

正交设计优选卷柏中总黄酮的提取工艺研究

冯卫生¹, 赵献敏¹, 王彦志¹, 魏悦¹, 郑晓珂^{2*}

(1. 河南中医学院药学院, 河南 郑州 450008; 2. 河南中医学院基础医学院, 河南 郑州 450008)

摘要:目的 优选卷柏中总黄酮的提取工艺。方法 采用紫外分光光度法和高效液相色谱法分别测定总黄酮和阿曼托双黄酮。以提取量为考察指标, 用正交设计方法优选最佳提取工艺。结果 以总黄酮提取量为考察指标, 其优选工艺为 $A_1B_2C_2D_2$; 以阿曼托双黄酮提取量为考察指标, 其优选工艺为 $A_{1\sim3}B_{1\sim3}C_2D_2$ 。综合考察采用 $A_1B_2C_2D_2$ 为最佳提取工艺, 即药材加 10 倍量的 95% 乙醇, 回流提取 2 次, 每次 2h。结论 优选得到的工艺稳定可行, 可作为卷柏的提取工艺。

关键词: 卷柏; 总黄酮; 正交设计

中图分类号: R284.2; R286.06

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2009)06-0893-04

Optimization of extracting technology for flavonoids in *Selaginella tamariscina* with orthogonal design

FENG Wei-sheng¹, ZHAO Xian-min¹, WANG Yan-zhi¹, WEI Yue¹, ZHENG Xiao-ke²

(1. School of Pharmacy, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. Basic Medical College, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: **Objective** To optimize the extraction technology for total flavonoids in *Selaginella tamariscina*. **Methods** To determine the content of total flavonoids by UV and the content of index constituent of amentoflavone by HPLC. The optimum extraction condition was investigated by orthogonal design and the extraction quantity was regarded as the investigated index. **Results** The optimum extracting condition was $A_1B_2C_2D_2$ with the extraction quantity of total flavonoids as the investigated index. The optimum extracting condition was $A_{1\sim3}B_{1\sim3}C_2D_2$ with the extraction quantity of amentoflavone as the investigated index. The optimum extracting condition was $A_1B_2C_2D_2$. That is adding ten times amount of 95% alcohol and refluxing twice, 2 h once. **Conclusion** The optimum technology is stable and feasible for the extraction of *S. tamariscina*.

Key words: *Selaginella amariscina* (Beauv.) Sping; total flavonoids; orthogonal design

卷柏为卷柏科植物卷柏 *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Sping 或垫状卷柏 *S. pulvinata* (Hook. et Grev.) Maxim 的干燥全草, 性辛平, 具有活血通经功效, 主要用于经闭痛经, 跌扑损伤, 吐血, 崩漏, 便血, 脱肛等^[1]。卷柏含有阿曼托双黄酮、扁柏双黄酮、新柳杉双黄酮等化合物^[2~4], 属天然多酚类抗氧化剂, 具有抗脂质过氧化和清除自由基的作用^[5,6], 能明显降低鼠耗氧速度和耗氧量, 提高耐氧能力, 扩张冠状动脉; 改善血液流变学各项指标, 对溶血性磷脂酰胆碱诱导的血管内皮细胞损伤有保护作用^[7]。为探索卷柏总黄酮提取工艺, 本实验采用正

交设计法, 以总黄酮提取量和阿曼托双黄酮提取量为考察指标, 对卷柏总黄酮提取工艺进行了研究。

1 仪器与试药

岛津 UV-2201 紫外分光光度计; Shimadzu LC-10AT 高效液相色谱仪; AB204-N 万分之一电子天平; AE240 十万分之一电子天平; DZKW-4 电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司); 旋转蒸发器 SB-1000(上海爱朗仪器有限公司)。

药材卷柏购自本草国药堂, 经过河南中医院药学院生药学科陈随清教授鉴定为卷柏科卷柏属卷柏

* 收稿日期: 2008-10-09

基金项目: 河南省高校新世纪优秀人才支持计划(2006 HANCET-08); 河南省重大公益性科研计划项目(08110091800)

作者简介: 冯卫生(1960-), 男, 河南林州人, 教授, 中药学博士, 享受国务院特殊津贴专家、中国药学会理事、中华中医药学会中药化学分会常委、河南省药学会常务理事, 主要从事中草药活性成分研究及新药开发。

Tel: (0371) 65575963 Fax: (0371) 65680011 E-mail: fwhsh@hactcm.edu.cn

* 通讯作者 郑晓珂 Tel: (0371) 65575963 E-mail: zhengxk_2006@yahoo.com.cn

S. tamariscina (Beauv.) Sping 的全草。阿曼托双黄酮为本实验室自制,质量分数达到98%以上。

乙腈为色谱纯(天津市四友精细化学品有限公司);乙醇等其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 提取工艺操作:精密称取药材18份(分为9组,每组2份),每份40 g,按 $L_9(3^4)$ 正交试验表中规定的条件用乙醇进行回流提取,提取液滤过,合并,减压回收乙醇,浓缩成稠膏状,置真空干燥箱中干燥至恒重,得相应提取物。

2.2 因素和水平的确定:精密称取卷柏药材40 g,用乙醇提取,根据单因素初筛试验结果,分别确定乙醇体积分数(A)、提取次数(B)、提取时间(C)和乙醇倍量(D)为因素,每个因素各取3个水平,因素水平见表1。

表1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A/ %	B/ 次	C/ h	D/ 倍量
1	95	1	1	8
2	70	2	2	10
3	50	3	3	12

2.3 卷柏提取物中总黄酮的测定

2.3.1 供试品溶液的制备:精密称取干燥恒重的提取物约3.00 mg,置100 mL量瓶中,加95%乙醇至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 标准曲线的绘制:精密称取干燥恒重的阿曼托双黄酮对照品2.00 mg,置25 mL量瓶中,加95%乙醇超声溶解,定容至刻度,摇匀。分别取0、1、2、3、4、5、6 mL置25 mL量瓶中,加95%乙醇至刻度,摇匀。在337 nm处测定其吸光度。以吸光度对质量浓度进行线性回归,得回归方程 $Y = 52.147 X + 0.028$ ($r = 0.9999$)。

2.3.3 精密度试验:精密吸取同一供试品溶液0.5 mL,重复测定6次吸光度,计算总黄酮的提取量,结果总黄酮提取量的RSD为0.88%。

2.3.4 稳定性试验:精密称取同一批样品10份,配制供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、10、12、18、24、48 h测定吸光度,计算总黄酮的提取量,结果总黄酮提取量的RSD为0.21%,说明供试品溶液在48 h内稳定。

2.3.5 回收率试验:精密称取卷柏乙醇提取物6份,加入阿曼托双黄酮对照品适量,制备供试品溶液,测定吸光度,计算回收率,结果平均回收率为99.90%。

2.3.6 样品测定:精密称取干燥恒重的各卷柏正交试验所得的乙醇提取物约3.00 mg,置100 mL量瓶中加95%乙醇至刻度,摇匀,在337 nm处测定其吸光度,由回归方程计算总黄酮质量分数,计算总黄酮提取量(总黄酮提取量 = 总黄酮的质量分数 × 提取物的质量)。

2.4 卷柏提取物中阿曼托双黄酮的测定

2.4.1 色谱条件:色谱柱为Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2%磷酸(40:60);体积流量:0.8 mL/min;检测波长:337 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。阿曼托双黄酮与相邻杂质峰的分离度大于2,理论塔板数按阿曼托双黄酮峰计算大于3000。

2.4.2 供试品溶液的制备:精密称取干燥恒重的乙醇提取物约3.00 mg,置100 mL量瓶中,加95%乙醇至刻度,摇匀,用0.45 μm的微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.4.3 标准曲线的绘制:精密称取干燥恒重的阿曼托双黄酮2.50 mg,置50 mL量瓶中,加95%乙醇超声溶解,定容至刻度,摇匀,用0.45 μm的微孔滤膜滤过,分别进样0、2、4、6、8、10、12 μL,测定峰面积。以峰面积对质量浓度进行线性回归,得回归方程 $Y = 2346639 X + 6411.314$ ($r = 0.9998$)。

2.4.4 精密度试验:精密吸取同一批供试品溶液10 μL,注入高效液相色谱仪,重复测定6次,记录阿曼托双黄酮峰面积,计算得其RSD值为0.92%。

2.4.5 稳定性试验:精密称取同一供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、12、24、48 h进样10 μL,记录色谱图,结果阿曼托双黄酮的峰面积无显著变化,RSD为0.35%。结果表明供试品溶液在48 h内较稳定。

2.4.6 回收率试验:精密称取卷柏乙醇提取物样品9份,每份约3.00 mg,分为3组,分别加入阿曼托双黄酮对照品0.10、0.20、0.30 mg,制备供试品溶液,进样测定,计算加样回收率,结果每组平均加样回收率分别为98.63%、99.18%、99.28%。

2.4.7 样品测定:精密称取干燥恒重各卷柏正交试验所得的乙醇提取物约15.00 mg,置50 mL量瓶中,加95%乙醇定容至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,进样10 μL,记录峰面积值,由回归方程计算阿曼托双黄酮的质量分数,计算阿曼托双黄酮的提取量(阿曼托双黄酮提取量 = 阿曼托双黄酮的质量分数 × 提取物的质量)。

2.5 正交试验及其结果:按照 $L_9(3^4)$ 正交设计安排试验,结果见表2,方差分析见表3。

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	总黄酮提取量/ mg	阿曼托双黄酮提取量/ mg
1	1	1	1	1	289. 53	160. 49
2	1	2	2	2	446. 68	246. 66
3	1	3	3	3	574. 31	245. 67
4	2	1	2	3	534. 85	223. 79
5	2	2	3	1	657. 40	286. 18
6	2	3	1	2	567. 18	240. 13
7	3	1	3	2	575. 18	245. 53
8	3	2	1	3	674. 32	216. 06
9	3	3	2	1	619. 66	254. 34
1	1	1	1	1	358. 77	184. 44
2	1	2	2	2	490. 13	276. 16
3	1	3	3	3	631. 68	258. 96
4	2	1	2	3	557. 83	246. 77
5	2	2	3	1	716. 39	280. 76
6	2	3	1	2	457. 68	190. 69
7	3	1	3	2	567. 21	212. 75
8	3	2	1	3	679. 43	231. 43
9	3	3	2	1	693. 78	260. 75
总黄酮提取量						
I	2 791. 10	2 883. 37	3 026. 91	3 835. 53		
II	3 491. 33	3 664. 35	3 842. 93	3 104. 06		
III	4 309. 58	4 044. 29	3 722. 17	3 652. 42		
R	1 518. 48	1 160. 92	816. 02	731. 47		
阿曼托双黄酮提取量						
I	1 372. 38	1 273. 77	1 423. 24	1 426. 96		
II	1 277. 63	1 737. 25	1 508. 47	1 411. 92		
III	1 620. 86	1 450. 54	1 529. 85	1 622. 68		
R	343. 23	463. 48	50. 64	210. 76		

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

	误差来源	离均差平方和	自由度	方 差	F 值	显著性
总黄酮	A	95 476. 932	2	47 738. 466	32. 145	$P < 0. 01$
	B	58 202. 596	2	29 101. 298	19. 596	$P < 0. 01$
	C	160 377. 140	2	80 188. 570	53. 996	$P < 0. 001$
	D	108 212. 593	2	54 106. 297	36. 433	$P < 0. 001$
	S_e^2	13 365. 741	9	1 485. 082		
阿曼托双黄酮	A	1 978. 200	2	989. 110	3. 580	
	B	4 128. 150	2	2 064. 070	19. 600	
	C	13 718. 280	2	6 859. 140	54. 000	$P < 0. 01$
	D	12 087. 350	2	6 043. 674	36. 430	$P < 0. 001$
	S_e^2	2 489. 780	9	276. 641		

$F_{0.05}(2,2) = 19.00$ $F_{0.01}(2,2) = 99.00$

以总黄酮提取量为考察指标,极差值显示,各因素作用主次为 A > B > C > D;方差分析结果表明:A、B、C、D 因素的影响均有显著性意义($P < 0.05$),以 A₁B₂C₂D₂ 为佳。以阿曼托双黄酮提取量为考察指标,极差值显示,各因素作用主次为 B > A > D > C;方差分析结果表明:A、B 因素的影响无显著性意义($P > 0.05$),C、D 因素的影响有显著性意义($P < 0.05$),优选的工艺条件为 A_{1~3}B_{1~3}C₂D₂ 为佳。综

合上述两项考察指标,优化水平组合应为 A₁B₂C₂D₂,即药材加 10 倍量的 95 %乙醇,回流提取 2 次,每次 2 h。

2.6 最佳提取工艺的验证试验:精密称取 6 批干燥的卷柏药材各 40 g,按最佳工艺条件平行操作,测定吸光度,分别计算总黄酮和阿曼托双黄酮的质量分数和提取量,结果见表 4。

结果表明:用最佳工艺条件提取,提取物中总黄

表4 最佳工艺的验证

Table 4 Results of optimum technology

批 次	药材中总黄酮 / %	药材中阿曼 托双黄酮/ %	提取物中总 黄酮/ %	总黄酮的提 取量/ mg	提取物中阿曼 托双黄酮/ %	阿曼托双黄酮的 提取量/ mg
20061010	4.90	1.58	24.00	843.92	11.20	298.25
20061207	5.54	1.64	23.54	800.14	12.94	335.42
20070120	4.39	1.60	21.39	791.74	10.28	291.68
20070506	6.15	1.52	25.15	921.15	13.26	343.79
20070823	4.76	1.49	21.76	709.21	8.87	286.30
20071102	5.37	1.55	22.37	832.17	9.49	288.56

酮和阿曼托双黄酮的质量分数均较高。提取物中总黄酮和阿曼托双黄酮的提取量均高于其他各正交试验值,故本最佳工艺条件合理,同时也表明此工艺具有较好的稳定性。

3 讨论

在制备样品溶液时,比较水煮、超声、回流等不同提取方法,发现回流提取方法得到的总黄酮量较高,故采用回流提取的方法对样品进行处理。

本实验采用紫外分光光度法测定总黄酮与高效液相色谱法测定指标性成分阿曼托双黄酮相结合,增加了因素选择的准确性和可靠性。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 毕跃峰,郑晓珂,冯卫生,等. 卷柏属植物化学成分与药理活性[J]. 国外医药:植物药分册,2002,17(3):97-100.
- [3] 毕跃峰,郑晓珂,冯卫生. 卷柏中化学成分的分离与结构鉴定[J]. 药学学报,2004,39(1):41-45.
- [4] 郑晓珂,毕跃峰,冯卫生,等. 卷柏中化学成分[J]. 药学学报,2004,39(4):266-268.
- [5] Millard D R. The island flap in cleft palates surgery [J]. Surg Gynaecol Obstet,1993,116.
- [6] 熊国强,雷荣昌. 析因设计在腮裂修复动物实验中的应用[J]. 中国现代医学杂志,2002,12(16):18-20.
- [7] 徐智,贾素洁,谭桂山,等. 垫状卷柏中双黄酮药理活性的研究[J]. 中国现代医学杂志,2004,14(14):88-100.

正交试验优选石杉碱甲脂质体的制备研究

张彦青^{1,2},解军波³,陈文倩^{1,2},邓晨辉^{1,2},酒向飞^{1,2},周田彦^{1,2},卢炜^{1,2,*}

(1. 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室,北京 100083; 2. 北京大学药学院药剂系,北京 100083; 3. 天津商业大学制药工程系,天津 300134)

摘要:目的 优化石杉碱甲脂质体的制备工艺和处方。方法 采用薄膜分散结合硫酸铵梯度法制备石杉碱甲脂质体,以包封率为评价指标采用正交试验优化石杉碱甲脂质体的最优处方和工艺条件。结果 石杉碱甲脂质体的最优处方工艺条件为:孵化温度为 60℃,药脂比为 1:40,孵化时间为 30 min。所得脂质体的包封率为 87.02%以上。结论 由最佳处方工艺条件制备的石杉碱甲脂质体包封率较高,包封率和体外释放稳定,重现性好。

关键词:石杉碱甲脂质体;制备;正交试验;高效液相色谱

中图分类号:R284.2;R286.06

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2009)06-0896-03

石杉碱甲是从蛇足石杉中分离得到的一种新型石松类生物碱有效单体,是我国首创的强效可逆性乙酰胆碱酯酶抑制剂,通过抑制脑内乙酰胆碱酯酶活性,提高脑内乙酰胆碱水平而发挥作用,是目前治疗老年痴呆最有效的药物之一^[1,2]。现有石杉碱甲制剂缺乏脑选择性,由于抑制外周胆碱酯酶活性导致用药者产生较大不良反应,如肌肉震颤,呼吸抑制

等。研究新型石杉碱甲制剂以提高其脑内浓度增强治疗效果并降低不良反应,对临床治疗老年痴呆将有重要意义。本实验研究制备石杉碱甲脂质体以增加石杉碱甲脑内浓度,增强治疗效果并降低外周不良反应。

1 材料和仪器

石杉碱甲(上海同田生化有限公司,质量分数为

* 收稿日期:2008-10-20

作者简介:张彦青,女,山东汶上人,讲师,北京大学药学院药剂学博士,研究方向:药物新剂型与药物动力学药效动力学研究。

Tel:13752524378 E-mail:zhyanqing@yahoo.com.cn

*通讯作者 卢炜 E-mail:luwei_pk@bjmu.edu.cn