

# 正交试验法优化土木香根中土木香内酯和异土木香内酯的提取工艺

王金<sup>1</sup>, 李素霞<sup>2</sup>, 赵永明<sup>1</sup>, 纪琳<sup>1</sup>, 王文静<sup>1</sup>, 郭春燕<sup>1\*</sup>  
(1. 河北北方学院基础医学院药理学系, 河北 张家口 075000;  
2. 河北化工医药职业技术学院, 石家庄 050026)

**[摘要]** 目的: 优选土木香根中土木香内酯和异土木香内酯的超声提取工艺。方法: 在单因素试验基础上, 采用正交试验设计对土木香提取参数中乙醇体积分数、料液比、超声时间及提取次数进行试验, 优化土木香根的提取工艺。结果: 土木香内酯和异土木香内酯的最佳超声提取条件为 15 倍量 65% 乙醇超声提取 2 次, 每次 30 min。在此条件下, 土木香内酯和异土木香内酯提取量分别为 28.647, 13.963 mg·g<sup>-1</sup>。结论: 该优选工艺稳定、可行。

**[关键词]** 土木香; 超声提取; 正交设计; 土木香内酯; 异土木香内酯

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0038-03

## Optimization of Extraction Technology for Alantolactone and Isoalantolactone from *Inula helenium* by Orthogonal Test

WANG Jin<sup>1</sup>, LI Su-xia<sup>2</sup>, ZHAO Yong-ming<sup>1</sup>, JI Lin<sup>1</sup>, WANG Wen-jing<sup>1</sup>, GUO Chun-yan<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, College of Basic Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;  
2. Hebei Chemical and Pharmaceutical Vocational Technology College, Shijiazhuang 050026, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize ultrasonic extraction process of alantolactone and isoalantolactone from *Inula helenium*. **Method:** Based on single-factor test, orthogonal design was used to optimize extraction technology of *I. helenium* with the concentration of ethanol, ratio of solid-liquid, ultrasonic-time and extraction times as factors. **Result:** Optimal ultrasonic extraction conditions were as follows: extracted 2 times with 15 times the amount of 65% ethanol, 30 min per time. Under such conditions, the content of alantolactone and isoalantolactone were 28.647, 13.963 mg·g<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion:** Optimized extraction process was stable and feasible.

**[Key words]** *Inula helenium*; ultrasonic extraction; orthogonal design; alantolactone; isoalantolactone

土木香具有健脾和胃、行气止痛、安胎之功效, 常用于脘腹胀痛、呕吐泻痢、岔气作痛、胎动不安<sup>[1]</sup>等症。土木香主要含有萜类、黄酮、挥发油、氨基酸和多糖等成分。现代医学研究认为土木香中以土木香内酯和异土木香内酯为代表的倍半萜类具有抑制肿瘤细胞和结核分枝杆菌、降低血糖等作用<sup>[2-4]</sup>, 是土木香根中的主要有效成分。超声辅助提取技术具

有操作简单、节能高效、尤其适用于热敏性有效成分的提取等特点, 目前已被广泛用于中药有效成分的提取研究<sup>[5-7]</sup>。本文以土木香内酯和异土木香内酯为考察指标, 对土木香的超声辅助提取进行初步的工艺探索。

### 1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), AB135-S 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多), JPCQ0628 型全数字超声波发生器(武汉嘉鹏电子有限公司)。

土木香购自河北安国药材市场, 经河北北方学院中医学院赵恒成教授鉴定为菊科旋覆花属植物 *Inula helenium* L. 的干燥根, 粉碎, 过 20 目筛, 备用。

**[收稿日期]** 20110926(001)

**[基金项目]** 河北省中医药管理局项目(2010046)

**[第一作者]** 王金, 硕士, 讲师, 从事新药研究开发, Tel: 0313-4029304, E-mail: wangjinzm@163.com

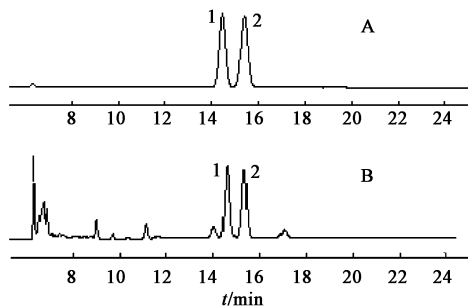
**[通讯作者]** \* 郭春燕, 博士, 教授, 从事中药新药研究开发, Tel: 0313-4029304, E-mail: guoqc0311@163.com

土木香内酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号110760-201008),异土木香内酯对照品(南京泽朗医药科技开发有限公司,纯度>98%),乙腈为色谱纯,水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 土木香内酯及异土木香内酯含量测定

**2.1.1 色谱条件** Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.05% 磷酸溶液(52:48),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长220 nm,柱温30 ℃,进样体积20 μL。见图1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 异土木香内酯; 2. 土木香内酯

图1 土木香 HPLC

**2.1.2 标准曲线绘制** 分别精密称取土木香内酯对照品3.41 mg,异土木香内酯对照品1.82 mg,置于5 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制成对照品储备液。精密量取对照品储备液逐级稀释成系列标准溶液,按上述色谱条件测定。分别以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为土木香内酯 $Y = 22.289X + 16.783$  ( $r = 0.9996$ );异土木香内酯 $Y = 40.618X + 20.996$  ( $r = 0.9993$ )。结果表明,土木香在2.13~68.2 mg·L<sup>-1</sup>,异土木香在1.14~34.1 mg·L<sup>-1</sup>与各自的峰面积线性关系良好。

**2.1.3 样品测定** 土木香超声提取液用流动相稀释100倍,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取20 μL注入液相色谱仪,按2.1.1项下色谱条件测定,每个样品测定3次。得土木香内酯和异土木香内酯平均峰面积。根据标准曲线分别计算其提取率。

### 2.2 土木香内酯和异土木香内酯提取条件的考察

**2.2.1 乙醇体积分数考察** 准确称取土木香粗粉6份,每份3 g,分别加入体积分数20%,35%,50%,65%,80%,95%的乙醇溶液30 mL(料液比1:10),封口,置于超声波发生器中提取1次,超声时间为30 min,提取液离心,取上清液定容至100 mL量瓶中。按2.1.3项下方法进样,计算土木香内酯和异土木香内酯提取率。结果表明,乙醇体积分数

在20%~65%时,土木香内酯和异土木香内酯的提取率随乙醇体积分数的增大而明显升高,但当乙醇体积分数超过65%后,提取率反而下降,故选择65%乙醇溶液作为提取溶媒。

**2.2.2 料液比的选择** 准确称取土木香粗粉5份,每份3 g,分别加入65%乙醇溶液21,30,45,60,90 mL,即料液比分别为1:7,1:10,1:15,1:20,1:30,封口,超声提取30 min,其余操作同2.2.1项下,计算土木香内酯和异土木香内酯的提取率。结果显示,土木香内酯和异土木香内酯的提取率随乙醇溶液用量增大而升高,在料液比为1:15时达最大值,继续增加提取溶媒量,二者含量并不随之增加,故选择15倍量乙醇溶液作为最佳溶媒量。

**2.2.3 提取时间的考察** 准确称取土木香粗粉6份,每份3 g,分别加入65%乙醇溶液45 mL,封口,分别超声提取10,20,30,40,50,60 min,其余操作按照2.2.1项下从“提取液离心”开始操作,计算土木香内酯和异土木香内酯提取率。结果显示,超声时间30 min时土木香根中土木香内酯和异土木香内酯提取率最高,之后随着超声时间的延长,二者提取率逐渐下降。故选择30 min作为较优提取时间。

**2.2.4 提取次数的考察** 准确称取土木香粗粉3 g,加入15倍量的65%乙醇溶液,分别提取1,2,3,4,5次,每次提取30 min,提取液分别定容至100 mL量瓶中,其余操作按2.2.1项下从“提取液离心”开始操作,计算土木香内酯和异土木香内酯提取率。结果发现,土木香内酯和异土木香内酯的第1次提取率分别为84.62%,86.47%,之后随提取次数的增加,二者提取率相应增加,但增加并不显著。

**2.3 正交试验设计** 在单因素考察基础上,为尽量减少试验次数,优化提取工艺,选取乙醇体积分数、超声时间、料液比及提取次数4个因素,各因素设定3个水平,按L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)表安排试验,正交试验安排见表1,方差分析见表2。为使分析结果更加真实客观,综合得分采用加权评分法。根据土木香内酯提取率(X)和异土木香内酯(Y)提取率的比例,确定权重系数,进行加权求和,最终综合评分 $Z = 0.66X + 0.34Y$ 。

由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序依次为A>B>C>D,即料液比影响最大,其次是超声时间,提取次数影响最小。方差分析结果表明料液比和超声时间对土木香内酯和异土木香内酯提取影响最大,具有显著性意义。结合生产实际情况,最终确定提取工艺为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即土木香药材加15倍量65%乙醇超声提取2次,每次30 min。

**2.4 验证试验** 准确称取土木香根细粉 3.0 g, 共 3 份。按上述优选提取工艺进行提取, 提取液合并定容至 100 mL 量瓶中, 提取液用流动相稀释 100 倍, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 按上述色谱条

件测定, 结果土木香内酯和异土木香内酯的提取率分别为 28.647, 13.963 mg · g<sup>-1</sup>。结果表明优选的提取条件合理可行。

表 1 土木香根中土木香内酯和异土木香内酯超声提取工艺正交试验安排

No.	A 料液比	B 超声时间	C 乙醇体积分数	D 提取数	土木香内酯	异土木香内酯	综合得分(Z)
					提取率/mg · g <sup>-1</sup>	提取率/mg · g <sup>-1</sup>	
1	1(1:10)	1(20 min)	1(55%)	1(1次)	15.240	8.166	12.835
2	1	2(30 min)	2(65%)	2(2次)	19.594	9.906	16.300
3	1	3(40 min)	3(75%)	3(3次)	10.411	5.605	8.777
4	2(1:15)	1	2	3	26.841	14.021	22.482
5	2	2	3	1	22.879	11.956	19.165
6	2	3	1	2	18.621	9.661	15.575
7	3(1:20)	1	3	2	20.566	10.915	17.285
8	3	2	1	3	23.257	12.504	19.601
9	3	3	2	1	19.564	10.136	16.358
K <sub>1</sub>	12.637	17.534	16.004	16.119			
K <sub>2</sub>	19.074	18.355	18.380	16.387			
K <sub>3</sub>	17.748	13.570	15.076	16.953			
R	6.437	4.785	3.304	0.834			

表 2 综合得分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	69.308	2	63.702	<0.05
B	39.287	2	36.109	<0.05
C	17.427	2	16.017	
D(误差)	1.088	2	1.000	

注: F<sub>0.05</sub>(2,2) = 19.00。

### 3 讨论

文献<sup>[8]</sup>选用 194 nm 作为检测波长, 此处属于远紫外区, 实际测定中发现采用紫外检测器时基线噪声和漂移比较严重。对土木香内酯和异土木香内酯分别进行紫外扫描, 发现二者从 250 nm 处开始有吸收, 190 nm 处达到最大吸收; 220 nm 处的吸收值约为最大吸收的 70%。综合以上因素, 选择 220 nm 作为检测波长。

土木香内酯和异土木香内酯均属于倍半萜内酯, 该类化合物常用提取溶媒有甲醇<sup>[7]</sup>和乙醇溶液。甲醇具有一定毒性, 不利于工业化大生产; 预试验分别考察过甲醇溶液和 95% 乙醇溶液作为提取溶媒时, 土木香内酯和异土木香内酯的提取率, 结果发现二者提取率接近, 经统计学分析无显著性差异。故本试验最终选用乙醇-水体系作为提取溶媒。

试验过程中考察过温度土木香内酯和异土木香内酯提取率的影响, 结果发现温度对其影响甚微, 推测可能是由于超声辅助提取法是利用超声波在溶剂中产生空化效应, 导致溶液内气泡形成。当这些气泡在被提取物质的细胞壁附近破裂, 产生的强大冲

击波使细胞壁破损, 有利于有效成分的溶出, 此过程受温度影响较小。故本试验固定温度为 25 ℃, 即室温。本实验通过正交试验优选土木香中土木香内酯和异土木香内酯的最佳提取方案, 该提取方法合理、简单、可行, 具有实际应用价值。

### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:15.
- [2] Dirsch V M, Stuppner H, Vollmar A M. Cytotoxic sesquiterpene lactones mediate their death-inducing effect in leukemia T cells by triggering apoptosis[J]. *Planta Med*, 2001, 67(6):557.
- [3] Konishi T, Shimada Y, Nagao T, et al. Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(10):1370.
- [4] Huo Y, Shi H M, Wang M Y, et al. Chemical constituents and pharmacological properties of Radix Inulae[J]. *Pharmazie*, 2008, 63(10):699.
- [5] 郭凯, 梁剑平, 华兰英, 等. 响应面法优化贯叶连翘中金丝桃素超声提取工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(11):7.
- [6] 徐秀泉, 许源, 汤建, 等. 响应面法优化金莲花总黄酮的超声提取工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(14):35.
- [7] 张曼丽, 霍长虹, 刘丽, 等. 土木香药材 HPLC 指纹图谱研究及土木香内酯和异土木香内酯测定[J]. *中草药*, 2010, 41(9):1539.
- [8] 肖远灿, 胡凤祖. RP-HPLC 测定藏木香中土木香内酯和异土木香内酯含量[J]. *中国药学杂志*, 2007, 42(7):490.

[责任编辑 仝燕]