

# 正交试验法优选了哥王中西瑞香素的提取工艺

喻文进, 夏武云, 肖玥, 王定勇\*  
(广东药学院药科学院, 广州 510006)

**[摘要]** 目的: 优选了哥王中西瑞香素的提取工艺。方法: 采用单因素及正交试验, 以西瑞香素含量为指标, 考察超声功率、甲醇用量、提取时间、提取次数 4 个因素对提取工艺的影响, 优选了哥王中西瑞香素的提取条件。结果: 了哥王中西瑞香素的最佳提取工艺为 16 倍量甲醇超声提取 2 次, 每次 1.5 h, 超声功率 160 W。结论: 提取工艺简单合理可行, 可用于了哥王中西瑞香素的提取。

**[关键词]** 了哥王; 西瑞香素; 提取工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0012-03

## Optimization of Extraction Technology for Daphnoretin from *Wikstroemia indica* by Orthogonal Test

YU Wen-jin, XIA Wu-yun, XIAO Yue, WANG Ding-yong\*

(College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize optimum extraction process of daphnoretin from *W. indica*. **Method:** Orthogonal design test and single factor test was used to optimize extraction conditions of daphnoretin from *W. indica* with the content of daphnoretin as index, and investigated effect of ultrasonic power, amount of methanol, extraction time and extraction times on extraction technology. **Result:** Optimum extracting technology of daphnoretin from *W. indica* were: extracted 2 times with 16 times the amount of methanol for 1.5 h each time, ultrasonic power was 160 W. **Conclusion:** This optimized extraction technique was simple, reasonable and feasible, which could be used in extraction of daphnoretin from *W. indica*.

**[Key words]** *Wikstroemia indica*; daphnoretin; extraction technique

了哥王学名南岭堇花, 始载于《岭南采药录》, 分布于江西、广东、广西、浙江、福建、湖南等地, 性味苦寒、微辛、有毒, 具有清热解毒、化痰散结、消肿止痛等功效, 主要用于治疗风湿性关节炎、淋巴结炎、痈肿和跌打损伤<sup>[1]</sup>。了哥王主要含有香豆素类、黄酮类、木脂素类等化学成分<sup>[2]</sup>, 其中西瑞香素为香豆素类化合物, 含量丰富<sup>[3]</sup>。据文献报道, 西瑞香

素具有很高的生物活性作用, 可抑制乙型肝炎病毒在人体肝细胞内的基因表达, 降低心肌耗氧量及抗癌<sup>[4-5]</sup>等。了哥王西瑞香素的提取溶剂有乙醇、甲醇、乙酸乙酯等<sup>[6-7]</sup>, 有学者曾以上述 3 种溶剂分别作为西瑞香素的提取溶剂, 发现甲醇提取物中的西瑞香素含量较高<sup>[8]</sup>。为探求了哥王中西瑞香素提取的最大化, 本实验采用甲醇作提取溶剂, 并通过单因素及正交试验考察影响了哥王中西瑞香素提取工艺的提取超声功率、甲醇用量、提取时间和提取次数, 优选出了哥王中西瑞香素的最佳提取工艺, 为工业化生产提供实验依据。

### 1 仪器与试剂

Agilent1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent), BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯); 西瑞香素对照品(广州来普达克生物技术有限公司, 纯度

**[收稿日期]** 20110619(003)

**[基金项目]** 广东省科技计划项目(2009B030801088)

**[第一作者]** 喻文进, 在读硕士研究生, 从事天然药物化学研究, Tel: 020-39350091, E-mail: yuwenjin166@163.com

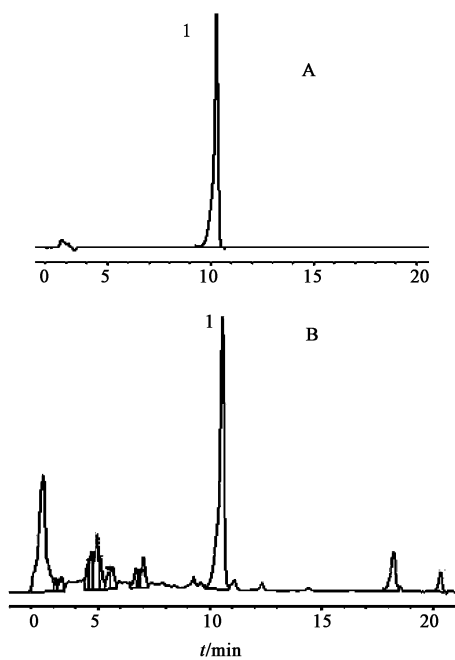
**[通讯作者]** \* 王定勇, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事天然药物化学研究, Tel: 13112243919, E-mail: wdingyong@163.com

98.9%,批号 20100620),了哥王购自广州清平药材市场,经广东药学院中药学院曾令杰鉴定为瑞香科堇花属植物了哥王 *Wikstroemia indica* (L.) C. A. Meyer,取其干燥茎皮粉碎,过 10 目筛,备用。乙腈为色谱纯,水为蒸馏水,甲醇、磷酸为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 西瑞香素的含量测定

**2.1.1 色谱条件** Shim-pack VP-ODS 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B),梯度洗脱程序 0 min (65% A),10 min (55% A),15 min (50% A),20 min (40% A),25 min(A),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 346 nm,柱温 35 °C,进样量 20 μL。理论塔板数按西瑞香素计不低于 3000。西瑞香素与相邻峰的分离度均 > 1.5。见图 1。



A. 对照品;B. 样品;1. 西瑞香素

图 1 了哥王中西瑞香素 HPLC

**2.1.2 对照品溶液的制备** 取西瑞香素对照品约 2.0 mg,精密称定,置于 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 20.0 mg·L<sup>-1</sup> 储备液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 将洗净的了哥王茎皮干燥后粉碎,过 10 目筛,得了哥王茎皮颗粒。取该颗粒约 10 g,精密称定,置于锥形瓶内,按药材-溶剂 1:16 加入甲醇,在超声功率为 160 W 的条件下超声提取 2 次,每次 1.5 h,过滤,合并滤液,滤液转移至 500 mL 的量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,精密吸取 2 mL 于 25 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液。

**2.1.4 标准曲线的制备** 依次精密吸取上述西瑞香素标准储备液 1,2,3,4,6,8 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配成西瑞香素浓度分别为 2.0,4.0,6.0,8.0,12.0,16.0 mg·L<sup>-1</sup> 系列的对照溶液。吸取 20 μL 上述溶液依次注入高效液相色谱仪中,于 346 nm 波长处测定峰面积。以西瑞香素对照溶液的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得回归方程  $Y = 57.825X + 9.2333$  ( $r = 0.9999$ )。结果表明西瑞香素在 2.0 ~ 16.0 mg·L<sup>-1</sup> 呈良好的线性关系。

**2.1.5 精密度试验** 取同一对照品溶液,按上述色谱条件,重复进样 6 次,得西瑞香素峰面积,其 RSD 1.2%,表明该方法的精密度良好。

**2.1.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于 0,2,4,8,16,24 h 按上述色谱条件,进样 20 μL 测定西瑞香素峰面积,RSD 1.5%,表明西瑞香素在 24 h 内稳定。

**2.1.7 重复性试验** 精密称取了哥王茎皮颗粒 6 份,按 2.1.3 项下方法制备并测定,RSD 1.6%,表明方法的重复性良好。

**2.1.8 加样回收试验** 称取已知含量的了哥王茎皮颗粒 6 份,每份约 2.5 g,精密称定,分别定量加入西瑞香素对照品约 20.2 mg,按 2.1.3 项下方法操作,计算平均回收率为 99.3%,RSD 1.6%。

## 2.2 提取工艺的优化

**2.2.1 单因素考察超声功率对西瑞香素得率的影响**<sup>[9]</sup> 分别精密称取了哥王茎皮颗粒 10 g,加入甲醇 100 mL,分别设定超声功率为 120,140,160,180,200 W,提取时间为 1 h。提取完毕后,过滤,滤液转移至 100 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,精密吸取 1 mL 于 50 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液按西瑞香素含量测定项测定。结果表明超声功率为 160 W 为最佳。

**2.2.2 正交试验** 除提取超声功率影响西瑞香素得率外,甲醇用量、提取时间、提取次数也是影响了哥王中西瑞香素提取率主要因素。因此在提取超声功率为 160 W 的条件下。称取 9 份了哥王茎皮颗粒,每份约 10 g,精密称定,按正交试验设计超声提取,过滤,合并滤液,滤液转移至 500 mL 的量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,精密吸取 2 mL 于 25 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液按西瑞香素含量测定项测定。因素水平见表 1,试验安排、结果及方差分析见表 2,3。

由表 2,3 可知,各因素对西瑞香素含量影响程

表 1 了哥王中西瑞香素提取工艺正交试验因素水平

水平	A 甲醇用量 /g·mL <sup>-1</sup>	B 提取时间 /h	C 提取数 /次
1	8	0.5	1
2	12	1.0	2
3	16	1.5	3

表 2 了哥王中西瑞香素提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	西瑞香素 /mg·g <sup>-1</sup>
1	1	1	1	2.39
2	1	2	2	4.81
3	1	3	3	4.91
4	2	1	2	6.09
5	2	2	3	6.62
6	2	3	1	5.26
7	3	1	3	5.60
8	3	2	1	5.81
9	3	3	2	8.06
K <sub>1</sub>	4.037	4.693	4.487	
K <sub>2</sub>	5.990	5.747	6.320	
K <sub>3</sub>	6.490	6.077	5.710	
R	2.453	1.383	1.833	

表 3 了哥王中西瑞香素提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	10.084	2	27.278	<0.05
B	3.132	2	8.472	>0.05
C	5.230	2	14.146	>0.05
D(误差)	0.370	2		

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19.00, F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

度依次为  $A > C > B$ , 因素 A 对提取效果的影响有统计学意义, C, B 对提取效果的影响无明显意义。综合上述结果, 并考虑降低成本等因素, 可确定最佳提取工艺为  $A_3B_3C_2$ , 即加 16 倍量的甲醇超声提取 2 次, 每次 1.5 h, 超声功率 160 W。

**2.2.3 验证试验** 根据上述单因素试验及正交试验结果筛选的工艺进行试验, 平行做 6 份, 按照 **2.1.3** 项下制备供试品溶液, 取 20  $\mu$ L 续滤液进样

分析。结果平均西瑞香素质量分数为 8.092  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 说明本提取工艺合理。

### 3 讨论

西瑞香素甲醇溶液于 200 ~ 400 nm 紫外区内进行扫描, 346 nm 处有最大吸收, 所以本试验采用 346 nm 为检测波长。有研究表明了哥王茎皮主要含有西瑞香素和一些常见的黄酮类成分, 其中西瑞香素的含量最高<sup>[10]</sup>。因此研究了哥王中西瑞香素的提取工艺时, 采用了哥王药材的茎皮部分。从了哥王茎皮中提取西瑞香素, 不仅节约溶剂, 而且西瑞香素得率高, 易于纯化。

### [参考文献]

[1] 余传隆. 中药辞海. 1 卷 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 1531.

[2] 陈扬, 孙立新. 中药了哥王研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(7): 587.

[3] 熊友香, 王显武, 尤志勉, 等. HPLC 法测定不同产地了哥王药材中西瑞香素含量 [J]. 中成药, 2009, 31(8): 附 18.

[4] Chen H C, Chou C K, Kuo Y H, et al. Identification of protein kinase C (PKC) activator, daphnoretin. That suppresses hepatitis B virus gene expression in human hepatoma cells [J]. Biochem Pharmacol, 1996, 52: 1025.

[5] Zhang G M, Qi C H, Bai P, et al. The effect of daphnoretin in heart [J]. Chin J Chin Med, 1993, 18: 751.

[6] 郭君阳, 郝桂彤, 孙立新. 了哥王中西瑞香素提取工艺的正交实验设计优选 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2190.

[7] Nunome S, Ishiyama A, Kobayashi M, et al. *In vitro* antimalarial activity of biflavonoids from *Wikstroemia indica* [J]. Planta Med, 2004(70): 72.

[8] 吕武清, 余良忠, 李六平, 等. HPLC 测定了哥王片中的西瑞香素含量 [J]. 中成药, 2005, 27(7): 858.

[9] 李艳敏, 姜建国, 余进峰. 了哥王总黄酮提取工艺的优化研究 [J]. 现代食品科技, 2009, 25(6): 653.

[10] 陈定双, 黄运东, 王定勇. 了哥王茎皮化学成分的研究 [J]. 亚热带植物科学, 2008, 37(4): 26.

[责任编辑 仝燕]