

正交试验优选黑骨藤的超声提取工艺研究

袁德彬¹, 张宏^{1,2*}, 廖颖¹, 钟菡¹

1. 四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610101

2. 四川师范大学植物资源应用与开发研究所, 四川 成都 610101

摘要: 目的 研究黑骨藤的最佳提取工艺。方法 以杠柳苷提取率为指标, 采用正交试验优选提取工艺参数。结果 最佳工艺条件: 溶剂为 50%乙醇, 料液比 1:15, 功率 800 W, 温度 50 ℃, 提取 2 次, 每次 20 min。结论 此工艺合理可行, 适用于黑骨藤中杠柳苷的提取。

关键词: 黑骨藤; 提取工艺; 正交试验; 杠柳苷; 超声提取

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)08-1543-04

Optimization of ultrasonic extracting technology of *Periploca forrestii* by orthogonal test

YUAN De-bin¹, ZHANG Hong^{1,2}, LIAO Ying¹, ZHONG Han¹

1. College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

2. Institute of Application and Development of Plant Resources, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

Key words: *Periploca forrestii* Schlechter; extracting technology; orthogonal test; glucoperiplocymarin; ultrasonic extraction

黑骨藤 *Periploca forrestii* Schlechter 又名黑龙骨, 苗族药名为蛙莽塞(贵州黔南州)、锐松怪(贵州铜仁地区)、嘎八又赊(贵州黔东南州); 布依族药名为雅告胡(贵州罗甸县); 仡佬族药名为腰搭浪(贵州中部), 属萝藦科(Asclepiadaceae)杠柳属 *Periploca* Linn. 植物^[1]。黑骨藤全株供药用, 味苦、辛, 性凉^[2], 可舒筋活络、祛风除湿, 治风湿性关节炎、跌打损伤、胃痛、消化不良、闭经、痢疾等, 效果良好^[3]。民间广泛应用于治疗闭合性软组织损伤、风湿与类风湿等疾病^[4]。根据文献报道和本课题组前期研究发现杠柳苷具有显著的抗肿瘤和免疫增强作用^[5-9]。近年来, 很多研究者对黑骨藤的生药学、化学成分、药理作用进行深入研究^[10], 但是缺乏相应的生产工艺报道。中药提取常用方法有浸渍法、回流法、超声法^[11-12], 本实验采用超声波提取法对黑骨藤有效成分杠柳苷的提取进行研究。本课题组以降低能耗为宗旨, 提高有效成分提取率为目的, 进行了主因素分析和优化, 对黑骨藤有效成分

杠柳苷的应用有着重要的意义, 为其合理开发成中药制剂提供理论依据。

1 仪器与试剂

WK—1000A 高速中药粉碎机(山东青州市精诚机械有限公司); ESJ120—4 型万分之一天平(沈阳龙腾电子有限公司); BP211D 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司); SYR—2000 双频多用途恒温超声波提取机(北京弘祥隆生物技术股份有限公司); Dionex-Summit P680A DGP—6 双三元高效液相色谱仪(美国戴安)。

杠柳苷对照品由本实验室分离得到, 经核磁、质谱、红外、紫外鉴定为杠柳苷, 经 HPLC 检测质量分数为 99.3%。甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。黑骨藤于 2008 年采集于四川西昌, 经成都中医药大学民族药学院张艺教授鉴定为萝藦科杠柳属植物黑骨藤 *Periploca forrestii* Schlechter 干燥茎, 粉碎, 取过 24 目筛未过 50 目筛的药材粉末, 备用。

收稿日期: 2011-11-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30870257)

作者简介: 袁德彬(1987—), 男, 安徽六安人, 硕士研究生, 研究方向为植物化学及药物分析。Tel: (028)84480322 E-mail: yuandebin1987@126.com

*通讯作者 张宏 Tel: 18008021106 E-mail: zhanghong651@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2012-07-11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120711.1125.001.html>

2 方法与结果

2.1 分析方法的建立

2.1.1 色谱条件^[13] 色谱柱为 Alltech Apollo C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (27:73), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 25 ℃, 检测波长 221 nm, 进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取杠柳苷对照品 4.86 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 制得 486.0 μg/mL 对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 准确称取药材粉末 50 g, 在不同条件下提取, 抽滤, 浓缩至一定量后定容于 100 mL 量瓶中, 即得供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 精密移取杠柳苷对照品储备液 0.05、0.1、0.2、0.5、1.00、2.00 mL 置于 5 mL 量瓶中, 用色谱纯甲醇定容至刻度, 在“2.1.1”项色谱条件下分别进样 3 次, 进样量为 10 μL。以平均峰面积 (Y) 对进样质量浓度 (X) 进行回归分析, 求得回归方程为 $Y=0.1905X+0.134$, $r=0.9999$, 表明杠柳苷在 4.86~194.4 mg/L 呈良好线性关系。

2.1.5 检测限和定量限的确定 将 4.86 μg/mL 的对照品溶液分别稀释成 972.0、486.0、146.0、97.2、48.6 ng/mL 的溶液, 将上述溶液分别进样 3 次, 计算峰面积的平均值。以信噪比 (S/N) 为 3 和 10 确定最低检测限和最低定量限, 测得杠柳苷的最低检测限为 48.6 ng/mL, 定量限为 146.0 ng/mL。

2.1.6 精密度试验 分别取高、中、低 (486.0、194.4、4.86 μg/mL) 3 个质量浓度的对照品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下分别连续进样 6 次, 测定, 计算得高、中、低质量浓度杠柳苷峰面积的 RSD 分别为 0.249%、0.224%、1.991%。

2.1.7 稳定性试验 精密称取 3 个平行样, 按照“2.1.3”项制备供试品溶液, 并按照“2.1.1”项的色谱条件进行测定, 室温下放置, 在 12 h 内每 2 h 测定 1 次, 12 h 后每 4 h 测定 1 次, 记录杠柳苷峰面积, 并计算得其峰面积的 RSD 在 12 h 内小于 2%, 稳定性良好。

2.1.8 重复性试验 精密称取黑骨藤药材 6 份, 每份 1.00 g, 按照“2.1.3”项方法制备供试品溶液, 并按照“2.1.1”项色谱条件进行测定, 记录峰面积, 计算得杠柳苷质量分数的 RSD 为 2.9%。

2.1.9 加样回收率试验 精密称取杠柳苷对照品 5.1 mg 至 10 mL 量瓶中, 色谱甲醇定容。取黑骨藤约 0.5 g, 共 6 份, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 每

份精密加入杠柳苷对照品溶液 (0.51 mg/mL) 1.0 mL, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件测定, 计算测得杠柳苷平均回收率为 98.48%, RSD 为 3.39%。

2.1.10 样品测定 分别取对照品溶液和供试品溶液各 1.0 mL, 经 0.45 μm 微孔过滤器滤过, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 外标法计算, 即得样品中杠柳苷的质量分数。

2.2 单因素试验

2.2.1 提取方法的选择 准确称取药材粉末 50 g, 按料液比 1:20 加入 50%乙醇, 一组在 80 ℃下回流提取 2 h, 另一组在 50 ℃, 超声功率 600 W, 超声间隙时间 5 s/3 s 下超声提取 10 min (1 次), 每组重复 3 次。得到超声提取时杠柳苷提取率为 0.105% (RSD 为 0.4%), 回流提取时提取率则为 0.092% (RSD 为 0.3%), 超声提取杠柳苷提取率高于回流提取, 故提取方法选择超声提取法。

提取率=提取液中杠柳苷质量/黑骨藤质量

2.2.2 提取溶剂的选择 准确称取药材粉末 50 g, 在 60 ℃, 料液比 1:20, 超声功率 800 W, 超声间隙时间 5 s/3 s 下超声提取 10 min (1 次), 提取溶剂分别为 30%、50%、75%、95%乙醇, 水, 醋酸乙酯, 氯仿和甲醇。由表 1 可知, 用 50%乙醇提取杠柳苷提取率最高, 故选择 50%乙醇为提取溶剂。

表 1 提取溶剂对杠柳苷提取率的影响 ($n=3$)

Table 1 Effect of different solvents on extraction rate of glucoperiplocymarin ($n=3$)

提取溶剂	提取率 / %	提取溶剂	提取率 / %
30%乙醇	0.043±0.004	水	0.027±0.001
50%乙醇	0.063±0.007	醋酸乙酯	0.013±0.003
75%乙醇	0.050±0.002	氯仿	0.010±0.001
95%乙醇	0.034±0.004	甲醇	0.041±0.001

2.2.3 提取次数的选择 准确称取药材粉末 50 g, 在 60 ℃, 料液比 1:20, 超声功率 800 W, 超声间隙时间 5 s/3 s 下, 以 50%乙醇为提取溶剂, 超声提取 4 次, 每次 10 min。每次提取滤液分别浓缩至一定量后定容于 100 mL 量瓶中。结果见表 2, 杠柳苷第 2 次提取率明显低于第 1 次, 以后基本没有杠柳苷提出。

2.2.4 提取温度的选择 准确称取药材粉末 50 g, 分别在 40、50、60、80 ℃下以 50%乙醇为提取溶剂, 料液比 1:20, 超声功率 800 W, 超声间隙时

间 5 s / 3 s 超声提取 10 min (1 次)。结果见表 3, 杠柳苷提取率随温度变化不明显, 因考虑到温度控制, 选择易于控制的 60 ℃。

表 2 提取次数对杠柳苷提取率的影响 ($n=3$)

Table 2 Effect of extracting times on extraction rate of glucoperiplocymarin ($n=3$)

提取次数	提取率 / %	提取次数	提取率 / %
1	0.106±0.016	3	0.001±0.000
2	0.014±0.003	4	0.000±0.000

表 3 提取温度对杠柳苷提取率的影响 ($n=3$)

Table 3 Effect of extracting temperature on extraction rate of glucoperiplocymarin ($n=3$)

提取温度 / ℃	提取率 / %	提取温度 / ℃	提取率 / %
40	0.117±0.009	60	0.114±0.004
50	0.105±0.004	80	0.105±0.009

2.2.5 料液比的选择 准确称取药材粉末 50 g, 分别按料液比 1 : 10、1 : 20、1 : 30、1 : 40 加入 50% 乙醇在 60 ℃, 超声功率 800 W, 超声间隙时间 5 s / 3 s 下超声提取 10 min (1 次)。结果见表 4, 在料液比 1 : 10~1 : 20, 提取率变化较快, 当料液比超过 1 : 20 时, 杠柳苷提取率随料液比增大而增加缓慢, 为了节省溶剂及方便后续处理, 选择料液比 1 : 20。

表 4 料液比对杠柳苷提取率的影响 ($n=3$)

Table 4 Effect of solid-liquid ratio on extraction rate of glucoperiplocymarin ($n=3$)

料液比	提取率 / %	料液比	提取率 / %
1 : 10	0.076±0.018	1 : 30	0.115±0.007
1 : 20	0.108±0.011	1 : 40	0.133±0.001

2.2.6 提取时间的选择 准确称取药材粉末 50 g, 在 60 ℃, 50% 乙醇为提取溶剂, 料液比 1 : 20, 超声功率 800 W, 超声间隙时间 5 s / 3 s 下超声提取 1 次, 每次提取时间分别为 5、10、20、30 min。结果见表 5, 表明杠柳苷提取率随提取时间延长缓慢升高。

表 5 提取时间对杠柳苷提取率的影响 ($n=3$)

Table 5 Effect of t extracting time on extraction rate of glucoperiplocymarin ($n=3$)

提取时间 / min	提取率 / %	提取时间 / min	提取率 / %
5	0.031±0.050	20	0.123±0.006
10	0.125±0.007	30	0.129±0.003

2.2.7 超声功率的选择 将黑骨藤粉碎, 准确称取药材粉末 50 g, 在 60 ℃, 50% 乙醇为提取溶剂, 料液比 1 : 20, 超声间隙时间 5 s / 3 s 下超声提取 10 min (1 次)。超声功率分别为 400、600、800、1 000 W, 结果见表 6, 超声功率对杠柳苷提取率影响不大。

表 6 超声功率对杠柳苷提取率的影响 ($n=3$)

Table 6 Effect of ultrasonic power on extraction rate of glucoperiplocymarin ($n=3$)

超声功率 / W	提取率 / %	超声功率 / W	提取率 / %
400	0.139±0.013	800	0.136±0.001
600	0.135±0.002	1 000	0.128±0.002

2.3 正交试验

精密称取黑骨藤药材粉末 100 g 进行正交试验。根据单因素试验结果, 选取提取温度 (A)、提取次数 (B)、提取时间 (C)、料液比 (D) 4 个影响杠柳苷提取率的主要因素, 每个因素选取 3 个水平, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验确定最佳工艺条件。提取后, 抽滤, 浓缩至一定量后定容于 100 mL 量瓶中, 得供试品溶液, 测定各样品中杠柳苷的量, 计算其提取率。正交试验设计及结果见表 7。方差分析结果见表 8。

由直观分析可知, 各因素对杠柳苷提取率影响大小顺序依次为 $D>B=C>A$, 但各因素间无显著差异。综上确定最佳提取工艺条件为 $A_2B_2C_2D_2$, 即加 15 倍量 50% 乙醇, 提取功率 800 W, 提取温度 50 ℃, 提取 2 次, 每次 20 min。

表 7 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果

Table 7 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A / ℃	B / 次	C / min	D	提取率 / %
1	40 (1)	1 (1)	10 (1)	1 : 10 (1)	0.110
2	40 (1)	2 (2)	20 (2)	1 : 15 (2)	0.155
3	40 (1)	3 (3)	30 (3)	1 : 20 (3)	0.120
4	50 (2)	1 (1)	20 (2)	1 : 20 (3)	0.140
5	50 (2)	2 (2)	30 (3)	1 : 10 (1)	0.120
6	50 (2)	3 (3)	10 (1)	1 : 15 (2)	0.148
7	60 (3)	1 (1)	30 (3)	1 : 15 (2)	0.115
8	60 (3)	2 (2)	10 (1)	1 : 20 (3)	0.153
9	60 (3)	3 (3)	20 (2)	1 : 10 (1)	0.123
K_1	0.385	0.365	0.411	0.353	
K_2	0.408	0.428	0.418	0.418	
K_3	0.391	0.391	0.355	0.413	
R	0.023	0.063	0.063	0.065	

表8 方差分析

Table 8 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
B	6.682×10^{-5}	2	7.042	无
C	7.949×10^{-5}	2	8.377	无
D	8.722×10^{-5}	2	9.192	无
A (误差)	9.489×10^{-6}	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.0 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.0$$

2.4 工艺验证

精密称取黑骨藤粉末 100 g, 在正交试验设计所优化的最佳工艺条件下进行验证试验, 测定最佳工艺条件下的杠柳苷的量, 计算其提取率。结果 3 次杠柳苷提取率分别为 0.161%、0.155%、0.159%, 表明工艺稳定可行。

3 讨论

本实验采用超声提取法提取黑骨藤得到的杠柳苷提取率明显高于回流提取法, 此方法与文献报道基本相似^[14]。根据文献报道^[15-16], 槐花、山楂花、金银花、豆角等多种植物提取黄酮、皂苷类化合物方法中较常用的为超声波提取法和回流提取法, 其中超声波提取法具有能耗低、省时等优点, 该方法提取杠柳苷时具有快速、提取率高等优点, 为节省提取成本, 降低能耗和工业合理化生产提供了科学依据。

参考文献

- [1] 徐树芸. 贵州十种民族药的应用研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2006, 8(6): 73-78.
- [2] 张援虎, 王锋鹏. 杠柳属植物化学成分研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(2): 157-161.

- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 63 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [4] 陈庆, 靳风云, 陈华国, 等. 苗药黑骨藤有效部位的筛选研究 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2005, 14(3): 163-164.
- [5] 张静, 单保恩, 李巧敏, 等. 香加皮杠柳苷对荷瘤小鼠的免疫调节作用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(10): 887-890.
- [6] 刘士斌, 杜彦艳, 刘鑫, 等. 香加皮杠柳苷对 SW480 细胞在裸鼠体内的成瘤抑制作用及其机制研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2009, 21(5): 344-348.
- [7] 韩宇博, 赵爱国. 杠柳苷元的抗肿瘤作用研究 [J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2008, 13(1): 1-5.
- [8] 景小楠. 黑骨藤抗肿瘤活性成分的研究 [D]. 成都: 四川师范大学, 2009.
- [9] 张静, 杨光, 单保恩, 等. 杠柳苷对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1307-1311.
- [10] 陈芳, 汪毅. 苗药黑骨藤的研究及开发应用 [J]. 中国民族民间医药, 2010(1): 6-7.
- [11] 吴晓云. 正交试验法优选麻黄的提取工艺研究 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 747-750.
- [12] 郑国栋, 蒋林, 杨得坡, 等. HPLC 法同时测定不同产地广陈皮中 5 种活性黄酮成分 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 652-655.
- [13] 赵爱萍. 黑骨藤及其配伍药材的质量标准研究 [D]. 成都: 四川师范大学, 2008.
- [14] 冷薇. 超声提取技术的新探索 [J]. 中国现代实用医学杂志, 2006, 5(5): 43-45.
- [15] 朱英, 裘德胜, 陈民, 等. 金银花叶总黄酮的水提取工艺研究 [J]. 中成药, 2007, 29(1): 60-63.
- [16] 刘宁, 李健, 金龙哲. 超声波法提取豆角总皂苷的工艺研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(10): 327-329.