

玄参环烯醚萜苷热回流提取工艺的优化

周炳文， 钟晓明， 黄 真*
(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: **目的** 优化玄参环烯醚萜苷热回流提取工艺。**方法** 在单因素试验基础上, 以提取温度、料液比、提取时间为影响因素, 梓醇、桃叶珊瑚苷、哈巴苷、哈巴俄苷的总峰面积为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。**结果** 最佳条件为提取溶剂无水甲醇, 提取温度 73 ℃, 料液比 1 : 15, 提取时间 1.2 h, 总峰面积 4.39×10^6 。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于热回流提取玄参环烯醚萜苷。
关键词: 玄参; 环烯醚萜苷; 热回流提取; Box-Behnken 响应面法
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)06-1292-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.06.013

Heat reflux extraction optimization for iridoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*

ZHOU Bing-wen, ZHONG Xiao-ming, HUANG Zhen*
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

KEY WORDS: *Scrophularia ningpoensis* Hemsl.; iridoid glycosides; heat reflux extraction; Box-Behnken response surface method

玄参是玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根, 其味甘、苦、咸, 性寒, 具有滋阴降火、清热凉血、解毒散结的功效, 用于热入营血、温毒发斑、热病伤阴、舌绛烦渴、津伤便秘、痈肿疮毒等症状^[1]。环烯醚萜苷作为玄参质量控制的标准, 是其发挥药效的主要成分之一^[2], 具有抗微生物、保肝、降血糖、抗心脑血管疾病等作用^[3-7], 骨架主要分为 4 类^[8-9], 包括环戊烷型, 如哈巴苷、哈巴俄苷; 7, 8-环戊烯型, 如桃叶珊瑚苷; 7, 8-环氧烷型, 如梓醇; 变异环烯醚萜。本实验选择梓醇、桃叶珊瑚苷、哈巴苷、哈巴俄苷作为研究对象, 采用 Box-Behnken Design 响应面法优化玄参环烯醚萜苷热回流提取工艺。

1 材料

1.1 仪器 Waters 型高效液相色谱仪, 配置 1525 二元泵、2489 紫外检测器、2707 自动进样器、

Empower2 工作站; AL104 型电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); KQ-300DE 型超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); CLF-20C 型高速粉碎机 (浙江省温岭市创立药材器械厂)。
1.2 试药 乙腈为色谱纯 (美国天地公司); 磷酸为分析纯 (浙江新安化工集团股份有限公司, 批号 20051027); 甲醇 (批号 20170526)、乙醇 (批号 20170423) 为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司); 水为娃哈哈纯净水。梓醇、桃叶珊瑚苷、哈巴苷、哈巴俄苷对照品均购于上海源叶生物科技有限公司, 含量 $\geq 98\%$ 。玄参购于浙江天道医药有限公司, 经浙江中医药大学中药资源研究所黄真教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 含有量测定

2.1.1 色谱条件 waters Xbridge C₁₈ 色谱柱

收稿日期: 2017-11-29
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573643); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY15H280004)
作者简介: 周炳文 (1992—), 男, 硕士生。Tel: 18267134061, E-mail: zbw1992@yeah.net
* 通信作者: 黄 真 (1963—), 教授, 博士生导师, 研究方向为中药品质评价与资源开发利用。Tel: 13605818929, E-mail: huang-zhen@zcmu.edu.cn

(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 0.025% 磷酸水 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱 (程序见表 1); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 26 ℃; 检测波长 210 nm (梓醇、桃叶珊瑚苷、哈巴苷)、278 nm (哈巴俄苷); 进样量 30 μL。色谱图见图 1。

表 1 梯度洗脱条件

Tab. 1 Gradient elution conditions		
时间/min	A 0.025% 磷酸水/%	B 乙腈/%
0 ~ 7	98.4	1.6
7 ~ 11	96	4
11 ~ 18	96	4
18 ~ 29	78.4	21.6
29 ~ 40	68.4	31.6
40 ~ 60	68.4	31.6

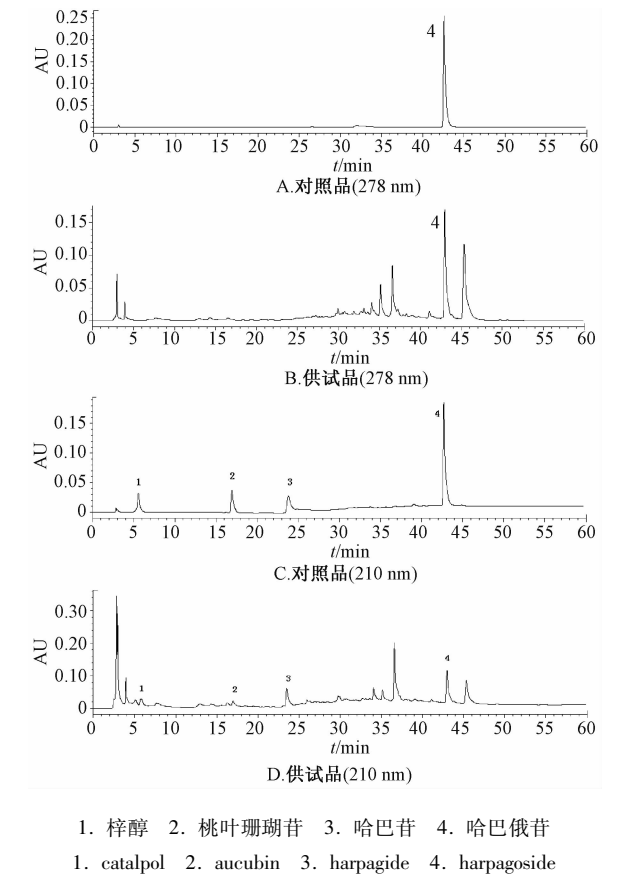


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取对照品梓醇 0.83 mg、桃叶珊瑚苷 1.03 mg、哈巴苷 1.06 mg、哈巴俄苷 1.14 mg, 置于 5 mL 量瓶中, 30% 甲醇溶解定容至刻度, 各取 1 mL 置于 5 mL 量瓶中, 30% 甲醇定容至刻度, 即得。

2.1.3 供试品溶液制备 称取药材粉末 2 g, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 40 mL 水浸泡 1 h, 70 ℃ 加热回流 2 h, 提取液定容至 100 mL, 吸取上层清

液 2 mL 于 5 mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 即得。

2.1.4 线性关系考察 取“2.1.2”项下对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样 2、4、6、8、10、20、30 μL 测定, 以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行回归, 得回归方程分别为梓醇 $Y = 2 \times 10^8 X - 33\,403$ ($r = 0.999\,6$), 线性范围 0.000 16 ~ 0.004 8 mg; 桃叶珊瑚苷 $Y = 3 \times 10^8 X - 67\,587$ ($r = 0.999\,4$), 线性范围 0.000 4 ~ 0.006 mg; 哈巴苷 $Y = 4 \times 10^8 X + 16\,920$ ($r = 0.999\,9$), 线性范围 0.000 4 ~ 0.006 mg; 哈巴俄苷 $Y = 2 \times 10^9 X - 522\,222$ ($r = 0.999\,6$), 线性范围 0.000 44 ~ 0.006 6 mg。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.2”项下对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 每次 10 μL, 测得梓醇、桃叶珊瑚苷、哈巴苷、哈巴俄苷峰面积 RSD 分别为 1.61%、1.76%、0.27%、0.53%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取 6 份药材粉末, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 每次 30 μL, 测得梓醇、桃叶珊瑚苷、哈巴苷、哈巴俄苷峰面积 RSD 分别为 1.17%、1.76%、0.28%、0.54%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液, 于 0、2、4、6、8、12、24、48、72 h 在“2.1”项色谱条件下进样 10 μL 测定, 测得梓醇、桃叶珊瑚苷、哈巴苷、哈巴俄苷峰面积 RSD 分别为 3.91%、3.19%、1.06%、3.93%, 表明溶液在 72 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取含有量已知的药材粉末 2 g, 共 6 份, 加入 100% 水平的对照品溶液, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果, 梓醇、桃叶珊瑚苷、哈巴苷、哈巴俄苷平均加样回收率分别为 95.76%、98.26%、97.47%、96.75%, RSD 分别为 4.26%、2.70%、1.87%、3.03%。

2.2 单因素试验

2.2.1 提取溶剂种类 取药材粉末 2 g, 分别加入 40 mL 水、30% 乙醇、30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、90% 甲醇、无水甲醇冷浸 1 h 后, 70 ℃ 加热回流 2 h, 提取液定容至 100 mL, 取上清液 2 mL 于 5 mL 量瓶中, 定容至刻度, 进样 30 μL。结果, 无水甲醇提取时总峰面积最大, 故选择其作为最佳提取溶剂。

2.2.2 提取温度 取药材粉末 2 g, 加入 40 mL 无

水甲醇，冷浸1 h后，于60、70、80、90℃加热回流2 h，提取液加无水甲醇定容至100 mL，取2 mL上清液于5 mL量瓶中，加水定容至刻度，在“2.1”项色谱条件下进样30 μL测定，结果见图2。由图可知，随着提取温度升高，总峰面积先增大后减小，在70℃时最大。环烯醚萜苷具有一定的热不稳定性，当温度过高时易分解生成其他物质，导致总峰面积降低，提取率下降^[10]，故选择60~80℃进行考察。

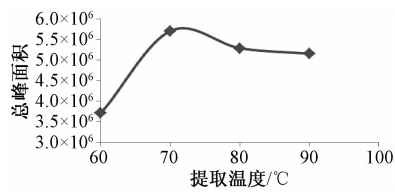


图2 提取温度对环烯醚萜苷提取率的影响
Fig.2 Effect of extraction temperature on the extraction rate of iridoid glycosides

2.2.3 料液比 取药材粉末2 g，加入20、30、40、50、60 mL无水甲醇，冷浸1 h后，70℃加热回流2 h，无水甲醇定容至100 mL，取2 mL上清液于5 mL量瓶中，加水定容至刻度，在“2.1”项色谱条件下进样30 μL测定，结果见图3。由图可知，随着料液比增加，总峰面积先增大后减小，在1:15时最大。总峰面积初期的升高与成分向溶剂扩散有关，料液比过小时，两相界面间的浓度差较小，不利于成分扩散；料液比大于1:15时，总峰面积反而降低，这可能是受到已提成分对未提成分协同浸提作用的影响；料液比过大，成分质量浓度下降，不利于协同浸提，总峰面积反而降低^[11]，故选择1:10~1:20进行考察。

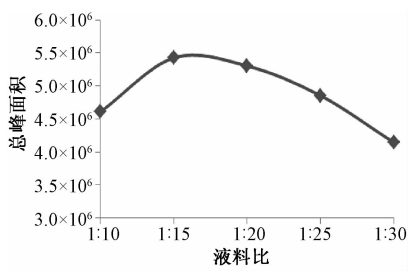


图3 料液比对环烯醚萜苷提取率的影响
Fig.3 Effect of solid-liquid ratio on the extraction rate of iridoid glycosides

2.2.4 提取时间 取药材粉末2 g，加入30 mL无水甲醇，冷浸1 h后，于70℃加热回流1、1.5、2、2.5、3 h，无水甲醇定容至100 mL，取2 mL上清液于5 mL量瓶中，加水定容至刻度，在“2.1”

项色谱条件下进样30 μL测定，结果见图4。由图可知，随着提取时间增加，总峰面积先增大后减小，在1.5 h时最大；进一步增加时，环烯醚萜苷易发生分解，总峰面积反而降低，故选择1~2 h进行考察。

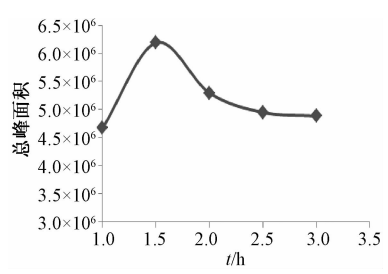


图4 提取时间对环烯醚萜苷提取率的影响
Fig.4 Effect of extraction time on the extraction rate of iridoid glycosides

2.2.5 提取次数 取药材粉末2 g，加入30 mL无水甲醇，冷浸1 h后，70℃加热回流1.5 h，提取1、2、3次，合并提取液，无水甲醇定容至100 mL，取2 mL上清液于5 mL量瓶中，加水定容至刻度，在“2.1”项色谱条件下进样30 μL测定，结果见图5。由图可知，随着提取次数增加，总峰面积增大，并且提取2、3次时变化不显著，综合考虑成本等因素，选择提取次数为2次。

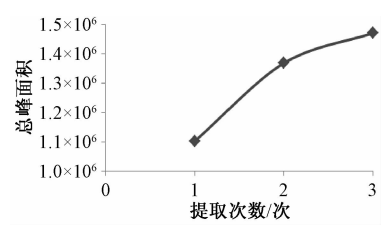


图5 提取次数对环烯醚萜苷提取率的影响
Fig.5 Effect of extraction times on the extraction rate of iridoid glycosides

2.3 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验基础上，选择提取温度(A)、料液比(B)、提取时间(C)作为影响因素，总峰面积作为评价指标(Y)。因素水平见表2，试验设计及结果见表3。

表2 因素水平
Tab.2 Factors and levels

水平	因素		
	A 提取温度/℃	B 料液比	C 提取时间/h
-1	60	1:10	1
0	70	1:15	1.5
1	80	1:20	2

将表3数据通过 Design-Expert 8.0.6 软件进行

分析,得到回归方程为 $Y = 4.553 \times 10^6 + 3.476 \times 15\,118.5AC + 14\,584.75BC - 5.979 \times 10^5A^2 - 10^5A + 23\,554.25B - 84\,082.38C - 10\,297.75AB + 4.499 \times 10^5B^2 - 643\,46.45C^2$ 。方差分析见表 4。

表 3 试验设计与结果
Tab. 3 Design and results of tests

试验号	A 提取温度/℃	B 料液比	C 提取时间/h	Y 总峰面积($\times 10^{-6}$)
1	1	1	0	3.72
2	0	0	0	4.69
3	-1	1	0	3.34
4	0	-1	-1	4.10
5	1	0	-1	4.47
6	0	0	0	4.32
7	0	0	0	4.59
8	0	0	0	4.50
9	0	-1	1	3.94
10	0	0	0	4.67
11	0	1	-1	4.11
12	1	-1	0	3.69
13	-1	0	-1	3.51
14	1	0	1	4.30
15	0	1	1	4.07
16	-1	-1	0	3.27
17	-1	0	1	3.28

表 4 方差分析
Tab. 4 Analysis of variance

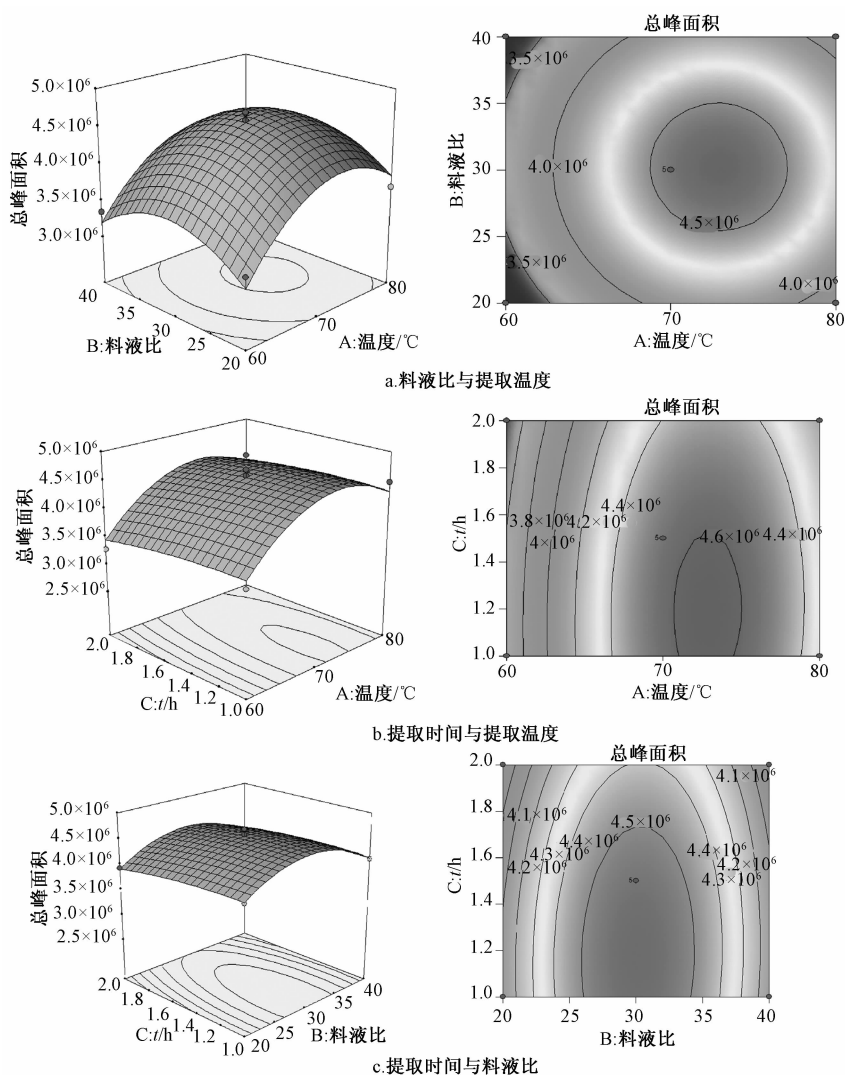
来源	离均差平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	3.58×10^{12}	9	3.97×10^{11}	10.3	0.002 8
A	9.66×10^{11}	1	9.66×10^{11}	25.1	0.001 5
B	4.44×10^9	1	4.44×10^9	0.115	0.744 2
C	5.66×10^{10}	1	5.66×10^{10}	1.47	0.264 9
AB	4.24×10^8	1	4.24×10^8	0.011 0	0.919 4
AC	9.14×10^8	1	9.14×10^8	0.023 7	0.881 9
BC	8.51×10^8	1	8.51×10^8	0.022 1	0.886 0
A ²	1.51×10^{12}	1	1.51×10^{12}	39.1	0.000 4
B ²	8.52×10^{11}	1	8.52×10^{11}	22.1	0.002 2
C ²	1.74×10^{10}	1	1.74×10^{10}	0.453	0.522 6
残差	2.70×10^{11}	7	3.85×10^{10}		
失拟项	1.79×10^{11}	3	5.98×10^{10}	2.66	0.184 4
纯误差	9.01×10^{10}	4	2.25×10^{10}		
总离差	3.85×10^{12}	16			

由表 4 可知,模型 $P < 0.05$,失拟项 $P > 0.05$,决定系数 R^2 为 0.929 9, R^2_{adj} 为 0.839 8,表明模型准确可靠,通用性良好;各因素影响程度依次为提取温度 > 提取时间 > 料液比,其中提取温度对提取率的影响较显著 ($P < 0.05$),而交互项则不显著 ($P > 0.05$),响应面分析见图 6。由此确定,最优工艺为提取溶剂无水甲醇,提取温度 72.82 ℃,料液比 1 : 15.065,提取时间 1.19 h,考虑到实际操作,最终将其修正为提取溶剂无水甲醇,提取温度 73 ℃,料液比 1 : 15,提取时间 1.2 h,总峰面积 4.63×10^6 。

2.4 验证试验 根据“2.3”项下优化工艺,进行 3 次验证试验,测得总峰面积为 4.39×10^6 ,与预测值 4.63×10^6 相当,表明模型拟合效果良好,可信度高。

3 结论

目前,以哈巴昔、哈巴俄昔作为玄参环烯醚萜苷类成分质量控制指标的报道较多^[12-16]。本实验选择梓醇、桃叶珊瑚苷、哈巴昔、哈巴俄昔作为研究对象优化热回流提取工艺,可为该成分工业化生产提供理论依据。



注：左图均为响应面图，右图均为等高线图

图 6 各因素响应面图

Fig. 6 Response surface plots for various factors

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：117.
- [2] 许福泉，许旭东，陈士林. 玄参化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国现代中药，2013，15(9)：752-759.
- [3] Li Y M, Jiang S H, Gao W Y, et al. Iridoid glycosides from *Srophularia ningpoensis* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50 (1)：101-104.
- [4] Li C G, Qu G R. The progress in the development of anti hepatitis virus drugs[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2002, 14(6)：81-87.
- [5] 金 雷. 桃叶珊瑚苷对糖尿病大鼠的抗氧化作用研究 [D]. 大连：大连理工大学，2007.
- [6] 胡瑛瑛，黄 真. 玄参的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 浙江中医药大学学报，2008，32(2)：268-270.
- [7] 楼烨亮，陈梦静，王 可，等. 哈巴苷对急性脑缺血及线粒体介导的 Caspase 依赖性细胞凋亡信号通路的影响[J]. 中国药理学通报，2017，33(4)：563-567.
- [8] 高 鑫，董婉茹，陈平平，等. 玄参中环烯醚萜苷不同构架的药理学研究[J]. 哈尔滨商业大学学报（自然科学版），2016，32(6)：655-658.
- [9] 张召强，李 明. 玄参的化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 中国医药指南，2013，11(26)：49-51.
- [10] 党娟丽，郭东艳，史亚军，等. 响应面法优化生地黄中 4 种环烯醚萜苷提取工艺及热稳定性考察[J]. 中南药学，2017，15(6)：745-749.
- [11] 张吉祥，欧来良. 枣核总黄酮的微波辅助提取工艺优化 [J]. 食品科学，2012，33(16)：45-49.
- [12] 傅 亚，范 佳，陈 芳，等. 微波辅助萃取法提取玄参中哈巴苷和哈巴俄苷的工艺研究[J]. 天然产物研究与开发，2015，27(11)：1938-1942.
- [13] 陈 鹏，李 硕，邱 佳，等. 玄参药材质量控制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21(18)：220-225.
- [14] 贾成友，张传辉，赵凤平，等. 玄参饮片质量控制方法研究[J]. 天然产物研究与开发，2015，27(8)：1385-1390.

- [15] 白云娥,袁鹏飞,王庆辉,等. HPLC-UV 波长转换法测定
玄参药材及饮片中哈巴苷与哈巴俄苷的含量[J]. 中国中
药杂志, 2011, 36 (19): 2697-2702.
- [16] 龚友兰,刘东亮,龙亦文,等. 均匀试验法优选玄参总环
烯醚萜苷提取工艺[J]. 中医药导报, 2016, 22 (24):
43-46.

卵磷脂/果胶锌凝胶球在 3 种缓冲液中的释放行为

谭丽珠, 赵基思, 张分地, 陈容容, 何婷香, 武文洁*
(天津科技大学化工与材料学院, 天津 300457)

摘要: **目的** 研究卵磷脂/果胶锌凝胶球在 3 种缓冲液中的释放行为。**方法** 以酮洛芬为模型药物, 果胶、卵磷脂、氯化锌为原料, 制备凝胶球。然后, 以溶胀度、释药率、锌离子含量为指标, 考察凝胶球在不同缓冲液 (Sorensen、Mc Ilvaine, 含磷酸盐; Tris, 不含磷酸盐) 中的溶胀及释放行为。**结果** 在 Mc Ilvaine 缓冲液中, 凝胶球破碎严重, 释药率高; 在 Sorensen 缓冲液中, 凝胶球逐渐变小但不破碎, 释药率低, 两者均有白色不溶物产生; 在 Tris 缓冲液中, 凝胶球形状不变, 释药率介于其他 2 种缓冲液之间, 无白色不溶物产生。添加卵磷脂后, 凝胶球溶胀度、释药率降低, 锌离子释放率提高。**结论** 卵磷脂/果胶锌凝胶球的释放行为受缓冲液组成影响, 卵磷脂对其有疏水和缓释作用。

关键词: 卵磷脂; 果胶锌; 凝胶球; 释放行为; 缓冲液

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)06-1297-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.06.014

Release behaviors of lecithin/zinc pectin gel beads in three buffer solutions

TAN Li-zhu, ZHAO Ji-si, ZHANG Fen-di, CHEN Rong-rong, HE Ting-xiang, WU Wen-jie*
(College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

KEY WORDS: lecithin; zinc pectin; gel beads; release behaviors; buffer solutions

果胶在胃肠道上部不消化, 但会被结肠菌群降解, 故其凝胶球具有结肠定位特性, 广泛用于药物制剂研究^[1-4], 然而也存在易溶胀的缺点。为了实现结肠定位给药的目的, 课题组^[5-6]前期通过添加卵磷脂与果胶复合制备凝胶球, 研究释药性能, 发现药物释放特性与凝胶球中残存金属离子含量有一定相关性, 值得进一步深入研究。

研究表明, 体外模拟液常采用磷酸盐缓冲液^[7-9], 但仅考虑缓冲液 pH 值并不能充分反映药物释放和凝胶球溶胀行为。本实验选择含磷酸盐 (Sorensen, S; Mc Ilvaine, M)、不含磷酸盐 (Tris, T) 的缓冲液进行体外模拟释放研究, 以期可更全面地反映药物释放特点。

1 材料与仪器

果胶 (酯化度 62% ~ 66%, 半乳糖醛酸 ≥ 70%, 三门峡富元果胶工业有限公司); 卵磷脂 (PC-60, 北京华清美恒天然产物技术开发有限公司); 酮洛芬 (KTP, 含量 ≥ 98%, 上海笛柏生物科技有限公司)。三羟甲基氨基甲烷、氯化锌、柠檬酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氢氧化钠均为分析纯。ZRS-8G 型智能溶出度测定仪 (天津海益达科技有限公司); UV-1800 型紫外可见分光光度计 (上海美普达仪器有限公司); TAS-990 型原子吸收分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司)。

2 方法

2.1 凝胶球制备^[10] 向 4% 果胶液中加入

收稿日期: 2017-10-23

基金项目: 天津科技大学大学生实验室创新基金 (1503A208)

作者简介: 谭丽珠 (1992—), 女, 硕士生, 从事天然产物提取与改性研究。Tel: (022) 60601172, E-mail: 13682106389@163.com

* 通信作者: 武文洁 (1963—), 女, 硕士, 教授, 从事天然产物提取与改性研究。Tel: (022) 60601172, E-mail: wwjie@tust.edu.cn