

· 工艺与制剂 ·

荆三棱中有效成分的提取工艺优选

雷玲玲, 梁侨丽*, 邹娜姝, 李军, 崔晓东
(南京中医药大学药学院, 南京 210046)

[摘要] 目的: 优选荆三棱中三棱内酯 B 和三棱双苯内酯的提取工艺。方法: 采用 HPLC 测定三棱内酯 B 和三棱双苯内酯含量, 色谱条件为汉邦色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-1% 冰醋酸(65:35), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 385 nm, 进样量 10 μL。以三棱内酯 B 和三棱双苯内酯提取量为指标, 通过正交试验考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间及提取次数对提取工艺的影响。结果: 各因素对三棱内酯 B 提取量的影响顺序依次为提取次数 > 乙醇体积分数 > 乙醇用量 > 提取时间, 各因素对三棱双苯内酯提取量的影响大小依次为乙醇体积分数 > 提取次数 > 提取时间 > 乙醇用量。优选的提取工艺为加 10 倍量 70% 乙醇水浴加热 2 次, 每次 1.5 h, 三棱内酯 B、三棱双苯内酯平均提取量分别为 13.95, 5.95 μg·g⁻¹。结论: 优选的工艺稳定可行, 提取效率高; 建立的 HPLC 测定方法灵敏、准确、重复性好。

[关键词] 荆三棱; 提取工艺; 三棱内酯 B; 三棱双苯内酯; 含量测定; 方差分析

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0001-03

[doi] 10.11653/syjf2013200001

Optimization of Extraction Technology of Active Components from *Scirpus yagara*

LEI Ling-ling, LIANG Qiao-li*, ZOU Nuo-shu, LI Jun, CUI Xiao-dong
(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extracting technology of sparsolonin B and sanleng diphenyllactone from *Scirpus yagara*. **Method:** Contents of sparsolonin B and sanleng diphenyllactone were determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: Hanbang column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of methanol-1% acetic acid (65:35), flow rate 1.0 mL·min⁻¹, column temperature 30 °C, detection wavelength 385 nm, injection volume 10 μL. With extracting amounts of sparsolonin B and sanleng diphenyllactone as indexes, orthogonal test was adopted to investigate effects of the concentration and dosage of ethanol, extraction time, extraction times on technology. **Result:** Order of effects of each factors on yield of sparsolonin B was extraction times > ethanol concentration > ethanol consumption > extraction time, but effects of each factor on yield of sanleng diphenyllactone was in order of ethanol concentration > extraction times > extraction time > ethanol consumption. Optimum extraction technology was as following: reflux extracted 2 times with 10 times the amount of 70% ethanol, 1.5 h per time; Average extracting amounts of sparsolonin B and sanleng diphenyllactone were 13.95, 5.95 μg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** Optimized extraction technology was stable and feasible with high extraction efficiency; This established determination method was sensitive, accurate and reproducible.

[Key words] *Scirpus yagara*; extraction technology; sparsolonin B; sanleng diphenyllactone; content determination; analysis of variance

[收稿日期] 20130321(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173515); 江苏高校优势学科建设工程项目; 南京中医药大学中药学一级学科开放课题(2011ZYX1-003)

[第一作者] 雷玲玲, 在读硕士, 从事中药化学研究, Tel:15895897365, E-mail:leixling_1988@163.com

[通讯作者] * 梁侨丽, 副教授, 从事中药化学研究, Tel:025-85811512, E-mail:liangqiaoli2008@163.com

荆三棱味苦、性平,具有破血行气、消积止痛的功效,用于治疗癥瘕痞块、瘀血经闭、食积胀满^[1-2],主要成分为黄酮类、三萜类和芪类等^[2-4]。前期试验已从荆三棱中分离出了三棱双苯内酯和三棱内酯 B,其中三棱双苯内酯为首次从蓼草属植物中分离到^[5],三棱内酯 B 为新化合物^[6],均属天然异香豆素类成分。研究发现三棱内酯 B 具有良好的抗炎活性,是一个选择性的 Toll 样受体(TLR)2 和 4 的拮抗剂^[6],能显著下调由 LPS (TLR4 配体)、Pam3CSK4 (TLR1/2 配体)和 FSL-1 (TLR2/6 配体)刺激的巨噬细胞炎性因子的 mRNA 表达,但对 Poly (I:C) (TLR3 配体)和 ODN1668 (TLR9 配体)刺激无影响;同时能明显降低 LPS, Pam3CSK4, FSL-1 诱导的巨噬细胞 Erk1/2, p38a, JNK, Ikb α 信号蛋白的磷酸化水平;能阻断 MyD88 与 TLR2, TLR4 的结合,但不影响 MyD88 与 TLR9 的结合,其炎性信号传递是通过 MyD88 依赖途径^[7]。目前,荆三棱中有效成分的提取方法研究较少,本实验采用正交设计优选荆三棱中三棱内酯 B 和三棱双苯内酯的提取工艺,利用 HPLC 同时测定 2 种有效成分的含量,为荆三棱资源的充分利用提供理论依据。

1 材料

515 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), AG285 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司), H-HS 型电热恒温水浴锅(巩义市英裕予华仪器厂)。三棱内酯 B、三棱双苯内酯对照品(自制,经 HPLC 测定纯度均 >98%), 甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。荆三棱于 2010 年 11 月采自江苏兴化,经南京中医药大学吴启南教授鉴定为莎草科植物荆三棱 *Scirpus yagara* Ohwi-S. *fluviatilis* (Torr.) A. Gray var. *yagara* (Ohwi) T. Koyama. 的块茎。

2 方法与结果

2.1 提取工艺设计 在预试验基础上,选取乙醇体积分数、提取时间、乙醇用量、提取次数为考察因素,称取药材粉末(过 5 号筛)10 g,共 9 份,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验,加乙醇水浴回流提取,过滤,合并滤液,减压回收溶剂至干,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,以三棱内酯 B 和三棱双苯内酯含量为考察指标,因素水平见表 1。

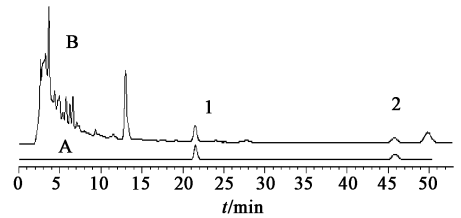
2.2 有效成分的含量测定

2.2.1 色谱条件 汉邦色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相甲醇-1% 冰醋酸(65:35), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 385 nm, 进样

表 1 荆三棱中三棱内酯 B 和三棱双苯内酯
提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 提取时间/h	C 乙醇用量/倍	D 提取次数/次
1	70	1.5	8	1
2	80	2.0	10	2
3	90	2.5	12	3

量 10 μ L, 见图 1。



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 三棱内酯 B; 2. 三棱双苯内酯

图 1 荆三棱 HPLC

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取一定量三棱内酯 B 和三棱双苯内酯对照品, 置 10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇定容, 得质量浓度依次为 49.0, 51.0 mg·L⁻¹ 的混合对照品储备液。

2.2.3 线性关系考察 精密量取混合对照品储备液 5.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 依次稀释, 得 5 个不同质量浓度的混合对照品溶液, 进样, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y_{\text{三棱内酯 B}} = 17\ 888X + 2\ 643.3 (r = 1.000\ 0)$, $Y_{\text{三棱双苯内酯}} = 22\ 293X - 1\ 708.6 (r = 0.999\ 8)$, 线性范围分别为 3.1 ~ 49.0, 3.2 ~ 50.0 mg·L⁻¹。

2.2.4 精密度试验 取混合对照品溶液适量, 连续进样 5 次, 结果峰面积的 RSD 0.22%, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 取正交试验 2 号样品溶液 6 份, 按 2.2.1 项下方法测定, 测得峰面积的 RSD 1.46%, 表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取正交试验 2 号样品溶液, 每隔 40 min 按 2.2.1 项下方法进样 1 次, 共 6 次, 结果峰面积的 RSD 1.52%, 供试品溶液在 4 h 内稳定。

2.2.7 加样回收率试验 精密量取已知含量的正交试验 2 号样品溶液 6 份, 分别精密加入三棱内酯 B 对照品溶液(50.0 mg·L⁻¹)0.30 mL 和三棱双苯内酯对照品溶液(50.0 mg·L⁻¹)0.16 mL, 制备供试品溶液, 测定峰面积, 结果平均加样回收率分别为 112.83%, 99.91%, RSD 分别为 0.83%, 0.25%。

2.3 正交试验分析 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3, 4。

表2 荆三棱中三棱内酯B和三棱双苯内酯提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	三棱内酯B	三棱双苯
					提取量 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	内酯提取量 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	1.12	6.06
2	1	2	2	2	15.27	7.89
3	1	3	3	3	12.07	4.36
4	2	1	2	3	13.12	5.23
5	2	2	3	1	9.37	3.94
6	2	3	1	2	15.24	5.06
7	3	1	3	2	11.85	4.12
8	3	2	1	3	8.01	2.51
9	3	3	2	1	5.45	1.62
三棱内酯B	K_1	28.46	26.09	24.37	15.94	
	K_2	37.73	32.65	33.84	42.09	
	K_3	25.31	32.76	33.29	33.20	
	R	12.42	6.67	9.47	25.85	
三棱双苯内酯	K_1	18.31	15.41	13.63	11.62	
	K_2	14.23	14.34	14.74	17.07	
	K_3	8.25	11.04	12.42	12.10	
	R	10.06	4.37	2.32	5.45	

表3 三棱内酯B方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	27.790	2	13.895	2.857	>0.05
B(误差)	9.726	2	4.863	1.000	
C	18.839	2	9.419	1.937	>0.05
D	112.381	2	56.190	11.555	<0.01

注: $F_{0.01}(2,2)=9.00$ 。

表4 三棱双苯内酯方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	17.068	2	8.534	38.013	<0.05
B	3.459	2	1.730	3.852	>0.05
C(误差)	0.898	2	0.449	1.000	
D	6.07	2	3.035	6.759	>0.05

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$ 。

由直观分析可知,各因素对三棱内酯B提取量的影响顺序依次为提取次数>乙醇体积分数>乙醇用量>提取时间,以极值最小的B因素为误差项进行方差分析,表明D因素具有极显著影响,因素A,C则无显著影响,优化的提取工艺为 $A_2B_3C_2D_2$;各因素对三棱双苯内酯提取量的影响大小依次为乙醇

体积分数>提取次数>提取时间>乙醇用量,以极值最小的C因素为误差项进行方差分析,表明A因素具有显著影响,因素B,D则无显著影响,优化的提取工艺为 $A_1B_1C_2D_2$;综合生产成本和化合物性质考虑,确定提取工艺为加10倍量70%乙醇加热提取2次,每次1.5h。

2.4 验证试验 精密称取荆三棱药材粉末100g,共3份,按优化的工艺条件进行提取,进行3次验证试验,结果三棱内酯B提取量分别为13.85,14.07,13.94 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,三棱双苯内酯提取量分别为5.78,5.95,6.12 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,表明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

荆三棱临床多用于慢性炎症疾病^[8],三棱内酯B和三棱双苯内酯为荆三棱的抗炎有效成分,这2种成分均为异香豆素类成分,易溶于乙酸乙酯、乙醇等有机溶剂。香豆素类成分多选用醇提法从植物中提取,但考虑到内酯环结构长时间受热可能会被破坏,结合二者理化性质,最终选取乙醇用量、乙醇体积分数、提取时间和提取次数为考察因素。

[参考文献]

- [1] 李晓辰. 三棱的本草考证[J]. 浙江中西医结合杂志, 2009,19(7):437.
- [2] 张铁军,王丽莉. 荆三棱化学成分研究(I)[J]. 现代药物与临床,2009,24(1):36.
- [3] Powell R G, Bajaj R, McLaughlin J L. Bioactive stilbenes of *Scirpus maritimus*[J]. J Nat Prod,1987,50(2):293.
- [4] Nakajima K, Taguchi H, Endo T, et al. The constituents of *Scirpus fluvialis* (Torr.) A. Gray. I: The structures of two new hydroxystilbene dimers, scirpusin A and B [J]. Chem Pharm Bull,1978,26(10):3050.
- [5] KANG K, SHI Y H, ZHANG P F, et al. Chemical study on *Scirpus yagara* [J]. Nat Prod Res Dev, 2008, 20(4):639.
- [6] 崔晓东,梁侨丽,孔丽娟,等. 荆三棱块茎的化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2012,47(24):1987.
- [7] LIANG Q L, WU Q N, JIANG J H, et al. Characterization of sparsolonin B, a Chinese herb-derived compound, as a selective toll-like receptor antagonist with potent anti-inflammatory properties [J]. J Biol Chem, 2011, 286(30):26470.
- [8] 邱才炜,徐晓玉,祝慧凤. 三棱丸抗炎镇痛作用研究[J]. 中药药理与临床,2008,24(5):7.

[责任编辑 全燕]