

正交试验法优选赶黄草的提取工艺

项慧慧¹, 杨洁红^{1*}, 傅旭春², 张宇燕¹, 万海同¹

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 浙江大学城市学院, 杭州 310015)

[摘要] 目的: 优选赶黄草的提取工艺。方法: 以槲皮苷提取量为指标, 采用正交试验考察乙醇用量、提取时间、提取次数和乙醇体积分数对提取工艺的影响。HPLC 测定槲皮苷含量。结果: 提取次数对赶黄草提取工艺的影响最大, 最佳提取工艺为加 10 倍量 80% 乙醇提取 2 次, 每次 0.5 h。结论: 优选的提取工艺稳定可行。

[关键词] 赶黄草; 槲皮苷; 提取工艺; 正交设计

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0050-03

Optimization of Extraction Technology of *Penthorum chinense* by Orthogonal Test

XIANG Hui-hui¹, YANG Jie-hong^{1*}, FU Xu-chun², ZHANG Yu-yan¹, WAN Hai-tong¹

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of *Penthorum chinense*. **Method:** With extraction amount of quercitrin as index, influence of ethanol amount, extraction time, extraction times and ethanol concentration on extraction technology was investigated by orthogonal test. The content of quercitrin was determined by HPLC. **Result:** Extration times had significant effect on extraction technology of *P. chinense*, optimum extraction technology was as following: extracted 2 times with 10 times the amount of 80% ethanol, 0.5 h per time. **Conclusion:** This optimized extraction process was stable and feasible.

[Key words] *Penthorum chinense*; quercitrin; extraction technology; orthogonal design

赶黄草分布于海拔约 1 000 m 的乌蒙山麓原始森林, 是四川古蔺的道地药材^[1-3]。其全草性平, 味苦, 微辛, 无毒, 具有清热解毒、退黄化湿、活血散瘀、

利水消肿之功效, 临床广泛用于治疗黄疸、水肿、经闭、血崩、带下、跌打损伤, 以及各型肝炎、胆囊炎、脂肪肝等症^[4]。文献报道赶黄草中黄酮类化合物具

[收稿日期] 20120928(005)

[基金项目] 浙江省科技计划基金项目(2011C23100); 浙江省自然科学基金项目(Z2101201, LR12H27001); 浙江省中医药重点学科建设计划(2012-XK-A06)

[第一作者] 项慧慧, 在读硕士, 从事方剂配伍研究, E-mail: xhh5767@126.com

[通讯作者] * 杨洁红, 教授, 博士生导师, 从事方剂配伍研究, E-mail: yjhong@zjtem.net

[9] 朱斌, 陈晓光, 徐友辉. 用四川紫草提取紫草素的工艺优化研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(3): 642.

[10] 于黎鑫, 刘军锋, 刘珂. 新疆紫草羟基萘醌有效部位制备工艺研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(9): 54.

[11] 吴学渊, 刘萍. 正交试验设计优选紫草的醇提工艺[J]. 中国医院用药评价与分析, 2008, 8(10): 750.

[12] 白研, 宋粉云, 毋福海, 等. 正交试验优选紫草提取工艺[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(4): 288.

[13] 王阳, 朱燕霞, 孙殿甲, 等. 均匀设计研究紫草的提取工艺[J]. 西北药学杂志, 2003, 18(4): 157.

[14] 杨秀芳. 紫草提取工艺的优化[J]. 陕西科技大学学报, 2004, 22(4): 35.

[责任编辑 全燕]

有保护酒精及药物性肝损伤、退黄降酶、抗肝炎病毒的作用,可抑制肝纤维化、肝硬化^[5],临床上用于治疗各种急慢性肝炎^[6]。本实验以槲皮苷提取量为指标,采用正交试验优选赶黄草的提取工艺,为其资源的充分利用提供实验依据。

1 材料

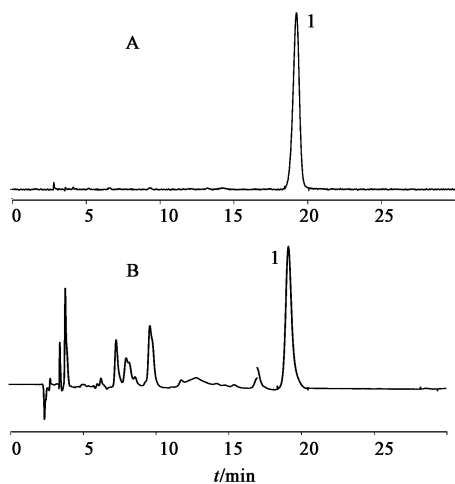
XS105 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 集团), 1260 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 有限公司),DK-S24 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司),赶黄草购于四川古蔺县赶黄草种植基地,经检验为虎耳草科扯根菜属植物扯根菜 *Penthorum chinense* Pursh 的干燥地上部分,符合《湖南省中药材标准》(2009 年版)越黄草项下的质量标准。槲皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111538-200403),乙腈为色谱纯,其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 槲皮苷的含量测定

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取赶黄草药材,用适量乙醇溶液提取,过滤,滤液定容至一定体积,摇匀,所得样品溶液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.2 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm),流动相乙腈-0.04 mol·L⁻¹磷酸二氢钾(18:82),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 350 nm,柱温 35 °C,进样量 20 μL。见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 槲皮苷

图 1 赶黄草提取物 HPLC

2.1.3 线性关系考察 精密称取干燥至恒重的槲皮苷对照品适量,加甲醇溶解并稀释成 11.76 g·L⁻¹ 的对照品溶液。精密吸取对照品溶液 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5, 10 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇

稀释至刻度,摇匀,制得系列对照品溶液。按 2.1.2 项下条件进行分析。以槲皮苷峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $A = 36.65C - 2.31$ ($r = 0.9999$),表明槲皮苷在 0.294 ~ 11.760 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好线性关系。

2.2 提取工艺优选

2.2.1 提取溶媒对槲皮苷提取量的影响 取赶黄草药材 50 g, 2 份,精密称定,分别加 6 倍量水和 80% 乙醇回流提取 1.5 h, 滤过,定容至 500 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜,测得槲皮苷提取率分别为 0.045, 0.111 mg·g⁻¹。故选择乙醇为提取溶媒。

2.2.2 正交试验设计 选择乙醇用量、提取时间、提取次数、乙醇体积分数为考察因素,以槲皮苷提取量为考察指标,按 L₉(3⁴) 正交表进行提取工艺优化,因素水平见表 1。取赶黄草药材 50 g 左右,精密称定,置于圆底烧瓶中,以乙醇水溶液为提取溶媒,在恒温水浴锅中加热回流,提取液趁热过滤,若多次提取,则合并滤液,定容到一定体积,测定含量,计算提取量,结果见表 2,方差分析^[7]见表 3。

表 1 赶黄草提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇用量 /倍	B 提取时间 /h	C 提取数 /次	D 乙醇体积 分数/%
1	6	0.5	1	60
2	8	1	2	80
3	10	1.5	3	95

表 2 赶黄草提取工艺 L₉(3⁴) 正交试验安排

No.	A	B	C	D	槲皮苷提取量 /mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	0.114
2	1	2	2	2	0.260
3	1	3	3	3	0.206
4	2	1	2	3	0.193
5	2	2	3	1	0.212
6	2	3	1	2	0.111
7	3	1	3	2	0.289
8	3	2	1	3	0.121
9	3	3	2	1	0.244
K ₁	0.193	0.199	0.115	0.190	
K ₂	0.172	0.198	0.232	0.220	
K ₃	0.218	0.187	0.236	0.173	
R	0.046	0.012	0.121	0.047	

表 3 提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.003 2	2	12.466	>0.05
B(误差)	0.000 3	2	1.000	
C	0.028 4	2	111.817	<0.01
D	0.003 3	2	13.128	>0.05

注: $F_{0.01}(2,2) = 99, F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,影响槲皮苷提取量因素的大小顺序为 $C > D > A > B$,即提取次数 > 乙醇体积分数 > 乙醇用量 > 提取时间,各因素最佳水平组合为 $A_3B_1C_3D_2$ 。以极值最小的 B 因素为误差项进行方差分析,表明 C 因素对赶黄草中槲皮苷的提取量有极显著影响,因素 A、D 均无显著影响。确定赶黄草的最佳提取工艺为加 10 倍量 80% 乙醇提取 3 次,每次 0.5 h。

2.3 工艺验证

2.3.1 提取次数的确定 按正交试验优选的提取工艺进行提取,提取次数分别为 1,2,3,4 次,结果槲皮苷提取量分别为 0.221 6,0.057 8,0.009 7,0.005 4 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。说明 2 次提取后即可使槲皮苷提取率达到 94.7%。综合生产成本考虑,最终确定提取 2 次。

2.3.2 验证试验 取赶黄草药材 50 g,精密称定,加 10 倍量 80% 乙醇提取 2 次,每次 0.5 h。结果槲皮苷提取量分别为 0.282,0.278 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,说明优选的提取工艺稳定可行。

3 讨论

赶黄草中黄酮类化合物主要有没食子酸、槲皮素、槲皮苷、乔松素-7- β -O-D-吡喃葡萄糖苷等^[9],其中槲皮苷是主要活性成分,具有抗炎抗病毒、保护肝脏等作用^[10-12],因此本研究将槲皮苷作为正交试验的考察指标。目前有些文献将没食子酸、槲皮素作为指标成分^[13-15],如杨明等以没食子酸和槲皮素为指标,采用单因素试验考察赶黄草药材粒径、不同药用部位、提取溶媒酸碱度这 3 种因素对指标成分提取率的影响^[13];程贺军等以槲皮素为指标成分,通过正交设计考察乙醇体积分数、溶媒用量、浸渍时间对赶黄草提取工艺的影响^[14];但均未将提取次数作为考察因素。本试验研究表明,提取次数对提取工艺的影响大于乙醇体积分数、溶媒用量和提取时间。

程贺军等^[14]研究显示乙醇体积分数和溶媒用量对提取结果无影响,这可能与所考察的溶媒用量太大有关。

[参考文献]

[1] 全国中草药汇编编委会. 全国中草药汇编. 下册 [M]. 北京:人民卫生出版社,1991:245.

[2] 中国植物志编委会. 中国植物志. 第 2 册 [M]. 北京:北京科学出版社,1992:23.

[3] 马志虎,陈宇航,陈红霞. 扯根菜资源分布、栽培技术及质量控制研究概述 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(9):298.

[4] 池少铃,庄元春,税丕先. 中药材扯根菜的研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报,2009,11(5):61.

[5] 张媛辉,刘俊田. 中药抗肝纤维化作用机制的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(6):66.

[6] 宋丽,臧志和,廖洪利,等. 赶黄草的研究进展 [J]. 西南军医,2007,9(2):87.

[7] 祝国强,滕海英,黄平. 正交试验方法在医药学中的应用 [J]. 数理医药学杂志,2007,20(4):568.

[8] 陈永祥,孙耀志,高松,等. 正交试验优选黄芪桂枝五物汤的水提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(2):56.

[9] 张旭,杨明. 赶黄草有效成份的研究 [J]. 成都中医药大学学报,2002,25(4):46.

[10] 刘丽,侯立强,满莹. 槲皮苷对扑热息痛诱导的大鼠急性肝损伤的保护作用研究 [J]. 药物与临床,2007, 45(10):98.

[11] Donfack J H, Amadou D, Nguenim T F, et al. *In vitro* hepatoprotective and antioxidant activities of crude extract and isolated compounds from *Ficus Gnaphalocarpa* [J]. *Inflammonpharm*,2011,19(1):35.

[12] 朱学鑫,蒋福升,丁志山. 槲皮苷生物活性的研究进展 [J]. 蛇志,2012,24(1):47.

[13] 杨明,谢兴亮,邱雪兰,等. 赶黄草提取工艺的研究 [J]. 中成药,2005,25(8):971.

[14] 程贺军,罗红艳,冯超. 正交试验法研究赶黄草中槲皮素的提取工艺 [J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2009,35(1):104.

[15] 陈浩,黎刚,李建. 正交试验法研究赶黄草中没食子酸的提取工艺 [J]. 四川中医,2009,27(1):56.

[责任编辑 仝燕]