发现:第 1 次提取加入溶剂后,干燥的药材会吸收大量的溶剂,且乙醇浓度越小的溶剂越容易被药材吸收,而工业生产惯于将药材浸泡过夜后提取,这样将导致剩余的提取液大量减少,所以过少的溶剂量不利于有效成分充分溶出。该实验的最佳溶媒比为 15 倍,在工业放大实验中较 6 倍量更可取。

龙胆苦苷和芒果苷均为葡萄糖苷,用反相液相色谱检测其二着色谱保留时间接近。同时,笔者采用星点设计-效应面法对川西獐牙菜提取条件进行优化的实验表明,以龙胆苦苷质量分数和浸膏收率为指标得最佳工艺为 86%乙醇 12.4 倍量回流提取 3 次,每次 63 min,与得出的最佳工艺条件相近,说明实验设计因素的水平合理,结果可靠。

实验结果表明,提取时间对两个指标值没有显著影响,预实验时比较了冷浸和回流 0、2、4、6、8 h 的指标值,冷浸与 0 h 相差较大,而后 5 者差异不明显。可能的原因是:提取过程为先加入溶剂浸泡药材过夜,水浴加热,以溶剂沸腾时开始计时,经过这样一个浸泡和逐渐升温的过程后,指标成分已经基本上溶出,导致回流提取时间对指标值没有显著影响。缩短提取时间,可以节约工业成本,但同时也要求在放大生产时,浸泡和回流提取过程尽可能地搅动,使药材充分接触溶剂。

参考文献

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991.
- [2] 党合群,王志平,张杰. 藏茵陈制剂及其有效成分对实验性肝损伤的药理实验研究[J]. 青海医药,1983(5):20-23.
- [3] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中药志[M]. 北京:人民卫生出版社,1988.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [5] 田薇,张喜民,陈朝辉,等. 正交试验优选獐牙菜的提取工艺[J]. 中草药,2007,38(4):545-548.
- [6] 黄秀梅,邢素丽,吉元德. 正交设计法研究藏茵陈的提取工艺[J]. 中国药理学杂志,1994,29(8):491-492.

作流动相在 AQ-C18 色谱柱上能很好地分离 DA-6。

参考文献

- [1] 梁广坚,李芸英,邵玲. DA-6 和 BR+GA-3 对菠菜生长和光合速率的影响[J]. 园艺学报,1998,25(4):356-360.
- [2] 刘祥英,柏连阳. DA-6 缓解胺苯磺隆对后茬水稻伤害的作用[J]. 现代农药,2005,4(3):31-32.
- [3] 张子龙. DA-6 浸种对水稻幼苗生长及抗寒性的影响[J]. 贵州农业科学,2001,29(4):14-16.