

优化刺齿凤尾蕨抗癌二萜的超声提取工艺

范世锦¹, 郑雅元¹, 吕应年^{1,2*}, 苟占平^{1,2}
(1. 广东医学院药学院, 广东 东莞 523808;
2. 广东医学院广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023)

[摘要] 目的: 优选刺齿凤尾蕨抗癌二萜的超声提取工艺。方法: 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计试验考察乙醇体积分数、提取时间、提取次数和料液比 4 个影响因素, 以抗肿瘤活性二萜化合物 Ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid(5F) 的含量为评价指标, 采用 HPLC 进行含量测定。结果: 超声提取最佳工艺为 $A_2B_2C_3D_3$, 即加 12 倍量 75% 乙醇超声提取 3 次, 每次 65 min。结论: 优选得到的工艺稳定可行。

[关键词] 刺齿凤尾蕨; 抗癌; 二萜; 正交试验; 超声波提取

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)11-0049-03

Optimization of Ultrasonic Extraction Process
for Antitumor Diterpenoid from *Pteris dispar*

FAN Shi-jin¹, ZHENG Ya-yuan¹, LV Ying-nian^{1,2*}, GOU Zhan-ping^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China ; 2. Guangdong Key Lab for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

[Abstract] Objective: To optimize ultrasonic extraction technology of antitumor diterpenoid from *Pteris dispar*. Method: Four factors of the concentration of ethanol, extraction time, extraction times and solid-liquid ratio were investigated by $L_9(3^4)$ orthogonal design test, the content of ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid (5F) was defined as index, the content of 5F was determined by HPLC. Result: $A_2B_2C_3D_3$ was optimum ultrasonic extraction technology, which was ultrasonic extracted 3 times with 12 times the amount of 75% ethanol by 65 min each time. Conclusion: This optimized process was stable and available.

[Key words] *Pteris dispar*; antitumor; diterpenoid; orthogonal test; ultrasonic extraction

刺齿凤尾蕨, 别名刺齿半边旗^[1], 具有清热解毒、止血祛痰的功效, 民间常用于治疗肠炎、痢疾、疮毒^[2]。刺齿凤尾蕨提取物对人癌细胞具有明显抑制作用^[3], 日本学者从刺齿凤尾蕨中分离鉴定出多种萜类化合物^[3-4], 现代药理学研究发现其主要抗肿瘤活性化合物是 Ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid(5F), 该化合物是具有贝壳杉烷型结构的二萜, 其抗肿瘤活性可能和分子中不饱和环戊酮结构有关。该二萜化合物不易溶于水, 故宜用醇提取。中药有效成分的提取一般采用传统的溶剂回流法, 超声提取技术因具有设备简单、操作方便、提取时间短、效率高等优点, 已被广泛应用于中药有效成分的提取^[5-6]。近年关于刺齿凤尾蕨的研究较少, 本课题组已建立 HPLC 测定 5F 含量^[7]。本试验以刺齿凤尾蕨中 5F 含量为评价指标, 采用正交试验考察溶剂浓度、提取时间、提取次数和料液比对超声提取效果的影响, 优选最佳提取方案。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪 (G1311A 四元泵,

[收稿日期] 20111228(007)

[基金项目] 广东省科技计划项目 (2009B0308O1336); 广东省东莞市高等院校科研机构科技计划项目 (2008108101050)

[第一作者] 范世锦, 从事天然药物活性成分提取研究, Tel: 0759-2388405, E-mail: fanshijin. bestchoice@ yahoo. com. cn

[通讯作者] * 吕应年, 副研究员, 从事天然活性产物研究, Tel: 0759-2388405, E-mail: lyn211@ 21 cn. com

G1328B 手动进样器, G1315B 二极管阵列检测器, G1316A 柱温箱, 美国安捷伦), AE240 型电子天平 (梅特勒-托利多上海有限公司), VGT-1860QTD 型超声振荡仪 (广东固特超声实业有限公司), 刺齿凤尾蕨药材采自韶关乐昌, 经广东医学院苟占平博士鉴定为凤尾蕨科草本植物 *Pteris dispar* Kze. 的干燥全草, 5F 对照品 (实验室自制, 由日本东京理工大学药学部和广东医学院生化研究所鉴定符合要求), 甲醇为色谱纯, 水为三重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 二萜化合物 5F 的含量测定

2.1.1 色谱条件 Hypersil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 242 nm, 流动相甲醇-1% 醋酸水溶液 (0 ~ 4 min, 40% 甲醇; 4 ~ 15 min, 60% 甲醇; 15 ~ 17 min, 40% 甲醇), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃。

2.1.2 对照品溶液配制 精密称取 5F 对照品 1.2 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 定容至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 0.12 g·L⁻¹ 的 5F 对照品储备液。精密吸取储备液 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL, 分别加入甲醇定容至 1.0 mL, 摇匀, 即得 5F 系列对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称取药材粗粉 3 g, 按正交试验安排进行超声提取, 合并提取液, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

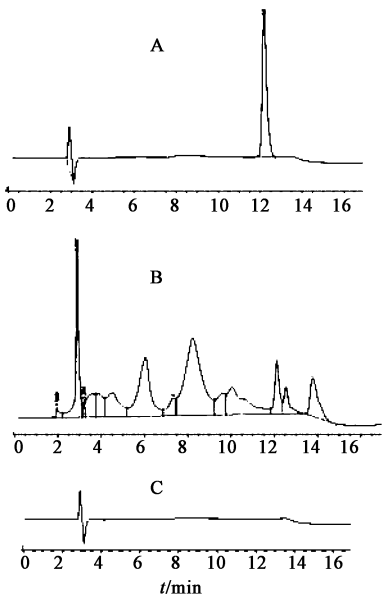
2.1.4 阴性对照溶液制备 按对照品溶液配制方法配制, 溶剂中不加入对照品。即得。

2.1.5 系统适应性和专属性 分别取 96 mg·L⁻¹ 对照品溶液, 供试品溶液, 阴性对照溶液各 20 μL 进样, 记录色谱图 (图 1)。在相应位置无干扰峰出现, 表明溶剂对样品分析无干扰。试验结果表明该方法该色谱系统的适应性及专属性良好。

2.1.6 线性关系 分别精密量取上述对照品溶液各 20 μL 进样, 以色谱峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行回归, 得线性回归方程为 $Y = 14.131X + 48.723$ ($R^2 = 0.9981$), 线性范围 0.12 ~ 1.92 μg。

2.1.7 重复性试验 取刺齿凤尾蕨叶片样品, 按供试品制备方法在相同条件下配制成 6 份, 分别进样 20 μL, 测定 5F 含量, 结果 RSD 2.39%, 表明该方法重复性好。

2.1.8 精密度试验 取质量浓度为 72 mg·L⁻¹ 的 5F 对照品溶液 20 μL, 连续进样 6 次, 结果 RSD 2.71%, 表明仪器精密度良好。



A. 对照品; B. 叶片提取物; C. 阴性; 1. 5F
图 1 刺齿凤尾蕨叶片提取物 HPLC

2.1.9 加样回收率试验 取同一刺齿凤尾蕨的叶片样品 (质量浓度 12 mg·L⁻¹), 加入 5F 对照品制备成质量浓度分别为 24 mg·L⁻¹ 的样品, 进样 6 次, 每次 20 μL, 结果平均回收率 103.1%, RSD 4.439%。

2.2 超声提取工艺优化

2.2.1 正交试验设计 在预试验基础上, 考察乙醇体积分数 (A)、提取时间 (B)、提取次数 (C) 和料液比 (D) 4 个影响因素进行试验, 因素水平表见表 1。精密称取 9 份刺齿凤尾蕨叶片加工的粉末, 每份 3 g, 按 L₉ (3⁴) 正交表超声提取, 合并提取液, 计算所得液体的体积, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 即得样品溶液, HPLC 检测分析 5F 含量, 试验安排见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 刺齿凤尾蕨抗癌二萜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 /min	C 提取次数 /次	D 料液比
1	50	30	1	1:6
2	75	65	2	1:9
3	100	100	3	1:12

由表 3 极差分析可知, 超声影响因素主次顺序为 B > A > C > D; 以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析, 结果可知, 各因素均无显著性差异, 故根据极差分析得到优选提取工艺为 A₂B₂C₃D₃。

按优选工艺固定乙醇体积分数、提取时间和料量比, 优选提取次数 (3, 4, 5 次), 结果 5F 提出量分别为 1.396, 1.402, 1.415 mg·g⁻¹。即提取 3 次基本

表 2 刺齿凤尾蕨抗癌二萜提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	5F 提出量 /mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	0.633
2	1	2	2	2	1.084
3	1	3	3	3	0.735
4	2	1	2	3	1.312
5	2	2	3	1	1.396
6	2	3	1	2	0.802
7	3	1	3	2	1.269
8	3	2	1	3	1.343
9	3	3	2	1	0.746
K ₁	0.817	1.071	0.926	0.925	
K ₂	1.170	1.274	1.047	1.052	
K ₃	1.119	0.761	1.133	1.130	
R	0.353	0.513	0.207	0.205	

表 3 提取工艺 5F 提出量方差分析

方差来源	SS	f	F
A	0.218	2	3.406
B	0.401	2	6.266
C	0.065	2	1.016
D	0.064	2	1.000
E(误差)	0.06	2	

注： $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

提取完全,故选定提取次数为 3 次。

2.2.2 工艺验证 称取药材 3 份,每份 30 g,按上述优选超声提取工艺进行重复试验。结果 5F 提出量分别为 1.404,1.423,1.412 mg·g⁻¹。表明该提取工艺稳定可靠。

3 讨论

超声提取法^[8]理论依据是根据超声具有空化、粉碎、搅拌等特殊作用,对植物药材的细胞有破坏现

象,使其溶媒渗透到药材的细胞中,以便使药材中的化学成分溶于溶媒之中。该法具有实验设备简单,操作方便,提取时间短,提取率较高,无需加热等优点,作为中药提取的新工艺,具有良好的应用前景。本实验采用 HPLC 测定刺齿凤尾蕨抗癌二萜活性成分 5F 的含量,方法稳定,快速,重复性好,杂质干扰小,可用于刺齿凤尾蕨中抗肿瘤二萜活性成分的含量测定。

[参考文献]

[1] 丁恒山.中国药用孢子植物[M].上海:上海科技出版社,1982:408.

[2] 龚先玲,苟占平,,梁念慈,等. 凤尾蕨属 6 种药用植物抗肿瘤有效部位筛选[J]. 时珍医国药,2010,21(7):1599.

[3] Murakami T, Tanaka N. Occurrence, structure and taxonomic implications of ferm constituents[M]. New York: Wien Springer-Verlag, 1988: 285.

[4] Chen G G, Liang N C, Lee J F, et al. Over-expression of Bcl-2 against *Pteris semipinnata* L. induced apoptosis of human colon cancer cells via a NF-kappa B-related pathway[J]. Apoptosis, 2004, 9(5): 619.

[5] 吴科锋,吕应年,刘义,等. 半边旗提取物 5F-Na 盐溶液的制备及体外抑癌作用研究[J]. 中国药房,2010,21(47): 4419.

[6] 韦玮,金日显,陈燕军. 二萜类化合物的提取与纯化工艺研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(12):66.

[7] 吕应年,吴科峰,梁念慈,等.半边旗 5F 注射液中有有效成分的含量测定方法[J]. 中国新药杂志,2008,17(23):2048.

[8] 孙于杰,王莹,侯林,等. 超声法提取远志中细叶远志皂苷的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):53.

[责任编辑 全燕]