

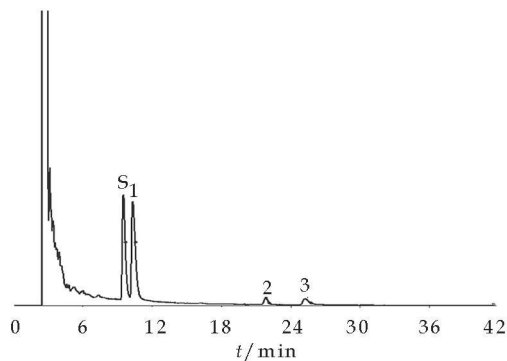


图 2 银杏内酯注射液的对照指纹图谱

Fig 2 HPLC Reference fingerprint
of Ginkgolide Injections

种色谱柱, Thermo Hypersil ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (美国 Thermo Hypersil-Keystone 公司); Luna C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (美国 Phenomenex 公司); Zorbax SB C₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (美国 Agilent 公司) 进行实验筛选, 比较分离度、峰型和柱效, 结果 Thermo Hypersil ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱较为适合。

流动相的选择: 选用不同比例的水/甲醇/四氢呋喃体系和异丙醇/水体系洗脱, 峰分离度不好; 用

不同比例的水/甲醇体系洗脱, 分离度和峰型不佳; 故选用甲醇/乙酸铵水溶液体系为流动相, 经试验确定了溶剂比例, 峰型、分离度、柱效均满意。

参考文献:

- [1] Van Beek T A. Ginkgolides and bilobalide: Their physical, chromatographic and spectroscopic properties [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 5001-5012.
- [2] 楼凤昌, 凌 娅, 唐于平, 等. 银杏萜内酯的分离、纯化和结构鉴定[J]. *中国天然药物*, 2004, 2(1): 11-15.
- [3] 徐艳芬, 张丽娟, 宋新波. 银杏叶提取物的研究进展[J]. *药物评价研究*, 2010, 33(4): 298-302.
- [4] Braquet P. The ginkgolides: Potent platelet activating factor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L.: chemistry, pharmacology and clinical applications [J]. *Drugs Future*, 1987, 12(7): 643-699.
- [5] 张中朋, 刘秀芬. 银杏叶提取物发展概述[J]. *中药研究与信息*, 2005, 7(2): 38-40.
- [6] 戴翔翎, 凌 娅, 施 炜, 等. HPLC-ELSD 法测定注射用银杏内酯中银杏内酯 A 与银杏内酯 B 的含量[J]. *南京中医药大学学报*, 2005, 21(1): 22-23.
- [7] 毕雨萌, 孙国祥, 于秀明. HPLC-ELSD 法测定银杏达莫注射液中的萜类内酯的含量[J]. *中南药学*, 2007, 5(2): 124-127.
- [8] 陈香爱, 袁志芳, 张兰桐. HPLC 法测定银杏叶粉针中总黄酮醇苷和萜类内酯[J]. *中草药*, 2008, 38(9): 1333-1335.
- [9] 任子瑜, 秦雪梅, 薛黎明, 等. 黄芩不同中医调剂品的 HPLC 指数图谱比较研究[J]. *中草药*, 2010, 41(4): 573-576.
- [10] 马 瑛, 刘 芑, 柴士伟. 化癥通脉汤的 HPLC 指数图谱研究[J]. *中草药*, 2010, 41(3): 398-400.

正交设计优选竹节参总皂苷微波提取工艺的研究

欧阳丽娜^{1,2}, 李兰林^{1,3}, 吴 雪^{1,3}, 向大位^{1,3}, 孙晓博^{1,3}, 向大雄^{1,3*}

(1. 中南大学湘雅二医院 中药与天然药物研究室, 湖南 长沙 410011; 2. 岳阳市第一人民医院 药剂科, 湖南 岳阳 414000;

3. 中南大学药学院, 湖南 长沙 410013)

摘 要: 目的 优选竹节参总皂苷的微波提取工艺。方法 利用紫外分光光度法测定竹节参中总皂苷, 运用正交试验设计, 以总皂苷转移率为考察指标, 筛选最佳微波提取工艺; 并将其与加热回流提取法及超声提取法进行比较。结果 微波提取竹节参总皂苷的最佳提取工艺参数为: 乙醇体积分数 80%, 微波功率 400 W, 料液比 1: 18, 提取 4 次, 每次提取 5 min。在此条件下, 竹节参总皂苷的转移率高达 97.77%。结论 微波提取工艺具有效率高、时间短、能耗低、环保等优点, 为竹节参总皂苷的工业化生产和新药开发提供了参考。

关键词: 竹节参; 总皂苷; 微波提取; 正交设计; 含量测定

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)10-1639-04

竹节参为五加科植物竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey. 的干燥呈竹鞭状根茎, 广泛分布于日本及中国西南至中部地区^[1], 存在羽叶三七、狭叶竹节参及珠子参等变种^[2]。其性温、味甘、微苦, 具有

滋补强壮, 散瘀止痛, 止血祛痰等功效^[3], 兼具我国北药人参和南药三七的功用, 享有“土家族神参”的美誉。现代药理研究表明, 竹节参中研究最多、功效最显著的为皂苷类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗

①收稿日期: 2010-02-27

基金项目: 湖南省中医药科研计划项目(2009062)

作者简介: 欧阳丽娜(1984—), 女, 湖南岳阳人, 主要从事药物新资源与新剂型的开发。

Tel: (0731) 5292093 E-mail: ouyanglina410@126.com

* 通讯作者 向大雄 Tel: (0731) 5292093 E-mail: xiangdaxiong@163.com

肿瘤以及降血糖等药理活性^[4-8]。微波作为天然产物提取中一种非常有发展潜力的新型技术,具有快速、溶剂用量少、提取率高、成本较低、环保等许多优点,引起广泛关注^[9-11]。为此,本实验拟采用正交设计方案,以总皂苷转移率为指标,优选出竹节人参总皂苷微波提取的工艺参数,并将其与加热回流法、超声提取法进行比较研究,以期竹节人参总皂苷的工业化生产和新药开发提供实验依据。

1 仪器与试剂

SPECORD50型紫外-可见分光光度计(德国耶拿分析仪器股份公司),恒温水浴锅(上海医疗器械五厂),Mettler分析天平,RE52-98旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),NJL07-3型微波提取器(南京杰全微波设备有限公司),KQ3200型超声波清洗器(昆山市仪器超声有限公司)。

人参皂苷 Re 对照品(中国药品生物检定所产品,批号为7549204),其他乙醇、甲醇、正丁醇、香草醛、高氯酸、冰醋酸均为分析纯。竹节参药材购于湖北恩施圣丰药业,经中南大学湘雅药学院生药教研室李劲平副教授鉴定为竹节参的根茎,生药中含总皂苷为124.32 mg/g。

2 方法与结果

2.1 总皂苷的测定

2.1.1 检测波长的选择:人参皂苷 Re 和样品溶液在400~700 nm波长扫描。人参皂苷 Re 对照品溶液和竹节参样品溶液显色后的吸收光谱基本一致,在552 nm处有最大吸收,故选择人参皂苷 Re 为对照品,并选用552 nm作为测定波长。

2.1.2 溶液的制备:精密称定人参皂苷 Re 对照品10.12 mg,加甲醇溶解,定容至10 mL,得1.012 mg/mL溶液。精密称定干燥的竹节参粉末(过30目筛)20 g,分别按所设置的工艺参数进行提取,滤过,合并提取液,定容至500 mL。精密量取其中50 mL,挥干溶剂,残渣用20 mL水分次转移至分液漏斗中,用石油醚萃取2~3次,每次20 mL,弃去醚层,水层再用水饱和的正丁醇萃取5次,每次20 mL,合并正丁醇液,再用正丁醇饱和的水洗涤2次,每次30 mL,最后将正丁醇液减压回收,蒸干,残渣用甲醇溶解,滤过并定容至50 mL。

2.1.3 标准曲线的制备:用20~200 μ L可调微量取样器吸取制备好的人参皂苷 Re 对照品溶液40、80、120、160、200 μ L于10 mL具塞试管中,70 $^{\circ}$ C水浴蒸干,于每个试管中加新配制的5%香草醛-冰醋酸溶液0.2 mL,高氯酸0.8 mL,摇匀,置60 $^{\circ}$ C水浴

上加热15 min,流水冷却,准确加入冰醋酸5 mL,摇匀,以分光光度计在552 nm波长测定吸光度值。以质量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 0.0046X - 0.0013$, $R^2 = 0.9997$,表明人参皂苷 Re 在40.48~202.40 μ g与吸光度的线性关系良好。

2.1.4 精密度试验:精密吸取5份人参皂苷 Re 对照品溶液120 μ L,按标准曲线的制备项下的方法测定吸光度值,计算RSD值为0.75%。

2.1.5 稳定性试验:精密吸取人参皂苷 Re 对照品溶液120 μ L,按标准曲线的制备项下的方法,分别在0、10、20、30、40、50、60、90、120 min测定吸光度值,计算RSD值为1.42%,说明在90 min内基本稳定。

2.1.6 重现性试验:取5份竹节参粉末各2.00 g,制备供试品溶液,每份取50 μ L,测定吸光度值,计算质量分数的RSD值为1.51%。

2.1.7 加样回收率试验:分别吸取一定量的样品溶液,加入适量人参皂苷 Re 对照品溶液,按标准曲线的制备项下的方法测定其吸光度,计算其回收率为100.46%,RSD值为1.06%。

2.1.8 样品测定:用20~200 μ L可调微量取样器吸取提取纯化后样品50 μ L,置于10 mL具塞试管中,70 $^{\circ}$ C水浴蒸干,于每个试管中加新配制的5%香草醛-冰醋酸溶液0.2 mL,高氯酸0.8 mL,摇匀,置60 $^{\circ}$ C水浴上加热15 min,流水冷却,准确加入冰醋酸5 mL,摇匀,以分光光度计在400~800 nm扫描,在552 nm波长处有最大吸收,记录吸光度值,计算竹节人参总皂苷质量浓度。

2.2 单因素试验:以溶剂体积分数、微波功率、料液比、提取时间及提取次数作为影响竹节人参皂苷转移率的单因素,各因素设置4个不同的水平,分别对20.0g竹节参药材进行提取工艺考察,找出不同因素的适宜范围。

2.2.1 溶剂体积分数对皂苷提取效果的影响:为了研究溶剂体积分数对竹节人参皂苷提取效果的影响,本试验设置了4个不同的溶剂体积分数,分别为40%、60%、80%、95%乙醇。提取功率为300 W,温度控制在40~80 $^{\circ}$ C,料液比为1:18,每个样品提取3次,每次3 min,平行操作3份,测定,计算总皂苷的平均转移率分别为42.73%、54.16%、85.35%、32.48%,结果表明80%乙醇为最佳。

2.2.2 提取功率对皂苷提取效果的影响:为了研究提取功率对竹节人参皂苷提取效果的影响,本试验设置了4个不同的提取功率,分别为200、300、400、

500 W。提取条件为体积分数为 80% 乙醇, 温度控制在 40~ 80 ℃, 料液比为 1: 18, 每个样品提取 3 次, 每次 3 min, 平行操作 3 份, 测定, 计算总皂苷的平均转移率分别为 78.71%、85.56%、84.92%、82.53%, 结果表明提取功率为 300 W 为最佳。

2.2.3 料液比对皂苷提取效果的影响: 为了研究料液比对竹节人参皂苷提取效果的影响, 本试验设置了 4 个不同的料液比, 分别为 1: 10、1: 14、1: 18、1: 22。提取条件为微波 300 W, 温度控制在 40~ 80 ℃, 乙醇体积分数为 80%, 每个样品提取 3 次, 每次 3 min, 平行操作 3 份, 测定, 计算总皂苷的平均转移率分别为 82.72%、84.11%、85.47%、85.96%, 结果表明料液比对实验影响不明显, 综合考虑生产成本及操作可行性等因素, 选取 1: 18 为最佳料液比。

2.2.4 提取时间对皂苷提取效果的影响: 为了研究提取时间对竹节人参皂苷提取效果的影响, 本试验设置了 4 个不同的提取时间, 分别为每次提取 2、3、4、5 min。提取条件为微波 300 W, 温度控制在 40~ 80 ℃, 乙醇体积分数为 80%, 料液比为 1: 18, 每个样品提取 3 次, 平行操作 3 份, 测定, 计算总皂苷的平均转移率分别为 79.64%、85.32%、87.85%、89.48%, 结果表明提取时间以每次提取 5 min 为宜。

2.2.5 提取次数对皂苷提取效果的影响: 为了研究提取次数对竹节人参皂苷提取效果的影响, 本试验设置了 4 个不同的提取次数, 分别为提取 1、2、3、4 次。提取条件为微波 300 W, 温度控制在 40~ 80 ℃, 乙醇体积分数为 80%, 料液比为 1: 18, 每个样品提取 5 min, 平行操作 3 份, 测定, 计算总皂苷的平均转移率分别为 53.29%、78.67%、89.54%、97.32%, 结果表明提取次数以 4 次时转移率最大, 但是提取 3 次时转移率亦可达到 85% 以上, 综合考虑成本、时间因素, 简化操作流程, 一般选择提取 3 次。

2.3 正交试验: 以单因素试验结果为参考, 对乙醇体积分数、提取功率、提取时间及提取次数进行 4 因素 3 水平正交试验(表 1)。以总皂苷转移率为指标, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验确定最佳提取条件。准确称取干燥的竹节参粉末(过 30 目筛) 20 g, 浸渍 12 h 后, 分别按表 2 的试验条件进行微波提取, 每个试验条件平行做 3 份, 滤过, 合并滤液, 转移至 500 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 50 mL, 测定各次提取液中总皂苷的质量浓度, 计算其平均转移率(转移率=提取物中总皂苷质量/原药材中总皂苷质量×100%)。结果及极差分析见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels				
水平	因 素			
	A 乙醇体积分数/ %	B 微波功率/ W	C 提取时间/ min	D 提取次数/ 次
1	40	300	3	2
2	60	400	4	3
3	80	500	5	4

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案及结果

Table 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test					
试验号	A	B	C	D	平均转移率/ % (n= 3)
1	1	1	1	1	36.43±0.87
2	1	2	2	2	48.21±1.38
3	1	3	3	3	69.45±0.73
4	2	1	2	3	73.56±1.32
5	2	2	3	1	58.26±0.81
6	2	3	1	2	53.33±1.34
7	3	1	3	2	89.42±0.96
8	3	2	1	3	94.57±1.39
9	3	3	2	1	72.29±0.99
K_1	154.09	199.41	184.33	166.98	
K_2	185.15	201.04	194.06	190.96	
K_3	256.28	195.07	217.13	237.58	
R	34.06	1.99	10.93	23.53	

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance					
方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	1 829.67	2	914.83	1 099.03	$P<0.01$
B	6.35	2	3.17	3.81	$P<0.05$
C	189.19	2	94.60	113.64	$P<0.01$
D	859.20	2	429.60	516.10	$P<0.01$
误差	22.47	27	0.83		

$F_{0.05}(2, 27)=3.35$ $F_{0.01}(2, 27)=5.49$

由表 2 的极差可知, 各因素对竹节人参总皂苷转移率影响大小顺序为 A(乙醇体积分数)>D(提取次数)>C(提取时间)>B(微波功率)。表 3 的方差分析表明, 乙醇体积分数、提取次数及提取时间均对竹节人参总皂苷转移率具有极显著影响, 微波功率对竹节人参总皂苷的转移率存在明显影响。从试验结果来看, 竹节人参总皂苷微波提取的最佳工艺条件为 $A_3B_2C_3D_3$, 即乙醇体积分数为 80%, 微波功率 400 W, 每次 4 min, 提取 4 次。

按上述最佳提取工艺进行 3 批药材的验证试验, 竹节人参总皂苷的转移率分别为 98.28%、97.16%、97.87%, RSD 为 0.58%, 表明本提取工艺较为稳定可靠, 且提取率较高。

2.4 不同方法提取竹节人参总皂苷工艺的比较: 将本实验优选的微波提取工艺与文献所优选出的加热回流提取工艺及超声提取工艺进行比较, 进行不同提取方法的优选。

2.4.1 加热回流提取法: 取竹节参药材粉末 20.0 g, 精密称定, 加 10 倍量 60% 乙醇溶液, 浸泡 2 h 后, 加热回流提取 3 次, 每次 3 h, 滤过, 合并提取液, 减压浓缩后定容至 500 mL, 测定, 计算总皂苷的转移率为 80.51%。

2.4.2 超声提取法: 取竹节参药材粉末 20.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 按固液比 1: 20 加入适量乙醇, 于 50 °C 提取 4 次, 每次提取 40 min, 滤过, 合并提取液, 定容至 500 mL, 测定, 计算总皂苷的转移率为 94.81%。

2.4.3 微波提取法: 取竹节参药材粉末 20.0 g, 精密称定, 预先浸渍 2 h, 按正交试验优选的工艺参数进行微波提取, 滤过, 合并提取液, 定容至 500 mL, 测定, 计算总皂苷的转移率为 97.77%。

结果表明, 微波提取与加热回流提取及超声提取比较, 竹节人参总皂苷的转移率有所提高, 且提取时间大大缩短了, 相比较之下, 微波提取竹节人参总皂苷具有提取率高、时间短、能耗低等优点。

3 讨论

微波能在短时间内穿透竹节参细胞组织内部, 使其内部分子极化迅速升温, 达到提取效果。但在提取过程中, 因乙醇沸点较低, 加之皂苷具有较强表面活性, 在加热时易产生大量泡沫。故应控制好温度范围和时间, 避免浸提溶媒沸腾逸出和有效成分随乙醇蒸气带出, 从而影响其提取。

中药材含水量的多少, 直接影响到微波提取的效果, 药材细胞含水量充足, 才能吸收足够的微波能, 细胞壁才能被击破, 细胞内容物才能够得以释放出来, 故应注意预先浸渍。此外药材粒度对微波提取也有一定的影响。充分考虑到微波提取工艺工业

化大生产的具体操作可行性, 建议在提取前将人参与药材粉碎成药材粗粉(过 16 目筛), 浸泡于提取溶媒中 12 h, 让药材粗粉充分接触溶媒且促进溶媒渗透于药材粗粉细胞组织内部, 产生有效的体积分数梯度, 以利于有效成分的浸出, 提高提取效率。

本实验以竹节人参总皂苷的转移率为指标, 优选微波提取的最佳工艺为: 乙醇体积分数为 80%, 微波功率 400 W, 料液比 1: 18, 提取 4 次, 每次提取 5 min。相对加热回流工艺及超声提取工艺而言, 微波提取竹节人参总皂苷的工艺提取时间短, 提取含量高, 可以降低生产成本, 提高提取效率, 且较环保, 具有明显的优势。而且微波提取细粉不会出现传统提取方法的糊化、堵塞等问题, 适宜大生产。

参考文献:

- [1] Zou K, Zhu S. Dammarane-type triterpene saponins from *Panax japonicus* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65: 346-351.
- [2] 林先明, 谢玲玲, 由金文, 等. 竹节参名称及基原考[J]. *中药材*, 2007, 30(6): 742-743
- [3] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [4] 左锐, 袁丁. 竹节参化学成分与药理活性的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2005, 16(9): 833-834
- [5] 吴瑕, 陈东辉, 雷玲, 等. 竹节人参抗炎镇痛作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(1): 43-45
- [6] 肖本见, 谭志鑫, 朱敏英, 等. 竹节人参对小鼠低氧/复氧损伤的保护作用[J]. *中国公共卫生*, 2006, 22(4): 473-473
- [7] 袁丁, 左锐, 张长城. 竹节参总皂苷抑制小鼠肿瘤生长的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(2): 277-278
- [8] 欧阳丽娜, 向大位, 吴雪, 等. 竹节参化学成分及药理活性研究进展[J]. *中草药*, 2010, 41(6): 1023-1027
- [9] 程一帆, 苟虹, 谭淇文. 正交试验优选阿胶、龟甲胶、鹿角胶的微波炮制胶珠工艺的研究[J]. *中草药*, 2010, 41(1): 45-48
- [10] 张萍, 廖正根, 梁新丽, 等. 均匀设计优选舒胸片处方药材的微波辅助提取工艺的研究[J]. *中草药*, 2009, 40(1): 45-49
- [11] 刘永练, 郑成, 毛桃嫣, 等. 微波提取人参中活性成分人参皂苷的研究[J]. *广州大学学报: 自然科学版*, 2006, 5(6): 52-55.

欢迎订阅 2011 年《中国药物化学杂志》

《中国药物化学杂志》是由沈阳药科大学与中国药学会共同主办、国内惟一专门反映药物化学学科的科技成果与科研动态的专业性学术期刊。本刊设有研究论文、研究简报、快报、新药信息、综述等栏目, 涉及新药研究、药物合成方法、合成工艺改进、天然药物有效成分研究、重要药物中间体合成等内容。本刊为双月刊、大 16 开、80 页, 每期定价 12.00 元。国内邮发代号 8-101, 国外发行代号 BM 5991。欢迎广大读者通过当地邮局订阅。

本刊地址: 沈阳市沈河区文化路 103 号

邮编: 110016

联系电话: (024) 23986082 (024) 23994540

传真: (024) 23986086