

正交试验优选雷公藤提取工艺

巴文强, 王利胜*, 王玳, 卢映, 吴俊洪, 黄雨威
(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 优选雷公藤的提取工艺。方法: 以雷公藤甲素和总二萜内酯提取量为指标, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验考察提取时间、乙醇用量及体积分数对雷公藤提取工艺的影响。采用 HPLC 测定雷公藤甲素含量, 流动相甲醇-水(45:55), 检测波长 218 nm; 利用 UV 测定总二萜内酯含量, 检测波长 550 nm。结果: 乙醇体积分数对雷公藤甲素提取量具有显著性影响, 其他 2 个因素则无显著性差异; 各因素对总二萜内酯提取量均无显著性影响。最佳提取工艺为加 8 倍量 95% 乙醇回流提取 3 次, 提取时间分别为 2, 1, 1 h; 雷公藤甲素、总二萜内酯提取量分别为 4.20, 86.64 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 指标成分提取效率较高。

[关键词] 雷公藤; 雷公藤甲素; 总二萜内酯; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0016-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014140016

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1143.006.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 11:43

Optimization of Extraction Process for *Tripterygium wilfordii* by Orthogonal Design

BA Wen-qiang, WANG Li-sheng*, WANG Ding, LU Ying, WU Jun-hong, HUANG Yu-wei

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of *Tripterygium wilfordii*. **Method:** Taking extracting amounts of triptolide and total diterpene lactones as indexes, orthogonal test was adopted to optimize extraction process with extracting time, ethanol concentration and consumption as factors. HPLC was adopted to determine the content of triptolide with mobile phase of methanol-water (45:55) and detection wavelength at 218 nm; UV was employed to determine the content of total diterpene lactones with detection wavelength at 550 nm. **Result:**

[收稿日期] 20131024(021)

[基金项目] 广东省教育部产学研结合项目(2012B091100486)

[第一作者] 巴文强, 硕士, 从事药物制剂新剂型与新技术研究, Tel: 13824431417, E-mail: bawenqiang2009@126.com

[通讯作者] * 王利胜, 教授, 硕士生导师, 从事药物制剂新剂型与新技术研究, Tel: 020-39358043, E-mail: wls68@126.com

[参考文献]

- [1] Lahlou J P, Lescure A M, Briat J F. Purification and characterization of ferritins from maize, pea, and soya bean seeds[J]. J Biol Chem, 1988, 263(21): 10289.
- [2] 肖克来提·木尼拉. 维药鹰嘴豆的国内外应用简介[J]. 中国民族医药杂志, 2003, 11(3): 20.
- [3] 杨建梅, 张慧, 余琛, 等. 鹰嘴豆的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(1): 89.
- [4] 杨秀丽. 红小豆铁蛋白的分离纯化、初步结构表征及

铁吸收活性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2010.

- [5] Yun S J, Yang S P, Huang L Y, et al. Isolation and characterization of a new phytoferritin from broad bean (*Vicia faba*) seed with higher stability compared to pea seed ferritin[J]. Food Res Int, 2012, 48(1): 271.
- [6] 刘文营. 鹰嘴豆铁蛋白的分离纯化表征及性质分析[D]. 石河子: 石河子大学, 2011.
- [7] 袁小红. 豌豆种子铁蛋白的纯化及其抗血清的制备[D]. 重庆: 西南农业大学, 2002.

[责任编辑 刘德文]

Ethanol concentration had significant effect on extracting amount of triptolide, but the other two factors had no significant difference; three factors all had no significant effect on the content of total diterpene lactones. Optimum extraction condition were as follows: reflux extracted thrice with 8 times the amount of 95% ethanol for 2, 1, 1 h; extracting amounts of triptolide and total diterpene lactones were 4.20, 86.64 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** This optimized process was feasible and stable with high extracting efficiency of index components.

[**Key words**] *Tripterygium wilfordii*; triptolide; total diterpene lactones; orthogonal test

雷公藤又名黄藤木、断肠草、红药等,功效祛风除湿、消肿止痛、解毒杀虫及通络止痛,具有抗炎、抗菌、免疫调节等药理作用^[1-2],被推荐为治疗类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的首选药物。其主要活性成分为二萜类和生物碱类^[3-4],此外还含有三萜类、倍半萜类及卫矛醇、卫矛碱等成分,其中某些成分既是活性成分又是毒性成分^[5-6]。目前,雷公藤的提取工艺优选多选择雷公藤甲素为指标,评价指标选择不够全面^[7-8]。本实验以雷公藤甲素和总二萜内酯含量为指标,通过正交试验考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间等因素对雷公藤提取工艺的影响,为雷公藤中有效成分的充分利用提供参考。

1 材料

AUW120型和ELB200型电子天平(日本岛津),SKM型数显恒温电热套(山东鄄城光明仪器有限公司),515型高效液相色谱仪(2487型紫外检测器,N3000型色谱工作站,美国Waters公司),UV-2450型紫外-可见分光光度计(上海卫兆电子科技有限公司)。

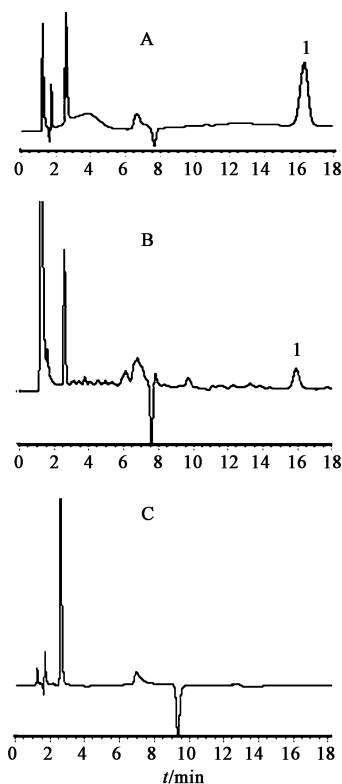
雷公藤药材购于安国市冷背药材有限公司,产地河南,经广州中医药大学中药鉴定教研室李薇教授鉴定为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f.的根;雷公藤甲素对照品(中国食品药品检定研究院,批号111567-200502),中性氧化铝(100~200目,上海五四化学试剂有限公司),3,5-二硝基苯甲酸(美国阿拉丁制造公司),甲醇为色谱纯,水为纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 雷公藤甲素的含量测定^[7]

2.1.1 色谱条件 Platisil ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(45:55),检测波长218 nm,柱温为室温,流速1.0 mL·min⁻¹,进样量20 μL 。理论塔板数以雷公藤甲素计应不低于3 000,见图1。

2.1.2 对照品贮备液的配制 精密称取干燥至恒重的雷公藤甲素对照品适量,置25 mL量瓶中,加无



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性样品;1. 雷公藤甲素

图1 雷公藤提取液 HPLC

水乙醇溶解并定容至刻度,得0.058 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 贮备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取雷公藤药材粉末(过3号筛)5 g,按一定条件进行回流提取,过滤,合并滤液,水浴挥干乙醇至1~2 mL。称取中性氧化铝8 g,湿法装柱(内径1.0 cm),样品上柱,加乙酸乙酯30 mL洗脱,洗脱液浓缩至干,残留物加适量无水乙醇溶解并转移至5 mL量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,摇匀,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取对照品贮备液0.05,0.25,0.5,0.75,1,2,4 mL,分别置于5 mL量瓶中,加无水乙醇定容至刻度,配制系列对照品溶液,按2.1.1项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 45\,186.8X - 11\,192.8$ ($r = 0.999\,9$),表明雷公藤甲素在0.58~46.40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 精密吸取 $23.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品溶液适量,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算雷公藤甲素峰面积的 RSD 1.10%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于制备后 1,2,4,6,8,12 h 按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果峰面积的 RSD 0.80%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 精密称取同一批雷公藤药材粉末 5 g,按 2.1.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算峰面积的 RSD 1.91%,表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收试验 精密称取已知含量的雷公藤药材粉末 2.5 g,共 6 份,各精密加入等量的雷公藤甲素对照品贮备液,挥干,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算平均回收率 100.52%,RSD 2.28%,表明该方法准确可靠。

2.2 总二萜内酯的含量测定^[8-9]

2.2.1 对照品贮备液的制备 精密称取雷公藤甲素对照品 0.001 23 g 至 25 mL 量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 显色剂的配制 称取 3,5-二硝基苯甲酸 2 g,加无水乙醇溶解至 100 mL,得 2% 3,5-二硝基苯甲酸溶液。称取氢氧化钾 2 g,加纯水溶解至 100 mL,得 2% 氢氧化钾溶液。临用前按体积比 1:1 混合。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取 2.1.3 项下供试品溶液 1 mL,置于 5 mL 量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取雷公藤甲素对照品贮备液 0.05,0.25,0.5,0.75,1,2,4 mL,分别置于 5 mL 量瓶中,加无水乙醇定容至刻度,配制一系列对照品溶液。精密吸取对照品溶液 2 mL 至 10 mL 试管中,置于冰水浴中,精密加入 2% 3,5-二硝基苯甲酸溶液和 2% 氢氧化钾溶液各 2 mL,摇匀,冰水浴中放置 10 min,取出,用自来水冲洗管壁 2 min 至室温,摇匀,于 550 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 0.012 2C + 0.000 2 (r = 0.999 9)$,表明雷公藤总二萜内酯(以雷公藤甲素计)在 $0.49 \sim 39.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取 $19.68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 雷公藤甲素对照品溶液 2 mL,按 2.2.4 项下方法进行显色,于 550 nm 处连续测定 6 次,计算 A 的 RSD 0.20%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 2 mL,制备后 1 h 内每隔 5 min 按 2.2.4 项下方法进行显色,于 550 nm 处测定 A,结果 RSD 2.48% ($n = 5$),表明供试品溶液在 20 min 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取 2.1.7 项下 6 份供试品溶液,按 2.2.3 项下制备样品溶液,按 2.2.4 项下方法显色,于 550 nm 处测定 A,计算 RSD 1.82%,表明该方法重复性较好。

2.2.8 加样回收试验 精密称取已知含量的雷公藤药材粉末 2.5 g,共 6 份,各加入等量的雷公藤甲素对照品贮备液,挥干,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.4 项下方法显色,于 550 nm 处测定 A,计算平均加样回收率 93.28%,RSD 1.72%。

2.3 提取工艺优选 在预试验基础上,确定提取数为 3 次,选择乙醇用量、乙醇体积分数、提取时间为考察因素,每个因素选择 3 个水平,以雷公藤甲素和总二萜内酯提取量为评价指标,精密称取雷公藤药材粉末(过 3 号筛)5 g,共 9 份,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 雷公藤提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇用量 /倍	B 乙醇体积分数 /%	C 提取时间 /h	D (空白)
1	8	75	4,3,3	1
2	14	85	3,2,2	2
3	20	95	2,1,1	3

由直观分析可知,各因素对雷公藤甲素提取量的影响顺序为 $B > A > C$;方差分析表明 B 因素的影响具有显著性意义,因素 A,C 则无显著性影响。各因素对总二萜内酯提取量的影响顺序为 $A > B > C$;方差分析表明 A,B,C 因素的影响均无显著性意义 ($P < 0.05$)。综合考虑,确定最佳提取工艺 $A_1 B_3 C_3$,即加 8 倍量 95% 乙醇提取 3 次,提取时间分别为 2,1,1 h。精密称取雷公藤药材粉末(过 3 号筛)5 g,共 3 份,按优选的提取工艺进行 3 次验证试验,计算提取量,结果雷公藤甲素分别为 $4.17, 4.24, 4.20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,总二萜内酯分别为 $86.99, 84.96, 87.97 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,表明该提取工艺稳定可行。

3 讨论

预试验考察了提取方法和提取溶剂,结果显示回流法优于超声法,选择乙醇作为提取溶剂时,有效成分提取量高于甲醇和乙酸乙酯,故本文选择乙醇

表2 雷公藤提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	雷公藤甲素/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	总二萜内酯/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	2.58	46.40
2	1	2	2	2	2.73	47.21
3	1	3	3	3	3.67	53.61
4	2	1	2	3	3.04	52.68
5	2	2	3	1	2.83	51.25
6	2	3	1	2	3.89	76.66
7	3	1	3	2	3.92	77.42
8	3	2	1	3	2.94	51.65
9	3	3	2	1	4.78	89.72
雷公藤甲素	K_1	2.993	3.180	3.137	3.397	
	K_2	3.253	2.833	3.517	3.513	
	K_3	3.880	4.113	3.473	3.217	
	R	0.887	1.280	0.380	0.296	
总二萜内酯	K_1	49.072	58.833	58.237	62.457	
	K_2	60.197	50.037	63.203	67.097	
	K_3	72.930	73.330	60.760	52.647	
	R	23.857	23.293	4.966	14.450	

表3 雷公藤提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P	
雷公藤甲素	A	1.246	2	9.299	>0.05
	B	2.630	2	19.627	<0.05
	C	0.260	2	1.940	>0.05
	D(误差)	0.134	2	1.000	
总二萜内酯	A	867.140	2	2.618	>0.05
	B	743.591	2	2.542	>0.05
	C	36.015	2	0.113	>0.05
	D(误差)	352.315	2	1.000	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

为提取溶剂。雷公藤甲素为雷公藤中活性最高的环氧二萜内酯化合物^[10],故选择其作为评价指标;雷公藤中生物碱类、二萜类、三萜类及苷类成分均具有一定毒性,其中二萜类成分毒性最大^[5],故控制二萜类成分含量可适当减轻提取液毒性。正交试验选择雷公藤甲素和总二萜内酯提取量作为评价指标,结果优选的提取工艺组合一致,可能是因为雷公藤甲素属于总二萜内酯类成分。

[参考文献]

[1] 马伟光,张滔,张超,等.有毒药物雷公藤的研究及展望[J].中华中医药杂志,2006,21(2):117.

[2] 饶毅,魏惠珍,陈银芳,等.中药配伍应用于雷公藤减毒增效的研究进展[J].中国中药杂志,2008,33(14):1658.

[3] 徐央丽.雷公藤的研究进展[J].现代中西医结合杂志,2008,17(12):1941.

[4] 杨芳.雷公藤的研究进展[J].第一军医大学分校学报,2003,26(2):159.

[5] 薛璟,贾晓斌,谭晓斌,等.雷公藤化学成分及其毒性研究进展[J].中华中医药杂志,2010,25(5):726.

[6] 刘为萍,刘素香,唐慧珠,等.雷公藤研究新进展[J].中草药,2010,41(7):1215.

[7] 郑达敏,吕耿彬,王利胜.雷公藤甲素微透析体外回收率的研究[J].中国医药导报,2013,10(13):17.

[8] 庄莹,宋敏,杭太俊,等.雷公藤片剂中雷公藤总内酯及雷公藤甲素的测定[J].药物分析杂志,2008,28(1):259.

[9] 张一萍,喻丽元.雷公藤提取物中的内酯类成分分析[J].中国现代药物应用,2007,1(8):6.

[10] 刘明星,董静,杨亚江,等.雷公藤甲素的研究进展[J].中国中药杂志,2005,30(3):170.

[责任编辑 刘德文]