

2.4.11 验证试验:综合以上结果,优选天山雪莲的最佳纯化工艺条件为:HPD400型大孔树脂,药液调pH值为2~3,上样量4BV,吸附时间12h,树脂径高比17.4BV蒸馏水洗去水溶性杂质,6BV的30%乙醇和4BV的50%乙醇洗脱。按优选的最佳工艺条件进行验证,结果紫丁香苷、绿原酸和芦丁的解吸率分别为86.74%、89.36%、92.56%($n=3$),说明所选工艺稳定可行。

2.5 产品的对比:精密吸取50mL上柱液和过柱后30%、50%乙醇的混合洗脱液水浴蒸干,105℃干燥至恒重,得总固形物,称定质量,折合成同量生药材计算,得出膏率分别24.9%、4.6%,紫丁香苷、绿原酸和芦丁的质量分数由纯化前的0.15%、1.4%、1.6%增加到纯化后的0.9%、7.6%、8.2%,质量分数提高了4倍左右。

3 讨论

文献报道使用磷酸盐作为流动相可以分离紫丁香苷、绿原酸和芦丁这3个指标成分^[10],但长时间使用盐对色谱柱及仪器的损害都较大。为了保护液相又能一次测定3个指标成分,先后尝试了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸、乙腈-磷酸等多种流动相,最终选择了乙腈-0.4%磷酸,但在这个条件下芦丁的出峰时间较晚,长达1h,不利于色谱分析。所以,实验选择了梯度洗脱,结果大大缩短了分析时间。

在工业生产中希望使用载药量大,且解吸率高的型号树脂,这样不仅可以保证有效成分最大程度被回收,而且大大降低成本。本实验优选出HPD400型大孔树脂就是从这些方面考虑的;另外,

在静态解吸时,由于其他条件都没有优化,且最佳洗脱乙醇体积分数还没考察,所以导致树脂的解吸率较低,但不影响筛选树脂的型号。

绿原酸水溶性较强,易伴随着上样及水洗脱过程而冲洗出来,达不到分离富集的目的。实验通过调节药液的pH值使绿原酸充分游离出来,大大降低了绿原酸的极性,这样大孔树脂对绿原酸的吸附性能增强,经过调节药液pH值,可使绿原酸在醇中才被洗脱出来。

参考文献:

- [1] 袁晓凡,赵兵,王玉春. 雪莲的研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(12):1424-1426.
- [2] Choi J W, Shin K M, Park H J, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of sinapyl alcohol and its glucoside syringin [J]. *Planta Med*, 2004, 70(11): 1027-1032.
- [3] Cho J Y, Nam K H, Kim A R, et al. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory effects of syringin [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53(9): 1287-1294.
- [4] 金汝城,李贵文,马素丽. 大孔吸附树脂法分离纯化当归中阿魏酸的工艺研究[J]. 中草药, 2008, 39(9):1324-1327.
- [5] 翟科峰,邢建国,杨伟俊,等. HPLC法同时测定天山雪莲中紫丁香苷、绿原酸和芦丁的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(5):762-765.
- [6] 刘火安,贾云,戴传云,等. 葛根总黄酮分离纯化的研究[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(5):522-524.
- [7] 刘虹,杨虹,王萌,等. 大孔树脂纯化香加皮提取物的工艺考察[J]. 天津中医药大学学报, 2006, 25(3):188-190.
- [8] 杨克迪,葛利,李宏,等. 大孔树脂吸附分离纯化玉屏风复方中色原酮苷的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12):2915-2916.
- [9] 周媛,程凡,罗少华. 大孔树脂对葛根总黄酮的吸附及分离纯化研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12):3008-3010.
- [10] 薛秀峰,陈华山,熊志立. RP-HPLC法同时测定雪莲注射液3种成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 2(5):363-366.

正交试验优选丰城鸡血藤的提取工艺研究

钟小群,李艳,王丽静,利家平,朱良辉*,徐丽瑛,李良

(江西省药物研究所,江西南昌 330029)

摘要:目的 对丰城鸡血藤的提取工艺进行研究。方法 采用正交设计试验,以总黄酮提取率、芒柄花素提取率及提取物干膏得率为指标,优化提取工艺。结果 最优提取工艺为:加8倍的水煎煮3次,每次3h。结论 本提取工艺能最大限度地提取出丰城鸡血藤的有效成分,节能、省时、不污染环境,适宜工业化大生产。

关键词:丰城鸡血藤;总黄酮;芒柄花素;正交设计;干膏得率

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)07-1066-03

* 收稿日期:2008-10-25

基金项目:国家科技支撑计划课题(2006BA106A18-09);江西省科技计划任务

作者简介:钟小群(1968-),女,江西省吉安人,硕士,副研究员,从事新药研究工作。

Tel:(0791)8105994 E-mail:zhxq1015@yahoo.com.cn

*通讯作者 朱良辉 Tel:(0791)8100538 E-mail:zh572@sohu.com

丰城鸡血藤又称丰城崖豆藤,为豆科崖豆藤属植物丰城崖豆藤 *Millettia nitida* Benth. var. *hirsutissima* Z Wei 的干燥藤茎,是正品鸡血藤的地区代用品,收载于《江西中药材标准》中,具有补血、活血、舒筋活络的功效,主要用于肢体麻木、瘫痪、腰膝酸痛、月经不调、贫血等症。本品为江西特色中药材,有悠久的入药历史。丰城鸡血藤主要成分为黄酮类、酚类、三萜及甾醇等,多为大豆黄酮、染料木素、刺芒柄花素、美皂异黄酮及 3-*O*-methylrobofl、染料木素、鹰嘴豆芽素 A、阿弗洛莫生等异黄酮化合物^[1,2]。丰城鸡血藤与《中国药典》中所收载的鸡血藤属同名异种,也属鸡血藤众多品种中的正品之一,两者临床功效基本相似。本课题组在对该药材药效学筛选研究中发现,本品水提取液部分具有明显升高由⁶⁰Co 引起的小鼠白细胞减少作用,因此本实验采用正交试验优选丰城鸡血藤最优水提取工艺。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (Waters600 高压恒流泵, Waters 2996 二极管阵列紫外检测器)。

芦丁 (批号 0080-9705)、芒柄花素 (批号 111703-200501) 对照品均购于中国药品生物制品检定所。流动相所用溶剂为色谱纯,其他试剂为分析纯。丰城鸡血藤药材采于江西丰城市,经江西省药物研究所朱良辉研究员鉴定为丰城崖豆藤 *M. nitida* Benth. var. *hirsutissima* Z Wei 的干燥藤茎。

2 方法与结果

2.1 提取时间和提取次数选择的预试验:丰城鸡血藤初步药效试验结果显示,本品水煎煮液具有明显的升高白血球作用,因此对水提取部分进行工艺优化。取 200 g 药材,3 份,分别加 8 倍水,提取 0.5、1.0、1.5 h,各 3 次,分别滤过、浓缩、干燥,计算每次提取的干膏量,结果见表 1。结果显示总提取率随提取时间的增加及提取次数的增加呈增加趋势,因此提取次数选择 2、3、4 次,提取时间选择 2、3、4 h。因素水平见表 2。

表 1 提取时间和提取次数的预试结果

Table 1 Results of extracting periods and times

提取时间/h	第一次提取	第二次提取	第三次提取	总提取率/%
	干膏量/g	干膏量/g	干膏量/g	
0.5	1.8	2.4	2.2	3.2
1.0	2.5	2.9	2.8	4.1
1.5	3.8	3.2	2.8	4.9

2.2 芒柄花素的 HPLC 法测定^[3,4]

2.2.1 色谱条件:Alltech C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5μm); 甲醇-水 (60 : 40) 为流动相; 检测波

表 2 因素水平

Table 2 Factors and levels

水平	因素		
	A 提取次数/次	B 提取时间/h	C 加水倍数/倍
1	2	2	6
2	3	3	8
3	4	4	10

长为 254 nm。理论板数按芒柄花素峰计算应不低于 2 000。

2.2.2 对照品溶液的制备:精密称取芒柄花素对照品适量,加甲醇制成 100 μg/mL 的溶液,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备:精密吸取上述各提取液 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 测定法:分别精密吸取芒柄花素对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定,计算。

2.3 总黄酮的测定:参考《中国药典》2005 年版一部槐米项下方法。

2.3.1 标准曲线的制备:精密称取在 120 °C 减压干燥至恒重的芦丁对照品 20 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇 70 mL,置水浴上微热使溶解,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀。精密吸取 10 mL,置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得 (每 1 mL 含无水芦丁 0.2 mg)。精密量取芦丁对照品溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,分别置 25 mL 量瓶中,各加水至 6 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,使混匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加氢氧化钠试液 10 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,照分光光度法 (《中国药典》2005 年版附录 B),在 500 nm 的波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 0.0115 X + 0.0002$, $r = 0.9993$ 。

2.3.2 测定法:吸取各提取液 10 mL 置 100 mL 量瓶中,加水至刻度,分别从中吸取 1、2、3 mL 置 25 mL 量瓶,自“各加水至 6 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL”起,以下操作同标准曲线的制备项下方法,测定吸光度,在回归方程中计算总黄酮的质量浓度。

2.4 干膏得率的测定:吸取各供试品溶液 25 mL,于恒重的蒸发皿中,依法测定,计算干膏得率。

2.5 正交试验设计与结果:称取丰城鸡血藤药材 150 g,9 份,按 L₉(3⁴) 正交设计表的要求进行试验,即分别加入不同量的水,提取不同时间,不同提取次数,滤过,滤液浓缩至含药材 0.3 g/mL,即得。以总黄酮提取率、芒柄花素提取率、干膏得率为指标,采

用综合评价(综合评价 = 总黄酮提取率 $\times 50\%$ + 芒柄花素提取率 $\times 30\%$ + 干膏得率 $\times 20\%$)为指标,得

出最优工艺,正交设计见表3。数据处理及方差分析结果见表4。

表3 $L_9(3^4)$ 正交设计及结果

Table 3 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D	总黄酮/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	芒柄花素/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	干膏得率/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	综合评价
1	1	1	1	1	3.905 2	0.071 4	51.20	12.564
2	1	2	2	2	4.628 6	0.033 4	55.50	13.748
3	1	3	3	3	5.430 0	0.043 7	58.20	14.699
4	2	1	2	3	5.381 5	0.071 4	65.90	16.243
5	2	2	3	1	5.750 6	0.061 9	68.50	16.937
6	2	3	1	2	5.295 0	0.093 6	66.40	16.321
7	3	1	3	2	5.967 8	0.095 3	69.80	17.339
8	3	2	1	3	5.659 9	0.095 3	69.50	17.125
9	3	3	2	1	6.014 2	0.088 8	67.00	16.796
K_1	13.67	15.38	15.34	15.43				
K_2	16.50	15.94	15.60	15.80				
K_3	17.09	15.94	16.33	16.02				
极差	3.416 7	0.556 8	0.988 2	0.589 7				

表4 差分析

Table 4 Analysis of variance

误差项	离均差 平方和	自由 度	平均 方差	F值	显著性
A	20.0266	2	10.013 3	37.576 897 630	$P < 0.05$
B	0.6180	2	0.309 0	1.159 511 040	
C	1.5760	2	0.788 0	2.957 172 367	
D(误差)	0.5330	2	0.266 5		

结果显示,提取次数有显著差异($P < 0.05$),提取时间、提取溶剂在试验所设范围内无显著的差异,因此最优工艺为 $A_3B_2C_2$;从数据分析看, A_3 、 A_2 结果相似,再从实际生产的可操作性考虑,选择提取3次,最优工艺为 $A_2B_2C_2$ 。

2.6 验证试验:取丰城鸡血藤生药材 150 g,3份,分别加8倍的水煎煮3次,每次3 h,合并滤液,滤液浓缩至含药材 0.3 g/mL,依法测定,结果见表5。

表5 验证试验结果

Table 5 Results of verification test

试验号	总黄酮/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	芒柄花素/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	干膏得率/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	5.942	0.102 3	67.9
2	5.913	0.097 8	69.1
3	6.015	0.099 3	70.3

3 讨论

丰城鸡血藤为落叶攀缘灌木的根茎,民间常采

用水煎煮或酒浸泡用于治疗多种疾病,运用广泛。本品质地坚硬,纤维性强,使用时将药材浸泡过夜后再煎煮2~3 h,若与其他药材合并煎煮时常采用先煎煮本品2 h后再加入其他药物一起处理,使最大限度地提出成分。本课题组选择煎煮时间和次数的时候,在考虑民间原始的使用方法同时,也以干膏得率为指标做过一些预试验,结果提取率随提取时间及提取次数的增加而增加,以此为据选择正交设计试验的因素水平。

以总黄酮提取率、芒柄花素提取率、干膏得率为指标,根据其权重的差异进行综合评价,并进行方差分析,结果显示最优工艺定为:加8倍的水煎煮3次,每次3 h,滤过。验证试验结果显示本工艺重复性好,可操作性强。本工艺不引入异物,不污染环境,能适合工业大生产。

参考文献:

- [1] 冯洁,向诚,梁鸿,等.丰城鸡血藤异黄酮类成分的研究[J].中国中药杂志,2007,32(4):321-322.
- [2] 王瑞,耿培武,福山爱保.香花崖豆藤化学成分的研究[J].中草药,1989,20(2):2.
- [3] 余燕影,章丽华,曹树稳.高效液相色谱-质谱法分析丰城鸡血藤中刺芒柄花素[J].食品科学,2006,27(11):415-418.
- [4] 余燕影,章丽华,曹树稳.RP-HPLC法测定丰城鸡血藤提取物中大豆黄酮、染料木素、刺芒柄花素和美皂异黄酮[J].中草药,2006,37(11):1655-1656.