

超声法与闪式提取法提取龙胆中龙胆苦苷的工艺对比研究

朱鹤云, 张丽, 冯波* (吉林医药学院药学院, 吉林 吉林 132013)

摘要: 目的 对比研究超声法与闪式提取法提取龙胆中龙胆苦苷的工艺。方法 采用高效液相色谱法测定龙胆中龙胆苦苷的含量, 超声法以乙醇浓度、提取时间、超声功率、料液比为考察因素, 闪式提取法以乙醇浓度、料液比、提取时间为考察因素, 以龙胆苦苷提取率为考察指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选最佳提取工艺条件。结果 与超声法相比, 闪式提取法效率更高, 其最佳提取工艺为提取溶剂 50%乙醇, 料液比 1:60, 提取时间 3 min。结论 本法工艺简单、经济、提取率高, 可为中药龙胆的开发利用提供参考。

关键词: 超声法; 闪式提取法; 龙胆; 龙胆苦苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)05-0395-04

Comparison of Ultrasonic Method and Smashing Tissue Extraction Process of Gentiopicroside from *Gentianae Radix et Rhizoma*

ZHU Heyun, ZHANG Li, FENG Bo* (School of Pharmacy, Jilin Medical College, Jilin 132013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare the ultrasonic extraction and smashing tissue extraction process of gentiopicroside from *Gentianae Radix et Rhizoma*. **METHODS** An HPLC method was applied to determine the content of gentiopicroside from *Gentianae Radix et Rhizoma*. The best extraction technology was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal test with the concentration of ethanol, extraction time, ultrasonic power, material-liquid ratio as factors for ultrasonic extraction and with the concentration of ethanol, material-liquid ratio, extraction time as factors for smashing tissue extraction process, the extraction rate of gentiopicroside was chosen as index. **RESULTS** Smashing tissue extraction process was superior to ultrasonic extraction, optimal extraction technology were as follows: extraction solvent of 50% ethanol, the material-liquid ratio of 1:60, extracting time of 3 min. **CONCLUSION** The smashing tissue extraction process is simple and economical with high extraction rate and can provide parameters for exploitation and utilization of *Gentianae Radix et Rhizoma*.

KEY WORDS: ultrasonic method; smashing tissue extraction process; *Gentianae Radix et Rhizoma*; gentiopicroside; HPLC

龙胆(*Gentianae Radix et Rhizoma*)为龙胆科植物条叶龙胆(*Gentiana manshurica* Kitag.)、龙胆(*G. scabra* Bge.)、三花龙胆(*G. triflora* Pall.)、坚龙胆(*G. rigescens* Franch.)的干燥根和根茎。龙胆苦、寒, 归肝、胆经, 具有清热燥湿、泻肝胆火的功效^[1]。主要分布于黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、浙江、

湖南、江西、福建、江苏、广东、新疆等省。龙胆苦苷(gentiopicroside, GTP)是龙胆的主要有效成分, 具有强烈苦味活性, 是龙胆药苦寒的物质基础^[2]。现代药理研究证明, 龙胆苦苷具有显著的肝脏保护、抗炎、抗病原微生物、中枢兴奋及健胃利胆等作用^[3-4]。

基金项目: 吉林省科技厅科研课题(200905113)

作者简介: 朱鹤云, 男, 硕士, 助教 Tel: 13578505986
Tel: (0432)64560529 E-mail: fengbo2@sina.com

E-mail: zhy19820903@126.com

*通信作者: 冯波, 男, 博士, 教授

文献中报道的龙胆苦苷提取方法主要有超声法^[5-7]和溶剂回流提取法^[7]。本试验采用一种新的提取技术——闪式提取法提取龙胆中龙胆苦苷，并将其与文献中报道较多的超声法进行比较，为继续深入研究龙胆的质量标准和龙胆苦苷的药效奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 2010A 系列高效液相色谱仪(配备二极管阵列检测器,日本岛津公司), KQ-500GVDV 型三频恒温数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), FA1104N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), JHBE-50S 型闪式提取器(河南金鼎科技发展有限公司), FW80 型微型万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试药

龙胆药材购自吉林省吉林市,经吉林省中医药科学院王威教授鉴定为龙胆科植物龙胆 *G. scabra* Bge.的干燥根和根茎;龙胆苦苷对照品(纯度>98%,批号:0912056,上海融禾医药科技有限公司);甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);95%乙醇(分析纯,天津市永大化学试剂开发中心);甲醇(分析纯,天津市大茂化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 龙胆苦苷含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Inertsil ODS-SP 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 预柱为 C₁₈ 保护柱(4.0 mm×3.0 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(25:75), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 270 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。理论板数以龙胆苦苷计算应不低于 4 000, 龙胆苦苷对照品与龙胆样品的色谱图见图 1。

2.1.2 标准曲线的制备 取龙胆苦苷对照品适量,精密称定,加甲醇配制成 1.0 mg·mL⁻¹的对照品溶液。精密吸取对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20 μL, 分别注入高效液相色谱仪测定,以峰面积(Y)为纵坐标,龙胆苦苷进样量(X)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $Y=1.596 \times 10^6 X - 8.985 \times 10^4$ ($r=0.9999$)。结果表明,龙胆苦苷进样量在 1.0~20 μg 内与峰面积呈良好线性关系。

2.1.3 仪器精密度试验 精密吸取龙胆苦苷对照品溶液 10 μL(浓度为 1.0 mg·mL⁻¹),按“2.1.1”项

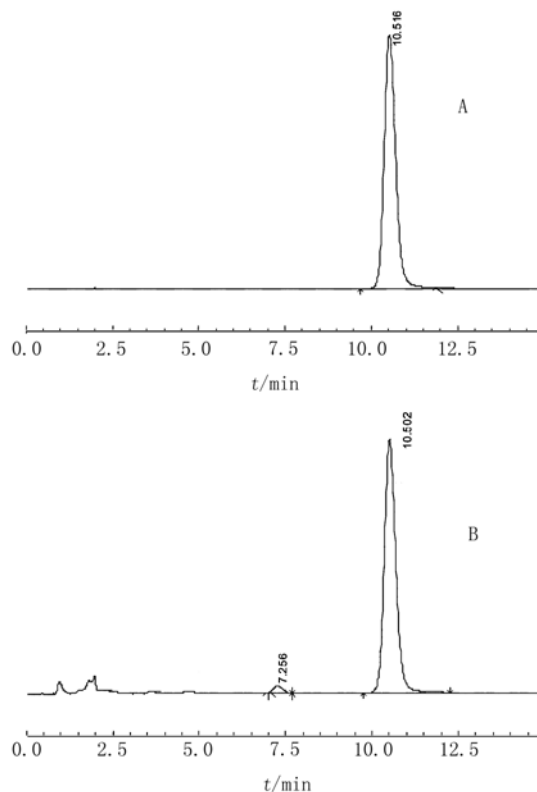


图 1 高效液相色谱图

A-龙胆苦苷对照品; B-龙胆样品

Fig 1 HPLC chromatograms

A-standard of gentiopicoside; B-sample of Gentianae Radix et Rhizoma

下色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积。结果, RSD=0.25%,表明仪器精密度良好。

2.1.4 稳定性试验 取龙胆苦苷供试品溶液于 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 分别进样 10 μL, 测定峰面积。结果 RSD 为 1.49%,表明对照品溶液 48 h 内稳定性良好。

2.1.5 重复性试验 取同一批龙胆样品粉末 6 份,按“2.1.6”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进行 HPLC 分析,计算龙胆苦苷含量。结果 RSD 为 1.23%,表明本法重复性良好。

2.1.6 供试品的测定 取龙胆药材粉末 0.5 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70%乙醇 25 mL,称定重量,超声提取 1 h,功率为 400 W,放至室温后再称重,用 70%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 10 mL,蒸干,用流动相转溶至 10 mL 量瓶中,稀释至刻度,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,作为供试品溶液。精密吸取供试品溶液 10 μL,按“2.1.1”项下色谱条件进行 HPLC 分析。

2.2 超声法提取龙胆中的龙胆苦苷

2.2.1 正交试验设计 选择乙醇浓度(A)、提取时间(B)、超声功率(C)、料液比(D)4个因素,以龙胆苦苷的提取率为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表安排试验。因素水平见表1,正交试验结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 超声法因素水平表

Tab 1 Factors and levels of ultrasonic extraction

水平	因素			
	A/%	B/h	C/W	D/g·mL ⁻¹
1	50	1.0	300	1:40
2	70	1.5	400	1:50
3	90	2.0	500	1:60

表2 正交试验结果(n=3)

Tab 2 Results of orthogonal test ultrasonic extraction (n=3)

序号	A	B	C	D	龙胆苦苷提取率/%
1	1	1	1	1	3.34
2	1	2	2	2	2.49
3	1	3	3	3	2.90
4	2	1	2	3	4.45
5	2	2	3	1	4.30
6	2	3	1	2	6.38
7	3	1	3	2	5.35
8	3	2	1	3	5.36
9	3	3	2	1	5.40
K ₁	2.91	4.38	5.03	4.35	
K ₂	5.04	4.05	4.11	4.74	
K ₃	5.37	4.89	4.18	4.24	
R	2.46	0.84	0.91	0.50	

表3 方差分析结果

Tab 3 The results of variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	F比	F检验临界值 $\alpha=0.05$	显著性
A	10.71	2	25.50	19.00	*
B	1.08	2	2.58	19.00	
C	1.55	2	3.69	19.00	
D	0.42	2	1.00	19.00	

由表可知,以龙胆苦苷提取率为检测指标,各因素影响顺序为 A>C>B>D,乙醇浓度对提取工艺有显著性影响。优化出超声法提取龙胆中龙胆苦苷最佳方案为 A₃B₃C₁D₂,即提取时间为1h,提取溶剂为90%乙醇,超声功率为300W,料液比为1:50。

2.2.2 验证试验 取供试品3份,按照优化工艺条件,重复3次试验进行验证,结果龙胆苦苷提取率平均为6.45%,比正交试验中最高提取率(6.38%)高,表明试验所确定的工艺条件为超声法最佳工艺条件。

2.3 闪式提取法提取龙胆中的龙胆苦苷

2.3.1 正交试验设计 选择乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)3个因素,以龙胆苦苷提取率为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表安排试验。因素水平见表4,正交试验结果见表5,方差分析结果见表6。

表4 闪式提取法因素水平表

Tab 4 Factors and levels of smashing tissue extraction process

水平	因素		
	A/%	B/g·mL ⁻¹	C/min
1	50	1:40	1.0
2	70	1:50	2.0
3	90	1:60	3.0

表5 正交试验结果(n=3)

Tab 5 Results of orthogonal test(n=3)

序号	A	B	C	空列 D	龙胆苦苷提取率/%
1	1	1	1	1	4.66
2	1	2	2	2	5.17
3	1	3	3	3	6.52
4	2	1	2	3	5.47
5	2	2	3	1	5.19
6	2	3	1	2	5.30
7	3	1	3	2	5.20
8	3	2	1	3	4.95
9	3	3	2	1	5.37
K ₁	5.45	5.11	4.97	5.07	
K ₂	5.32	5.10	5.34	5.22	
K ₃	5.17	5.73	5.64	5.65	
R	0.28	0.63	0.67	0.57	

表6 方差分析结果

Tab 6 The results of variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	F比	F检验临界值 $\alpha=0.05$	显著性
A	0.12	2	0.22	19.00	*
B	0.78	2	1.47	19.00	
C	0.67	2	1.26	19.00	
空列 D	0.53	2	1.00	19.00	

由表可知,以龙胆苦苷提取率为检测指标,各因素影响顺序为 C>B>A,各因素对试验结果均无显著性影响。优化出闪式提取法提取龙胆中龙胆苦苷最佳方案为 A₁B₃C₃,即以 50%的乙醇作为提取溶剂,料液比为 1:60,提取时间为 3 min。

2.3.2 验证试验 取供试品 3 份,按照优化工艺条件,重复 3 次试验进行验证,结果龙胆苦苷提取率平均为 6.51%,表明试验所确定的工艺条件为闪式提取法最佳工艺条件。

2.4 超声法与闪式提取法提取效果对比

以不同方法提取龙胆中龙胆苦苷的条件及提取率对比见表 7。由表可知,要获得相同的提取率,闪式提取法提取时间仅为超声法的 1/20,因而闪式提取法更加省时、高效。

表 7 不同方法提取龙胆中龙胆苦苷的提取率

Tab 7 The extraction rate of gentiopicroside from *Gentianae Radix et Rhizoma* by different extraction technologies

方法	提取时间/min	龙胆苦苷提取率/%
超声法	60	6.45
闪式提取法	3	6.51

3 讨论

文献[8]中采用乙腈-水-醋酸(10:80:1)为流动相,龙胆苦苷的色谱保留时间为 14.0 min,文献[9]以甲酸-0.4%磷酸为流动相进行梯度洗脱,龙胆苦苷的色谱保留时间为 16.5 min。本实验采用中国药典 2010 年版一部收录的龙胆苦苷含量测定方法^[1],以甲醇-水(25:75)作为流动相,龙胆苦苷与龙胆中其他物质能够完全分离,色谱保留时间仅为 10.5 min,分析时间较短,且峰形较好。

闪式提取法所采用的闪式提取器是根据植物组织破碎提取法的基本思想设计的一种用于植物软、硬组织快速提取的新型提取器。依靠高速机械剪切力和超动分子渗滤技术,在室温及溶剂存在下数秒钟内把植物的根、茎、叶、花、果实等物料破碎至细微颗粒,并使有效成分迅速达到组织内外平衡,通过过滤达到提取之目的。闪式提取法的优点是能够最大限度保护植物有效成分,不会受热破坏,溶剂用量小,提取时间短,效率高,节约能源^[10]。目前已有文献报道采用闪式提

取法提取积雪草总皂苷、甘草叶总黄酮和三七总皂苷^[11-13]。

本研究首次将闪式提取法应用于龙胆中龙胆苦苷的提取,并对比了超声法与闪式提取法提取龙胆中龙胆苦苷的工艺。结果表明,与超声法相比,闪式提取法效率更高,其最佳提取工艺为提取溶剂 50%乙醇,料液比 1:60,提取时间 3 min。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版.一部)[S]. 2010: 89.
- [2] ZHENG H Z, DONG Z H, SHE J. *Modern Chinese Medicine Research and Application: Volume(II)*(中药现代研究与应用)[M]. Beijing: Academic Press, 1997: 1398-1408.
- [3] CAO F H, LI C. New advances in research of chemical constituents and pharmacological activities of genus *Gentiana* [J]. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2008, 17(1): 27-29.
- [4] YU X H, ZHAO L, LI Y, et al. Identification and content determination of gentiopicroside in *Gentiana officinalis* H.Smith from different areas of Gansu [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2010, 27 (6): 504-507.
- [5] WANG Y Y, WANG Y P. Research for the best extracting-craftwork about available component of *Gentiana scabra* Bunge [J]. *Spec Wild Econ Animal Plant Res*(特产研究), 2007, 23(2): 504-507.
- [6] KANG H, YU S X, HAO X X. Optimization of the extraction technology of gentiopicroside from *gentiana macrophylla* pall by ultrasonic wave [J]. *Hebei J Ind Sci Technol*(河北工业科技), 2008, 25 (3): 142-144.
- [7] CAO Y, ZUO D Y, WANG W N. Orthogonal experimental design for optimization of extraction of medicinal gentian [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2009, 20(9): 2264-2265.
- [8] WEI L, CHEN X H, WANG X H, et al. Determination of the contents of gentiopicroside of *Gentianae Radix* from different habitats [J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2004, 21 (2): 114-117.
- [9] DONG T X, ZHAN H Q, WANG Z T, et al. Quantitative detection of gentiopicroside in *Gentianae Radix* [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*(上海中医药杂志), 2005, 39 (11): 53-55.
- [10] LIU Y Z. Principle and practice of smashing tissue extraction and herbal Blitzkrieg extractor [J]. *Chin J Nat Med*(中国天然药物), 2005, 5 (6): 401-407.
- [11] WANG Z B, ZHAO Y Q. Studies on the smashing tissue extraction process of the total saponins of *Centella asiatica* [J]. *Mod Chin Med*(中国现代中药), 2009, 11 (2): 36-38.
- [12] DENG Y M, CUI Y M, LI W, et al. Optimization for homogenate extraction of total flavonoids from *Glycyrrhiza* leaves by response surface method [J]. *Chem Bioeng*(化学与生物工程), 2008, 25(9): 44-47.
- [13] ZHOU Z, LUI Y Z, LIU G F, et al. Studies on the smashing tissue extraction and purification process of the total saponins of the basal part of stem and beard from *Panax notoginseng*[J]. *Mod Chin Med*(中国现代中药), 2009, 11 (3): 34-36.

收稿日期: 2010-08-05