

正交设计优选百蕊草的提取工艺

储晓琴^{1,2}, 岳磊¹, 胡叶青¹, 谢法平¹

(1. 安徽中医学院药学院, 安徽 合肥 230031; 2. 现代中药安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230031)

[摘要]目的 优选百蕊草的最佳提取工艺。方法 采用正交试验法, 以干膏得率及山奈酚含量为指标, 考察溶剂浓度、溶剂用量、提取时间以及提取次数的影响, 确定最佳提取工艺。结果 最佳提取工艺参数为: 加8倍量80%乙醇, 提取3次, 每次1 h。结论 优选的提取工艺切实可行, 可以作为百蕊草的提取工艺。

[关键词]百蕊草; 山奈酚; 正交设计

[中图分类号]R283 **[文献标志码]**A **[DOI]**10.3969/j.issn.1000-2219.2013.02.024

百蕊草, 又称百乳草、地石榴、打食草等, 为檀香科 (*Santalaceae*) 植物百蕊草 *Thesium chinense Turcz.* 的全草。百蕊草性寒而平缓, 味辛微苦, 归肺、脾、肾经。主治肾虚腰痛、肾虚头晕、急性乳腺炎、急性扁桃体炎、咽炎、肺炎、肺脓疡、上呼吸道感染、大叶性肺炎、各种感染等^[1]。现代药理研究表明: 百蕊草具有显著的抗炎、解热、镇痛和抗菌作用, 其所含的黄酮类化合物为其抗菌的有效成分^[2-4]。本研究以干膏得率和山奈酚含量为指标, 在预实验的基础上采用正交试验设计, 对百蕊草的最佳提取工艺进行研究, 旨在为百蕊草的进一步开发奠定基础。

作者简介: 储晓琴(1979-), 女, 硕士, 讲师

1 仪器与试剂

1.1 仪器 ML204/02 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); 岛津高效液相色谱仪(包括 LC-20AB 泵, RF-535 荧光检测器及岛津 LC solution 色谱工作站); C18 色谱柱(phenomenex, 250 mm×4.60 mm, 5 μm); CQX25-16 超声波清洗器(上海必能信超声有限公司, 功率 250 W, 频率 25 kHz); UV757CRT 紫外分光光度计(上海精科有限公司); 旋转蒸发器 R-1001N(郑州长城科工贸有限公司); WB-2000 水浴锅, 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); DZF-6050 型真空干燥箱(上海博迅实业有限公司)。

1.2 试剂与试药 山奈酚标准品(中国食品药品检定研究所, 批号 110861-200808); 百蕊草饮片(亳州

[3] 陆树刚. 云南产凤丫蕨属植物(裸子蕨科)的分类订正[J]. 广西植物, 2001, 21(1): 37-42.

[4] 代朝霞, 苟先前. 贵州蕨类植物新记录[J]. 植物研究, 2006, 26(4): 387-389.

[5] 云雪林, 赵能武, 赵俊华, 等. 黔产瘤足蕨科、膜蕨科、裸

子蕨科、书带蕨科药用植物的资源研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1742-1743.

[6] 中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科技出版社, 1999: 144.

(收稿日期: 2012-11-16)

Species of Coniogramme in Southwestern China and Their Medicinal Uses

SUN Yu-zheng, LIU Shou-jin, CHEN Yun-fei, CHEN Jia-jia, HU Xiao-peng

(School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the species of *Coniogramme* (*Hemionitidaceae*) in southwestern China and their distribution characteristics and medicinal values. **Methods** Investigation was conducted on collected plant specimens and literature for taxonomic study. **Results** There were 39 species of *Coniogramme* in China, and 29 of them were concentrated in the area with relatively high elevation in southwestern China. The rhizomes or herbs of some species of *Coniogramme* were used as folk medicines in southwestern China due to their functions of clearing heat and detoxication, cooling blood and detumescence, activating blood circulation and relieving pain, dispelling pathogenic wind and removing dampness, and so on. **Conclusion** There are abundant medicinal plants belonging to *Coniogramme* in southwestern China, and further exploration and utilization are recommendable.

[Key words] *Coniogramme*; species; medicinal use; southwestern China

千草药业饮片厂,批号 20110902,经安徽中医学院王德群教授鉴定);甲醇为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司,批号 20111017);其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材吸水率考察 分别称取3份干燥药材50 g置砂罐中,加15倍量(750 ml)水,待药物浸透,滤过,药渣称质量,计算出吸水率,结果平均吸水率为128%。因此第1次煎煮时,加水量应增加1.3倍。

2.2 正交试验设计 根据预实验结果,采用醇提法提取百蕊草,以干膏中山奈酚的含量和干膏得率为指标,在提取工艺中以乙醇浓度(A)、乙醇用量(B)、提取时间(C)以及提取次数(D)为因素,按 $L_9(3^4)$ 方案进行正交设计,进行最佳提取工艺试验,因素水平见表1。

表1 正交试验因素水平表

水平	因素			
	A/%	B/倍	C/h	D/次
1	60	8	1	1
2	70	10	1.5	2
3	80	12	2	3

2.3 干膏得率测定 取正交试验所得的百蕊草提取液,置于已干燥至恒质量的蒸发皿中,水浴蒸干,于70℃真空干燥箱中干燥至恒质量,置干燥器中冷却30 min,迅速称质量,计算干膏得率。

2.4 山奈酚含量测定 参照文献[5-6]方法,采用高效液相色谱法测定山奈酚的含量。

2.4.1 色谱条件:色谱柱为C18色谱柱(phenomenex,250 mm×4.60 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.4%磷酸液(60:40);流速:0.9 ml/min;柱温:40℃;检测波长:365 nm;进样量20 μl。

2.4.2 对照品溶液的制备:精密称取山奈酚对照品9.1 mg置于10 ml容量瓶中,加甲醇定容,制成910 μg/ml的山奈酚对照品贮备液。

2.4.3 供试品溶液的制备:取百蕊草提取物干膏适量,用甲醇溶解定容至25 ml,称质量,加热回流1 h,冷却,称质量,补足减失质量,过滤,取续滤液15 ml,加入50%的盐酸溶液5 ml回流1 h,迅速冷却,转移至25 ml容量瓶中,用甲醇定容,0.45 μm微孔滤膜过滤,置冰箱中保存,待测。

2.4.4 线性关系考察:分别精密吸取适量对照品溶液,置于10 ml的容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,进样测定。以对照品浓度(x)为纵坐标,峰面积(y)为横坐标,得线性方程为: $y = 65\ 020x + 13\ 512$, $r = 0.999\ 9$,表明在2.275~45 μg/ml内线性关系良好。

2.4.5 精密度考察:精密吸取对照品溶液,重复测

定6次,其RSD=0.87%,结果表明仪器精密密度良好。

2.4.6 重现性考察:取百蕊草提取物浸膏粉适量,按“2.4.3”项下方法操作,进样测定,其RSD为1.95%,结果表明重复性良好。

2.4.7 回收率考察:取已知含量的浸膏粉6份,精密称定,分别加入一定量的山奈酚,按“2.4.3”项下方法操作,进样测定,结果见表2。

表2 加样回收率结果

原含量/ mg	加标量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
0.456 2	0.448	0.916 2	102.68		
0.455 8	0.456	0.901 5	97.74		
0.453 3	0.448	0.905 2	100.87		
0.458 9	0.454	0.904 2	98.08	98.93	2.06
0.455 3	0.451	0.898 5	98.27		
0.454 3	0.464	0.907 5	97.67		
0.451 1	0.461	0.899 2	97.20		

2.5 正交试验结果 分别取百蕊草药材100 g,按照 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验,每组试验平行3次,按照上述方法处理样品溶液,分别测定干膏得率和山奈酚含量,测定结果及方差分析结果见表3和表4。

表3 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	评价指标	
					干膏得率/%	山奈酚含量/(mg/g)
1	1	1	1	1	9.77	6.52
2	1	2	2	2	17.32	6.75
3	1	3	3	3	23.33	7.15
4	2	1	2	3	21.66	10.04
5	2	2	3	1	12.72	8.18
6	2	3	1	2	16.60	8.92
7	3	1	3	2	14.31	9.73
8	3	2	1	3	16.74	11.24
9	3	3	2	1	11.39	8.67
K_1	16.807	15.247	14.370	11.293		
K_2	16.993	15.593	16.790	16.077		
K_3	14.147	17.107	16.787	20.577		
R	2.846	1.860	2.420	9.284		
K'_1	6.807	8.763	8.893	7.790		
K'_2	9.047	8.723	8.487	8.467		
K'_3	9.880	8.247	8.353	9.477		
R'	3.073	0.516	0.540	1.687		

由表3直观分析得:考虑出膏率的最佳工艺是 $A_2B_3C_2D_3$,考虑山奈酚的最佳工艺是 $A_3B_1C_1D_3$ 。从方差分析来看,提取次数对浸膏得率有显著影响,乙醇浓度对山奈酚含量有显著影响。综合考虑各因

表4 得膏率及山奈酚含量方差分析结果

指标	方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
浸膏得率	A	15.214	2	7.607	2.59	
	B	5.870	2	2.935	1.00	
	C	11.697	2	5.848	1.99	
	D	129.311	2	64.655	22.03	<0.05
山奈酚含量	A	15.157	2	7.58	31.93	<0.05
	B	0.496	2	0.25	1.04	
	C	0.475	2	0.24	1.00	
	D	4.323	2	2.16	9.11	

素对提取结果的影响及节约能源,最佳工艺定为 $A_3B_1C_1D_3$,即乙醇浓度为80%、乙醇用量为8倍量、提取次数为3次,提取时间为1 h。

2.6 验证试验结果 为考察上述工艺的稳定性,按最佳工艺条件进行重复试验($n=3$),分别测定浸膏粉中百蕊草山奈酚的含量为13.01、12.65、12.59 mg/g,平均值为12.75 mg/g,说明该工艺稳定可行。

3 讨论

根据现代文献研究结果,百蕊草所含的黄酮类化合物为其抗菌消炎的有效成分^[2-4],而山奈酚是多种百蕊草黄酮苷的共同苷元^[7-8],因此采用水解后山奈酚的含量作为百蕊草的定量指标,并采用高效液相色谱法来测定,相较于硝酸铝比色法,结果更为准确,灵敏度高。

百蕊草中的总黄酮苷类化合物均属3位糖苷,在酸性条件下易水解,在预实验中摸索了水解浓度及水解时间的影响,显示50%盐酸水解1 h已经水

解完全。

本实验以干膏得率和山奈酚含量为指标,对百蕊草的醇提工艺进行了优化。正交试验结果表明最佳工艺为:8倍量的80%乙醇,提取3次,每次1 h。

考虑到百蕊草干药材的吸水性,考察了药材吸水率,结果提示第1次提取加水量应增加1.3倍。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:595-597.
- [2] 刘永松,潘玲,祁克宗,等. 百蕊草有效提取成分对七种细菌的敏感性试验[J]. 贵州医药,2006,30(6):564-566.
- [3] Parveen Z, Deng Y, Saeed MK, et al. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside[J]. Yakugaku Zasshi, 2007, 127(8):1275-1279.
- [4] 丁秀年,张三军,明亮. 百蕊草片有明显的镇痛作用[J]. 淮海医药,2001,19(1):17-18.
- [5] 韩玲玲,徐国兵. 百蕊草质量标准的研究[J]. 中医药学报,2010,38(5):90-91.
- [6] 徐国兵,黄万著,王德群,等. 百蕊草药材中山奈酚和总黄酮的含量测定[J]. 中医药学报,2008,36(1):39-41.
- [7] 王先荣,王兆全,杜安全. 百蕊草有效成分的化学研究 II:百蕊草IV的提取、分离和鉴定[J]. 现代应用药学,1994,11(4):15.
- [8] 鲁霞,汪俊松. 百蕊草的化学成分研究[J]. 中草药,1993,35(5):49-493.

(收稿日期:2012-10-31)

Optimization of Extraction Process of *Thesium chinense* Turcz. by Orthogonal Design

CHU Xiao-qin^{1,2}, YUE Lei¹, HU Ye-qing¹, XIE Fa-ping¹

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China; 2. Anhui Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the extraction process of *Thesium chinense* Turcz. **Methods** The orthogonal design was used to investigate the effects of solvent concentration, solvent volume, extraction time, and extraction frequency on yield of dry extract and content of kaempferol (as assessment indices) and to determine the optimal extraction process. **Results** In the optimal process, extraction was performed 3 times (for 1 h each time) using 80% ethanol (8 times). **Conclusion** The optimized extraction process is feasible and reliable, and it can be used for extracting *Thesium chinense* Turcz.

[Key words] *Thesium chinense* Turcz.; kaempferol; orthogonal design