

文章编号:1001-6880(2010)Suppl-0146-06

藏药川西獐牙菜活性成分的超声提取工艺研究

陈涛^{1,2},贾静^{1,2},赵晓辉¹,肖远灿¹,李玉林^{1*}¹中国科学院西北高原生物研究所,西宁 810001; ²中国科学院研究生院,北京 100049

摘要:以龙胆苦苷和芒果苷的提取率为考察指标,对藏药川西獐牙菜活性成分的超声提取工艺进行了研究。通过单因素试验和正交试验,从乙醇浓度、超声功率、料液比、提取时间、提取次数等方面确定提取的最优工艺条件。结果表明,最佳提取条件为:以50%乙醇作为溶剂,料液比为1:60,在超声波功率为120 W的条件下超声提取2次,每次20 min。

关键词:川西獐牙菜;超声提取;正交试验;龙胆苦苷;芒果苷

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

Research on Ultrasonic Wave Extraction of Active Components in *Swertia mussotii*

CHEN Tao^{1,2}, JIA Jing^{1,2}, ZHAO Xiao-hui¹, XIAO Yuan-can¹, LI Yu-lin^{1*}¹Northeast Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;²Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Extraction conditions of two components of gentipicrinide and mangiferin in *Swertia mussotii* with ultrasonic method were studied by single factor and orthogonal design. The effect of ethanol concentration, ultrasonic power, solid-liquid ratio, extraction times and extraction time on extracting efficiency of two components were investigated. The result indicated that the optimized conditions were as follows: ultrasonic solvent 50% ethanol, ultrasonic power 120 W, ratio of solid to liquid 1:60, ultrasonic times 2, ultrasonic time 20 min.

Key words: *Swertia mussotii*; ultrasonic extraction; orthogonal test method; gentipicrinide; mangiferin

川西獐牙菜(*Swertia mussotii*),俗称“藏茵陈”,龙胆科獐牙菜属植物,生长于海拔3600~3800 m的山坡、灌丛草地、林缘、河滩^[1]等,主产地有西藏、青海、甘肃等。该植物性寒,味苦,主治黄疸型肝炎、肝硬化、肝腹水,另外还对胆囊炎、胆道综合症、胆管反流性胃炎、尿路感染,妇科外阴疾患等症有一定疗效,并可发汗、解热、驱虫^[2]。研究发现,川西獐牙菜的有效成分为齐墩果酸、芒果苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药黄素等化合物^[3]。现代药理学研究表明,齐墩果酸具有保肝、降酶、抗炎、增强机体免疫功能及降血脂等作用^[4];芒果苷具有抑制中枢神经、抗炎、抗结核、利胆等疗效^[5];獐牙菜苦苷具有提高皮肤机能、促进毛发生长、抑制中枢神经、镇痛和抗炎等作用^[6];龙胆苦苷具有促进胃液分泌、抗原虫和抗炎作用^[7]。

川西獐牙菜常规提取方法有煎煮法、水蒸馏法、溶剂浸提法等,运用常规热回流提取技术对其活性成分提取工艺的研究已有报道^[8],但这些方法效率低,温度高,溶剂消耗量大,有效成分容易被破坏。超声提取是采用超声辅助提取溶剂进行提取的方法,其传播的振动频率在弹性介质中高达20 KHZ,可造成植物细胞壁及整个生物体的瞬间破裂,使溶液能渗透到药材细胞中,加速有效成分溶解于溶媒^[9]。本研究以川西獐牙菜为原料,以龙胆苦苷和芒果苷的含量为主要指标,并采用HPLC法测定其含量。通过正交试验,优选川西獐牙菜活性成分超声提取的最佳工艺条件,为其进一步开发利用和实现产业化提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

无水乙醇(AR, 天津市红岩化学试剂厂), 甲醇(AR, 天津市红岩化学试剂厂), 丙酮(AR, 天津市百

收稿日期:2010-03-22 接受日期:2010-06-12

基金项目:国家自然科学基金面上项目(20875099)

*通讯作者 Tel:86-532-88963233; E-mail:liyulin@neipb.ac.cn

世化工有限公司), 色谱甲醇(山东禹山实业有限公司化工分公司), 龙胆苦苷和芒果苷对照品购自中国生物药品制品检定所。

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), 色谱柱 Agilent Eclipse-XDB C₁₈(5 μm, 250 × 4, 6 mm), N-1001 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司), KQ5200D 和 KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), METTLER TOLEDO PL203 和 XS204 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 溶液制备

1.2.1 样品溶液的制备

将干燥全草切碎后粉碎, 过40目筛混匀, 准确称取獐牙菜样品0.300 g 置于圆底烧瓶中, 加入30 mL左右50%乙醇溶液热回流提取2次, 过滤, 合并滤液, 滤液用旋转蒸发仪浓缩, 再用50%乙醇溶液溶解并定容于25 mL容量瓶中, HPLC 测定前0.45 nm 有机滤膜过滤, 即为样品溶液。

1.2.2 对照品溶液的配制

准确称取对照品龙胆苦苷12.8 mg 和芒果苷6.4 mg, 置于10 mL容量瓶中, 以乙醇溶解并定容, 配制成浓度分别为1.28 mg/mL 和0.64 mg/mL 的龙胆苦苷和芒果苷混合对照品溶液, 使用时稀释成所需要的浓度。

1.3 色谱条件

Agilent Eclipse-XDB C₁₈(250 × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相: 甲醇-水(含0.04%乙酸)体系, 流速1.0 mL/min, 柱温25 °C, 检测波长254 nm, 其梯度洗脱程序见表1。此条件下的标准品及样品色谱图见图1和2。

1.4 标准曲线的绘制

将混和对照品溶液逐级稀释后配成如下浓度: (1)龙胆苦苷0.08、0.16、0.32、0.64和1.28 mg/mL; (2)芒果苷0.04、0.08、0.16、0.32和0.64 mg/mL。分别取上述对照品混和溶液5 μL, 注入高效液

表1 梯度淋洗程序

Table 1 Gradient elution program

时间 Time (min)	甲醇 Methanol (%)	水 Water (%)
0	24	76
10	34	66
15	50	50
20	70	30

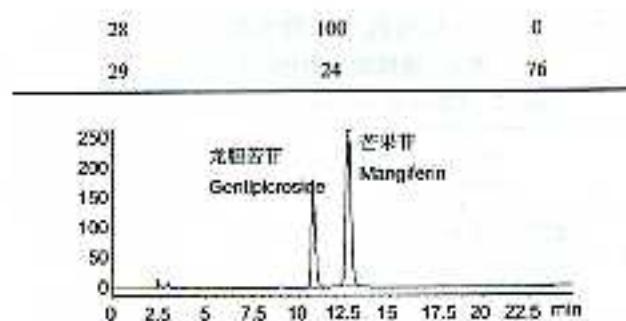


图1 对照品色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of the standards

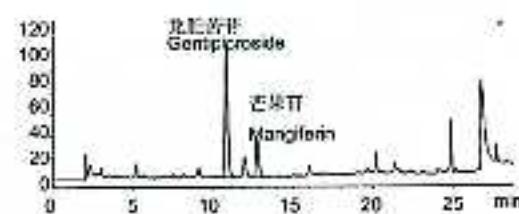


图2 样品色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatogram of the sample

相色谱仪进行检测。拟合峰面积(Y)和样品浓度(X , mg/mL)作回归曲线见图3和4, 得回归方程: (1)龙胆苦苷 $Y = 6027.4X + 6.9, R^2 = 1$; (2)芒果苷 $Y = 12935X - 42.6, R^2 = 0.9999$ 。

1.5 龙胆苦苷与芒果苷提取率的计算

将HPLC法测得的龙胆苦苷与芒果苷峰面积值代入回归方程, 即可求出样品中龙胆苦苷和芒果苷的浓度 C 再代入下式, 计算出它们的提取率。

$$\text{提取率}(\%) = \frac{C \times V}{W \times 1000} \times 100\%$$

式中: V 为定容体积(mL), W 为样品处理前干重(g), C 为样品龙胆苦苷和芒果苷浓度 mg/mL。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂选择

准确称取川西獐牙菜样品3份各0.300 g 置于25 mL具塞三角瓶中, 分别加入20 mL的50%甲醇、50%乙醇、50%丙酮溶液。浸泡1 h后, 在温度20 °C、超声功率500 W条件下提取1次, 每次20 min。提取完成后过滤、转移并定容于25 mL的容量瓶中, 插勾。样品测定前0.45 nm 滤膜过滤, 在选定HPLC色谱条件下进行测定, 结果见表2。结果表明: 甲醇溶液提取率最高, 乙醇次之, 丙酮最低。甲醇和乙醇的提取率较相近, 但甲醇毒性较大, 不利于

大批量生产,本实验选用乙醇水溶液为提取溶剂。

表2 提取溶剂对提取率的影响

Table 2 Effect of solvent on extraction efficiency

溶剂 Solvent	50% 甲醇 50% Methanol	50% 乙醇 50% Ethanol	50% 丙酮 50% Acetone
	龙胆苦苷提取率(%) Extraction efficiency of gentipicroside	2.23	2.25
芒果苷提取率(%) Extraction efficiency of mangiferin	0.54	0.50	0.50
合计提取率(%) Total extraction efficiency	2.82	2.75	2.53

2.2 单因素实验

2.2.1 乙醇浓度对提取率的影响

准确称取川西獐牙菜样品5份各0.300 g,置于25 mL具塞三角瓶中,分别加入20 mL 10%、30%、50%、70%和90%的乙醇溶液。浸泡1 h,在温度20 ℃、超声功率500 W条件下提取1次,每次20 min。提取完成后过滤、转移并定容于25 mL的容量瓶,摇匀。样品测定前0.45 nm滤膜过滤,在选定HPLC色谱条件下进行测定,结果见图3。结果表明:随乙醇浓度的增加,龙胆苦苷和芒果苷的提取率呈明显增加趋势,在乙醇浓度为70%时提取率达到最高,90%时又略有下降。

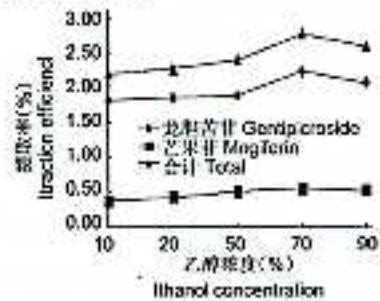


图3 乙醇浓度对提取率的影响

Fig. 3 Effect of ethanol concentration on extraction efficiency

2.2.2 超声功率对提取率的影响

准确称取川西獐牙菜样品5份各0.300 g置于25 mL具塞三角瓶中,加20 mL 50%的乙醇溶液。浸泡1 h后,在功率80 W、120 W、160 W、200 W和500 W的条件下提取1次,时间20 min。提取完成后过滤、转移并定容于25 mL的容量瓶中,摇匀。样品测定前0.45 nm滤膜过滤,在选定HPLC色谱条件下进行测定,结果见图4。结果表明:超声功率的变化对提取率无明显影响,超声功率为200 W时,龙胆

苦苷和芒果苷提取率较高。

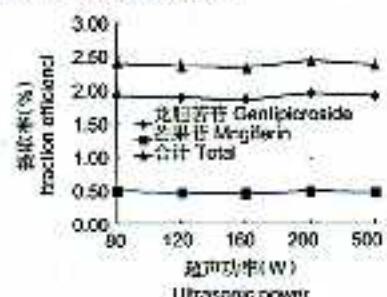


图4 超声功率对提取率的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic power on extraction efficiency

2.2.3 料液比对提取率的影响

准确称取川西獐牙菜样品5份各0.300 g置于25和50 mL具塞三角瓶中,分别按料液比1:20、1:40、1:60、1:80和1:100的比例加50%的乙醇溶液。浸泡1 h后,在超声功率500 W下提取1次,时间20 min。提取完成后过滤、转移并定容于25 mL的容量瓶中,摇匀。样品测定前0.45 nm滤膜过滤,在选定HPLC色谱条件下进行测定,结果见图5。结果表明:龙胆苦苷和芒果苷提取率随着料液比的增加而变大,但从1:60以后增加趋于缓慢。

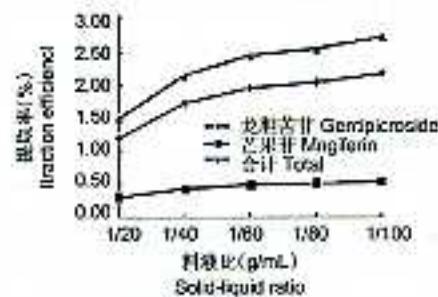


图5 料液比对提取率的影响

Fig. 5 Effect of Ratio of solid to liquid on extraction efficiency

2.2.4 提取时间对提取率的影响

准确称取川西獐牙菜样品5份各0.300 g置于25 mL具塞三角瓶中,加20 mL 50%乙醇。浸泡1 h后,在超声功率500 W条件下提取1次,提取时间为10、15、20、25和30 min。提取完成后过滤、转移并定容于25 mL的容量瓶中,摇匀。样品测定前0.45 nm滤膜过滤,在选定HPLC色谱条件下进行测定,结果见图6。结果表明:随着时间的延长龙胆苦苷和芒果苷提取率变化不大,甚至有所下降,以10至20 min为宜。

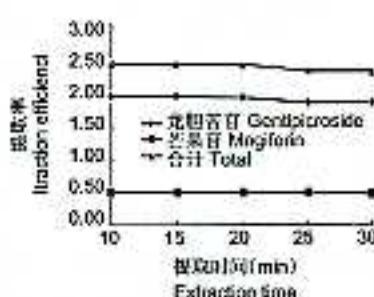


图 6 超声时间对提取率的影响

Fig. 6 Effect of ultrasonic time on extraction efficiency

2.2.5 提取次数对提取率的影响

准确称取川西獐牙菜样品 4 份各 0.300 g 置于 25 mL 具塞三角瓶中, 加 20 mL 50% 乙醇溶液。浸泡 1 h 后, 在超声功率 500 W 条件下提取 20 min, 提取次数分别为 1、2、3 和 4 次。提取完成后过滤、转移并定容于 25 mL 的容量瓶中, 摆匀。样品测定前 0.45 nm 滤膜过滤, 在选定 HPLC 色谱条件下进行测定。结果见图 7, 结果表明: 在提取次数为 2 次时

提取率达到最大, 以后随之减少, 但减小幅度不大, 说明在提取 2 次以后龙胆苦苷和芒果苷被基本提取尽, 故实验选择 2 次为宜。

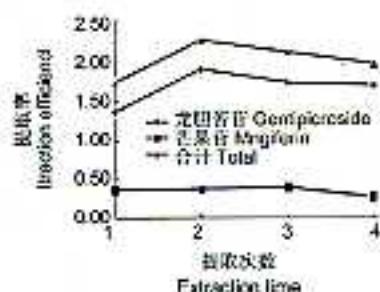


图 7 提取次数对提取率的影响

Fig. 7 Effect of extraction times on extraction efficiency

2.3 提取条件的优化设计

川西獐牙菜样品的提取过程受很多因素的影响, 本试验主要考察了超声提取时间、次数、功率、乙醇浓度、料液比等因素对两类苷类成分提取率的影响。在考察了以上各单因素影响的基础上, 其正交实验按表 3 设计的条件进行。

表 3 因素水平设计
Table 3 Level design of the factor

水平 Level	A 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	B 超声功率 Ultrasonic power (W)	C 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	D 提取时间 Extraction time (min)	E 提取次数 Extraction times
1	30	80	1:40	10	1
2	50	120	1:60	15	2
3	70	160	1:80	20	3
4	90	200	1:100	25	4

2.4 正交实验结果

对正交实验有关数据作极差分析, 结果见表 4。

由表 4 的数据可知, 川西獐牙菜两种苷类的最佳的提取工艺条件为 C₂A₂E₂D₃B₂, 即 50% 乙醇溶液, 料液比 1:60, 提取 2 次, 提取时间 20 min, 超声功率 120 W。从极差分析得知各因素对川西獐牙菜

两种苷类的提取影响大小分别为 C > A > E > D > B, 料液比对提取的影响最大, 乙醇浓度次之, 超声功率影响最小。优化后的最佳提取工艺条件为 50% 乙醇作溶剂, 料液比 1:60, 提取 2 次, 提取时间 20 min, 超声功率 120 W。

表 4 正交实验结果与分析
Table 4 Results and analysis of orthogonal test

试验号 Test No.	A	B	C	D	E	提取率 Extraction efficiency (%)
1	1	1	1	1	1	1.56
2	1	2	2	2	2	2.18
3	1	3	3	3	3	2.18
4	1	4	4	4	4	1.80

5	2	1	2	3	4	2.35
6	3	2	1	4	3	2.05
7	2	3	4	1	2	2.34
8	1	4	3	2	1	2.20
9	3	1	3	4	2	2.19
10	2	2	4	3	1	2.07
11	3	3	1	2	4	1.92
12	3	4	2	1	3	2.42
13	4	1	4	2	3	1.73
14	4	2	3	1	4	2.24
15	4	3	2	4	1	1.89
16	4	4	1	3	2	2.05
K ₁	7.72	7.83	7.58	8.56	7.72	
K ₂	8.94	8.54	8.84	8.03	8.76	
K ₃	8.60	8.33	8.81	8.65	8.38	
K ₄	7.91	8.47	7.94	7.93	8.31	
R	1.22	0.71	1.26	0.72	1.04	

结果表明最佳条件下川西獐牙菜中两种苷类提

按以上最佳条件进行重复进行 5 次实验, 结果
见表 5。

表 5 最佳条件下的验证试验结果

Table 5 Validate results of the optimum conditions

样品号 Sample No.	1	2	3	4	5	平均值 Average	RSD%
提取率 Extraction efficiency(%)	2.16	2.18	2.02	2.14	2.07	2.11	0.03

3 结论

本文用单因素实验和正交实验优化了超声提取川西獐牙菜中龙胆苦苷和芒果苷的提取工艺条件。结果表明, 用 50% 乙醇溶液, 料液比 1:60, 提取 2 次, 提取时间 20 min, 超声功率 120 W, 即可得到较理想的提取率。

参考文献

- Zou HY(邹寒雁). Development and utilization of Chinese traditional medicine in Qinghai Province(青海省中药资源开发及利用研究). Beijing: Oriental Press, 1990.
- Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. Economic flora of Qinghai Province(青海经济植物志). Xining: Qinghai People's Press, 1987, 453-454.

3 Ji LJ(纪兰菊), Sun HF(孙洪发), Ding JY(丁经业), et al. Preliminary study on chemical constituents of four kinds of gentian plants in Tibetan Plateau. *Bulletin of Plateau Biology*(高原生物学集刊), 1992, 11:113.

4 Yu FZ(余放争), Dong GP(董光平). The pharmacological and chemical research review of medicinal plants in *Saxifraga L.*. *Chinese J Ethnomedicine and Ethnopharmacy*(中国民族民间医药), 1999, 36:53-55.

5 Sun WJ(孙文基), Sheng JF(绳金房). Concise Handbook of Natural Active Ingredients(天然活性成分简明手册). Beijing: China Medical Science and Technology Press.

6 Shi VJ, Baner J, Topas KS. Assessment of the antiinflammatory effect of *Saxifraga chinata* in acute and chronic experimental models in male Albino rat. *India Journal of pharmacology*, 2000, 32:21-24.

(下转第 133 页)