

地黄提取工艺的优化

宋子荣^{1*}, 谭梓骏², 陈西松², 白海波³

(1. 江西中医学院, 江西 南昌 330006; 2. 浙江养生堂药物研究所, 浙江 杭州 310007;
3. 浙江中医学院, 浙江 杭州 310053)

[摘要] 目的: 研究地黄中有效成分梓醇以及地黄抗氧化能力的最佳提取条件。方法: 以 HPLC 为含量测定方法, 采用重复-正交实验法, 以乙醇浓度(A)、溶剂量(B)、提取时间(C)和提取次数(D)4 个因素, 每个因素选取 3 个水平进行实验, 同时利用化学发光法进行体外抗氧化能力研究, 最后确定提取工艺。结果: 因素 A、B、C、D 对梓醇的含量均有显著影响。其抗氧化能力以醇提 2 次为佳。结论: 60% 乙醇 8 倍量, 回流提取 2 次, 每次 1.5h 为梓醇及地黄抗氧化能力的较佳提取条件。

[关键词] 地黄; 梓醇; 正交实验; 抗氧化能力; HPLC; 化学发光法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)01-0008-02

地黄为玄参科植物 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的块茎, 其化学成分研究表明, 有效成分含有梓醇等环烯醚萜甙类, 极性较大, 为更好发挥地黄的药用功效, 本研究以梓醇为检测指标, 采用 HPLC 方法, 考察了提取溶媒、提取方法、提取次数和溶媒用量等因素, 同时采用化学发光法, 以地黄抗氧化能力为指标对提取条件进行探讨, 确定了最佳工艺条件。

1 仪器与试剂

Angilent 1100 高效液相色谱仪, DAD 检测器; Photochem 发光仪(德耶拿仪器公司); 梓醇(0808~9803, 中国药品生物制品检定所); 乙腈(色谱纯); 化学发光试剂盒(德耶拿仪器公司); 地黄药材(华东医药股份有限公司)经鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的块茎。

2 实验方法

2.1 梓醇含量测定 采用 HPLC 法测定, 色谱柱为 4.6×150mm C18; 流动相为乙腈-水(2:98); 检测波长 212nm; 柱温 28℃; 流量 0.6mL/min; 经方法学考察合格, 回归方程为 $Y = 0.0002X - 0.0016$, $r = 0.9999$ 。(Y: 浓度, X: 峰面积)

2.2 地黄抗氧化能力测定 地黄提取液(0.1g 生药/mL)作 1:50 稀释, 精密吸取 20μL, 按试剂盒说明操

作, 注入发光仪进行测定, 以 Vc 为对照品进行计算。

3 结果

3.1 梓醇为指标

3.1.1 提取溶剂的确定 取 10g 地黄药材两份, 一份用 10 倍水提取 1h, 提取 4 次, 每次 100mL 定容; 一份用 10 倍 70% 乙醇提取 1 小时, 提取 4 次, 每次 100mL 定容, 10 倍稀释后 HPLC 法测定梓醇含量。检测结果: 水提得率为 1.28%, 第一次提取出 66%, 70% 乙醇提取得率为 1.96%, 第一次提取出 75%。所以选择醇提法提取, 梓醇提取得率更高。

3.1.2 正交实验设计及结果 为确定地黄醇提的提取工艺, 以梓醇为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验进行优选, 正交因素, 水平见表 1。

表 1 正交试验因素、水平表

水平	因素			
	A	B	C	D
	乙醇浓度(%)	溶剂量(倍)	提取时间(h)	提取次数(次)
1	50	8	0.5	1
2	60	10	1	2
3	70	12	1.5	3

提取工艺过程为称取地黄 10g 左右, 以不同浓度乙醇为溶剂, 平行操作条件下, 分别按 $L_9(3^4)$ 正交试验进行回流提取。合并提取液, 加水稀释定容至 1000mL, 得 1~9 号样品液, 做 2 次重复。精密量取上述样品溶液 1mL, 高速离心, 注入色谱仪进行测

[收稿日期] 2004-11-30

[通讯作者] 宋子荣, (0571) 86669211

定, 以外标法计算梓醇含量。计算结果及方差分析见表 2, 表 3。

由表 3、表 4 可见, 以地黄梓醇提取量为指标, 则以 A₂B₁C₃D₂, 即 60% 的乙醇溶液 8 倍量提取 2 次, 每次 1.5h 为较佳方案。

表 2 关于地黄药材梓醇提取的正交实验表

试验号	A	B	C	D	梓醇含量(%)	
1	1	1	1	1	0.489	0.522
2	1	2	2	2	0.633	0.658
3	1	3	3	3	0.544	0.468
4	2	1	2	3	0.613	0.487
5	2	2	3	1	0.652	0.728
6	2	3	1	2	0.729	0.654
7	3	1	3	2	0.806	0.802
8	3	2	1	3	0.295	0.301
9	3	3	2	1	0.569	0.549
I	3.314	3.719	2.990	3.509		
II	3.863	3.267	3.509	4.282		
III	3.322	3.513	4.000	2.708		
(I ² +II ² +III ²)/9-CT	0.033	0.017	0.085	0.206		
离均差平方和						
误差平方和	0.0176					

表 3 影响地黄药材梓醇提取因素的方差分析

来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	0.033	2	0.0165	8.435	P < 0.01
B	0.017	2	0.0085	4.362	P < 0.05
C	0.085	2	0.0425	21.729	P < 0.01
D	0.206	2	0.1032	52.764	P < 0.01
误差	0.0176	9	0.0019		

查方差分析表, $F_{0.01(2,9)} = 8.06$, $F_{0.05(2,9)} = 4.26$

表 4 地黄药材抗氧化能力实验结果($\bar{x} \pm s$)

提取次数	醇提(mol)	水提(mol)	显著性(T-test)
第一次	1.453 ± 0.383	1.075 ± 0.137	P < 0.05
第二次	0.707 ± 0.238	0.585 ± 0.078	P > 0.05

3.2 地黄抗氧化能力为指标 地黄醇提、水提工艺在抗氧化能力方面是否有差别, 对此进行了研究。精密称取地黄 10g, 分别以 80mL60% 乙醇和水为溶剂, 平行操作条件下, 回流提取 2 次, 每次 1.5h。醇提液 60℃减压回收乙醇, 以水稀释定容 100mL, 得样品液, 测定样品液抗氧化能力, 各做 6 个样本, 结果见表 4。

4 讨论

有文献以薄层扫描法测定梓醇, 考察了水提 1~5h 和 95% 醇提 2~4h 梓醇含量, 认为地黄水提 1~2h 为宜^[1], 刘明等以 HPLC 测定梓醇, 通过正交试验表明甲醇 3 倍量, 加热回流提取 2 次, 为梓醇较佳提取条件^[2]。本实验采用有重复的正交实验, 以梓醇和抗氧化能力为指标, 评价了地黄提取工艺, 在选定的条件下, 梓醇和抗氧化能力均达到理想效果, 因此, 结果较为可靠, 为工业生产提供有意义的参考。

为了考察梓醇的热稳定性, 做了 60% 乙醇连续 8h 提取的实验, 在 0.5、1.5、3、5、8h 提取液中梓醇的含量逐渐上升, 未见有下降。在浓缩干燥时发现, 105℃烘干和 60℃真空烘干对样品中梓醇的含量影响较大。105℃烘干后, 梓醇的含量降为原来的 10%; 60℃真空烘干, 梓醇的含量为原来的 90%。表明梓醇在溶剂中提取时比较稳定, 但是在浓缩干燥时需注意, 温度不宜过高。

[参考文献]

- [1] 张玲, 徐新刚, 时延增, 等. 地黄提取工艺研究[J]. 中草药, 1998, 29(5): 308-310.
[2] 刘明, 李更生. 鲜地黄中梓醇提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(4): 301-302.