

多指标正交试验优选升麻提取工艺

靳波,刘友平*,彭月,陈鸿平,赵祎姗

(成都中医药大学药学院中药资源系统研究与开发利用省部级共建国家重点实验室培育基地,成都 611137)

[摘要] 目的:优选升麻的最佳提取工艺。方法:首次以升麻总皂苷(以升麻苷 H-1 计)和总酚酸(以咖啡酸、阿魏酸和异阿魏酸含量之和计)的含量为综合评价指标,采用多指标正交试验法进行提取工艺研究,得升麻的最佳提取工艺。结果:升麻的最优提取工艺为 6 倍量 70% 乙醇-0.1 mol·L⁻¹ HCl(95:5)提取 3 次,每次 2 h。结论:优选得到的工艺稳定、可行,为规范升麻的提取工艺提供了理论依据,也为升麻进一步的合理研究与利用奠定基础。

[关键词] 升麻;提取工艺;正交试验;总皂苷;总酚酸

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0027-03

Optimization Investigation of Extraction Technology of Rhizome Cimicifugae by Orthogonal Test with Multi-targets

JIN Bo,LIU You-ping*,PENG Yue,CHEN Hong-ping,ZHAO Yi-shan

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine,Pharmacy,Laboratory of Resources System

Research and Development Utilization of Traditional Chinese Medicine Constructioned by

PRC and Sichuan Province,Chengdu 611137,China)

[Abstract] Objective:To optimize the extraction technology of Rhizome Cimicifugae. Method:The content of total saponins (measured by cimicifuga glycosides H-1) and total phenolic acids (the sum of ferulic acid, isoferulic acid and caffeic acid) was selected as the evaluation index for the first time. Orthogonal test was carried out to achieve the best extraction technology of Rhizome Cimicifugae by multiple guidelines grading methods. Result:The optimum extraction condition was that the medicinal materials were extracted 3 times with 6 times amount of 70% alcohol-0.1mol·L⁻¹ HCl (95:5) and for 1.5 hours per time. Conclusion:The optimum extraction condition was stable and feasible. It will provide a theoretical basis for regulating the extracting process of Rhizome Cimicifugae and lay the foundation to the further research and use of Rhizome Cimicifugae.

[Key words] Rhizome Cimicifugae; extraction technology; orthogonal test; total saponins; total phenolic acids

升麻为毛茛科植物大三叶升麻 *Cimicifuga heracleifolia* Kom.、兴安升麻 *C. dahurica* (Turcz.)

Maxim.或升麻 *C. foetida* L. 的干燥根茎。其味辛、微甘,微寒,有发表透疹,清热解毒,升举阳气之功效^[1]。其中的主要化学成分有环菠萝蜜烷型三萜及其衍生物,阿魏酸、异阿魏酸等咖啡酸衍生物和色酮类化合物等^[2]。现代药理研究证实升麻中的三萜化合物具抑制核苷转运、抗病毒及防治骨质疏松等多种活性,酚酸类化合物具有抗炎、解热、镇痛、镇静、抗氧化等作用^[3]。由于中药药效物质基础的复杂性,为避免单一指标进行工艺优化时产生的偏差,本文首次以升麻总皂苷(以升麻苷 H-1 计)和总酚酸

[收稿日期] 20101101(007)
[基金项目] 质检公益性行业科研专项(2007GYB075-2);校学生科研实践创新课题(013-011-39)
[第一作者] 靳波,硕士研究生,研究方向:中药化学成分与质量标准化研究, Tel: 15882061845, E-mail: jinboliyuan@126.com
[通讯作者] * 刘友平,研究员,博士生导师,研究方向:中药质量标准化及药效物质基础研究, Tel: 028-61800235, E-mail: yxjxsy@cdutcm.edu.cn

(以咖啡酸、阿魏酸和异阿魏酸含量之和计)的含量为综合评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,系统地考察了提取过程中的溶媒用量、提取时间和提取次数等因素,为规范升麻的提取工艺提供理论依据,也为升麻进一步的合理研究与利用奠定基础。

1 材料

LC-10A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); CLASS-VP 工作站(日本岛津公司); SPD-10A 紫外检测器(日本岛津公司);紫外-可见分光光度计 UV-VIS 8500(无锡科达公司); BP211D 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司)。

阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110773-200611);异阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111698-200602);咖啡酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110885-200102);升麻苷 H-1 对照品(自制,纯度 >98%);乙腈(色谱纯),水为自制的超纯水,其他试剂均为分析纯。

升麻(购于西南药都,经成都中医药大学陈新教授鉴定为升麻 *C. foetida* L. 的干燥根茎)。

2 方法与结果

2.1 有效成分含量测定

2.1.1 UV 测定总皂苷的含量 以升麻苷 H-1 为对照品,5% 香草醛-高氯酸(1:4)的显色体系,于 60 ℃ 水浴中加热 15 min,置冰水中冷却 2 ~ 3 min,于 537 nm 处测定吸光度。方法学考察见文献[4]。

2.1.2 HPLC 测定总酚酸的含量 采用 Hypersil BDS C_{18} (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 色谱柱,乙腈-0.1% 磷酸水(15:85)为流动相,测定波长 316 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。

2.2 提取工艺研究

2.2.1 提取溶媒的选择 由于皂苷和酚酸类化合物在乙醇中的溶解度均较好,本实验对不同体积分数乙醇的提取作了比较,称取升麻药材 100 g,分别以 6 倍量不同浓度的乙醇回流提取 1.5 h。结果见表 1。

但由于 55% 乙醇提取物中非目标物成分过多,且回收乙醇较困难,不利于工业化大生产,故考虑 70% 乙醇为提取溶媒。

在试验中发现,阿魏酸和异阿魏酸有不同程度的分解现象发生,导致总酚酸含量测定不准确性,参考文献[5],在提取液中加入适量的 HCl,再次分别考察了 70% 乙醇,70% 乙醇-0.8 mol·L⁻¹ HCl(100:

2),70% 乙醇-0.1 mol·L⁻¹ HCl(95:5)作溶媒时回流提取 1.5 h 的提取效果。结果见表 2。

表 1 不同体积分数乙醇提取结果 %		
乙醇体积分数	总皂苷	总酚酸
40	0.71	0.05
55	1.07	0.07
70	1.03	0.07
85	0.73	0.05

表 2 不同提取溶媒试验结果 %		
提取溶媒	总皂苷	总酚酸
70% 乙醇	1.05	0.07
70% 乙醇-0.8 mol·L ⁻¹ HCl(100:2)	1.08	0.08
70% 乙醇-0.1 mol·L ⁻¹ HCl(95:5)	1.10	0.10

结果发现,70% 乙醇-0.1 mol·L⁻¹ HCl(95:5)能在适宜温度下明显抑制阿魏酸、异阿魏酸的水解,提高了提取率,增加了准确性,因此选择 70% 乙醇-0.1 mol·L⁻¹ HCl(95:5)作为提取溶媒。

2.2.2 提取方法的选择 结合工业生产实际,比较了回流提取和温浸提取 2 种方法。称取 100 g 升麻 2 份,1 份以 6 倍量 70% 乙醇-0.1 mol·L⁻¹ HCl(95:5)回流提取 2 次,每次 1.5 h。另 1 份以 6 倍量 70% 乙醇-0.1 mol·L⁻¹ HCl(95:5)60 ℃ 温浸提取 2 次,每次 1.5 h。2 种方法比较结果见表 3。

表 3 不同提取方法比较结果		
提取方法	总皂苷/%	总酚酸/%
乙醇浸渍	1.13	0.09
乙醇回流	1.59	0.15

由于乙醇回流效果明显优于乙醇浸渍,所以选择乙醇回流法来提取升麻。

2.2.3 正交试验设计 在单因素试验基础上采用正交试验优选提取工艺,进行 $L_9(3^4)$ 3 因素 3 水平正交试验,以升麻总皂苷和总酚酸的含量为综合评价指标,考察溶媒用量、提取时间和提取次数 3 个因素,每个因素各取 3 个水平。因素水平见表 4。

表 4 升麻提取工艺因素水平			
水平	A 溶媒用量/倍	B 提取时间/h	C 提取次数/次
1	6	1.5	1
2	8	2	2
3	10	2.5	3

2.2.4 正交试验结果 按照 $L_9(3^4)$ 正交设计表的条件进行试验,分别测定升麻总皂苷和总酚酸的含量。采用信息熵权重分析法^[9]确定总皂苷含量(X)

和总酚酸含量(Y)的权重系数分别为 0.5。根据各指标的权重,计算多属性综合评价指标,对正交试验数据进行综合分析。综合评分 = $(0.5X/2.04 + 0.5Y/0.1926) \times 100\%$,结果见表 5,6。

表 5 升麻提取工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

No.	A	B	C	D	总酚酸 /%	总皂苷 /%	综合评 分/%
1	1	1	1	1	0.09	1.17	50.10
2	1	2	2	2	0.15	1.57	74.19
3	1	3	3	3	0.21	1.93	97.30
4	2	1	2	3	0.16	1.63	78.05
5	2	2	3	1	0.19	2.04	95.24
6	2	3	1	2	0.11	1.39	60.26
7	3	1	3	2	0.18	1.82	87.47
8	3	2	1	3	0.11	1.36	59.52
9	3	3	2	1	0.15	1.52	72.97
K_1	221.59	215.62	169.88	218.31			
K_2	233.55	228.95	225.251	221.92			
K_3	219.96	230.53	280.01	234.87			
R	4.53	4.79	36.71	5.52			

表 6 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	36.71	2	0.726	>0.05
B	44.72	2	0.885	>0.05
C	2 021.45	2	39.99	<0.05
误差	50.55	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

直观分析表明,以综合评分为标准,在所选因素水平范围内,各因素作用主次顺序为 $C > B > A$ 。方差分析表明, C (提取次数)为主要影响因素,具有显著性($P < 0.05$),因素 C 取 C_3 ,因素 A 对提取结果影响不大,从节约成本出发选择 A_1 ,对于因素 B ,由于 B_2 与 B_3 差别不大,可取 B_2 。预测优化的工艺条件为 $A_1B_2C_3$,即 70% 乙醇-0.1 mol·L⁻¹ HCl(95:5)6 倍量,回流提取 3 次,每次 2 h。

2.2.5 验证试验 为确证该工艺的优劣和稳定性,按优化工艺条件进行了 3 次重复性试验,测定提取物中各指标性成分质量分数,并计算综合评分,其 RSD 0.92%,表明该工艺稳定、可行,结果见表 7。

表 7 工艺验证试验结果

No.	总酚酸	总皂苷	综合评分
1	0.191 4	2.07	97.03
2	0.193 3	1.98	95.27
3	0.191 8	2.01	95.66

3 讨论

由于升麻总酚酸类物质不稳定,易分解,在单纯使用醇提时测定含量偏低,因此本试验考察了加酸提取对总酚酸含量的影响。比较了 70% 乙醇,70% 乙醇-0.8 mol·L⁻¹ HCl(100:2),70% 乙醇-0.1 mol·L⁻¹ HCl(95:5)3 种不同溶剂提取升麻药材时总酚酸含量变化,最终确定工艺考察的最佳溶媒为 70% 乙醇-0.1 mol·L⁻¹ HCl(95:5)。

本试验还比较了第 3 次提取 2,1.5 h 时总皂苷和总酚酸含量的变化,结果第 3 次提取时间长短对总酚酸和总皂苷的含量变化影响不大,为了节约生产成本,缩短生产时间,可以考虑将第 3 次的提取时间缩短至 1.5 h。

升麻提取物多用于治疗女性雌激素失调而引起的疾病,如更年期综合症、因手术切除卵巢或子宫而导致的雌激素紊乱等,同时在抗骨质疏松及抗肿瘤等方面运用也较广。为充分发挥升麻的功效,合理利用资源,本试验以总皂苷(以升麻苷 H-1 计)和总酚酸(以阿魏酸、异阿魏酸和咖啡酸含量之和计)为综合评价指标,对升麻提取工艺进行研究,为升麻提取物行业发展奠定了基础。在提取工艺中,为了便于比较分析,对各指标数据进行必要的标准化处理,采用的是 $C_i/C_i(\max)$,即数据除以该组最大数。同时,实验选择多指标评价,符合中药“多靶点、多方位”的原则,比采用某种单一成分的含量进行提取工艺控制更合理,使结果更为科学、客观。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010:68.
[2] 刘勇,陈迪华,陈雪松.升麻属植物的化学、药理与临床研究[J].国外医药·植物药分册,2001,16(2):55.
[3] 高璟春,张金超,朱国元,等.升麻族植物药理活性研究进展[J].中草药,2006,37(10):附 3.
[4] 靳波,刘友平,陈鸿平,等.比色法测定升麻药材总皂苷[J].四川中医,2010,28(8):50.
[5] 王剑光.升麻中阿魏酸和异阿魏酸的提取工艺研究[J].中国中医药科技,2007,14(5):353.

[责任编辑 全燕]