

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.01.008

正交试验优选木姜叶柯中三叶苷提取工艺

王李婷, 王向根, 李 星, 江仁峰, 肖顺丽[△]

(湖南医药学院药学院, 湖南 怀化 418000)

摘要:目的 采用正交试验法优化木姜叶柯中三叶苷的提取工艺。方法 以三叶苷含量为评价指标,以液料比、提取时间、提取次数为影响因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,优选木姜叶柯中三叶苷提取工艺。结果 对木姜叶柯中三叶苷含量的影响强度依次为提取次数 > 提取时间 > 液料比;优选出的最佳提取工艺为液料比 15:1,提取 3 次,每次 1.5 h;经试验验证,平均含量为 33.89%, RSD 为 1.14 ($n=3$)。结论 所优选的提取工艺稳定可靠,流程简单,提取率高,可为大规模生产提供参考。

关键词:木姜叶柯;三叶苷;提取工艺;正交试验

中图分类号:R932;R284.2;TQ460.6

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)01-0026-03

Optimization of the Extraction Process of Trilobatin from *Lithocarpus litseifolius* by Orthogonal Test

WANG Liting, WANG Xianggen, LI Xing, Jiang Renfeng, XIAO Shunli

(School of Pharmaceutical Sciences, Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan, China 418000)

Abstract: **Objective** To optimize the extraction process of trilobatin from *Lithocarpus litseifolius* by orthogonal test. **Methods** The content of trilobatin was used as the evaluation index, the liquid-solid ratio, extraction time, and number of extractions as the influencing factors, and $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to optimize the extraction process of trilobatin from *Lithocarpus litseifolius*. **Results** The sequence of degree of influence on the extraction rate of trilobatin was number of extractions > extraction time > liquid-solid ratio; the optimized extraction technology was liquid-solid ratio 15:1, three times of extraction, and each time 1.5 h. The test showed that the average content was 33.89% (RSD = 1.14, $n=3$). **Conclusion** The above extraction process is stable and reliable, the process is simple, and the extraction rate is high, which can provide reference for large-scale production.

Key words: *Lithocarpus litseifolius*; trilobatin; extraction technology; orthogonal test

木姜叶柯又名多穗石柯、甜茶,为壳斗科柯属植物木姜叶柯 *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun 的干燥嫩叶^[1]。其为我国特有的植物资源,兼有茶、糖、药的功能,在民间应用已有上千年历史,具有清热解毒、化痰、祛风、降压作用,主要用于治疗湿热痢疾、皮肤瘙痒、痈疽恶疮等病症^[2]。现代药理研究表明,木姜叶柯中的黄酮成分具有降血糖^[3-4]、抗过敏^[5]、抗氧化^[6-7]、改善记忆力^[8]等药理作用。三叶苷是木姜叶柯中黄酮类含量最高的成分,对于预防肥胖、糖尿病、心血管病和高血压有一定效果^[9],具有抑制糖尿病^[9-10]、抗氧化^[11]、促肝细胞增殖^[12]等作用。本研究中以三叶苷含量为评价指标,采用正交试验法优选提取过程中液料比、提取时间、提取次数,为三叶苷的开发、利用奠定基础。现报道如下。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪,包括 G1311B 四元泵和 G4212B 型二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司); AUW120D 型电子分析天平(日本 Shimadzu 公司); Mighty-10 型超纯水机(上海砾鼎水处理设备有限公

司); RE-52CS 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试药

三叶苷对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号为 WKQ18052505,含量 > 98.0%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。木姜叶柯药材样品购自君健中药材合作社,经湖南医药学院蔡伟博士鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 三叶苷含量测定

2.1.1 色谱条件^[13-15]

色谱柱: Agilent XDB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.5% 磷酸水溶液(50:50, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。在此条件下的色谱图见图 1。

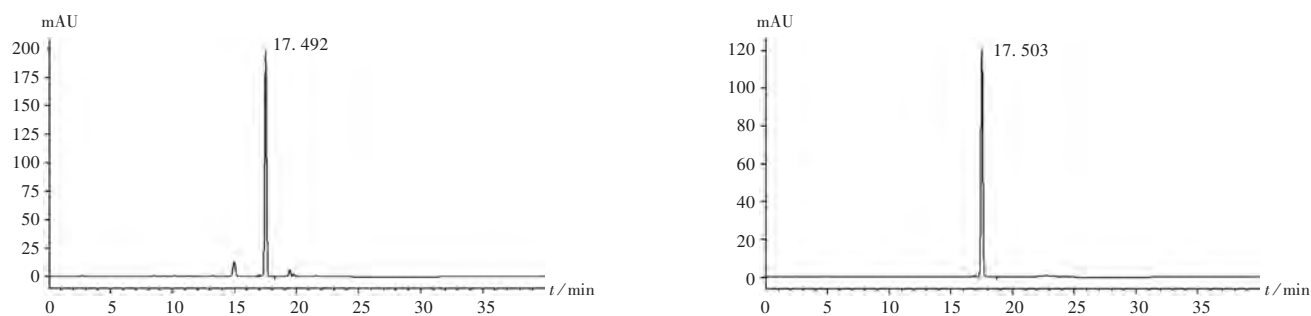
2.1.2 溶液制备

取三叶苷对照品适量,精密称定,加水制得对照品溶液。精密移取木姜叶柯提取液适量,以水定容至 1 000 mL,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

*基金项目:湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目[2016-886]。

第一作者:王李婷,女,大学本科,研究方向为药学,(电子信箱)1985556405@qq.com。

[△]通信作者:肖顺丽,女,硕士研究生,助教,主要从事中药化学成分分离与分析工作,(电子信箱)xiaosli3@163.com。



A. 供试品溶液 B. 对照品溶液

图1 高效液相色谱图

2.1.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密量取对照品溶液 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加水定容, 摇匀, 制成系列对照品溶液, 取 10 μ L, 按拟订色谱条件进样测定, 记录峰面积。以三叶苷质量浓度 (X , μ g/mL) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 25\,683X + 17.308$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 三叶苷质量浓度在 0.012 3 ~ 0.246 0 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度、稳定性、重复性试验: 试验按相关规定进行, 结果仪器精密度良好, 供试品溶液室温放置 12 h 内基本稳定, 方法重复性良好。

2.2 正交试验

以液料比(因素 A)、提取时间(因素 B)、提取次数(因素 C)为三因素, 三叶苷含量为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 因素水平见表 1, 数据采用 SAS 8.2 统计软件分析。

表1 因素水平表

水平	因素 A	因素 B(h)	因素 C(次)
1	9:1	1.0	1
2	12:1	1.5	2
3	15:1	2.0	3

正交试验设计及结果见表 2, 方差分析见表 3。可见, 以三叶苷含量为指标, 木姜叶柯正交试验中考察因素的影响强度依次为 $C > B > A$, 且差异均有显著性 ($P < 0.05$)。A 因素中, $A_3 > A_2 > A_1$, 故选择 A_3 ; B 因素中 $B_2 > B_1 > B_3$, 故选 B_2 ; C 因素中, $C_3 > C_2 > C_1$, 故选 C_3 。由此可推出, $A_3B_2C_3$ 为最优方案, 即液料比 15:1, 提取 3 次, 每次 1.5 h。

2.3 工艺验证

称取木姜叶柯 3 份, 每份 10 g, 按最佳工艺条件提取, 测得三叶苷的含量分别为 33.45%, 34.16%, 34.05%, 平均 33.89%, RSD 为 1.14%。

3 讨论

现有文献中关于木姜叶柯提取工艺大多为开发茶

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果

试验号	因素 A	因素 B	因素 C	误差 D	三叶苷含量(%)
1	1	1	1	1	10.42
2	1	2	2	2	16.91
3	1	3	3	3	19.31
4	2	1	2	3	19.83
5	2	2	3	1	25.45
6	2	3	1	2	9.86
7	3	1	3	2	25.69
8	3	2	1	3	14.94
9	3	3	2	1	16.56
K_1	46.64	55.94	35.21	52.43	
K_2	55.14	57.30	53.31	52.46	
K_3	57.19	45.72	70.44	54.08	
R	3.52	3.86	11.74	0.55	

注: 三叶苷含量(%) = 提取液中三叶苷含量(g)/药材质量(g) $\times 100\%$ 。

表3 方差分析结果

方差来源	离差平方和	n	均方	F	P
因素 A	20.86	2	10.43	35.17	<0.05
因素 B	26.70	2	13.35	45.02	<0.05
因素 C	206.95	2	103.47	348.94	<0.01
误差	0.59	2	0.30		
总变异	255.10	8			

注: $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$; $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

饮料进行的提取工艺考察, 以多成分为指标, 结果为液料比大, 提取时间短, 但三叶苷的提取率较低^[13-14]。

本研究中参考文献[15-16], 以水为提取溶剂, 以液料比、提取时间和提取次数为三因素。为节约生产成本和便于实际工业生产, 液料比选择 9:1, 12:1, 15:1。预试验中发现, 三叶苷的含量随着提取时间的延长而逐渐增加, 故提取时间选择 1.0, 1.5, 2.0 h。

本研究结果表明, 各因素对提取效果影响强度依次为提取次数 > 提取时间 > 液料比; 筛选出最佳提取方案为 $A_3B_2C_3$, 即称取适量木姜叶柯, 加入 15 倍水, 提取 3 次, 每次 1.5 h。在此工艺下三叶苷的平均含量为