

# 正交法优选连翘酯苷提取工艺

赵燕<sup>1</sup>, 玄振玉<sup>2\*</sup>

(1. 上海市第十人民医院, 上海 200072; 2. 上海玉森新药开发有限公司, 上海 201203)

**[摘要]** 目的: 通过正交试验, 优选连翘叶中连翘酯苷的最佳提取工艺。方法: 采用正交设计的方法, 考察加水量、提取时间、提取次数和提取温度对连翘酯苷得量的影响, 优选出最佳提取条件。结果: 各因素的影响依次为:  $C > A > B > D$ , 提取次数( $C$ )为主要因素, 加水量( $A$ )、提取时间( $B$ )、提取温度( $D$ )为次要因素。提取的最佳工艺条件为用 16 倍的水, 60 °C 温浸法提取 3 次, 每次提取 1 h。结论: 优选得到的连翘酯苷的提取工艺简单、稳定、可行。

**[关键词]** 连翘酯苷; 提取工艺; 正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0013-03

## Optimization of Extracting Technology for Forsythiaside by Orthogonal Test

ZHAO Yan<sup>1</sup>, XUAN Zhen-yu<sup>2\*</sup>

(1. Shanghai 10th People's Hospital, Shanghai 200072, China;

2. Shanghai Youseen Drug Development Corporation, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the optimal extraction technology of forsythiaside by orthogonal test. **Method:** The amount of water, extraction time, extraction times and extraction temperature were set as index for orthogonal test. **Result:** The factors were:  $C > A > B > D$ . Extraction times ( $C$ ) was as the main factor and the amount of water ( $A$ ), extraction time ( $B$ ), extraction temperature ( $D$ ) as a secondary factor. The optimum conditions for extraction was as follows: 16 times of water, soaking extraction 3 times at 60 °C, each time extracting for 1 hour. **Conclusion:** The optimum extraction process for forsythiaside was simple, stable and feasible.

**[Key words]** forsythiaside; extraction process; orthogonal test

连翘的药用价值日益引起国内外的重视, 连翘及其提取物均已经进入国际市场, 广泛用于保健品、食品防腐等领域, 研究表明连翘中的有效成分主要有连翘苷、连翘酯苷、齐墩果酸、熊果酸、芦丁、木脂素、挥发油等。连翘苷具有降血脂及抗氧化作用<sup>[1]</sup>, 并对营养性肥胖小鼠具有减肥作用<sup>[2-3]</sup>; 部分研究者<sup>[4-6]</sup>认为连翘中真正具有抗菌功效的成分为连翘酯苷, 也有研究证实, 连翘酯苷具有多方面的生物活性, 其抗病毒、抗菌作用显著<sup>[7-9]</sup>, 而且还具有抑制弹性蛋白酶<sup>[10]</sup>及抗氧化等作用<sup>[11]</sup>。为促进连翘酯苷的进一步深入研

究, 本试验采用正交试验方法对其提取工艺进行研究, 分析加水量、提取时间、提取次数和提取温度对连翘酯苷得量的影响, 优选出最佳提取条件。

### 1 仪器与试剂

美国 Agilent 系列 HPLC 色谱仪: Agilent 1100 series, G 1314 VWD 检测器, Agilent 色谱工作站; METTLER TOLEDO AX 天平 [梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

连翘叶购自河南卢氏县(批号 20050802), 经上海中医药大学教学实验中心可燕副研究员鉴定为木樨科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥叶子; 甲醇为色谱纯; 乙醇为分析纯; 水为纯净水。

### 2 连翘酯苷的含量测定方法<sup>[12]</sup>

**2.1 色谱条件** 色谱柱: 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 流动相 甲醇: 水: 冰醋酸 (33: 67: 0.2); 检测波长 332 nm; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL; 理论塔板数按连翘酯苷峰计算应不低于 8 000。

**[收稿日期]** 20100518(004)

**[基金项目]** 上海市优秀学科带头人计划(10XD1423100)

**[第一作者]** 赵燕, 主管药师, 主要研究方向为中药院内制剂研发, Tel : 021-66301694, E-mail: zhao11131113@163.com

**[通讯作者]** \* 玄振玉, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为中药新药研发, Tel : 021-50801298, E-mail: xuanzhenyu@163.com

**2.2 对照品溶液制备** 精密称取干燥至恒重的连翘酯苷对照品适量,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含淫羊藿苷约 0.02 mg 的溶液。

**2.3 供试品溶液制备** 取本品约 50 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,精密加入 50% 甲醇溶解并于室温下定容至刻度,摇匀,精密吸取 1 mL 至 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.22 μm)滤过,取续滤液,即得。

### 3 提取工艺优选

**3.1 药材吸水率的测试** 取连翘叶药材 2 份,每份 100.0 g,置于 2 000 mL 烧瓶中,加入水 1 000 mL,使溶剂完全浸没药材,摇匀,至药材完全浸透,将未吸入药材的溶剂完全倾出,用量筒量出倾出水液的体积数,计算其吸水率,结果见表 1。

$$\text{吸水率} = \frac{(\text{加入的水量} - \text{倾倒出水量})}{\text{生药}} \times 100\%$$

表 1 连翘叶吸水率试验结果

药材量/g	加入水量/mL	倾倒水量/mL	吸水率/%	平均吸水率/%
100.0	1 000	710	290	317
100.0	1 000	656	344	

连翘叶的吸水率为 317%,同时结合完全浸没药材的用水量,最终确定至少要 8 倍药材质量的水,才可以满足连翘叶完全吸水而且剩余的水可完全浸没药材。

**3.2 提取溶媒的选择** 取连翘叶粗粉 6 份,每份 10.0 g,分为 3 组,每组 2 份,分别加入乙醇、70% 乙醇及水各 100 mL,热回流提取 3 次,每次 2 h,滤过,滤液合并后减压浓缩至干,取干膏 3.0 ~ 4.0 mg,以 33% 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中,精密量取 10 μL 注入液相色谱仪,测定,结果见表 2。

表 2 不同溶媒对连翘叶中连翘酯苷的提取结果

药材质量/g	溶媒	干膏质量/g	连翘酯苷质量分数/%	连翘酯苷得量/mg	连翘酯苷平均得量/mg
10.00	水	4.033 67	11.28	455.00	444.61
10.03	水	4.187 26	10.37	434.22	
10.00	70% 乙醇	4.056 24	6.08	246.62	250.00
10.01	70% 乙醇	4.119 93	6.15	253.38	
10.01	乙醇	3.153 11	6.85	215.99	203.10
10.00	乙醇	3.028 64	6.28	190.20	

试验结果表明,以水作为提取溶媒对连翘叶中连翘酯苷的提取效果为最佳。

**3.3 提取温度的考察** 取连翘叶粗粉 6 份,每份 10.0 g,加水 100 mL,分别采用室温冷浸,70 ℃ 水

浴,及热回流(100 ℃)提取 3 次,每次 2 h,滤过,滤液合并后减压浓缩至干,取干膏约 5.0 mg,准确称重,以 33% 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中,精密量取 10 μL 注入液相色谱仪,测定,结果见表 3。

表 3 不同温度条件下连翘叶中连翘酯苷的提取结果

药材质量/g	提取温度/℃	干膏质量/g	连翘酯苷质量分数/%	连翘酯苷得量/mg	连翘酯苷平均得量/mg
10.0	25	2.698 54	6.79	183.23	168.93
10.0	25	2.489 79	6.21	154.62	
10.0	70	3.245 71	23.65	767.61	761.14
10.0	70	3.569 86	21.14	754.67	
10.0	100	4.226 59	1.12	47.34	64.01
10.0	100	4.115 64	1.96	80.67	

试验结果表明,采用温浸的方法,比室温冷浸和回流法对连翘叶中连翘酯苷的提取效果为佳。

**3.4 最佳提取条件考察** 以水作为提取溶媒提取连翘酯苷的过程中,水的用量、提取时间、提取次数和提取温度等因素都会影响到提取效果。选择加水量(A),提取时间(B),提取次数(C)和提取温度(D)4 个因素,每个因素设 3 个水平,用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验表进行正交试验,以确定最佳工艺条件(表 4)。

表 4 提取实验因素水平设置表

水平	A 加水量/倍	B 提取时间/h	C 提取次数/次	D 提取温度/℃
1	8	1.0	1	60
2	12	2.0	2	70
3	16	3.0	3	80

取药材 90.0 g,均分成 9 份(每份 10.0 g),加水依正交试验表条件进行提取。以提取物干浸膏得量(权重系数 0.4)和干浸膏中连翘酯苷得量(权重系数 0.6)的综合评分作为考察指标进行比较,从而筛选出最佳提取工艺,试验结果见表 5,方差分析结果见表 6。

由表 5 可知,对连翘酯苷的提取,各因素的影响依次为:C > A > B > D。其中,C 因素影响最大,A 因素次之,B、D 因素对连翘酯苷的提取影响不大,B 因素提取时间,从节约成本考虑可以选择 B<sub>1</sub>;从 D 因素的 3 个水平的数值可以看到 D 因素温度升高对连翘酯苷得量有下降的趋势所以应该选择 D<sub>1</sub>。

D 因素的 SS<sub>j</sub> 值较小,可以把 D 因素当作误差相来进行方差估算,从表 6 的方差分析结果表明,C 因素对实验结果有显著的意义,A 因素对实验结果有一定的影响,而 B 因素影响小。提取连翘酯苷的

表 5 连翘酯苷提取条件正交试验设计及正交试验结果

No	A	B	C	D	水提干	连翘酯苷	连翘酯苷	综合 评分
					浸膏得量 /g	质量分数 /%	得量 /g	
1	1	1	1	1	3.1	18.00	0.558	57.88
2	1	2	2	2	3.8	20.26	0.770	75.80
3	1	3	3	3	4.3	14.67	0.631	72.21
4	2	1	2	3	4.3	18.65	0.802	81.86
5	2	2	3	1	4.5	23.33	1.050	97.56
6	2	3	1	2	3.4	18.35	0.624	64.16
7	3	1	3	2	4.7	22.62	1.063	100.00
8	3	2	1	3	3.8	18.76	0.713	72.59
9	3	3	2	1	4.3	20.56	0.884	86.49
$I_j$	68.300	79.913	64.877	80.643				
$\bar{II}_j$	81.193	81.983	81.383	79.987				
$\bar{III}_j$	86.360	74.287	89.923	75.553				
R	17.730	7.696	25.046	5.090				

表 6 连翘酯苷提取条件正交试验方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	498.885	2	249.443	10.847	
B	95.183	2	47.592	2.069	
C	972.737	2	486.369	21.149*	
D(误差)	45.994	2	22.997	1.00	

最佳提取条件为  $A_3B_2C_3D_1$ ,即用 16 倍的水,60℃ 温浸法提取 3 次,每次提取 1 h。

**3.5 验证试验** 为了确保该提取工艺的可行性与合理性,按照上述提取方案,进行了 3 次验证试验。结果见表 7。

表 7 水提取最佳条件组合试验结果

生药量/g	提物得量/g	连翘酯苷质量分数/%	连翘酯苷得量/g
100.0	31.5	18.14	5.71
100.0	30.7	18.56	5.70
100.0	29.3	19.54	5.73
平均值	30.5	18.75	5.71

从表 7 可以看出:按最佳工艺进行生产,每次投料 100 g,水提物平均得量为 30.5 g,水提取物中连翘酯苷平均质量分数为 18.75%,连翘酯苷平均得率 5.71%,表明该工艺稳定、可行。

#### 4 讨论

我们分别对连翘、连翘子和连翘叶进行了系统

的化学成分研究,提取分离并鉴定了质量标准用连翘酯苷,含量测定结果表明,连翘叶中连翘酯苷的质量分数可高达 6%~8%,而连翘子中连翘酯苷的含量则为 1% 左右,连翘的测定结果与连翘子接近,由此可见,连翘叶中连翘酯苷的含量却明显高于连翘及连翘子。因此我们确定采用连翘叶作为连翘酯苷研究及生产用原药材。

连翘酯苷极性较大,水溶性良好,经过对水以及不同浓度的醇水体系进行筛选,同时经过对提取温度进行考察,确定药材的提取以水为提取溶媒,采用 60℃ 温浸提取的方法效果最好。

#### [参考文献]

- [1] 赵咏梅,李发荣,杨建雄,等. 连翘苷降血脂及抗氧化作用的实验研究[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(2):157.
- [2] 赵咏梅,李发荣,杨建雄,等. 连翘苷对营养性肥胖小鼠减肥作用的影响[J]. 中药材,2005,28(2):123.
- [3] 赵咏梅,李发荣,杨建雄,等. 连翘苷对营养性肥胖小鼠减肥作用的研究[J]. 陕西中医,2005,26(6):602.
- [4] 任延久,林秋梅,康丽,等. 连翘的提取工艺及有效成份的研究[J]. 黑龙江医药,1995,8(6):309.
- [5] 方翠芬,靖会,李教社,等. HPLC 法测定市售连翘中连翘酯苷的含量[J]. 中国药事,2003,17(12):760.
- [6] 张炜,张汉明,郭美丽,等. HPLC 法测定感冒退热颗粒(冲剂)中连翘酯苷 A 的含量[J]. 中草药,1999,30(4):268.
- [7] 胡克杰,徐凯建,王跃红,等. 连翘酯甙体外抗病毒作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2001,8(2):89.
- [8] 匡海学,张宁,陆志博. 青连翘抗菌活性成分的研究[J]. 中药通报,1988,13(7):32.
- [9] 梁文藻,傅晓勇,徐国土. 连翘成分分析 IV 连翘酯苷的分离、鉴定和测定[J]. 药物分析杂志,1986,6(5):263.
- [10] 张立伟,赵春贵,王进东,等. 连翘酯苷分离提取及抑制弹性蛋白酶活性研究[J]. 化学研究与应用,2004,14(2):219.
- [11] 张立伟,赵春贵,杨频. 连翘酯苷抗氧化活性及构效关系研究[J]. 中国药学杂志,2003,38(5):334.
- [12] 中国药典.一部[S]. 2005:附录 VID.

[责任编辑 仝燕]