

正交试验法优化超声提取女贞子中特女贞苷的工艺研究

程 敏,张凡帆,张亦琳

(商洛学院 生物医药与食品工程学院,陕西 商洛 726000)

摘 要:优选女贞子中特女贞苷的超声提取工艺。方法:在单因素考察的基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法研究提取时间、加水量、提取次数对特女贞苷得率的影响,以特女贞苷得率为指标性成分优选出最佳超声提取工艺条件。结果:提取次数和提取时间对特女贞苷得率具有显著性影响,最佳提取工艺为加 70 倍药材量的水,每次提取 2.5 h,提取 2 次,在此条件下特女贞苷得率为 0.976%。结论:该工艺方便、易行,能够有效提取女贞子中特女贞苷。

关键词:女贞子;特女贞苷;正交试验法;超声提取;工艺研究

女贞子又名女贞、女贞实,是木犀科植物女贞 (*Ligustrum lucidum* Ait.) 的干燥成熟果实。无臭,味甘、微苦涩。女贞子是一味传统的扶正固本中药,具有滋补肝肾、明目乌发之功效^[1]。女贞子中含有多糖、黄酮类、三萜类等多种化学成分,其中主要有效成分之一为特女贞苷^[2]。

现行的《中国药典》(2015 版)中,其指标性成分规定为特女贞苷,经查阅大量文献得知,目前对于女贞子中特女贞苷提取工艺的相关研究相对较少,因此本实验对女贞子中特女贞苷的超声提取工艺加以优化,以期对女贞子的进一步开发利用研究提供参考。

1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),CPA224S 型电子天平(德国)、750T 型多功能粉碎机(铂欧五金厂)、超声波清洗机(220V/50Hz,昆山禾创超声仪器有限公司)、循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司)、超纯水机(重庆市摩尔水处理设备有限公司)、药典筛(新乡市同心机械有限责任公司)。

色谱甲醇(赛默飞世尔科技中国有限公司)、超纯水(超纯水机重庆市摩尔水处理设备有限公司)、特女贞苷(批号:111926-201605)、女贞子药材(蒸后晒干炮制品)购买于西安天晟中药材市场。

2 方法与结果^[3~4]

2.1 特女贞苷的测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取特女贞苷对照品 1.25 mg,用甲醇定容至 5 ml 棕色量瓶中,得

到 1 ml 含特女贞苷 0.25 mg 的溶液,摇匀即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取女贞子粉末 0.5 g,置 150 ml 锥形瓶中,精密加入蒸馏水 50 ml,称定质量,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz)1 h,放冷,补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 特女贞苷色谱条件 Shim-pack VP-ODS(150 mmL × 4.6 mm, 5 μ m);甲醇-水(80:20)为流动相;检测波长为 224 nm;柱温为 25 $^{\circ}$ C;进样量:5 μ L;理论塔板数按特女贞苷计算应不低于 4 000。

2.1.4 标准曲线的绘制 精密吸取特女贞苷 0.25 mL 的对照品溶液置于岛津瓶中,在稳定的色谱条件下分别进样 1、2、3、4、5 μ L,测定其峰面积,横坐标(X)为特女贞苷的进样量(mg)、纵坐标(Y)为特女贞苷峰面积进行回归处理,得到回归方程为 $Y=2 \times 10^9 X - 11417$, $R^2=0.9998$ 。特女贞苷在 0.250~1.250 μ g 范围内呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度实验 精密吸取供试品溶液 5 μ L,在上述液相条件下测定峰面积,重复进样 5 次,记录特女贞苷峰面积,计算得 RSD 为 0.31%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 回收率实验 精密称取已知特女贞苷质量浓度的样品适量,置 25 mL 容量瓶中,共六份,分别加入一定量的特女贞苷对照品溶液,按 2.1.2 方法制备供试品溶液,在上述液相条件下测定,结果平均回收率为 102.06%,RSD 为 1.21%。

2.2 单因素实验

2.2.1 超声提取时间对特女贞苷得率的影响 称取女贞子粉 0.5 g 分别置于 5 个规格相同的锥

收稿日期:2017-08-18 修回日期:2017-09-10

基金项目:陕西省科技厅社发攻关项目(2016SF-369);商洛市科技计划项目(SK2014-01-04)。

第一作者简介:程 敏(1978-),女,陕西商南人,博士,副教授,主要从事中药化学成分与药理学相关研究。

形瓶中,加入 100 倍由制水机制得的三级水即为 50 ml,提取 1 次,选择提取时间分别为 0.5 h、1.0 h、1.5 h、2 h、2.5 h。结果如图 1 所示。

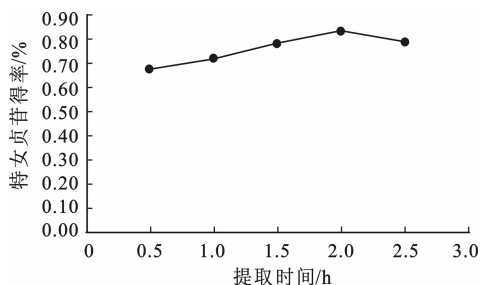


图 1 提取时间对特女贞苷得率的影响

由图 1 可知提取时间在 0.5 h 到 2 h 范围内,特女贞苷的得率随提取时间的增加而增加,而取时间在 2 h 到 2.5 h 范围内,特女贞苷的得率随提取时间的增加而降低。由此可知女贞子中特女贞苷的最佳提取时间为 2 h。

2.2.2 超声提取加水量对特女贞苷得率的影响

称取女贞子粉 0.5 g 分别置于 5 个规格相同的锥形瓶中,提取 1 次,提取时间 1 h,选择加水量为 20 mL、35 mL、50 mL、65 mL、80 mL 由制水机制

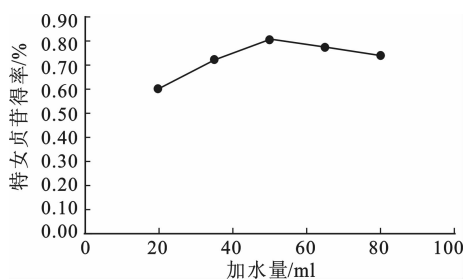


图 2 加水量对特女贞苷得率的影响

得的三级水。结果如图 2 所示。由图 2 可知加水量在 20 mL 到 50 mL 范围内,特女贞苷的得率随加水量的增加而升高,在 50 mL 到 80 mL 的范围内,特女贞苷的得率随加水量的增加而下降。由此可知,女贞子中特女贞苷的最佳提取溶剂的量为 50 mL,即加水量为 50 mL。

2.2.3 超声提取次数对特女贞苷得率的影响

称取女贞子粉 0.5 g 分别置于 4 个规格相同的锥形瓶中,加 100 倍由制水机制得的三级水即为 50 mL,超声提取时间为 1 h,选择提取次数为 1 次、2 次、3 次、4 次。结果如图 3 所示。

由图 3 可知,在提取次数范围为 1 到 2 次时,特女贞苷的得率在升高,当提取次数范围为 3 到 5 次时,特女贞苷的得率在缓慢下降。由此可知,女贞子中特女贞苷的最佳提取次数为 2 次。

2.3 正交试验法因素的确定及试验方案设计

根据正交试验设计原理和单因素实验的结果,选定三个考察因素依次为提取次数(A)、加水

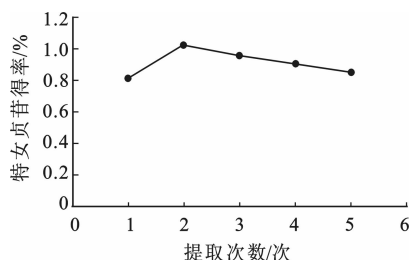


图 3 提取次数对特女贞苷得率的影响

量(B)、提取时间(C),每个因素选取 3 个水平进行试验(表 1),采用 $L_9(3^4)$ 设计正交试验的方案(表 2),以女贞子中特女贞苷得率为考察指标,进样量为 $10 \mu\text{L}$,将测得的峰面积代入线性方程中计算特女贞苷得率(表 2)。由(表 3 和表 4)可知,影响特女贞苷含量的因素顺序为提取次数(A) > 提取时间(C) > 加水量(B),三个因素中,提取次数和提取时间影响较为显著^[5-6]。综合考虑各因素将女贞子中特女贞苷的超声提取工艺定为 $A_2B_1C_3$,即 70 倍药材的水(35 mL)每次提取 2.5 h,提取 2 次。

表 1 超声提取特女贞苷的因素水平

因素水平	提取次数	加水量	提取时间
	/次	/ml	/h
	A	B	C
1	1	35	1.5
2	2	50	2
3	3	65	2.5

表 2 正交试验设计方案与结果 (n=3)

试验号	提取次数	加水量	提取时间	D	特女贞苷得率/%
	/次	/ml	/h		
1	1	1	1	1	0.336
2	1	2	2	2	0.412
3	1	3	3	3	0.468
4	2	1	2	2	0.756
5	2	2	3	3	0.834
6	2	3	1	1	0.432
7	3	1	3	3	0.984
8	3	2	1	1	0.716
9	3	3	2	2	0.822

表 3 极差分析

因素	A	B	C	D
K1	12.16	20.76	14.84	19.92
K2	20.22	19.26	19.90	18.28
K3	25.22	17.22	22.86	19.40
k1	4.05	6.92	4.95	6.64
k2	6.74	6.42	6.63	6.09
k3	8.41	5.74	7.62	6.47
R	13.06	3.54	8.02	1.64

表 4 方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值
A	28.947	2	14.474	209.446
B	2.105	2	1.052	1.052
C	10.965	2	5.483	30.009
D 误差	0.468	2	0.234	/

注: $F_{0.05}(2,2)=19$ 。

2.4 验证试验

取女贞子粉 0.5 g,按最佳工艺组合 $A_2B_1C_3$ 进行 3 次平行实验,测得女贞子含量为 $(4.92 \pm 0.15)\text{mg}$,接近于(表 2)中的最高值。由此可知,

女贞子中特女贞苷最佳超声提取工艺为女贞子以 35 mL 的水提取 2 次,每次提取 2.5 h。验证试验表明该提取工艺合理稳定可行。

2.5 特女贞苷 HPLC 图

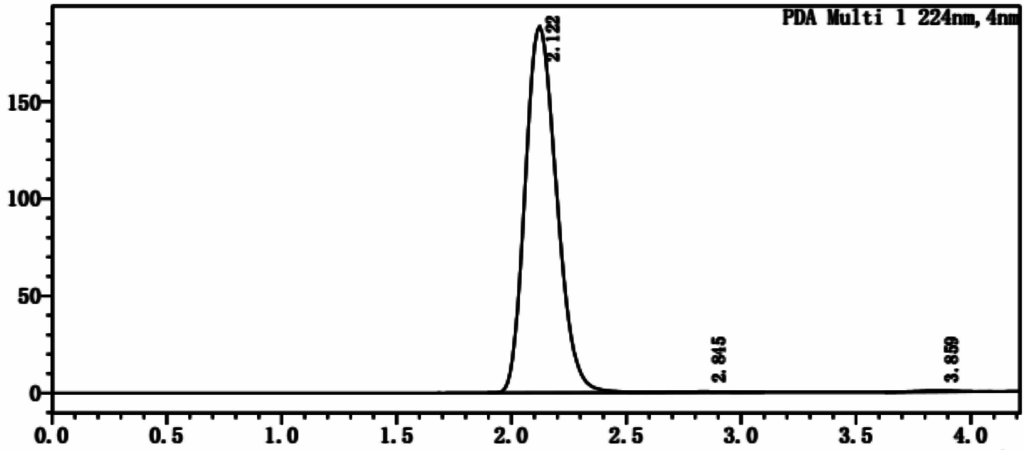


图 4 特女贞苷标准品

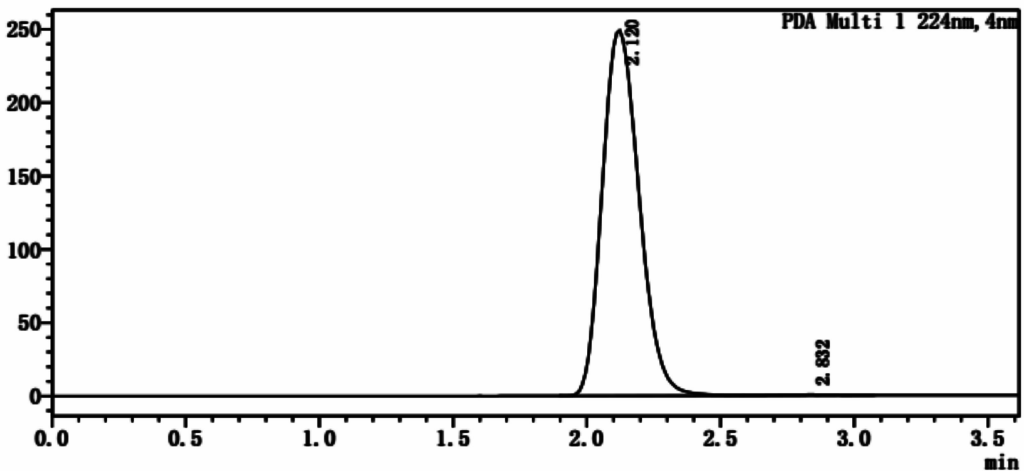


图 5 特女贞苷样品

3 讨论

在选择流动相时,结合中国药典选用以下 3 种方法:1、甲醇:水为(40:60),2、甲醇:水为(60:40),3、甲醇:水(80:20)。经比较发现,甲醇:水(80:20)流动相下特女贞苷对照品和样品的峰形好,保留时间合适。建立的特女贞苷 HPLC 液相条件为:流动相甲醇:水(80:20),流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 224 nm,柱温 25°C 。

正交试验法在中药提取上具有实验次数少、综合考虑相关性因素等优点,加之超声波提取法与常规的回流提取法相比具有提取时间短、效率高、操作简便等优点^[7],所以本实验在单因素实验的基础上,应用正交试验法对女贞子中特女贞苷的超声提取工艺进行优化。本实验研究为女贞子进一步开发利用提供理论依据^[8~9]。

(下转第 20 页)