

连翘中连翘苷和多糖的提取工艺优化及含量测定*

冯素香^{1,2}, 郝蕊¹, 吴兆宇¹, 刘富岗¹, 周悌强^{1,2}, 王蒙蒙¹

(1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450008; 2. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 郑州 450008)

摘要 目的 通过正交设计优选出闪式提取法提取连翘苷的最优工艺。方法 以提取物中连翘苷含量为指标, 以乙醇浓度、料液比、提取时间为考察因素, 采用正交实验法优选连翘苷的闪提最优工艺; 对闪式提取和回流提取连翘苷后的药渣提取多糖, 并比较多糖的提取率。结果 闪式提取的最佳工艺为: 电压 120 V, 加 10 倍量 70% 乙醇闪式提取 1 min, 提取 2 次。此条件下连翘苷的含量为 $4.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 回流法提取连翘苷的含量为 $4.06 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。闪式提取和回流提取法的药渣中多糖的出膏率分别为 2.16%, 1.51%。结论 闪式提取的连翘苷的含量及药渣中多糖的出膏率均高于回流提取, 该工艺稳定可行。

关键词 连翘苷; 多糖; 正交实验; 闪式提取

中图分类号 R282; R927.2 文献标识码 B 文章编号 1004-0781(2016)12-1348-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2016.12.013

Optimization of Extraction Process and Content Determination of Phillyrin and Polysaccharide in *Forsythia Suspensa*

FENG Suxiang^{1,2}, HAO Rui¹, WU Zhaoyu¹, LIU Fugang¹, ZHOU Tiqiang^{1,2}, WANG Mengmeng¹ (1. Department of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT Objective To optimize homogenate extraction process of *Forsythia suspensa*. **Methods** With the content of phillyrin serving as the index, the homogenate extraction process of phillyrin was optimized by orthogonal design, in which the ethanol concentration, ratio of solid to liquid and extracting time were selected as affecting factors. And the transfer rates of the polysaccharide in the dregs from homogenate extracting process and ethanol refluxing process were compared. **Results** The optimum conditions of the homogenate extraction were as follows: 10 times amount of 70% ethanol and 1 minute for each extraction with voltage of 120 V. The content of phillyrin extracted by the optimum process of homogenate extraction was $4.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, and $4.06 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ by ethanol refluxing method. The extraction rate of the polysaccharide from the dregs in the two processes was 2.16% and 1.51%, respectively. **Conclusion** Both the content of phillyrin and the extraction rate of polysaccharide from the dregs are higher in homogenate extraction than in refluxing extraction.

KEY WORDS Phillyrin; Polysaccharide; Orthogonal test; Homogenate extraction

连翘在我国已经有近千年的药用历史, 被视为“疮家要药”。连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 味苦, 性微寒, 归肺、心、小肠经, 具有清热解毒、消肿散结、疏散风热之功效, 主治痈疽、瘰癧、丹毒、风热感冒、温病初起、高热烦渴、神昏发斑、热淋涩痛等症^[1]。现代药理学研究表明, 连翘有降血脂^[2]、抗氧化^[3]、抗菌、抗病毒^[4]、抗肿瘤^[5]、解热镇痛活性, 以及抗糖尿病、镇吐止呕^[6]作用。连翘苷是连翘的主要有效成分, 具有抗病毒、抑制毛细血管通透性、强心和抗肝损伤^[7]等作用。据文献

报道, 连翘苷目前使用较多的提取方法有水煎煮法^[8]、超声提取法^[9]、回流法^[10]等。但尚未见到用闪式提取法提取连翘苷的报道, 笔者针对此方法对其进行工艺研究。另外, 在连翘有效成分提取方面往往忽略了多糖的提取, 本研究同时对提取连翘苷后的药渣进行了多糖的提取, 并与回流法进行比较。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 JHBE-50 闪式提取器 (河南金鼎科技发展有限公司), Waters e2695 高效液相色谱仪 (配 Waters2998 紫外检测器, Empower 色谱工作站); KH2200DB 型超声波清洗器 (江苏省昆山市超声仪器有限公司); XS105 型电子分析天平 (瑞士梅特勒仪器有限公司, 感量: 0.01 mg); SHE-D (III) 循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限责任公司); 数显电热恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司); Evolution 260 Bio 紫外-可见分光光度计 (赛默飞世尔科技公司)。

收稿日期 2015-02-02 修回日期 2015-05-14

基金项目 * 国家自然科学基金资助项目 (81130062)

作者简介 冯素香 (1971-), 女, 河南郑州人, 教授, 博士, 研究方向: 中药质量分析与新药研究。E-mail: fengsx221@163.com。

1.2 试药 连翘苷对照品(批号:110821-201112),*D*-无水葡萄糖(批号:110833-200904)均购于中国食品药品检定研究院;连翘药材购于张仲景大药房,经河南中医药大学药学院陈随清教授鉴定为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实;乙腈(HPLC grade, Fisher Scientific)、磷酸、无水乙醇、丙酮、乙醚等均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 连翘苷的含量测定方法

2.1.1 色谱条件与系统适用性实验 色谱柱为 Venusil XBP-C₁₈ (天津博纳艾杰尔科技有限公司, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(25:75), 流速:1.0 mL · min⁻¹;柱温为 25 ℃;检测波长:277 nm;理论板数按连翘苷峰计算应不低于 3 000;连翘苷对照品及供试品的色谱图见图 1。

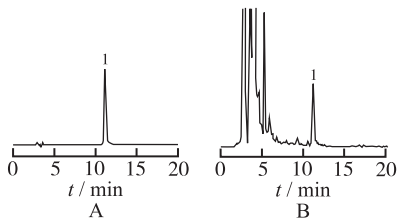


图 1 对照品(A)和供试品(B)HPLC 图
1. phillyrin

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference (A) and sample(B)

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定干燥至恒重的连翘苷对照品 7.10 mg,置 25 mL 量瓶,加甲醇溶解并稀释到刻度,作为对照品溶液(0.284 mg · mL⁻¹)。

2.1.3 供试品溶液的制备 取提取物 25 mg,精密称定,置 5 mL 量瓶,加甲醇使溶解并稀释至刻度。再用孔径 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 精密量取连翘苷对照品溶液 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。精密吸取对照品溶液以及上述稀释对照品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,以对照品进样质量浓度(mg · mL⁻¹)为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线:Y = 4.859 20 × 10⁵ X - 8 760.8; r = 0.999 2。结果表明,连翘苷在 0.014 2 ~ 0.142 0 mg · mL⁻¹ 浓度范围内与峰面积线性关系良好。

2.1.5 精密度实验 精密量取同一对照品溶液,重复

进样 6 次,每次 10 μL,记录峰面积,计算其相对标准偏差(RSD)为 1.09%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性实验 取供试品溶液分别于配制后的 0,1,2,4,6,8,12 h 进样,测定连翘苷的峰面积,RSD 为 1.62%,说明供试品溶液在常温下 12 h 内稳定。

2.1.7 重复性实验 取样品 6 份制备供试品溶液,并按“2.1.1”项下色谱条件进样,计算结果:连翘苷含量的 RSD 为 1.57%,表明方法的重复性良好。

2.1.8 加样回收率实验 取已知含量的同一批样品 9 份,分别置于 5mL 量瓶中,按照供试品测定的连翘苷的含量,以其 80%,100%,120% 比例精密加入对照品贮备液,挥干甲醇后加入样品,按供试品制备方法处理并按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,结果平均回收率为 101.7%,RSD 为 2.61%,见表 1。

表 1 连翘苷加样回收率实验结果
Tab.1 Recoveries of phillyrin

称样量	原有量	加入量	测得量	回收率/
	mg			%
12.93	0.23	0.18	0.41	100.0
12.41	0.22	0.18	0.41	105.6
12.76	0.22	0.18	0.41	105.6
12.80	0.22	0.23	0.46	104.3
12.19	0.21	0.23	0.44	100.0
12.37	0.22	0.23	0.45	100.0
12.61	0.22	0.27	0.49	100.0
12.54	0.22	0.27	0.49	100.0
12.78	0.22	0.27	0.49	100.0

2.2 正交实验优化连翘苷提取工艺

2.2.1 考察因素和水平的确定 根据预实验的结果,固定闪式提取电压为 120 V 和提取次数为 2 次,选取影响提取的乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)为考察因素,以提取物中连翘苷的含量为考察指标,因素和水平见表 2。

表 2 因素水平
Tab.2 Factors and levels

水平因素	乙醇浓度 (A)/%	料液比(B)/ (g · mL ⁻¹)	提取时间 (C)/min
1	60	1: 8	1
2	70	1: 10	1.5
3	80	1: 12	2

2.2.2 实验方法 取连翘药材粗粉,在 120 V 电压下按 L₉(3⁴) 正交表,分别闪式提取 2 次,合并滤液,回收

乙醇,用石油醚萃取2次,取下层溶液挥去石油醚,浓缩至浸膏,后冷冻干燥,得粗提物。取本品粗提物约25 mg,精密称定,精密加入甲醇并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,正交实验结果见表3,方差分析结果见表4。

表3 正交实验结果
Tab.3 Results of orthogonal test

实验号	乙醇浓度 (A)	料液比 (B)	提取时间 (C)	空白 (D)	连翘苷的 含量/%
1	1	1	1	1	2.55
2	1	2	2	2	2.89
3	1	3	3	3	2.73
4	2	1	2	3	4.13
5	2	2	3	1	4.32
6	2	3	1	2	4.51
7	3	1	3	2	3.21
8	3	2	1	3	3.60
9	3	3	2	1	3.48
I	8.17	9.89	10.66	10.35	
II	12.96	10.81	10.50	10.61	
III	10.29	10.72	10.26	10.46	
I ²	66.75	97.81	113.64	107.12	
II ²	167.96	116.86	110.25	112.57	
III ²	105.88	114.92	105.27	109.41	

表4 方差分析
Tab.4 Analysis of variance

方差来源	离均差 平方和	自由度	方差	F	P
乙醇浓度(A)	3.841	2	1.920	338.233	<0.01
料液比(B)	0.171	2	0.086	15.102	<0.05
提取时间(C)	0.027	2	0.014	2.380	>0.05
空白(D)	0.011	2	0.006		

$F_{0.05(2,2)} = 19.00; F_{0.01(2,2)} = 99.00; F_{0.10(2,2)} = 9.00$

由表3可知,3个因素的影响大小顺序是:乙醇浓度>料液比>提取时间。在表4中可知,A、B因素对连翘苷均有显著的影响($P_A < 0.01, P_B < 0.05$),而且 $A_2 > A_3 > A_1, B_2 > B_3 > B_1$ 故选 $A_2、B_2$;而C对连翘苷量无显著影响。根据测定结果,确定连翘苷的闪提最佳工艺是 $A_2B_2C_1$,即加10倍70%乙醇闪式提取1 min。

2.3 最优工艺验证实验 为验证正交设计实验中最优工艺的重现性和可靠性,分别取连翘50 g,用闪提最优工艺,即:在120 V电压下,加10倍70%乙醇闪式提取1 min,平行操作3份,药材中连翘苷的含量分别为4.51, 4.49,4.50 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,可见其可靠性和重复性良好。

2.4 乙醇回流提取法 目前连翘普遍采取加热回流方

法提取连翘苷,根据文献报道加热回流提取连翘中连翘苷的最优工艺为:6倍量70%的乙醇提取1 h^[10-11]。按此条件制备3批样品,并按照“2.1.1”项方法测定,计算平均结果与闪式提取的最优结果。闪式提取法虽然使用溶剂量较大,但是所用的时间比较短,而且连翘苷的量和转移率也较回流提取有所提高,由此可知从连翘中提取连翘苷,闪式提取优于回流提取。见表5。

表5 闪式提取与回流提取工艺的比较
Tab.5 Comparison of the results between homogenate
extraction and ethanol refluxing process $\bar{x} \pm s, n = 3$

提取方法	乙醇/ %	料液比/ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	提取时间/ min
闪提提取	70	1:10	1
回流提取	70	1:6	60
提取方法	提取 次数/次	连翘苷/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	转移率/ %
闪提提取	2	4.50 ± 0.08	75.54 ± 1.34
回流提取	2	4.06 ± 0.09	68.16 ± 1.51

2.5 连翘药渣中多糖的提取及含量测定

2.5.1 回流提取法 提取样品多糖分别将闪式提取和回流提取后的药渣烘干混匀,加药渣质量10倍量体积的超纯水回流提取两次,合并滤液,将滤液浓缩至料液比1:1.5~1:2(原料重:溶液体积),加入乙醇使醇浓度为80%(V/V)进行醇沉,在4℃冰箱中静置12 h,醇沉液离心,下层沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,真空干燥,即得连翘多糖粗提物^[12]。

2.5.2 对照品溶液的配制 精密称定干燥至恒重的无水葡萄糖对照品33.36 mg,加至100 mL量瓶中,加水溶解并定容至刻度,作为对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液的配制 称取“2.5.1”项下所得多糖粗提物2 mg,超纯水溶解于25 mL量瓶中定容摇匀,即得。

2.5.4 最大吸收波长的选择 分别精密量取对照品、供试品溶液和超纯水各2 mL置于具塞试管中,精密加入5%苯酚试液1 mL,摇匀,迅速加入硫酸5 mL,摇匀放置10 min,置40℃水浴中保温15 min,取出,迅速冷却至室温^[1],其中,以超纯水作为空白液,照分光光度法(《中华人民共和国药典》2010年版一部附录V A),用紫外-可见分光光度计于400~800 nm进行扫描。结果显示,葡萄糖对照品溶液和供试品溶液最大吸收波长均为490 nm。结果见图2。

2.5.5 标准曲线的绘制 精密量取对照品溶液0.2, 0.4,0.6,0.8,1.0 mL分别置于具塞试管中,加水补足

至 2 mL,照“2.5.4”项下方法自“精密加入 5% 苯酚……”操作,以相应的试剂做空白,在 490 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,显色时多糖的浓度为横坐标,绘制标准曲线: $Y = 61.103\ 0X - 0.081\ 7$, $r = 0.999\ 0$,其结果表明多糖在 0.033 36 ~ 0.166 80 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

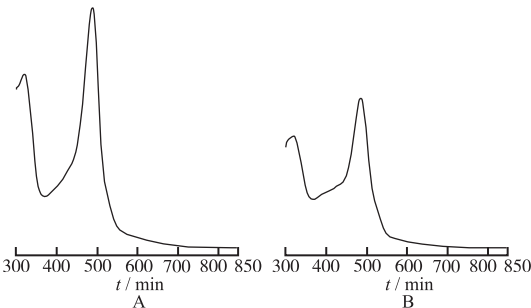


图 2 对照品(A)和供试品(B)扫描光谱
Fig. 2 Scanning spectrum of reference(A) and sample(B)

2.5.6 连翘多糖的含量测定和出膏率的计算 称取样品多糖 2 mg,超纯水溶解于 25 mL 量瓶中定容摇匀,精密吸取 2 mL 溶液于具塞试管中,按“2.5.2”项下方法测定吸光度,代入标准曲线计算样品溶液中葡萄糖平均质量浓度(C)。按下式计算多糖含量:粗提物多糖含量($\%$)= $C \times V/m \times 100\%$ (C :样品溶液中葡萄糖的浓度, V :样品溶液的稀释体积, m :粗提物的质量)。出膏率($\%$)=干膏质量/药材质量 $\times 100\%$

2.5.7 两种药渣中连翘多糖的提取比较 连翘闪式提取药渣与回流提取药渣提取多糖的比较结果见表 6。从药渣中提取多糖,闪式提取法所得药渣中多糖的出膏率高于回流提取法药渣中多糖的出膏率,可见闪式提取后的粉末粒径更小,更有利于药材有效成分的提取。

表 6 连翘闪式提取和回流提取药渣提取多糖的工艺比较
Tab. 6 Comparison of the process of polysaccharide extracting between homoganate extraction $\bar{x} \pm s, n = 3$

药渣类别	物料比/ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	提取时 间/h	提取次 数/次	粗提物多糖 含量/%	出膏率/ %
闪式提取药渣	1 : 10	2	2	39.88 ± 0.81	2.16 ± 0.04
回流提取药渣	1 : 10	2	2	39.51 ± 0.79	1.51 ± 0.03

3 讨论

本研究建立了连翘苷的闪式提取工艺,以连翘苷转移率为指标,采用正交实验得到最佳工艺条件为:工作电压 120 V,加 10 倍 70% 乙醇闪式提取 1 min,提取 2 次。与传统的乙醇回流法相比,闪式提取在连翘苷

转移率、操作简单、费时短等方面具有明显的优势,且方法简单可靠,重复性好。还用闪式提取法先对连翘苷的提取工艺进行优化,然后采用回流提取法对提取过连翘苷的药渣进行多糖提取,如此不仅能提高连翘药材的综合利用率,又能提高其各自的提取效率,大大降低能耗。在连翘苷最优工艺选择的最适合的乙醇浓度,不仅能最大限度地提取连翘苷外,还可以尽量减少多糖的溶出;并且该浓度乙醇可以有效地带走大部分色素以及部分脂类物质,即在连翘苷的提取过程中就将下一步多糖提取过程中的杂质除去,减少提纯的步骤,降低成本,增加该工艺的可行性。闪式提取器是根据组织破碎原理设计而成的一种操作简单、提取效率高、节约资源的新型提取器,它利用高速机械外力迅速破坏植物细胞组织,使有效成分与溶剂充分接触,可用在植物软硬材料的快速提取方面^[13],是一种具有很大发展潜力的新兴提取技术。笔者在预实验时发现提取次数的增加并没有明显提高连翘苷的转移率,因此将提取次数定为两次。由于提取次数的增加会使药液量增加,导致浓缩时耗时耗能,并且造成药物粉碎过细,又会对后期的过滤带来很大麻烦。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:159,232-233.
[2] 赵咏梅,李发荣,杨建雄,等. 连翘苷降血脂及抗氧化作用的实验研究[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(2):157-159.
[3] 公衍玲,金宏,玄光善. 7 种中药水提物体外抗氧化活性研究[J]. 医药导报,2010,29(7):863-865.
[4] 史洋,王小平,白吉庆,等. 连翘抗菌、抗病毒的药理作用研究[J]. 中国现代中药,2013,15(11):950-953.
[5] 颜晰,赵连梅,孙佳玮,等. 连翘提取物体外抗肿瘤活性的初步研究[J]. 癌变·畸变·突变,2012,24(1):20-24,29.
[6] 林艳艳,马洪新,卢燕,等. 连翘对豚鼠离体回肠运动的影响[J]. 中国中药杂志,2012,37(10):1483-1486.
[7] 冯芹,夏文凯,王现珍,等. 连翘苷元对四氯化碳大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2015,31(3):426-429,430.
[8] 孔燕芳,吴彩丽,段晓颖. 正交实验优选连翘提取工艺[J]. 中国药房,2013,24(3):230-231.
[9] 卢静华,刘元媛. 连翘中连翘苷超声法提取工艺的研究[J]. 辽宁医学院学报,2011,32(1):68-70.
[10] 周旭,朱红,陈红鸽,等. 正交实验法优选连翘药材中连翘苷的提取工艺[J]. 解放军药学报,2013,29(3):230-232.
[11] 胡光,姚志娟. 正交实验法优选乙醇提取连翘苷的工艺研究[J]. 黑龙江医药,2005,18(2):41-42.
[12] 薛丹,黄豆豆,黄光辉,等. 植物多糖提取分离纯化的研究进展[J]. 中药材,2014,37(1):157-161.
[13] 刘延泽. 植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践[J]. 中国天然药物,2007,5(6):401-407.