

# 正交试验法优选冬凌草的提取工艺\*

袁珂 胡润淮 翟剑波(郑州 450003 河南中医学院)

**摘要** 目的:研究冷浸提取法中冬凌草的最佳提取条件。方法:采用正交试验法,以溶剂用量、提取时间和提取次数3个因素,每个因素选取3个水平进行实验。结果:因素A和因素B对冬凌草甲素的含量均有显著的影响,因素C则有一定的影响。结论:最佳工艺A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>,即用10倍量95% EtOH提取2次,每次6d。

**关键词** 正交试验法;冬凌草;冬凌草甲素;提取工艺

## The choice of extracting process of the *robdosia rubescens hemsl* by the Method of Orthoonal test

Yuan Ke(Yuan K), Hu Renhuai(Hu RH), Zai Jianbo(Zai JB)(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003)

**ABSTRACT OBJECTIVE:** To study the bset extracting conditions of robdosia rubescens hemsl in the cold - soaked way. **METHODS:** A orthogonal test method was used, the solvent dosage, extracting time and extracting times are the three factors in the experiment. And we choose three levels of each factor to do the experiment. **RESULTS:** The actor A and B has conspicuous effect on the concent of oridonin, the factor C has only certain effect. **CONCLUSION:** The best extracting process is A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>, i e. extracting twice by using ten times of EtOH(95%), six days once.

**KEY WORDS** Method of orthogonal test, robdosia rubescens hemsl, oridonin, the extracting process

冬凌草系唇形科香茶菜属植物[Rabdosia rubescens (Hemsl.) Hara],广泛分布于我国黄河流域及其以南广大地区。据文献报道<sup>[1-4]</sup>,冬凌草除具有抗菌、消炎作用外,还具有较强的抗肿瘤活性。临床上多用于肝癌、食管癌及胰腺癌的治疗,并取得了一定疗效。近来通过实验<sup>[5]</sup>可知,冬凌草中的主要有效成分冬凌草甲素,其含量受温度影响变化很大。研究结果表明,提取不宜采用热提,只能选用冷提法中的破碎提取或冷浸提取。为了确定出冷浸提取法的最佳提取条件,本文采用正交试验法进行了研究,优选出了最佳工艺条件。

### 1 仪器、样品和试剂

CS-9301 双波长薄层扫描仪(日本岛津),微量分析天枰(EETTLER AE 240,瑞士),三用紫外线分析仪(江苏省江阴市申港光电仪器厂),点样定量毛细管(Drummond Scientific CO USA),硅胶G(青岛海洋化工厂),所用试剂均为分析纯。冬凌草于1995年9月采自河南省济源太行山区(由本院标本室王中会副教授鉴定)。冬凌草甲素对照品(中国科学院昆明植物研究所)。

### 2 实验方法与结果

#### 2.1 对照品溶液和样品溶液的制备:精密称取冬凌草

甲素对照品4.75mg,置1ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,为4.75mg/ml。

分别精密称取冬凌草原料9份,按正交试验表中所选取的3因素3水平条件进行冷浸提取,将提取液分别减压浓缩至干,然后分别用甲醇适量溶解,加2%活性炭煮沸脱色,抽滤,除去活性炭,将脱过色的提取液继续浓缩至一定量,分别转移至量瓶中用甲醇定容至刻度备用。

**2.2 薄层层析条件及薄层扫描条件:**吸附剂:硅胶G-0.3% CMC-Na 搅拌均匀后涂布于(20×20cm)玻璃板上,厚度为0.5mm,室温置干后于105℃活化1h后置干燥器中备用。展开剂:氯仿-甲醇(9:1),上行展开,展距18cm。显色剂:50%硫酸乙醇液,喷湿润,100~105℃烘烤5min,至斑点清晰,取出放凉后在紫外灯(365nm)下定位,R<sub>f</sub>值0.6左右。

采用反射法双波长锯齿扫描法,狭缝0.4×0.4mm,线性参数S<sub>x</sub>=3,灵敏度中,测定波长λ<sub>s</sub>=246nm,参比波长λ<sub>R</sub>=300nm。

#### 2.3 标准曲线的制备:用定量毛细管吸取上述对照品

\* 河南省科技攻关资助课题,第964025300号

溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 和 10.0 $\mu$ l 点于同一块硅胶 G 薄层板上, 以展开剂展开, 取出, 晾干, 喷以显色剂, 烘烤至出现亮黄绿色斑点。放置 30min 后进行扫描测定, 以冬凌草甲素( $\mu$ g)量为横坐标, 以斑点峰面积值为纵坐标作图, 得一不通过原点的直线, 求得回归方程:  $Y = 161.66X + 88.214$ ,  $r = 0.999$  ( $n = 5$ ), 结果表明冬凌草甲素在 9.5 ~ 47.5 $\mu$ g 范围内, 与其峰面积值呈良好的线性关系。

**2.4 样品测定:** 分别吸取一定量上述不同条件下冷浸提取所制得的样品溶液点于同一硅胶 G 薄层板上, 随点对照品溶液 2 和 4 $\mu$ l, 进行展开、显色、扫描, 用外标两点法计算出各样品中冬凌草甲素的含量。

表 2 正交试验设计及实验数据

试验号	A	B	C	冬凌草甲素的含量	
	1	2	3	4	
1	1	1	1	1	0.326
2	1	2	2	2	0.337
3	1	3	3	3	0.339
4	2	1	2	3	0.328
5	2	2	1	1	0.331
6	2	3	3	2	0.341
7	3	1	3	2	0.346
8	3	2	1	3	0.357
9	3	3	2	1	0.372
Ij	1.002	1.000	1.014	1.029	$G = \sum_{i=1}^9 y_i = 3.077$
IIj	1.000	1.025	1.037	1.024	
IIIj	1.075	1.052	1.026	1.024	$CT = \frac{1}{4}G^2 = 1.05199$
Rj	3.159629	3.157329	3.156241	3.155993	
SSj	$121.97 \times 10^{-5}$	$45.3 \times 10^{-5}$	$9.033 \times 10^{-5}$	$0.7666 \times 10^{-5}$	

表 3 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性	P 值
A	$121.97 \times 10^{-5}$	2	$60.985 \times 10^{-5}$	159.1	***	< 0.01
B	$45.3 \times 10^{-5}$	2	$22.65 \times 10^{-5}$	59.1	**	< 0.05
C	$9.033 \times 10^{-5}$	2	$4.5165 \times 10^{-5}$	11.8	*	< 0.1
误差 SSe	$0.7666 \times 10^{-5}$	2	$0.3833 \times 10^{-5}$			

### 3 讨论

我们选取冬凌草中的主要有效成分冬凌草甲素的含量作为优选正交方案的指标, 方差分析结果表明, 因素 A 和因素 B 对冬凌草甲素的含量均有显著的影响 ( $P < 0.05$ ), 因素 C 则有一定的影响, 根据表 2 直观分析结果, 最佳组合应为  $A_3B_3C_2$ 。因此, 优选出最佳工艺为: 用 10 倍量 95% 乙醇冷浸提取 2 次, 每次 6d。

### 参考文献

1 河南省冬凌草研究协作组. 冬凌草治疗食管癌、贲门癌 95 中国现代应用药学杂志 1998 年 10 月第 15 卷第 5 期

**2.5 正交设计:** 我们选取了提取物中主要有效成分冬凌草甲素的含量做考查指标, 选用  $L_9(3^4)$  正交方案, 考察了溶剂用量、提取时间和提取次数 3 因素, 每个因素 3 个水平设计试验方案, 见表 1。

表 1 试验因素水平表

因素水平	A	B	C
	溶剂用量(倍)	提取时间(天)	提取次数(次)
1	6	2	1
2	8	4	2
3	10	6	3

**2.6 结果:** 实验数据及方差分析结果见表 2, 3。

例临床疗效结果. 肿瘤防治研究, 1974, 1(2): 86.  
 2 王绵英, 张覃沐. 冬凌草甲素对几种肿瘤细胞 M 期作用机制的探讨. 癌症, 1984, 3(2): 84.  
 3 王庆瑞, 王绵英, 华海婴, 等. 不同地区冬凌草有效成分抗肿瘤作用研究. 河南医科大学学报, 1987, 22(1): 33.  
 4 河南医学院肿瘤科. 冬凌草抗肿瘤及其药理作用的研究. 河南医学院学报, 1975, 10(2): 9.  
 5 袁珂, 胡润淮, 张庆岭, 等. 冬凌草不同提取工艺的研究. 中草药, 1997, 28(7): 405.

收稿日期: 1997 - 10 - 10