

- 2014;220-221.
- [5] 高传发,马礼坤,李家宝,等.年轻急性心肌梗死的临床特点和预后分析[J].安徽医药,2014,18(11):2163-2165.
- [6] 应优优,李浙成,胡智星,等.焦虑抑郁与冠心病发生的关系研究[J].中华老年心脑血管病杂志,2015,17(7):762-763.
- [7] 严明.舒必利的临床不良反应[J].中国民康医学,2010,22(5):577-579.
- [8] ROEST AM, ZUIDERSMA M. Myocardial infarction and generalised anxiety disorder: 10-year follow-up [J]. Br J Psychiatry, 2012, 200(4):324-329.
- [9] 黄曾艳,梁东辉.急性冠脉综合征与焦虑抑郁状态相关性的研究进展[J].广东医学,2015,36(22):3552-3554.
- [10] 张焱,周勇杰.伴不同焦虑和(或)抑郁障碍的冠心病患者心率变异性情况及舍曲林的应用效果[J].广东医学,2017,38(14):2219-2223.
- [11] 谢芳,李高飞.西酞普兰对冠心病合并焦虑抑郁患者 HAMA SDS 评分的影响[J].重庆医学,2015,44(18):2512-2514.

(收稿日期:2018-03-27,修回日期:2019-02-15)

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.04.024

◇ 药学研究 ◇

种子类药材菟丝子提取工艺研究

夏宇成^{1,2}, 张兰¹, 陈宇洁¹, 鞠建明¹, 史艳玲³

作者单位:¹南京中医药大学附属中西医结合医院中药分析室,江苏 南京 210028;

²南京市第一中学,江苏 南京 210001;

³宜兴市皮肤病防治所药剂科,江苏 宜兴 214200

通信作者:史艳玲,女,副主任中药师,研究方向为中药制剂工艺与质量标准,E-mail: 563442954@qq.com

基金项目:江苏省科技支撑计划——社会发展项目(BE2012776)

摘要:目的 针对菟丝子种皮致密,提取溶剂不易渗透进入种子内部,有效成分难以提取出来的问题,本实验拟研究该药材的提取方法,优化提取工艺参数。方法 以菟丝子中主要活性成分金丝桃苷含量为评价指标,采用单因素平行比较法确定菟丝子提取前处理方法(捣碎与否)、提取方式(包煎与否)和溶剂类型(水或乙醇),采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法进一步优化提取工艺参数。结果 包煎不利于有效成分的溶出,种子捣碎有利于有效成分的溶出,菟丝子最适宜的提取工艺为首先将其捣碎破裂开,然后采用不包煎的方式,用10倍量55%乙醇提取2次,每次1h,验证实验菟丝子中金丝桃苷的提取量为2.04%,RSD(相对标准差)为1.7%。结论 优选的菟丝子提取工艺稳定可行,可用于该药材的提取,为同类性质的种子类药材的提取提供参考。

关键词:药用种子植物; 菟丝子; 金丝桃苷; 回收率; 煎出率; 中药工艺改进; 单因素试验; 正交试验

Study on extraction process of seed medicinal material *Cuscutae Semen*

XIA Yucheng^{1,2}, ZHANG Lan¹, CHEN Yujie¹, JU Jianming¹, SHI Yanling³

Author Affiliations: ¹Department of Pharmaceutical Analysis, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210028, China;

²Nanjing No. 1 Middle School, Nanjing, Jiangsu 210001, China; ³Department of Pharmacy, Yixing Institute of Dermatology and Venereology, Yixing, Jiangsu 214200, China

Abstract: **Objective** To study the extraction method and to optimize the extraction process parameters of *Cuscutae Semen* according to the problem that the effective ingredients are difficult to extract due to the dense seed coat of *Cuscutae Semen* and difficult penetration of solvent into the seeds. **Methods** With contents of hyperoside, one of the main active ingredients of *Cuscutae Semen*, as index, single factor parallel comparison method was employed to investigate the extraction method including material pretreatment (mashed or not), extraction means (packaged decocting or not) and solvent type (water or ethanol), and $L_9(3^4)$ orthogonal test was employed to optimize the extraction process parameters. **Results** Packaged decocting extraction method was not conducive to the dissolution of active ingredients; mashing the seeds was beneficial to the dissolution of the active ingredients and the optimal extrac-

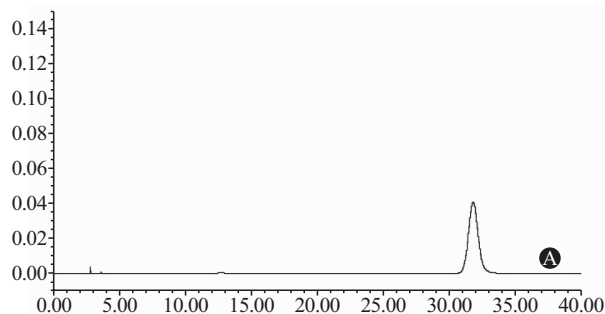
ting process was as follows: mashing the seeds first, decocting twice with 10 times the amount of 55% ethanol for 1 hour each time without package. The average extraction amount of hyperoside in *Cuscutae Semen* was 2.04%, and RSD was 1.7% in the verification experiment. **Conclusion** The optimized extraction technology was stable, feasible and suitable for *Cuscutae Semen* extraction, which provided reference for the extraction of the same kind of seeds.

Key words: Medicinal seed-plants; *Cuscuta chinensis*; Hyperin; Retrieving rate; Simmer rate; Technology Improving (TCD); Single factor test; Orthogonal test

种子类药材菟丝子为旋花科植物菟丝子(*Cuscuta chinensis* Lam.)或南方菟丝子(*Cuscuta australis* R. Br.)的干燥成熟种子,具有补益肝肾、固精缩尿、安胎、明目、止泻的功效^{[1]309}。菟丝子作为临床上一种常用的中药,最早记载于《神农本草经》,在我国产地分布广泛,主产于山东、河北、山西、陕西、江苏、黑龙江、吉林、新疆等地,其化学成分主要包括黄酮类、多糖类、生物碱类、萜类、甾体类、挥发油以及木质素等化合物^[2],其中金丝桃苷、槲皮素、紫云英甙等黄酮类成分为其主要活性成分^[3-4]。

菟丝子粒度细小,在实际煎煮过程中通常采用包煎的方式。但是课题组在研究其提取方法的时候发现该药材包煎或不包煎,水提或醇提其主要活性成分金丝桃苷提取率均较低。分析原因,推测可能因为菟丝子种皮致密,提取溶剂不易渗透进入种子内部,有效成分难以提取出来。文献报道菟丝子的提取方法有响应面法提取多糖^[5],正交试验酶法提取金丝桃苷^[6],正交试验提取总黄酮^[7]等方法,但均没有考虑菟丝子种皮致密,溶剂不易穿透进入的因素。鉴于王不留行、莱菔子等质地类似的种子类药材需要炒至爆开白花或炒至鼓起,用时捣碎的处理方法^{[1]53,272},本实验拟以金丝桃苷为评价指标,采用单因素平行比较法对菟丝子提取前处理方法进行研究,确定捣碎是否有利于活性成分溶出,并对提取方式(包煎与否)和溶剂类型(水或乙醇)进行比较研究;以正交设计法对溶剂浓度、溶剂倍数、提取次数、提取时间进行优选,确定最适宜工艺参数。

本研究起止时间为2016年6月至2017年6月。



1 仪器与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司; Milli-Q 纯水仪,美国 Millipore 公司; Mettler AT210 十万分之一电子天平,瑞士 METTLER 公司; Legend Micro 21R 离心机,赛默飞世尔科技;电热恒温水浴锅,江苏省医疗器械厂;IKA RV 10 旋转蒸发器,德国 IKA 公司;KQ-250E 超声波清洗器,昆山超声仪器有限公司。

甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。金丝桃苷对照品(批号 111521-201004),购自中国食品药品检定研究院。

菟丝子药材(批号 130501),购自安徽丰原铜陵中药饮片有限公司,产地内蒙古,经江苏省中医药研究院钱士辉研究员鉴定为旋花科植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* R. Br. 的干燥成熟种子。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法建立

2.1.1 色谱条件^[8] 色谱柱 Alltima C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (15:85);流速 1 mL/min;检测波长 360 nm;柱温 35 °C。此条件下金丝桃苷与杂质峰分离度大于 1.5,分离良好,如图 1。

2.1.2 对照品储备液的制备 精密称取金丝桃苷对照品 7.2 mg,置于 25 mL 容量瓶中,加 80% 乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含 0.288 mg 的对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取提取液 15 mL,置圆底烧瓶中,减压旋转蒸干溶剂,精密加入 20 mL 80% 乙醇,密塞,超声使充分溶解,离心,取上清液过

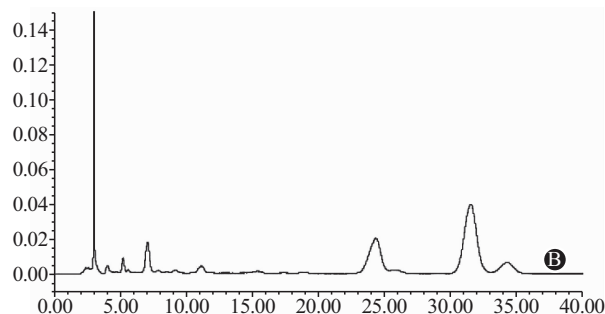


图1 金丝桃苷高效液相色谱图:A为金丝桃苷对照品;B为供试样品

0.45 μm 的微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.1.4 线性范围考察 取对照品储备液 5 mL,置 10 mL 容量瓶中,加入 80% 乙醇稀释至刻度,依次稀释成浓度为 0.144, 0.096, 0.072, 0.048, 0.024, 0.012 mg/mL 的对照品溶液,依次吸取系列浓度对照品溶液 20 μL ,注入液相色谱仪,测定峰面积。以进样量(μg)为横坐标(X),峰面积积分值为纵坐标(Y),进行回归分析,求得金丝桃苷回归方程为: $Y = 3.34 \times 10^6 X - 1.70 \times 10^5$ ($r = 0.9999$),结果表明金丝桃苷在 0.24~2.88 μg 范围内线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 精密吸取浓度为 0.096 mg/mL 的对照品溶液 20 μL ,连续进样 6 次,金丝桃苷峰面积的 RSD(相对标准差)为 1.1%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 同一样品液按照 2.1.3 供试品制备方法制备 6 份供试品溶液,取 20 μL 注入液相色谱仪,计算得到金丝桃苷含量为 0.044 mg/mL, RSD 为 2.8%。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样测定,结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定,金丝桃苷含量的 RSD 为 1.5%。

2.1.8 加样回收率试验 精密量取已知含量的样品液 7.5 mL,共 6 份,分别加入一定量的金丝桃苷对照品,按照 2.1.3 供试品制备方法制备供试品溶液,依法测定,结果回收率分别为 98.0%, 101.6%, 99.9%, 98.8%, 101.3%, 100.5%, 平均加样回收率为 100.0%, RSD 为 0.7%。

2.2 单因素试验考察菟丝子提取工艺 根据预实验,对影响菟丝子提取的主要因素提取前处理方法(捣碎与否)、提取方式(包煎与否)和提取溶剂类型(水或乙醇)分别进行单因素比较,以确定适宜的提取工艺。

取菟丝子药材 20 g,精密称定,按照表 1 各项加 10 倍量溶剂,加热回流提取 2 次,每次 1 h,抽滤,合并提取液,定容至 500 mL,得提取液 1~6 号,按照 2.1 建立的方法测定金丝桃苷含量,结果见表 1。

表 1 单因素考察菟丝子提取方法

编号	提取方法	含量/%
1	不包煎,水提,不捣碎	0.113
2	包煎,水提,不捣碎	0.070
3	不包煎,80%乙醇提,不捣碎	0.040
4	包煎,80%乙醇提,不捣碎	0.027
5	捣碎,不包煎,水提	0.100
6	捣碎,不包煎,80%乙醇提	0.180

由表 1 可知,在药材不捣碎的情况下,水提包煎金丝桃苷提取量比不包煎低 38.0%, 80% 乙醇提包煎金丝桃苷提取量比不包煎低 32.5%, 包煎不利于有效成分的溶出,水提较醇提有利于有效成分的溶出;在药材捣碎的情况下,不包煎醇提效果明显优于不包煎水提,而且不包煎醇提在所有平行比较实验中金丝桃苷提取量最高。综合上述结果,笔者认为菟丝子采用捣碎后不包煎醇提的方法有利于有效成分的提取。

2.3 正交试验优选菟丝子提取工艺参数

2.3.1 正交试验供试品制备及测定 根据表 1 及平行实验确定的提取条件,对影响提取工艺的主要因素(A 乙醇浓度、B 溶剂体积、C 提取时间、D 提取次数)按 4 因素 3 水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验^[9]。各因素水平安排见表 2。将菟丝子药材捣碎,取 20 g,精密称定,置圆底烧瓶中,分别按正交试验表中所列条件进行实验,平行 2 份,提取液抽滤,合并,根据实际得到的体积,适当稀释或浓缩,最终统一定容至 500 mL,按照 2.1 建立的方法测定金丝桃苷含量,结果见表 3。

表 2 菟丝子提取正交试验因素水平

水平	A 乙醇浓度/%	B 溶剂用量/倍	C 提取时间/h	D 提取次数/次
1	55	8	0.5	1
2	70	10	1	2
3	85	12	1.5	3

2.3.2 正交实验结果 对正交试验样品含量测定结果,采用 SPSS 18.0 统计软件进行直观分析及方差分析,结果见表 3, 4。

表 3 菟丝子提取正交试验安排及直观分析

编号	A	B	C	D	含量/%
1	1	1	1	1	0.154
2	1	2	2	2	0.206
3	1	3	3	3	0.183
4	2	1	2	3	0.190
5	2	2	3	1	0.159
6	2	3	1	2	0.151
7	3	1	3	2	0.098
8	3	2	1	3	0.089
9	3	3	2	1	0.070
k_1	0.543	0.442	0.394	0.383	
k_2	0.500	0.454	0.466	0.455	
k_3	0.257	0.404	0.440	0.462	
R	0.286	0.050	0.072	0.079	

注: k_i 表示任意列上水平号为 i 时所对应的试验结果之和; R 为极差

表4 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F 值	P 值
A	1.20	2	0.60	34.91	0.028
C	0.07	2	0.03	1.95	0.339
D	0.10	2	0.05	2.81	0.263
B(误差)	0.03	2	0.02	1.00	

注: $F_{0.05(2,2)} = 19$, $F_{0.01(2,2)} = 99$, f 均为 2

由直观分析可知,极差最大的为 A 因素,影响因素排序为 $A > D > C > B$ 。说明对金丝桃苷含量影响最大的为乙醇浓度,其次为提取次数、提取时间、溶剂倍数,最优提取工艺参数为 $A_1D_3C_2B_2$;以 B 为误差项对提取结果进行方差分析,结果 A 差异有统计学意义,C、D 差异无统计学意义,从节约能源,提高生产效率角度考虑,综合直观分析和方差分析结果,确定最佳提取工艺为 $A_1D_2C_2B_2$,即 10 倍量 55% 乙醇,提取 2 次,每次 1 h。

2.3.3 验证实验 按优选的最佳提取工艺进行试验,测定提取液中金丝桃苷含量,结果见表 5。

表5 工艺验证实验($n=3$)/%

编号	含量	平均含量	RSD
1	0.203		
2	0.208	0.204	1.7
3	0.201		

由表 5 可见,确定的提取工艺金丝桃苷的平均含量为 0.204%,RSD 为 1.7%,说明工艺重复性好,稳定可行。

3 讨论

种子类药材由于其种皮致密,传统一般将其捣碎或炒至爆开白花,使溶剂能进入种子内部,有利于有效成分的溶出,然而菟丝子在临床使用时一般用生品,未经任何处理。本研究首次对菟丝子提取方法进行了较系统的研究,发现菟丝子不捣碎时,不论是水提还是醇提,不包煎比包煎更有利于有效成分的溶出,可能是因为不包煎菟丝子药材分散在溶剂中,能充分接触溶剂,而且在提取的过程中,菟丝子在微沸的溶剂中滚动,起到搅拌的作用;根据菟丝子中活性成分金丝桃苷的理化性质,醇提效果应该优于水提,然而在不捣碎时,醇提效果不如水

提,可能是因为乙醇的渗透性不如水,难以进入菟丝子种子内部,有效成分不利于提取出来,一旦菟丝子被捣碎破壁,乙醇就容易进入其内部,根据相似相溶原理,其醇提效果就优于水提。总之,本研究认为菟丝子适宜的提取方法为先捣碎,然后采用乙醇提取,不宜包煎。该结论为同类种子类药材的提取提供了较好的参考价值。

一般认为,种子类药材不包煎不利于提取液过滤,药材捣碎破壁更加增加过滤的难度。但是我们对含菟丝子的临床复方单副药进行煎煮,用 100 目滤网过滤,由于药量较少,滤过比较容易,药渣也能较好地滤除;工业生产中,随着制药设备的进步,大量的药液可以通过加压使得提取液快速滤过,因此无论是临床汤剂的单剂量煎煮,还是工业大生产,种子类药材捣碎破壁不包煎都是可行的。

本研究在确定提取方法后,采用正交试验法对醇提工艺参数进一步优化,确定了最适宜提取溶剂浓度、溶剂用量、提取时间和提取次数,在此基础上进行了验证实验,确定制定的工艺重复性好,活性成分提取率高,适用于菟丝子的提取。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2015 年版. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 郭澄,王雅君,张剑萍. 菟丝子的化学成分和药理活性研究[J]. 时珍国医国药,2005,16(10):1035-1036.
- [3] 孙晶晶,吴秀娟,鲍军,等. 菟丝子总黄酮对氢化可的松致大鼠少弱精子症的治疗作用及其机制[J]. 华西药理学杂志,2016,31(1):14-17.
- [4] 周园,董秋菊,冯薇,等. 一测多评法测定南方菟丝子中 7 种活性成分的含量[J]. 中草药,2018,49(1):227-232.
- [5] 祁小妮,隋英,李振亮,等. 响应曲面优化菟丝子多糖提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国酿造,2015,34(8):35-38.
- [6] 周蓉,王洛临,徐文杰,等. 菟丝子的酶法提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(22):33-36.
- [7] 林晓,练立婷,罗丽丹,等. 菟丝子总黄酮超声提取工艺的研究[J]. 广州化工,2014,42(2):57-59.
- [8] 刘文苹,张振凌,吴小菲. RP-HPLC 法测定男宝胶囊中 7 种活性成分的含量[J]. 安徽医药,2016,20(1):58-60.
- [9] 石慧慧,李萍,戴运好,等. 正交试验优选复方肠泰颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4):23-26.

(收稿日期:2018-11-24,修回日期:2019-02-02)