

正交试验优选了哥王的提取工艺

陈 爽,邵曼莉,杨振宇,杜智敏*

(哈尔滨医科大学附属二院临床药物研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:目的 研究影响了哥王提取的各种因素,确定最佳提取工艺。方法 采用正交试验,考察乙醇提取次数、加醇量、醇体积分数、提取时间 4 个因素的影响,以乙醇浸膏收率、总黄酮的质量分数、抗炎效果为指标优选了哥王的乙醇提取工艺。结果 在所考察的因素中,对乙醇浸膏收率、总黄酮的质量分数、抗炎效果影响程度均为醇体积分数>提取次数>提取时间>加醇量。3 方面因素,以抗炎效果为主要指标,确定最佳提取工艺为 $A_1B_3C_2D_2$,即 75% 乙醇 10 倍量提取 2 次,每次 4 h。结论 本实验采用的方法和指标适合于哥王的提取。

关键词:了哥王;总黄酮;抗炎;正交试验

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)02-0208-03

Optimum extracting technology of *Wikstroemia indica* by orthogonal test

CHEN Shuang, SHAO Man-li, YANG Zhen-yu, DU Zhi-min

(Institute of Clinical Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Key words: *Wikstroemia indica* (L.) C. A. Meyer; total flavones; antiinflammation; orthogonal test

了哥王 *Wikstroemia indica* (L.) C. A. Meyer 始载于《岭南采药录》,为瑞香科茛花属植物,苦寒、微辛、有毒,清热解毒、化痰散结、通经利水,可用于治疗扁桃体炎、腮腺炎、淋巴结炎、支气管炎、哮喘、肺炎、风湿性关节炎、跌打损伤、麻风、闭经、水肿等疾病^[1,2]。了哥王含有小麦黄素、羟基茛花素、酸性树脂、挥发油、皂苷、多糖类、黄酮类等成分。其中黄酮类成分有抗菌、抗炎、镇痛等作用^[2,3]。目前文献报道了哥王提取溶剂有水、石油醚、乙醇、甲醇等^[4,5]。了哥王对二甲苯所致小鼠耳部炎症有抑制作用^[6]。为探索药材有效成分提取的最大化,本实验用乙醇提取,乙醇浸膏收率、总黄酮质量分数、抗炎效果为指标,考察影响了哥王提取的主要因素,寻求最佳的提取工艺条件。

1 材料、试剂与仪器

了哥王购自安徽亳州敬德药业公司,经哈尔滨医科大学附属二院临床药物研究所金瑞教授鉴定为瑞香科茛花属植物了哥王 *W. indica* (L.) C. A. Meyer,取茎干燥粉碎后备用。芦丁对照品购自中国药品生物制品检定所。其余试剂均为分析纯。

紫外可见分光光度计(日本岛津 UV-2201 型);超声波仪(昆山市超声仪器有限公司 KQ2200E 型);电子分析天平(日本岛津 AEU-210 型);电热

恒温干燥箱(上海市跃进医疗器械一厂)。

昆明小鼠(哈尔滨医科大学动物中心)。

2 方法与结果

2.1 因素水平的确定:采用 $L_9(3^4)$ 设计实验,以不同倍数的乙醇、提取次数、醇体积分数、提取时间为指标进行比较,因素水平安排见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因 素			
	A 醇提取次数 /次	B 加醇量 /倍	C 醇体积分 数/%	D 提取时间 /h
1	2	6	50	3
2	3	8	75	4
3	4	10	95	5

2.2 乙醇浸膏收率的测定:取了哥王粗粉 50 g,按正交表中规定的条件进行回流提取,提取液滤过,回收乙醇,浓缩成稠膏状,干燥至恒重,得干膏,称质量,计算醇浸膏收率。

2.3 总黄酮的测定

2.3.1 供试品溶液制备:精密称取正交试验下的干膏 1 g,置锥形瓶中,用石油醚超声脱脂 3 次,每次 2 h,弃去石油醚层。剩余残渣挥干溶剂,加入甲醇 45 mL 密闭放置 14 h,水浴回流提取 2 h,放冷,滤过,滤液置于 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,即得供试品溶液。

收稿日期:2006-04-12

作者简介:陈 爽(1980—),女,河南鹤壁人,硕士研究生,研究方向:新药研发与药代动力学。

Tel:(0451)86692623 E-mail:chenshuang1215@tom.com

* 通讯作者 杜智敏 Tel:(0451)86605353 E-mail:dzm1956@126.com

2.3.2 对照品溶液的制备:精密称取 120 ℃干燥恒重的芦丁对照品 10 mg,加甲醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中,即得 0.2 mg/mL 的对照品溶液。

2.3.3 标准曲线的制备:分别取对照品溶液 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 mL 于 25 mL 量瓶中,加 5%亚硝酸钠 1.0 mL,静置 6 min,加 10%硝酸铝 1.0 mL,静置 6 min 后,加 4%氢氧化钠 10.0 mL,加甲醇至刻度,摇匀,静置 15 min,进行全波长扫描,在 510 nm 处均有最大吸收。以该波长处吸光值为横坐标,样品质量浓度(mg/mL)为纵坐标,得标准曲线回归方程为 $C=1.964\ 9A+0.003\ 5$, $r=0.999\ 7$,线性范围为 0.4~2.4 mg/mL。

2.3.4 精密度试验:分别精密吸取的供试品溶液 1.0 mL,按实验方法操作测定 5 次吸光度,结果 RSD 分别为 2.17%。

2.3.5 稳定性试验:取供试品溶液室温放置 4、8、12、16、20、24 h 测定吸光度,RSD 为 1.29%,说明供试品溶液在 24 h 内基本保持不变。

2.3.6 回收率试验:精密吸取供试品溶液 0.5 mL 于 25 mL 量瓶中,加入芦丁对照品溶液(0.2 mg/mL)0.5 mL,制备供试品溶液,测定吸光度,计算得平均回收率分别为 99.12%(RSD 为 1.66%)($n=5$)。

2.3.7 样品测定:精密吸取供试品溶液 1.0 mL,依

法测定吸光度,按回归方程计算总黄酮的质量分数。

2.4 抗炎效果的测定:采用二甲苯致小鼠耳部炎症试验^[7]。小鼠 18~22 g,雄性,100 只,随机分为 10 组,每组 10 只。其中 9 组为实验组,分别 ig 给予提取的醇浸膏,药物溶液浓度为 8%,剂量为 1.6 g/kg,给药容积为 0.4 mL/20 g;另 1 组为对照组,给予等体积的蒸馏水。每天 ig 给药一次,连续 3 d。末次给药后 1 h,每鼠右耳两面均匀涂 100%二甲苯致炎剂 0.02 mL 致炎,左耳作对照。1 h 后处死小鼠,沿耳廓基线剪下两耳,用直径 9 mm 打孔器打下双耳同一部位圆片,电子分析天平称重,计算肿胀度(肿胀度=右耳片质量-左耳片质量)。对 9 组实验组与蒸馏水组肿胀度进行 t 检验。

2.5 正交试验结果与分析:试验结果见表 2。方差分析结果见表 3。可见各组乙醇提取物对二甲苯所致小鼠耳部炎症都有抑制作用,与蒸馏水组比较,第 3、5、7 组有显著性差别($P<0.05$),其余各组有非常显著性差别($P<0.01$)。由表 2 的 R 值看出各因素对浸膏收率、总黄酮的质量分数、肿胀度的影响程度顺序均为醇体积分数>提取次数>提取时间>加醇量。方差分析表明:醇体积分数对浸膏收率、肿胀度有显著影响,而其余 3 因素对结果影响不显著。以抗炎作用为主要指标,确定提取最佳条件为 $A_1B_3C_2D_2$,即 75%乙醇 10 倍量提取 2 次,每次 4 h。

表 2 提取工艺正交设计试验结果

Table 2 Results of extracting technology by orthogonal test

实验号		A	B	C	D	浸膏收率/%	总黄酮/%	肿胀度($\bar{x}\pm s$)/mg
蒸馏水组	1	1	1	1	1	12.24	9.58	2.5±1.2**
	2	1	2	2	2	15.04	10.99	2.1±1.3**
	3	1	3	3	3	10.10	7.59	2.9±1.0*
	4	2	1	2	3	17.44	10.11	2.4±1.5**
	5	2	2	3	1	10.82	5.18	3.3±1.0*
	6	2	3	1	2	17.32	10.25	2.3±1.5**
	7	3	1	3	2	11.00	6.34	3.2±1.2*
	8	3	2	1	3	13.48	8.06	2.8±1.1**
	9	3	3	2	1	15.44	9.49	2.5±1.4**
浸膏收率	K_1	37.38	40.68	43.04	38.50			4.5±1.5
	K_2	45.58	39.34	47.92	43.36			
	K_3	39.20	42.86	31.92	41.02			
	R	8.20	3.52	16.00	4.86			
总黄酮	K_1	28.16	26.03	27.89	24.25			
	K_2	25.54	24.23	30.59	27.58			
	K_3	23.89	27.33	19.11	25.76			
	R	4.27	3.1	11.48	3.33			
肿胀度	K_1	7.5	8.1	7.6	8.3			
	K_2	8.0	8.2	7.0	7.6			
	K_3	8.5	7.7	9.4	8.1			
	R	1.0	0.5	2.4	0.7			

与蒸馏水组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

	方差来源	SS	ν	MS	F	P
浸膏收率	A	11.747 5	2	5.083 7	5.58	
	B(误差)	2.104 3	2	1.052 1	1.00	
	C	44.829 9	2	22.414 9	21.30	<0.05
	D	3.938 4	2	1.969 2	1.87	
	总和	62.620 1	8			
总黄酮	A	3.091 1	2	1.545 6	1.91	
	B(误差)	1.615 6	2	0.807 9	1.00	
	C	24.018 8	2	12.009 4	14.86	
	D	1.853 5	2	0.926 8	1.15	
	总和	30.579 0	8			
肿胀度	A	0.166 7	2	0.083 4	3.56	
	B(误差)	0.046 7	2	0.023 4	1.00	
	C	1.040 0	2	0.520 0	22.22	<0.05
	D	0.086 7	2	0.043 4	1.86	
	总和	1.340 1	8			

$$F_{0.05}(2,2)=19.00$$

2.6 验证试验:按 $A_1B_3C_2D_2$ 的条件进行提取 3 次,结果浸膏得率平均为 17.98%,总黄酮的质量分数平均值为 11.14%,肿胀度为 (1.9 ± 1.1) mg。由实验结果看出,利用正交试验方法确定的 $A_1B_3C_2D_2$ 为最佳的工艺条件。

3 讨论

了哥王用乙醇为提取剂,有利于黄酮类化合物的溶出且可提出水溶和脂溶的成分,乙醇毒性小,来源方便。乙醇体积分数对总黄酮影响最大,75%乙醇提取黄酮类化合物较多,体积分数增加,提取量下降,可能由于以下两种原因。一方面醇体积分数增加,植物细胞皱缩,不利于黄酮类成分溶出;另一方面提取液颜色加深,说明一些醇溶性的杂质、色素等成分溶出量增加,可能这些成分与黄酮类化合物竞争乙醇-水分子结合,导致提取率下降。

通过正交试验已考察到醇体积分数对浸膏收率、抗炎效果有显著影响,75%乙醇提取量较多,抗炎效果好,提取黄酮类化合物较多,所以确定乙醇体积分数为 75%。由于加醇量对结果影响最小,虽然乙醇 6 倍量节约能源,但 10 倍量更有利于有效物质的浸出。所以正交试验优选出最佳提取条件为 $A_1B_3C_2D_2$,即用 75%乙醇,加 10 倍量,提取 2 次,每次 4 h。由实验结果看出,不同工艺条件所获得乙醇浸膏收率可相差 7.34%,总黄酮的质量分数可相差 5.81%,肿胀度可相差 1.2 mg。

有研究表明了哥王中黄酮类成分有抗炎作用,所以本实验以总黄酮质量分数为指标,结果看出肿胀度与浸膏得率无关,而与总黄酮质量分数有关,再次证明了黄酮类化合物有抗炎作用。

References:

- [1] Xie Z W, Yu Y C. *Taxonomy of Nationwide Chinese Herbal Medicine* (全国中草药名鉴) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.
- [2] Editorial Office of National Chinese Herbal Medicine Collection. *Collection of National Chinese Herbal Medicine* (全国中草药汇编) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996.
- [3] Luo X R. *Practical Kromgram Collection of Chinese Medicinal Plants* (实用中草药彩色图集) [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Publishing House, 2000.
- [4] Tian D H. *Dictionary of Practical Chinese Medicinal Plants* (实用中药辞典) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003.
- [5] Nunome S, Ishiyama A, Kobayashi M, et al. *In vitro* antimalarial activity of biflavonoids from *Wikstroemia indica* [J]. *Planta Med*, 2004, 70: 72-76.
- [6] Fang L, Zhu L Y, Liu W L, et al. Studies on the effect of antiinflammation and antibacterial of Liaogewang Tablet [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息), 2000, 7 (1): 28.
- [7] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.

何首乌清蒸工艺研究

赵荣华, 赵声兰, 解奉江, 饶高雄, 毛晓健

(云南中医学院 中药炮制研究中心, 云南 昆明 650200)

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。何首乌的炮制对其化学成分和药理作用均有一定的影响。何首乌常用的方法为清蒸法。何首乌中结合蒽醌随着蒸制时间

的延长而减少,结合蒽醌水解反应属于一级反应,反应物为游离蒽醌^[2]。常用的清蒸炮制方法费时费力^[1],而高温炮制则时间短。因此本实验以结合蒽醌的量和淀粉糊化程度为指标,研究了 120 ℃ 下长、

收稿日期:2006-04-06

基金项目:国家中药现代化科技产业(云南)基地建设专项基金资助项目

作者简介:赵荣华(1958—),男,昆明人,中药炮制研究中心主任,主要从事中药炮制方面的研究。

Tel:(0871)6212611 E-mail:zharh@tom.net