

贞栝颗粒中女贞子提取效率的影响因素考察及醇提工艺优选

王莹^{1,2}, 曹伟^{1,2}, 贺俊杰², 陈彦^{1,2*}, 朱方石²

(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏省中医药研究院中药新型给药系统重点实验室, 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 南京 210028)

[摘要] **目的:** 优选贞栝颗粒中女贞子和白花蛇舌草的乙醇提取工艺。**方法:** 采用 HPLC 测定特女贞苷、齐墩果酸和熊果酸含量。通过单因素试验考察影响特女贞苷转移率的因素, 以特女贞苷和总三萜酸含量为评价指标, 采用正交试验考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取次数及提取时间对贞栝颗粒醇提工艺的影响。**结果:** 最佳提取工艺为女贞子粗粉碎后与白花蛇舌草合并, 分别加 9, 7 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 1.5 h; 特女贞苷、总三萜酸提取量分别为 19.083, 7.163 mg·g⁻¹。**结论:** 优选的提取工艺合理、稳定可行, 为贞栝颗粒工业化生产提供参考。

[关键词] 贞栝颗粒; 女贞子; 特女贞苷; 齐墩果酸; 熊果酸; 正交试验; 醇提工艺

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0032-04

[doi] 10.11653/syjf2013240032

Investigation of Factors Influencing on Extraction Efficiency of Active Constituents in Ligustri Lucidi Fructus and Optimization of Ethanol Extraction Process of Zhenzhi Granules

WANG Ying^{1,2}, CAO Wei^{1,2}, HE Jun-jie², CHEN Yan^{1,2*}, ZHU Fang-shi²

(1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Key Laboratory of Novel Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ethanol extraction technology of Ligustri Lucidi Fructus and Herba Hedyotis from Zhenzhi granules. **Method:** Contents of oleanolic acid, ursolic acid and specnuezhenide were determined by HPLC. Factors influencing transfer rate of specnuezhenide were investigated by single factor tests, with contents of specnuezhenide and total triterpenoid acids as indexes, orthogonal test was adopted to optimize ethanol extraction technology of Zhenzhi granules by taking the amount and concentration of ethanol, extraction time and times as factors. **Result:** Optimum extraction process was as following: coarse crushed Ligustri Lucidi Fructus and mixed with Herba Hedyotis, extracting twice with 70% ethanol (9 folds for the first time, 7 folds for the second time) for 1.5 h each time; Extraction amount of specnuezhenide and total triterpenoid acids were 19.083 and 7.163 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** This optimized extraction process was reasonable, stable and feasible, which could provide scientific basis for industrial production of Zhenzhi granules.

[Key words] Zhenzhi granules; Ligustri Lucidi Fructus; specnuezhenide; oleanolic acid; ursolic acid; orthogonal design; alcohol extraction process

[收稿日期] 20130703(007)

[基金项目] 江苏省省名医处方研究开发与评价业务建设项目(BM200903);江苏省中医药领军人才项目(LJ200913)

[第一作者] 王莹,在读硕士,从事药剂学研究,Tel:18013966856,E-mail:wangying9021@163.com

[通讯作者] *陈彦,研究员,硕士生导师,从事中药复方与新制剂研究,Tel:025-85608672,E-mail:y.chen202@hotmail.com

贞梔颗粒是由女贞子、白花蛇舌草、焦梔子、柴胡等多味中药组成的复方制剂,具有清热解毒、疏肝健脾之功效,临床用于治疗慢性乙型肝炎。方中女贞子为君药,白花蛇舌草为臣药,裂环烯醚萜类成分如特女贞苷是女贞子特有的有效成分^[1-3],三萜类成分如齐墩果酸和熊果酸是女贞子与白花蛇舌草共有的有效成分。研究表明,特女贞苷、齐墩果酸和熊果酸均具有保肝护肝、抗菌消炎、抗肿瘤及免疫调节的作用^[4-7]。由于齐墩果酸和熊果酸脂溶性极强,难溶于水,而特女贞苷既可溶于水也可溶于乙醇,故本实验将女贞子与白花蛇舌草合并醇提。女贞子果实质地坚硬,有效成分不易溶出,以特女贞苷为指标成分,通过单因素试验考察粉碎对女贞子有效成分提取效率的影响;以特女贞苷、总三萜含量为指标,通过正交试验优选醇提工艺条件,为贞梔颗粒的新药研发提供参考。

1 材料

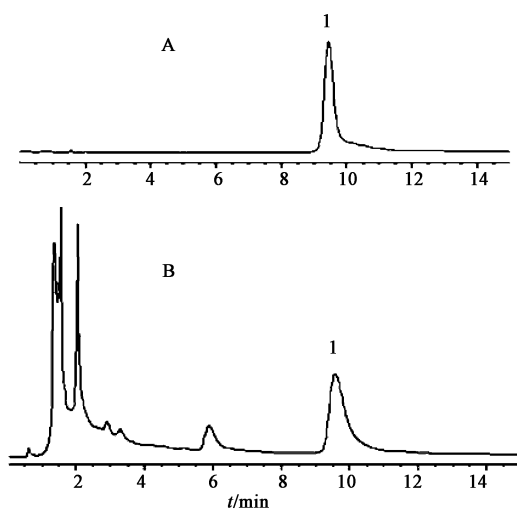
1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),FA2104 型电子分析天平(上海良平仪器仪表有限公司),DHG-9143BS-111 型电热恒温鼓风干燥箱(上海新苗医疗器械制造有限公司),DJ-04B 型万能粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司),AL204 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。女贞子等药材(均购于安徽省亳州市万珍中药饮片厂,经江苏省中医药研究院钱士辉研究员鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下要求),特女贞苷、齐墩果酸、熊果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111926-201102,110709-200505,110742-200518),甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 特女贞苷的含量测定

2.1.1 色谱条件^[7] ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相甲醇-水(40:60),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 224 nm,柱温 30 ℃,见图 1。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密称取特女贞苷对照品适量,加甲醇配成质量浓度分别为 12.6,25.3,50.5,101.0,202.0,404.0 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液各 10 μL,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,得回归方程 $Y = 11.09X + 67.57$ ($r = 0.9999$),表明特女贞苷在 12.6~404.0 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好线性关系。

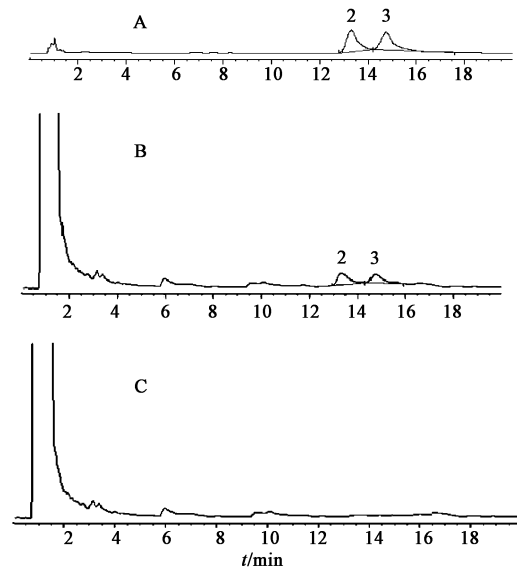


A. 对照品;B. 供试品;1. 特女贞苷

图 1 贞梔颗粒中特女贞苷 HPLC

2.2 齐墩果酸、熊果酸的含量测定

2.2.1 色谱条件^[8] ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相乙腈-pH 7.6 磷酸盐缓冲液(48:52),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm,柱温 30 ℃,见图 2。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性样品;

2. 齐墩果酸;3. 熊果酸

图 2 贞梔颗粒醇提液 HPLC

2.2.2 对照品贮备液的制备 分别精密称取齐墩果酸、熊果酸对照品 2.02,2.18 mg,分别加甲醇溶解并定容于 5 mL 量瓶中,即得。

2.2.3 标准曲线的绘制 分别吸取齐墩果酸、熊果酸对照品贮备液各 0.5 mL,混合,加甲醇稀释,制备系列混合对照品溶液。精密吸取上述混合对照品溶液各 10 μL,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以对照品

质量浓度为横坐标,峰面积积分为纵坐标,得齐墩果酸、熊果酸回归方程分别为 $Y = 4.958X + 9.334$ ($r = 0.9999$), $Y = 4.625X + 47.61$ ($r = 0.9999$),线性范围分别为 $13.0 \sim 202.0$, $14.0 \sim 218.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 女贞子提取效率的影响因素考察

2.3.1 女贞子果肉与果核中特女贞苷含量比较

预试验发现女贞子水提或醇提时,特女贞苷转移率均较低,推测可能是女贞子果肉和果核中特女贞苷含量差别较大引起的。分别称取女贞子的果肉和果核粉末(过三号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇 50 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液^[9],试验平行 3 份,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果果肉中特女贞苷提取量分别为 0.626, 0.598, 0.610 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,果核中提取量则分别为 64.466, 63.290, 64.301 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。表明果核中特女贞苷含量较果肉中含量约高 100 倍,故后续试验考虑将女贞子粗粉碎后与白花蛇舌草合并提取,使女贞子果核中特女贞苷能溶出充分。

2.3.2 粉碎

称取适量女贞子,经粉碎机粗粉碎(过 10 目筛)。分别称取粗粉碎与未粉碎的女贞子 24 g ($n = 3$),白花蛇舌草 60 g ($n = 6$),分别用 9 倍量体积分数为 70%, 80%, 90% 的乙醇溶液提取 3 次,每次 1.5 h,滤过,取续滤液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,考察特女贞苷的溶出量与转移率,结果见表 1,表明女贞子粗粉碎后醇提时,特女贞苷转移率明显提高,即女贞子粗粉碎后再与白花蛇舌草合并醇提。

2.4 正交试验优选^[10]

在预试验基础上,选取乙醇体积分数及用量、提取时间和回流次数为考察因素,以特女贞苷、总三萜酸(齐墩果酸和熊果酸总量)含量为考察指标,按处方比例称取女贞子、白花蛇舌草药材各 9 份,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表 2,由于第 1 次回流时药材为干品,会吸

收约 2 倍量溶剂,故所有试验第 1 次加溶剂量均在表 2 中数据基础上增加 2 倍。试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4,5。

表 1 女贞子粗粉碎与未粉碎对贞栎颗粒醇提工艺的影响

方法	乙醇体积分数/%	提取数/次	特女贞苷提取量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	特女贞苷转移率/%
未粉碎	70	1	2.11	55.01
		2	4.85	
		3	4.62	
	80	1	1.28	39.74
		2	3.46	
		3	3.62	
	90	1	0.81	10.95
		2	0.61	
		3	0.88	
粗粉碎	70	1	15.58	93.97
		2	3.56	
		3	0.64	
	80	1	14.30	88.14
		2	3.75	
		3	0.50	
	90	1	9.94	81.14
		2	4.49	
		3	2.65	

注:女贞子药材中特女贞苷含量 $21.05 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 2 贞栎颗粒中女贞子、白花蛇舌草醇提工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 加醇量/倍	C 提取时间/h	D 提取数/次
1	70	7	1.0	1
2	80	9	1.5	2
3	90	11	2.0	3

表 3 贞栎颗粒中女贞子、白花蛇舌草醇提工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	特女贞苷/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	总三萜酸/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	14.796	2.775
2	1	2	2	2	18.148	7.077
3	1	3	3	3	19.164	4.718
4	2	1	2	3	17.331	4.421
5	2	2	3	1	17.384	4.490
6	2	3	1	2	16.524	4.953
7	3	1	3	2	14.434	4.286
8	3	2	1	3	14.388	4.518
9	3	3	2	1	12.422	4.152

续表 3

指标	项目	A	B	C	D
特女贞苷/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	K_1	52.107	46.560	45.708	44.601
	K_2	51.240	49.920	47.901	49.107
	K_3	41.244	48.111	50.982	50.883
	R	10.863	3.360	5.274	6.282
总三萜酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	K_1	14.571	11.481	12.246	11.418
	K_2	13.863	16.086	15.651	16.317
	K_3	12.957	13.824	13.494	13.656
	R	1.614	4.605	3.405	4.899

注:总三萜酸提取量以女贞子和白花蛇舌草总质量计算。

表 4 特女贞苷含量方差分析

方差来源	SS	F	P
A	24.298	12.897	>0.05
B(误差)	1.884	1.000	
C	4.680	2.484	>0.05
D	6.988	3.709	>0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ (表 5 同)。

表 5 总三萜酸含量方差分析

方差来源	SS	F	P
A(误差)	0.436	1.000	
B	3.532	8.101	>0.05
C	1.977	4.534	>0.05
D	4.010	9.197	>0.05

由直观分析可知,各因素对特女贞苷提取量的影响顺序为 $A > D > C > B$;影响总三萜酸提取量的顺序为 $D > B > C > A$ 。方差分析表明各因素对特女贞苷和总三萜酸的含量均无显著性影响,综合考虑,确定女贞子、白花蛇舌草的最佳醇提工艺组合为 $A_1B_1C_2D_2$,即分别加 9,7 倍量 70% 乙醇提取 2 次,每次 1.5 h。

2.5 验证试验 称取 10 倍处方量药材,按优选的醇提工艺进行 3 次验证试验,结果特女贞苷、总三萜酸提取量分别为 19.083,7.163 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,表明优选的提取工艺稳定可行。

3 讨论

女贞子和白花蛇舌草均含有有效成分齐墩果酸和熊果酸,二者难溶于水但可溶于乙醇,女贞子中其他有效成分(如特女贞苷等成分)既可溶于水亦可溶于乙醇,故选用一定体积分数乙醇溶液提取女贞子和白花蛇舌草,以最大限度地保留有效成分,保证

贞梔颗粒的临床疗效。

试验发现为了使女贞子中有效成分完全溶出,宜将女贞子粗粉碎后过 10 目筛进行提取,显示有效成分特女贞苷的转移率约提高了 71%,且总三萜酸转移率也明显提高,但最佳粉碎粒度还需进一步考察。

[参考文献]

- [1] 冯志毅,冯静,崔瑛.女贞子的化学成分研究[J].中国药学杂志,2011,46(4):259.
- [2] 程敏,胡正海.女贞子的生物学和化学成分研究进展[J].中草药,2010,7(41):1219.
- [3] 金芝贵,金剑,肖忠革,等.女贞子的药理作用及其临床应用进展[J].药学服务与研究,2011,11(3):189.
- [4] 黄建荣,刘咏海,喻志标,等.白花蛇舌草化学成分和药理活性研究进展[J].中成药,2005,27(11):1329.
- [5] 田丽婷,马龙,堵年生.齐墩果酸的药理作用研究概况[J].中国中药杂志,2002,27(12):884.
- [6] 张贵平,黎银燕,吕嘉春,等.熊果酸对乳腺癌细胞 caspase-3 和 PARP 表达的影响[J].中国中药杂志,2006,31(2):141.
- [7] 张学兰,侯杰,李慧芬,等.炮制对女贞子中特女贞苷含量的影响[J].中药材,2009,32(4):498.
- [8] 段雪云,许腊英,毛维伦,等.HPLC 测定乌梅饮片中熊果酸和齐墩果酸的含量[J].中成药,2006,28(7):982.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:43.
- [10] 郭宇洁,任焯,葛争艳,等.正交试验法比较女贞子中齐墩果酸与特女贞苷的乙醇提取工艺[J].中成药,2013,35(2):277.

[责任编辑 仝燕]