

## 正交试验优选山豆根有效部位的提取工艺

孟美, 王化宇, 任钰, 张炜煜\*

(长春中医药大学, 长春 130117)

**[摘要]** 目的: 优选山豆根有效部位的提取工艺。方法: 采用  $L_9(3^4)$  正交试验法, 以总生物碱含量为指标, 选取乙醇体积分数、加醇量、提取时间及提取次数为考察因素, 优选山豆根中总生物碱的提取工艺; 以总多糖含量为指标, 选取加水倍量、提取时间及提取次数为考察因素, 优选山豆根中总多糖的提取工艺。结果: 总生物碱最佳提取工艺为加 6 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 1 h; 总多糖最佳提取工艺为加 6 倍量水提取 3 次, 每次 1 h。结论: 优选的提取工艺操作简单、稳定可行, 适合于产业化生产, 具有良好的应用前景。

**[关键词]** 山豆根; 总生物碱; 总多糖; 提取工艺; 正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0046-04

## Optimization of Extraction Technology for Effective Parts from *Sophora tonkinensis* by Orthogonal Test

MENG Mei, WANG Hua-yu, REN Yu, ZHANG Wei-yu\*

(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of effective parts from *Sophora tonkinensis*. **Method:** Taking the content of total alkaloids as index, with extraction time, extraction times, ethanol concentration and amount as factors, extraction technology of total alkaloids from *S. tonkinensis* was optimized by  $L_9(3^4)$  orthogonal test; With the content of total polysaccharides as index, taking the amount of water, extraction time and times as factors, extraction technology of total polysaccharides was optimized by orthogonal test. **Result:** Optimal extraction technology of total alkaloids was as following: extracted 2 times with 6 times the amount of 70% ethanol, 1 h per time; Optimum extraction technology of total polysaccharides was as following: extracted 3 times with 6 times the amount of water, 1.0 h each time. **Conclusion:** This optimized extraction technology was stable and feasible, it was suitable for industrial production with a good prospect.

**[Key words]** *Sophora tonkinensis*; total alkaloids; total polysaccharides; extraction technology; orthogonal test

复方灵丹胶囊为吉林大学第一临床医院的院内制剂, 具有保肝、抗纤维化、防止肝硬化等作用, 用于治疗正虚血瘀兼湿热证所致的病毒性肝炎、肝纤维

化等疾病, 临床疗效确切。该处方由丹参、山豆根和灵芝组成, 方中君药丹参中有效成分丹参酮 II<sub>A</sub> 受热易分解, 山豆根为臣药, 其有效部位提取时间相对较长, 为保证有效部位提取完全, 故分开提取。山豆根味苦、寒, 有毒, 具有清热解毒、消肿利咽的功效<sup>[1]</sup>。大量研究表明, 山豆根主要有效部位为生物碱和多糖类。其中生物碱具有良好的保肝降酶活性, 能防治多种原因引起的肝功能损伤<sup>[2]</sup>。去除生物碱的山豆根水煎液仍能显著降低实验性急性肝损伤大鼠血清中异常升高的丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平, 推测山豆根中

**[收稿日期]** 20121016(010)

**[基金项目]** 吉林省科技厅 2011 年项目 (20110949)

**[第一作者]** 孟美, 在读硕士, 从事新剂型新技术研究与开发, Tel: 13943001853, E-mail: meng.mei2008@163.com

**[通讯作者]** \* 张炜煜, 硕士, 教授, 博士生导师, 从事新剂型新技术研究与开发, Tel: 0431-86172198, E-mail: weiuzhang2003@126.com

总多糖也可能是降酶保肝抗纤维化的有效成分<sup>[3-5]</sup>。本实验分别以总生物碱和总多糖含量为指标,采用正交试验法优选复方灵丹胶囊中山豆根有效部位的提取工艺。

## 1 材料

UV-5100 型紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司),AR2140 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),JA5103N 型电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司),DZF-6050 型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司),DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

D-无水葡萄糖、苦参碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110833-200904,110805-200508),山豆根购于河南聚仁中药饮片有限公司,经长春中医药大学鉴定教研室姜大成教授鉴定为豆科植物越南魁 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根和根茎。试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 总生物碱的含量测定

**2.1.1 对照品溶液的制备** 称取干燥至恒重的苦参碱对照品约 1 mg,精密称定,置 5 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 取山豆根提取物约 0.05 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.1.3 检测波长的选择** 取苦参碱对照品溶液适量,干燥,精密加入溴百里香酚蓝 4 mL 和三氯甲烷溶液 6 mL,震荡 2 min 后置于分液漏斗中静止 2 h,分取三氯甲烷层溶液,并以相应试剂为空白,采用紫外-可见分光光度法于 300 ~ 800 nm 扫描,结果在 413 nm 处有最大吸收。而《中国药典》2010 年版规定的检测波长为 415 nm,综合扫描结果,故确定测定波长 415 nm。

**2.1.4 标准曲线的制备** 精密量取苦参碱对照品溶液 0.04,0.06,0.08,0.12,0.15 mL,分别置具塞锥形瓶中,挥干溶剂,加入溴百里香酚蓝溶液 4 mL 和三氯甲烷溶液 6 mL,震荡 2 min 后置于分液漏斗中静止 2 h,分取三氯甲烷层溶液,以相应试剂为空白,于 415 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 0.0819X - 0.0306$  ( $r = 0.9996$ ),表明总生物碱在 33.44 ~ 83.61 mg·L<sup>-1</sup> 呈良好线性关系。

**2.1.5 精密度试验** 称取同一样品 3 份,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,依法进行含量测定。结

果总生物碱 RSD 1.2%,表明仪器精密度良好。

**2.1.6 重复性试验** 取同一批样品 6 份,按 2.1.2 项下制备供试品溶液,依法进行含量测定,结果总生物碱 RSD 0.6%,表明此方法重复性良好。

**2.1.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于室温放置 0,10,20,30,60,120 min,依法进行含量测定,结果总生物碱的 RSD 1.2%,表明供试品溶液至少在 120 min 内稳定。

**2.1.8 回收率试验** 精密吸取已知含量的供试品溶液 6 份,分别精密加入生物碱对照品 0.027 8 mg,依法进行含量测定,计算回收率。结果总生物碱的平均回收率 100.99%,RSD 1.02%,表明此方法可行。

### 2.2 总多糖的含量测定

**2.2.1 对照品溶液的制备** 取葡萄糖对照品约 5.00 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加去离子水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取山豆根提取物约 0.05 g,精密称定,加入 10 mL 去离子水溶解,称定质量,超声提取 30 min,放置至室温,再称定质量,用去离子水补足减失的质量,摇匀,滤过,用石油醚萃取 2 次,每次 20 mL,水层加无水乙醇约 40 mL,边加边振摇,使含醇量达 80%,以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,去除上清液,沉淀加 80% 乙醇洗涤 2 次,再用去离子水溶解,至 50 mL 量瓶中,用去离子水稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.2.3 检测波长的选择** 取葡萄糖对照品溶液适量,至具塞试管中,加入 5% 苯酚溶液 1 mL,迅速摇匀,加入浓硫酸 5.0 mL,振摇 30 s,置于沸水浴中加热 15 min,立即置于冰水浴中冷却 30 min,摇匀,以相应试剂为空白,采用紫外-可见分光光度法于 400 ~ 700 nm 进行全波长扫描,确定检测波长 625 nm。

**2.2.4 标准曲线的制备** 分别精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.4,0.5,0.6,0.7,0.8 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加去离子水溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取上述溶液各 1 mL,按 2.2.3 项下方法处理,于 625 nm 波长处测定 A,以 A 为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 71.265X - 0.0503$  ( $r = 0.9995$ ),表明总多糖在 0.004 7 ~ 0.009 4 g·L<sup>-1</sup> 线性关系良好。

**2.2.5 精密度试验** 称取同一样品 3 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,依法进行含量测定。结果总多糖的 RSD 0.59%,表明仪器精密度良好。

**2.2.6 重复性试验** 取同一批样品 6 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,依法进行含量测定,总多糖 RSD 0.79%,表明此方法重复性良好。

**2.2.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于室温下放置 0,5,10,15,30,60 min,依法进行含量测定,结果总多糖的 RSD 0.66%,表明供试品溶液在 60 min 内稳定。

**2.2.8 回收率试验** 精密吸取已知含量的供试品溶液 6 份,分别精密加入葡萄糖对照品 0.047 mg,依法进行含量测定,计算回收率。结果总多糖的平均回收率 101.0%,RSD 0.84%,表明此方法稳定可行。

### 2.3 山豆根提取工艺的优选

**2.3.1 乙醇体积分数的考察** 称取山豆根饮片 3 份,每份 100.0 g,分别加入 8 倍量体积分数为 90%,80%,70%,60%,50% 的乙醇溶液,浸泡 2 h 后,加热回流提取 2 次,每次 2 h。过滤,合并滤液,减压回收乙醇,干燥至恒重。按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,测定山豆根总生物碱含量,结果依次为 0.989,1.106,1.936,1.207,0.819 mg·g<sup>-1</sup>,表明乙醇体积分数为 70% 时,提取物中总生物碱含量最高,故确定乙醇体积分数为 60%~80%。

**2.3.2 正交试验设计** 以总生物碱含量为指标,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 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山豆根总生物碱提取工艺的影响。分别称取 9 份药材,每份 100.0 g,按因素水平表(表 1)的设计条件进行乙醇加热回流提取,提取液滤过,合并滤液,减压浓缩至干燥,测定总生物碱含量。试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 山豆根总生物碱提取工艺正交试验因素水平

	A	B	C	D
水平	乙醇体积分数 /%	加醇量 /倍	提取时间 /h	提取次数 /次
1	60	6	1.0	1
2	70	8	2.0	2
3	80	10	3.0	3

直观分析表明,影响山豆根提取工艺的因素作用顺序为乙醇体积分数 > 提取次数 > 加醇量 > 提取时间,以极值最小的 C 因素为误差项进行方差分析,发现 A,D 因素对提取工艺具有显著性影响。确定山豆根总生物碱最佳提取工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>,即加 6 倍量 70% 乙醇提取 2 次,每次 1.0 h。

**2.3.3 验证试验** 称取 10 倍处方量药材,按优选的提取工艺进行 3 次验证试验,滤液浓缩,干燥,测

表 2 山豆根总生物碱提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	总生物碱提取量 /mg·g <sup>-1</sup>
1	1	1	1	1	1.197
2	1	2	2	2	1.898
3	1	3	3	3	1.736
4	2	1	2	3	1.901
5	2	2	3	1	1.838
6	2	3	1	2	2.527
7	3	1	3	2	1.595
8	3	2	1	3	1.109
9	3	3	2	1	1.007
K <sub>1</sub>	1.610	1.564	1.611	1.347	
K <sub>2</sub>	2.089	1.615	1.602	2.007	
K <sub>3</sub>	1.237	1.757	1.723	1.582	
R	0.852	0.193	0.121	0.660	

表 3 总生物碱提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	1.094	2	40.52	<0.05
B	0.060	2	2.22	>0.05
C(误差)	0.027	2	1.00	
D	0.670	2	24.82	<0.05

注: F<sub>0.05</sub>(2,2) = 19.00(表 6 同)。

得总生物碱平均提取量 2.366 mg·g<sup>-1</sup>,RSD 0.38%,说明优选的工艺稳定可行。

### 2.4 山豆根总多糖提取工艺的优化

**2.4.1 正交试验设计** 以总多糖含量为考察指标,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验。分别称取 9 份药材,每份 100.0 g,按因素水平表(表 4)的设计条件进行水煎煮提取,滤过,合并滤液,减压浓缩至干燥,测定总多糖含量。试验安排及结果见表 5,方差分析见表 6。

表 4 山豆根总多糖提取工艺正交试验因素水平

水平	A 加水量/倍	B 提取时间/h	C 提取次数/次
1	6	1	1
2	8	2	2
3	10	3	3

直观分析表明影响山豆根提取工艺的因素作用顺序为提取次数 > 提取时间 > 加水量;以极值最小的 D 因素为误差项进行方差分析,发现 B 因素对总多糖提取工艺有显著影响,C 因素对提取工艺具有

表5 山豆根总多糖提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	总多糖提取量 /mg·g <sup>-1</sup>
1	1	1	1	1	0.563
2	1	2	2	2	1.931
3	1	3	3	3	2.754
4	2	1	2	3	1.980
5	2	2	3	1	2.158
6	2	3	1	2	1.363
7	3	1	3	2	2.371
8	3	2	1	3	1.338
9	3	3	2	1	3.306
K <sub>1</sub>	1.749	1.638	1.088	2.009	
K <sub>2</sub>	1.834	1.809	2.406	1.888	
K <sub>3</sub>	2.338	2.474	2.428	2.024	
R	0.589	0.836	1.340	0.136	

表6 总多糖提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.609	2	18.455	>0.05
B	1.171	2	35.485	<0.05
C	3.531	2	107.00	<0.01
D(误差)	0.033	2	1.00	

极显著性影响,A因素则无显著影响;确定山豆根总多糖最佳提取工艺为A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>,即加6倍量水煎煮3次,每次3.0h。

**2.4.2 验证试验** 称取10倍量处方药材,按优选的提取工艺进行3次验证试验,滤液浓缩,干燥,测得总多糖平均提取量为2.786 mg·g<sup>-1</sup>,RSD 0.90%,表明该工艺稳定可行。

### 3 讨论

比较了乙酸提取、盐酸提取、水煎煮提取

及乙醇回流提取<sup>[6-8]</sup>方法,发现以乙醇回流法提取所得总生物碱含量最高,水煎煮法提取所得总多糖含量最高。在总生物碱含量测定的预试验中,分别对溴百里香酚蓝溶液用量和三氯甲烷用量进行考察,结果表明在其他条件相同的情况下,pH 7.6 溴麝香草酚蓝溶液用量为4 mL时,A达最大;再增加用量,反而会因空白溶液颜色加深,导致A下降;在其他条件相同的情况下,三氯甲烷用量达到6 mL后,A基本稳定,说明此时即可将生物碱与酸性染料的络合物基本萃取完全,用量再增加对A已无显著影响。

### [参考文献]

- [1] 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,2010:25.
- [2] 张友祥,张佳发,刘龙民. 苦参及其有效成分治疗病毒性肝炎作用机理的研究进展[J]. 上海中医药大学学报,2001,15(2):63.
- [3] 王君明,崔瑛. 山豆根化学成分、药理作用及毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):229.
- [4] 戴五好,钱利武,杨士友,等. 苦参、山豆根生物碱及其总碱的抑菌活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):177.
- [5] 盛云华,李峰杰,周绮,等. 山豆根对小鼠急性肝毒性及其病理形态学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):144.
- [6] 际薇,曲彩虹,庄华玲,等. 山豆根煎煮工艺的优选试验[J]. 中药材,2005,28(4):339.
- [7] 志英,禹春平. 山豆根的提取工艺研究与探讨[J]. 中药材,2007,30(1):101.
- [8] 建军,黄小蕊,钟小平. 正交实验法优选山豆根提取工艺的研究[J]. 广东药学院学报,2005,21(3):258.

[责任编辑 仝燕]