

彭支莲, 张 丹, 李业洪, 等. 正交法优选续断中绿原酸的提取工艺[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 269–270.

正交法优选续断中绿原酸的提取工艺

彭支莲¹, 张 丹^{2,3,4}, 李业洪², 王 刚², 颜学伟²

(1. 重庆市九龙坡区第一中医院, 重庆 400080; 2. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331;

3. 重庆医科大学中医药研究室, 重庆 400016; 4. 重庆医科大学中医药实验教学中心, 重庆 401331)

摘要:设计正交试验,以绿原酸的得率为评价指标,对续断中绿原酸的提取工艺参数进行优化。结果表明:最优提取工艺为 60% 乙醇、料液比 1 g : 10 mL、提取 3 次、提取温度 70 ℃。验证试验证明优选的续断中绿原酸提取工艺稳定、质量可控,可为续断中绿原酸的开发利用奠定基础。

关键词:续断;绿原酸;正交试验;高效液相色谱法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)07–0269–02

续断为川续断科植物川续断 (*Dipsacus asperoides* C. Y. Cheng et. T. M. Ai) 的干燥根^[1],别称川断,为临床常用中药,主要用于胎漏、胎动不安、滑胎、腰膝酸软、跌打损伤和骨折等病症。目前续断的研究主要集中于其三萜皂苷类化合物的研究,而续断中同时含有绿原酸、咖啡酸等多种酚酸类化合物,其中绿原酸具有抗炎、抗菌、抗病毒和抗氧化等多种药效活性,是非常重要的—种中药有效成分。笔者所在课题组前期研究发现续断中绿原酸含量较高^[2],目前尚未见关于其提取工艺的研究报道,因此本试验拟通过设计正交试验,优选续断中绿原酸的较优提取工艺,为续断资源的深入开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 仪器 日本岛津 LC–20A 高效液相色谱仪,LC solution 色谱工作站,宁波新芝 SB–5200D 超声清洗器,Millipore 溶剂过滤系统,METIER TOLEDO AG204 万分之一电子分析天平。

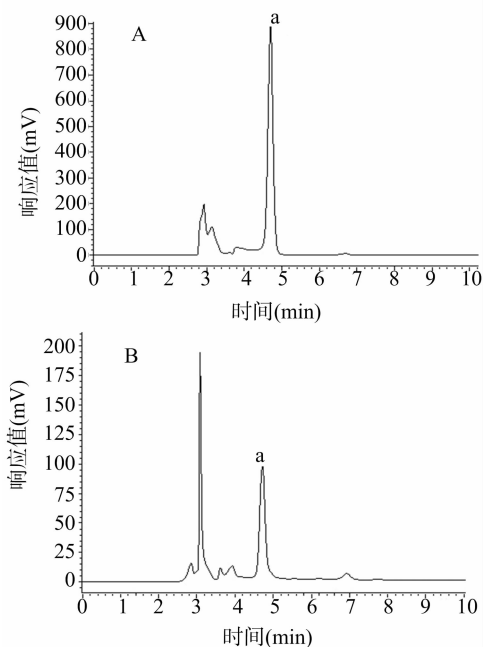
1.1.2 药剂 绿原酸对照品(由中国药品生物制品检定所提供,批号为 110753–200413),乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其余所用试剂均为分析纯。

1.1.3 药材样品 本试验川续断样品采自重庆市武隆县,经本校中药教研室王刚副教授鉴定为川续断 (*Dipsacus asperoides* C. Y. Cheng et. T. M. Ai)。

1.2 绿原酸的含量测定方法

1.2.1 高效液相色谱条件 Hypersil BDS–C₁₈ 柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm);流动相为乙腈–0.05% 磷酸水溶液(17 : 83, 体积比);流速为 1.0 mL/min;检测波长为 323 nm;

柱温为室温;进样量为 20 μL,理论塔板数按绿原酸计不低于 3 000,在该条件下样品组分得到较好的分离(图 1)。



A—对照样品; B—续断样品; a—绿原酸

图1 样品的高效液相色谱

1.2.2 对照品溶液的制备 精确称取绿原酸标准品 19 mg, 置 25 mL 容量瓶中,加 80% 乙醇定容,摇匀即得对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备 将续断置烘箱中 60 ℃ 烘 2 h,粉碎过三号筛,精确称取 5 g 置于 250 mL 圆底烧瓶中,按“1.3.1”项进行正交试验,抽滤后合并提取液,滤液定量转移至 50 mL 容量瓶中,加 80% 乙醇定容,即得供试品溶液。

1.3 续断中绿原酸提取工艺研究

1.3.1 正交试验的设计^[3–5] 参考文献,结合预试验结果,确定对绿原酸提取工艺影响较大的乙醇浓度、提取温度、料液比和提取次数为考察因素,按照正交表 L₉(3⁴) 设计四因素三水平正交试验,因素水平见表 1。

1.3.2 正交试验的安排 按照“1.3.1”项下试验设计,将续断药材 60 ℃ 烘 2 h 后粉碎,过三号筛,每组称取续断药材 5 g

收稿日期:2012–12–14

基金项目:重庆市九龙坡区科技项目(编号:2010–43–1);重庆市渝中区科技创新项目(编号:20100208)。

作者简介:彭支莲(1971—),女,四川宜宾人,副主任医师,主要从事中医药科技开发。E–mail: cqpzhappy@163.com。

通信作者:张 丹,硕士,副教授,主要从事药用植物资源开发与利用工作。E–mail: cwgzd2001@sohu.com。

表 1 绿原酸提取工艺优化正交试验的因素水平

水平	因素			
	A:乙醇浓度 (%)	B:提取温度 (℃)	C:料液比 (g : mL)	D:提取次数
1	60	60	1 : 10	1
2	70	70	1 : 15	2
3	80	80	1 : 20	3

置于 250 mL 圆底烧瓶中,采用回流法提取,每次 1 h,抽滤后合并滤液并测定体积。再按照“1.2.3”项下供试品溶液制备方法制备样品,按照“1.2.1”项下色谱条件测定,并计算绿原酸的提取得率,筛选续断中绿原酸的醇提工艺。

1.3.3 验证试验 为考察所确定绿原酸提取工艺的稳定性,称取续断药材 20 g,按上述工艺进行提取,设平行试验 3 组,合并滤液后,按照“1.2.3”项下制备方法制备供试品溶液,按照“1.2.1”项下色谱条件测定并计算绿原酸得率。

2 结果与分析

2.1 绿原酸含量测定的结果

2.1.1 标准曲线及线性范围 分别精确量取绿原酸对照品溶液 1、2、4、6、8、10 mL,置于 10 mL 容量瓶中,加 80% 乙醇定容至刻度,制成系列不同浓度的对照品溶液,按“1.2.1”项下方法测定峰面积。以色谱峰面积 *A* 为纵坐标,标准品浓度 *C* 为横坐标计算线性关系,结果表明绿原酸在进样浓度 0.076 ~ 0.456 mg/mL 范围内线性关系良好,回归方程为 $A = 18\,175\,617C - 124\,621$, $r = 0.999\,9$ 。

2.1.2 精密度试验 在上述色谱条件下,精确吸取绿原酸对照品溶液(0.226 mg/mL)20 μL 进样,重复 6 次,测得峰面积的 *RSD* 为 1.05%,表明精密度良好。

2.1.3 重复性试验 对同一批续断药材按“1.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,分别进样 20 μL,依照样品测定方法测定,并计算得峰面积的 *RSD* 为 1.60%,表明该方法重复性较好。

2.1.4 稳定性试验 在上述色谱条件下,精确吸取同一供试品溶液 6 份,在室温下于 0、0.5、1、2、4、8 h 进样,进样量为 20 μL,测定峰面积,计算 *RSD* 为 1.35%,表明样品溶液在 8 h 内稳定。

2.1.5 加样回收率试验 取已知绿原酸含量的续断药材 6 份,每份约 1.0 g,精确称定,分别加入绿原酸对照品适量,按照“1.2.3”项下样品溶液制备方法制备,在上述色谱条件下测定并计算,结果平均加样回收率为 99.83%,*RSD* 为 1.27%。

2.2 续断中绿原酸提取工艺的研究结果

2.2.1 正交试验及结果分析 按照“1.3.2”项下操作,以绿原酸的得率为评价指标,筛选续断中绿原酸的醇提工艺,正交试验结果见表 2,方差分析结果见表 3。

由表 2 极差分析结果可知,各因素的主次顺序为 D > A > C > B,由此可以看出续断中绿原酸醇提工艺中一定要控制好因素 D,即提取次数;由表 3 方差分析结果也可以得出,因素 D 作用显著,因素 A、B、C 作用不显著。由上述试验结果可知,续断中绿原酸醇提的较优工艺为 D₃A₁C₃B₂ 即 60% 乙醇、

表 2 续断中绿原酸提取工艺优化的正交试验结果

编号	因素				绿原酸的 得率(%)
	A:乙醇 浓度	B:提取 温度	C:料液比	D:提取 次数	
1	1	1	1	1	0.264
2	1	2	2	2	0.407
3	1	3	3	3	0.447
4	2	1	2	3	0.374
5	2	2	3	1	0.285
6	2	3	1	2	0.344
7	3	1	3	2	0.347
8	3	2	1	3	0.354
9	3	3	2	1	0.243
<i>k</i> ₁	0.373	0.328	0.321	0.264	
<i>k</i> ₂	0.334	0.349	0.341	0.366	
<i>k</i> ₃	0.315	0.345	0.360	0.392	
<i>R</i>	0.058	0.021	0.039	0.128	

表 3 续断中绿原酸提取工艺方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	<i>F</i>	<i>P</i>
乙醇浓度	0.005	2	5.00	
提取温度	0.001	2	1.00	
料液比	0.002	2	2.00	
提取次数	0.027	2	27.00	*

注: $F_{0.05(2,2)} = 19.00$,“*”表示差异显著。

料液比 1 g : 20 mL、提取 3 次、提取温度 70 ℃。由方差分析的结果可知,料液比对续断中绿原酸的得率影响较小,因此从节约成本的角度考虑,料液比选用 1 g : 10 mL。

2.2.2 验证试验结果 按照上述工艺条件进行验证试验,结果绿原酸的平均得率为 0.385%,*RSD* 为 3.9%,说明该工艺稳定可行。

3 讨论与结论

本试验通过正交法优选出续断中绿原酸的醇提工艺,该工艺稳定可行,所选定的条件可为续断中绿原酸的开发利用提供参考。

目前续断资源的开发侧重于其皂苷类成分,而其所含绿原酸等重要活性物质未得到重视。本试验通过正交试验筛选了续断中绿原酸的较优提取工艺,可将其与皂苷类提取工艺结合,综合开发利用续断资源,对提高续断的产品附加值和提高资源的利用率具有一定意义。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典 2010 年版:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:309-310.
[2] 张 丹,陶燕辉,曹纬国,等. 重庆产续断中总酚酸与绿原酸的含量测定[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(17). 1463-1465.
[3] 刘丹赤,杨建华,李 鹏. 牛蒡叶中绿原酸提取工艺研究[J]. 江苏农业科学,2009(4):305-306.
[4] 刘军海,仁惠兰,裴爱冰. 杜仲叶中绿原酸的提取研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(5):1184-1186.
[5] 刘艳清,汪洪武. 正交试验法优选庐山石韦中绿原酸的提取工艺[J]. 华西药学杂志,2008,23(3):310-311.