

浓度,计算提取率。两种提取方法结果见表 3。可知微波法对有效成分的提取率较药典法高,而且还节约了时间。

表 3 微波辅助与《中国药典》法提取舒胸片中有效成分的比较($n=3$)

Table 3 Comparison between microwave-assistant and Pharmacopeia method on extracting active ingredients in Shuxiong Tablets ($n=3$)

提取方法	阿魏酸提取率/ %	羟基红花黄色素 A 提取率/ %	总耗时/ h
微波法	83.00 $\pm$ 2.96	85.34 $\pm$ 1.60	1.23
药典法	79.13 $\pm$ 3.15	70.84 $\pm$ 2.79	4.00

3 讨论

通过单因素试验确定了各影响因素的较优水平范围,在此基础上采用均匀设计法进一步优化出微波辅助提取舒胸片方的最优工艺条件,得出阿魏酸的提取率为 83.00%,羟基红花黄色素 A 的提取率为 85.34%,均高于药典法的提取率,其原因可能在于微波辅助提取不同于传统加热方式的基于热传导作用的外加热,而是通过偶极子旋转和离子传导两种方式内外同时加热^[4],升温迅速导致药材基质组织结构发生变化,材料变得疏松,减小了传质阻力,

从而达到提高提取效果的目的。

《中国药典》2005 年版一部中舒胸片处方工艺为三七粉碎成细粉直接压片,川芎先单提 1 次,药渣再与红花混提 2 次,总共为提取 3 次。因此,本实验首先优选川芎单次微波辅助提取的工艺条件,再优选混提的工艺条件。由于混提过程中尚能提取部分阿魏酸(测得阿魏酸的提取率为 15%左右),故最后阿魏酸 3 次总提取率为 83.00%。

本实验以多成分提取率为考察指标,研究微波技术对舒胸片方中活性成分提取率的影响,并将对制剂的理化性质及有效成分的药理和药物疗效、不良反应作进一步考察,为微波提取舒胸片方工艺的可行性提供参考。

参考文献:

- [1] 张 力,孙秀利,王松青,等.微波法提取葡萄籽中原花青素的工艺研究[J].中草药,2007,38(12):1808-1811.
- [2] Kwon J H, Belange J M R, Pare J R J, et al. Application of the microwave-assisted process (MAPTM) to the fast extraction of ginseng saponins [J]. Food Res Int, 2003,36(5):491-498.
- [3] Pare J R, Miche S. Microwave-assisted natural products extraction [P]. US: 5002784, 1991.
- [4] Pare J R J, Belanger J M R, Stafford S S. Microwave-assisted Process (MAPTM); a new tool for the analytical laboratory [J]. Trend Anal Chem, 1994,13(4):176-184.

均匀设计优选驱虫斑鸠菊的半仿生提取工艺研究

刘晓东¹, 闫 明², 高丽丽³, 霍仕霞¹, 张兰兰¹

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832003; 2. 新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830049; 3. 长江大学研究生学院, 湖北 荆州 434023)

摘要:目的 优选驱虫斑鸠菊的半仿生提取的最佳工艺条件。方法 以指纹图谱共有峰 HPLC 总面积、总黄酮、干浸膏得率等为综合评定指标,采用均匀设计及指纹图谱优选驱虫斑鸠菊半仿生提取法的条件。结果 优化条件结合工业生产实际,确定其半仿生提取法工艺条件为:3 次煎煮用 80%乙醇的 pH 值依次 6.0、6.5、8.0;煎煮时间依次为 1.0、0.5、0.5 h。结论 驱虫斑鸠菊的提取工艺采用半仿生提取,均匀设计优选相关参数效果较好。

关键词: 驱虫斑鸠菊;半仿生提取法;均匀设计

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)01-0049-04

Technical condition for semi-bionic extraction of *Vernonia anthelmintica* by uniform design

LIU Xiao-dong¹, YAN Ming², GAO Li-li³, HUO Shi-xia¹, ZHANG Lan-lan¹

(1. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. Xinjiang Institute of Traditional Uighur Medicine, Urumqi 830049, China; 3. Graduate School, Yangtze University, Jingzhou 434023, China.)

Abstract: Objective To optimize the best condition of semi-bionic extraction for *Vernonia anthelmintica*.

①收稿日期:2008-06-05

基金项目:国家科技支撑计划项目(2007BAI30B00; 2007BAI48B06)

作者简介:刘晓东(1980—),男,河南商丘人,硕士研究生,从事仪器分析新方法 & 新药研究。

Tel:15894683921 E-mail: xiaodongliu204@hotmail.com

*通讯作者 闫 明 Tel:(0991)2574309 Fax:(0991)2557730 E-mail:yanming21cn@sohu.com

tica. **Methods** The best condition of the semi-bionic extraction for *V. anthelmintica* by uniform design was optimized with total HPLC integrate area of common peaks in fingerprints, total flavonoids and dried extract weight as the indexes. **Results** According to industry production condition, the best technical condition: pH values of 80 % ethanol for the 1st, 2nd, and 3rd decoctions were in order of 6.0, 6.5, and 8.0, and the extraction time were 1, 0.5, and 0.5 h, respectively. **Conclusion** It is better for *V. anthelmintica* extracted by semi-bionic extraction, and the parameters are optimized by uniform design.

Key words: *Vernonia anthelmintica* (Linn.) Willd.; semi-bionic extraction; uniform design

驱虫斑鸠菊 *Vernonia anthelmintica* (Linn.) Willd. 为菊科斑鸠菊属一年生草本植物,别名印度山茴香,在新疆和田、阿克苏,云南西部有栽培,为新疆维吾尔医用药,具有清除异常黏液质、驱虫、消肿、散寒止痛等作用,用于治疗湿寒性胃痛、肝病、白癜风等病症,其中治疗白癜风有突出的疗效。本实验采用均匀设计对其进行半仿生提取法研究,建立了其有效黄酮部位的指纹图谱,用相关系数计算指纹图谱各共有峰的相关性,以各共有峰相对峰面积的变化考察各共有峰的异同,并以指纹图谱共有峰 HPLC 总面积、总黄酮、干浸膏得率为综合评定指标,优选其半仿生提取法工艺条件,为其作用物质基础及药效学研究奠定基础。

1 仪器与材料

GBC 紫外可见分光光度计;美国 Waters1525 二元泵高效液相色谱仪, Waters2996 二极管阵列检测器, Empower 数据采集系统; Milli-Q 超纯水纯化系统(18 M Ω , Millipore 公司); SGT7200 HBT 型超声清洗器(上海冠特超声仪器有限公司); PB-10 型精密 pH 计(北京赛多利斯有限公司); BS110S 电子天平(北京赛多利斯有限公司); TGL-16B 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

驱虫斑鸠菊药材由新疆华康制药有限公司提供,经新疆维吾尔自治区药物研究所张彦福研究员鉴定为菊科植物驱虫斑鸠菊 *V. anthelmintica* (Linn.) Willd. 的成熟瘦果。

芦丁对照品(中国药品生物制品检定所),高效液相用甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 实验设计:为保证试验的可比性和重复性,依据半仿生提取法理论,在药材粒度、温度、滤过、浓缩等条件一致的情况下考察 3 次煎煮 pH 值及煎煮时间,以指纹图谱共有峰 HPLC 总面积、总黄酮的量和干浸膏得率为指标,采用 $U_9(9^1 \times 3^3)$ 均匀设计表安排试验^[1],见表 1。

表 1 $U_9(9^1 \times 3^3)$ 均匀设计

Table 1 $U_9(9^1 \times 3^3)$ uniform design

试验号	A 第 1 煎 pH	B 第 2 煎 pH	C 第 3 煎 pH	D 总提取时间/h
1	2.00	7.00	9.00	4.0
2	4.00	6.50	9.00	2.0
3	2.50	6.50	8.00	3.0
4	3.00	7.50	8.50	2.0
5	5.50	7.00	8.00	2.0
6	3.50	7.00	8.00	4.0
7	4.50	7.50	9.00	3.0
8	5.00	7.50	8.50	3.0
9	6.00	6.50	8.50	4.0

2.2 提取液的制备:精密称取 9 份驱虫斑鸠菊药材(过 20 目筛),每份 10 g,以 80 %乙醇加热回流提取 3 次,3 次用量依次为药材的 10、8、8 倍^[2],pH 值按表 1 安排,3 次煎煮时间为 2:1:1,煎煮液 4 000 r/min 离心 10 min,合并上清液,置 250 mL 量瓶中,加 80 %乙醇至刻度,制得 1~9 号样品(相当于原药材 0.04 g/mL)。

2.3 提取液指纹图谱中共有峰相对峰面积和 HPLC 总面积的测定

2.3.1 色谱条件:Shim-pack VP-ODS C_{18} 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-0.5 %磷酸水溶液,梯度洗脱程序,0~120 min,25 %~75 %甲醇^[3];体积流量:1 mL/min;检测波长:280 nm;进样量:10 μ L。

2.3.2 供试品溶液的制备:精密吸取 1~9 号样品溶液 2 mL,置 25 mL 量瓶中,加 80 %乙醇至刻度,摇匀,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得。

2.3.3 重现性试验:取同一样品溶液(1[#] 样品),制备 6 份供试品溶液,分别进样,测得各共有峰总峰面积的 RSD < 2.12 %。

2.3.4 稳定性试验:取供试品溶液(1[#] 样品),分别在 0、4、8、12 h 测定指纹图谱,测得各共有峰总峰面积的 RSD < 2.03 %,表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.5 共有峰的选择:按色谱峰占总峰面积的 0.5 %以上的共有峰入选的原则选择共有峰^[4]。

2.3.6 指纹图谱的建立^[4]:利用 Empower 工作站计算软件对 9 个驱虫斑鸠菊的半仿生提取液的指纹图谱进行重叠,符合匹配要求,见图 1。将色谱工作站数据导入 Excel2002 软件,经谱峰匹配后产生 11 个共有峰,以供试品各峰的平均值(即标准样品)为

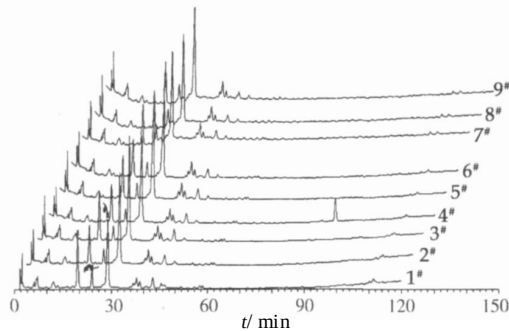


图 1 驱虫斑鸠菊的半仿生提取液指纹图谱的重叠图

Fig.1 Overlapping chromatograms of solution by semi-bionic extraction for *V. anthelmintica*

对照模板,计算相对峰面积(以峰面积适中的 2 号峰作为参比峰),利用 Excel 2002 软件^[5],采用相关系数的方法计算驱虫斑鸠菊的半仿生提取液指纹图谱相对峰面积的相似度,结果见表 2。计算 9 个半仿生提取液共有峰的总峰面积,结果见表 3。

2.4 总黄酮的测定

2.4.1 对照品溶液的制备:精密称取 105℃干燥至恒重的芦丁对照品 20 mg,置 100 mL 量瓶中,加 80%乙醇适量,置水浴微热使溶解,放冷,加 80%乙醇稀释至刻度,摇匀;精密吸取 25 mL 置 50 mL 量瓶中,加 80%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得(每毫升中含芦丁 0.1 mg),置于 4℃冰箱保存。

2.4.2 供试品溶液的制备:精密量取样品液 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加 80%乙醇适量,超声处理(功率 135 W,频率 59 kHz)10 min,放冷,加 80%乙醇至刻度,摇匀,得 1~9 号供试品溶液。

表 2 半仿生提取液的 HPLC 指纹图谱中共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative areas of common peaks in fingerprints of solution by semi-bionic extraction

峰 号	共有峰的相对峰面积									平均值
	1 #	2 #	3 #	4 #	5 #	6 #	7 #	8 #	9 #	
1	3.25	3.132	3.86	3.226	3.015	2.965	2.803	2.422	2.491	3.018
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	5.24	9.198	9.777	9.36	8.848	8.518	7.843	7.775	7.105	8.185
4	0.078	0.42	0.278	0.212	0.466	0.4	0.337	0.328	0.266	0.309
5	0.435	1.207	0.878	0.878	1.203	1.322	1.176	1.094	1.011	1.023
6	0.264	0.533	0.469	0.447	0.502	0.465	0.42	0.342	0.345	0.421
7	0.641	0.873	1.049	0.907	0.825	0.687	0.713	0.535	0.404	0.737
8	0.11	0	0.105	0	0.094	0.037	0.083	0	0.134	0.063
9	0.075	0.089	0.07	0.039	0.086	0	0.085	0	0	0.049
10	0.059	0.063	0.046	0.052	0.1	0	0	0.058	0.125	0.056
11	0.068	0.058	0.064	0.083	0.058	0	0.054	0.03	0	0.046
相关系数	0.970	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	1	0.998	0.999	1

2.4.3 线性关系的考察:精密吸取芦丁对照品溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 分置 10 mL 量瓶中,分别加 80%乙醇至 5.0 mL,精密加入 5%亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,加 10%硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min;再加 4%氢氧化钠溶液 4 mL,用 80%乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应试剂作空白,于 510 nm 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 $Y = 12.499 X - 0.0148$, $r = 0.9990$ 。结果表明芦丁在 0~500 μg 线性良好。

2.4.4 精密度试验:精密吸取芦丁对照品溶液 3 mL,显色后,重复测定 6 次吸光度值,计算吸光度

值的 RSD 为 0.11%。

2.4.5 重现性试验:取同一提取液 5 份,显色后测定其吸光度,计算得总黄酮质量浓度的 RSD 1.0591%

2.4.6 加样回收率试验:精密量取 1 号样品溶液 3.0 mL,6 份,分别加入 0.1 mg/mL 芦丁对照品溶液 2.0 mL,显色后测定,计算总黄酮质量浓度,结果平均回收率为 98.04%,RSD 为 2.01%。

2.4.7 样品中总黄酮测定:取 1~9 号供试品溶液各 5 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,显色,于 510 nm 处测定吸光度,代入回归方程,计算总黄酮的质量分数,结果见表 3。

2.5 干浸膏得率的测定:精密吸取1~9号提取液各10 mL,分别置于已烘至恒重的蒸发皿中(105℃恒重2 h),蒸发溶剂至微量水分后,移入恒温干燥箱恒重3 h后,置干燥器内30 min,称定质量并计算干浸膏得率,结果见表3。

2.6 工艺条件的优化:为消除各指标量纲及各指标变量范围相差悬殊造成的影响,将指纹图谱共有峰HPLC总面积^[6]、总黄酮、干浸膏得率3个指标的数据进行多指标综合评分。评分时以各指标的最大值

为参照将数据进行归一化,根据各指标在提取工艺选择中的主次地位,给予不同的加权系数,总黄酮质量分数、HPLC总面积和干浸膏得率的权重系数分别为0.5、0.3、0.2。以标准化的指标值加权后求得Y值作为综合评价指标进行统计分析,结果见表3。其中综合评价指标 $Y = 0.5 \times A \times 100 / 84.25 + 0.3 \times B \times 100 / 730.991 + 0.2 \times C \times 100 / 37.25$ 。

将最终结果输入均匀设计软件,用逐步回归法进行二次多项式回归,得回归方程: $Y = 57.196 +$

表3 正交试验结果及综合评分法处理

Table 3 Results of orthogonal test and comprehensive score

试验号	A	B	C	D	总黄酮/(mg·g ⁻¹)	HPLC总面积(AU)	干浸膏得率/(mg·g ⁻¹)	综合评价指标(Y)
1	2.00	7.00	9.00	4.00	84.25(50.00)	595 385(24.42)	37.25%(20.00)	94.42
2	4.00	6.50	9.00	2.00	56.00(33.25)	641 409(26.31)	19.25%(10.34)	69.90
3	2.50	6.50	8.00	3.00	61.00(36.20)	711 694(29.22)	21.75%(11.68)	77.10
4	3.00	7.50	8.50	2.00	56.00(33.25)	596 171(24.48)	19.25%(10.34)	68.07
5	5.50	7.00	8.00	2.00	63.00(37.40)	730 991(30.00)	22.50%(12.08)	79.48
6	3.50	7.00	8.00	4.00	65.25(38.70)	625 703(25.68)	22.25%(11.94)	76.32
7	4.50	7.50	9.00	3.00	67.50(40.05)	632 549(25.95)	22.75%(12.22)	78.22
8	5.00	7.50	8.50	3.00	58.50(34.70)	625 468(25.68)	21.25%(11.40)	71.78
9	6.00	6.50	8.50	4.00	64.25(38.15)	661 924(27.18)	23.50%(12.62)	77.95

1.846 5 $X_1^2 - 0.464 7 X_4^2 - 0.587 1 X_1 X_2 - 0.129 9 X_2 X_3 + 2.309 8 X_3 X_4$, $r = 0.976 7$,显著性水平 $\alpha = 0.05$,检验值 $F_t = 9.340 1$,临界值 $F(0.05, 4, 3) = 6.895 0$,回归方程显著。再将方程在计算机上进行优化处理,得出优化结果。确定优选结果为 $A = 5.862$ 、 $B = 6.646$ 、 $C = 8.000$ 、 $D = 2.000$,结合工业生产实际,确定其半仿生提取法工艺条件为:三煎用水的pH值依次为6.0、6.5、8.0,煎煮时间依次为1、0.5、0.5 h。

2.7 验证性试验:按照优化所得工艺条件,制备3批样品,分别对各指标进行测定考察。结果,HPLC总面积为694 357;总黄酮质量分数为78.04 mg/g,干浸膏得率为29.09 mg/g, $Y = 90.52$,接近预测值,说明优选条件可行。

3 讨论

目前对于驱虫斑鸠菊的研究较少,报道较多的是其总黄酮部位在治疗白癜风方面疗效显著,其真正起作用的有效成分有待进一步研究。本实验采用半仿生技术对其进行提取,以模仿口服药物在胃肠道的转运过程,对于作用物质基础不明确而又疗效确切的药物,半仿生提取法相比之下则更能确切反应药物真正的作用基础。

在指纹图谱的建立中,流动相曾尝试考察了甲

醇-0.2%甲酸、甲醇-0.4%甲酸、甲醇-1%甲酸系统,但结果不是太理想,改流动相系统为甲醇-0.5%磷酸梯度洗脱,结果峰形较好,色谱峰较多。检测波长采用二极管阵列检测器扫描,在242、280、289、356 nm处吸收峰较多,综合参考文献、峰形及色谱峰的个数,选用测定波长280 nm、参比波长220 nm。

从图1和表2可以看出,2[#]~9[#]样品的相关系数大于0.99,说明2[#]~9[#]样品与供试品各峰的平均值的相似度较高,而1[#]样品的相关系数低于0.98,与样品各峰的平均值相差较大,从测定结果看,9个半仿生提取液的指纹图谱比较相似,但色谱峰之间的相对峰面积并不相同,由此可以看出均匀设计所安排的实验结果之间有差别。

参考文献:

- [1] 程艳芹,孙秀梅,张兆旺,等.均匀设计法优选甘草的半仿生提取工艺条件[J].中药材,2007,30(5):598-601.
- [2] 于鲁海,孙力,李燕菊,等.驱虫斑鸠菊制剂提取工艺优选[J].新疆医科大学学报,2002,25(3):240-241.
- [3] 孙力,尚靖,李红健,等.驱虫斑鸠菊抗肿瘤活性部位的初步研究[J].中国现代中药,2006,8(11):10-12,16.
- [4] 王丽聪,曹玉华,徐红兰,等.银黄口服液的质量控制及其高效液相色谱指纹图谱的研究[J].色谱,2006,24(4):367-372.
- [5] 苗爱东,孙殿甲. Excel 2002 在中药指纹图谱相似度计算中的应用[J].药学进展,2003,27(1):51-54.
- [6] 惠建国,孙秀梅,张兆旺.苦参半仿生提取法与水提法的比较[J].山东中医药大学学报,2007,31(3):245-246,255.