

微波辅助萃取法提取玄参中哈巴昔和哈巴俄昔的工艺研究

傅亚¹, 范佳¹, 陈芳¹, 杨荣萍², 张景勅³, 姚波^{1*}¹重庆科技学院, 重庆 401331; ²重庆中药研究院, 重庆 400065; ³重庆医科大学药学院, 重庆 400016

摘要: 本文研究微波辅助萃取法提取玄参中哈巴昔和哈巴俄昔的最佳工艺条件, 应用微波辅助萃取法提取玄参中的哈巴昔和哈巴俄昔, 采用高效液相色谱法测定哈巴昔和哈巴俄昔的含量。结果表明微波辅助萃取法提取玄参中哈巴昔和哈巴俄昔的最佳工艺参数: 纯水作提取剂、料液比为 1:20、微波温度为 50 °C、微波时间为 30 min、微波功率为 600 W。在此最佳工艺条件下玄参中哈巴昔和哈巴俄昔的总提取率为 1.1172%。

关键词: 微波辅助萃取; 玄参; 哈巴昔; 哈巴俄昔; 高效液相色谱法

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.11.018

Optimization of Microwave-assisted Extraction of Harpagide and Harpagoside from Radix Scrophulariae

FU Ya¹, FAN Jia¹, CHEN Fang¹, YANG Rong-ping², ZHANG Jing-qing³, YAO Bo^{1*}¹Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China; ²Chongqing Academy of Chinese materia medica, Chongqing 400065, China; ³Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: This paper was aimed to optimize the microwave-assisted extraction process of harpagide and harpagoside from Radix Scrophulariae. The content of harpagide and harpagoside in the extract was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the optimal extraction conditions were: using water as extraction solvent, with solid-liquid ratio of 1:20 (g/mL), microwave temperature of 50 °C, microwave time of 30 min and microwave power of 600 W. Under the optimal conditions, the total extraction yield of harpagide and harpagoside was 1.1172%.

Key words: microwave-assisted extraction; Radix Scrophulariae; harpagide; harpagoside; high performance liquid chromatography

中药玄参(Figwort Root, Radix Scrophulariae)为玄参科植物玄参(*Scrophularia ningpoensis* Hemsl)的干燥根, 具有清热凉血, 滋阴降火, 解毒散结的功效^[1]。天然药物化学研究发现, 玄参主要含有环烯醚萜类、苯丙素苷、糖类、肉桂酸、皂苷等^[2,3]。近年对其主要化学成分环烯醚萜类研究较多, 哈巴昔与哈巴俄昔是环烯醚萜苷类中两个主要的成分^[4,5], 经研究发现, 这两种成分具有抗慢性炎症、降压、镇痛以及免疫促进的作用, 因此将哈巴昔与哈巴俄昔作为玄参的特征性成分^[6,7]。

微波辅助萃取技术是近年来发展迅速的中药有效成分提取技术, 与传统的中药活性成分提取技术相比, 具有简便、快速高效、选择性强、能耗少和环境

污染小等优点^[8], 已广泛应用于黄酮、多糖和生物碱等有效成分的提取^[9]。

本研究设计单因素实验和正交实验, 利用微波辅助萃取法提取玄参中的哈巴昔与哈巴俄昔, 采用 HPLC 测定哈巴昔和哈巴俄昔的含量, 通过对乙醇浓度、料液比、微波温度、微波时间和微波功率因素的考察, 筛选出微波提取玄参中哈巴昔与哈巴俄昔的最佳工艺条件。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

玄参(采自重庆南川玄参 GAP 基地); 哈巴昔(四川, 成都曼斯特生物科技有限公司, 批号 MUST-13121902, 纯度 ≥ 98%) 及哈巴俄昔(四川, 成都曼斯特生物科技有限公司, 批号 MUST-11071801, 纯度 ≥ 98%); 乙腈、甲醇(HPLC Grade, Honeywell Burdick & Jackson); 乙醇、磷酸(AR, Honeywell Burdick &

Jackson)。

1.2 仪器

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);X101 型微波催化合成/萃取仪(北京详鹤科技有限公司);旋转蒸发仪 RE-2000A(上海亚荣生化仪器厂);DZF-6020 真空干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司);BosChrom ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);KH-250 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);DZF-6020 真空干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司);SHZ-95B 循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);FA2104B 电子天平(上海越平科学仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 原料预处理

玄参根块 50 °C 干燥后,粉碎,过 70 目筛,备用。

2.2 哈巴昔和哈巴俄昔的测定

哈巴昔和哈巴俄昔的 HPLC 测定方法参照中国药典 2010 版^[10], 色谱柱: BosChrom ODS (250mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈(A)-0.03% 磷酸(B), 梯度洗脱: 0~10 min, 3%~10% (A); 10~20 min, 10%~33% (A); 20~25 min, 33%~50% (A); 25~30 min, 50%~80% (A); 30~35 min, 80% (A); 35~37 min, 80%~3% (A), 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 210 nm, 进样量: 20 μL, 柱温为常温。

2.3 玄参哈巴昔和哈巴俄昔的微波提取工艺

将玄参药材清洗除杂,晾干,粉碎,取已粉碎玄参药材 5.0 g,加入一定量的溶剂作为萃取剂,在控制设置条件下,微波萃取,抽滤,恒温干燥,温度控制在 60 °C 左右,取干燥样品约 0.5 g,精密加入 50% 甲醇 50 mL 密封,备用。

2.4 单因素实验

2.4.1 乙醇浓度对玄参哈巴昔和哈巴俄昔提取率的影响

称取玄参粉末约 5 g,微波辅助提取玄参中的哈巴昔和哈巴俄昔,在微波功率为 600 W、提取时间为 35 min、料液比为 1:20、微波温度为 50 °C 的条件下,分别选择不同浓度的乙醇 0、20%、40%、60%、80% 进行单因素试验,得到哈巴昔、哈巴俄昔和总昔的提取率。

2.4.2 料液比对玄参哈巴昔和哈巴俄昔提取率的影响

称取玄参粉末约 5 g,微波辅助提取玄参中的哈

巴昔和哈巴俄昔,在微波功率为 600 W、提取时间为 35 min、乙醇浓度为 40%、微波温度为 50 °C 的条件下,分别选择不同的料液比 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 进行单因素试验,得到哈巴昔、哈巴俄昔和总昔的提取率。

2.4.3 微波温度对玄参哈巴昔与哈巴俄昔提取率的影响

称取玄参粉末约 5 g,微波辅助提取玄参中的哈巴昔和哈巴俄昔,在微波功率为 600 W、料液比为 1:20、乙醇浓度为 40%、提取时间 35 min 的条件下,分别选择不同的微波温度为 30、40、50、60、70 °C 进行单因素试验,得到哈巴昔、哈巴俄昔和总昔的提取率。

2.4.4 微波时间对玄参哈巴昔与哈巴俄昔提取率的影响

称取玄参粉末约 5 g,微波辅助提取玄参中的哈巴昔和哈巴俄昔,在微波温度为 50 °C、料液比为 1:20、乙醇浓度为 40%、微波功率为 600 W 的条件下,分别选择不同的微波时间 20、25、30、35、40 min 进行单因素试验,得到哈巴昔、哈巴俄昔和总昔的提取率。

2.4.5 微波功率对玄参哈巴昔与哈巴俄昔提取率的影响

称取玄参粉末约 5 g,微波辅助提取玄参中的哈巴昔和哈巴俄昔,在微波温度为 50 °C、料液比为 1:20、乙醇浓度为 40%、提取时间 35 min 的条件下,分别选择不同的微波功率为 500、600、700、800、900 W 进行单因素试验,得到哈巴昔、哈巴俄昔和总昔的提取率。

2.5 正交实验

在上述单因素实验基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验进一步分析乙醇浓度、微波温度、微波功率、微波时间对玄参哈巴昔和哈巴俄昔总提取率的影响,优化哈巴昔和哈巴俄昔的微波提取工艺。表 1 为优化实验因素及因素所取水平。

2.6 玄参提取率的计算

根据标准工作曲线,按下式分别求出哈巴昔与哈巴俄昔浓度、提取率及总提取率:

$$C_1 = \frac{(A_1 - 6618.1)}{5899.6}$$

$$C_2 = \frac{(A_2 - 11410)}{28559}$$

$$P_1 = \frac{C_1 \times 50 \times \frac{m}{m_1}}{1000000 \times M} \times 100\%$$

表 1 优化实验因素及因素所取水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

因素 Factors	(A) 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	(B) 微波温度 Temperature (°C)	(C) 微波功率 Microwave power (W)	(D) 微波时间 Microwave time (min)
水平 Levels	0	40	500	25
	20	50	600	30
	40	60	700	35

$$P_2 = \frac{C_2 \times 50 \times \frac{m}{m_1}}{1000000 \times M} \times 100\%$$

$$P_3 = P_1 + P_2$$

式中: C_1 -哈巴昔的浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; C_2 -哈巴俄昔的浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; A_1 -哈巴昔的峰面积, mv ; A_2 -哈巴俄昔的峰面积, mv ; P_1 -哈巴昔的提取率, %; P_2 -哈巴俄昔的提取率, %; P_3 -哈巴昔和哈巴俄昔的总提取率, %; m -玄参提取液的干燥物质量, g ; m_1 -用于测定的干燥物质量, g ; M -玄参药材的质量, g 。

3 实验结果

3.1 样品中哈巴昔和哈巴俄昔的 HPLC 测定

取不同浓度的哈巴昔与哈巴俄昔对照品进样, 记录高效液相色谱图中哈巴昔与哈巴俄昔的峰面积 (见图 1A), 建立哈巴昔和哈巴俄昔的标准曲线和

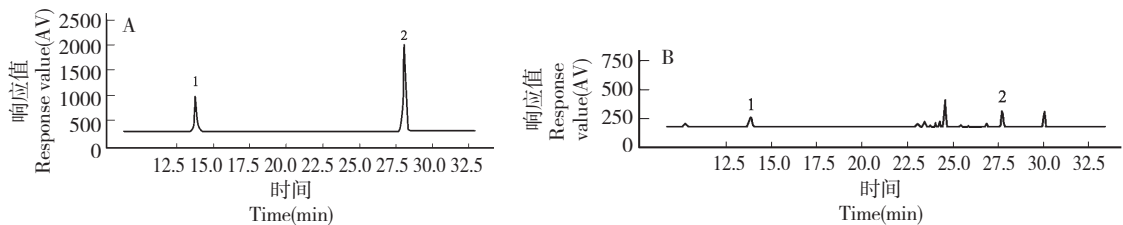


图 1 混合标准品(A)、玄参样品(B)的 HPLC 色谱图

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

3.2 单因素实验

3.2.1 乙醇浓度对玄参哈巴昔和哈巴俄昔提取率的影响

实验结果显示 (见图 2A): 当溶剂为纯水时玄参哈巴昔的提取率最高, 哈巴俄昔的提取率最低, 在其他实验条件不变的情况下, 随着乙醇浓度的增大, 哈巴昔的提取率降低, 哈巴俄昔的提取率升高。因为, 一方面乙醇浓度的变化会使溶剂的极性发生改变, 使得哈巴昔和哈巴俄昔及玄参中其他成分的溶出率随之改变, 之所以哈巴俄昔提取率仍然在升高, 可能是哈巴俄昔的极性较小; 另一方面可以直接观察到玄参提取液呈黑色, 可能因为该色素在乙醇中

回归方程: 哈巴昔线性回归方程: $Y = 5899.6X + 6618.1$, $R^2 = 0.9998$; 哈巴俄昔线性回归方程: $Y = 28559X + 11410$, $R^2 = 0.9997$ 。哈巴昔与哈巴俄昔分别在 $15 \sim 240 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $5 \sim 80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内具有良好的线性关系。

取哈巴昔与哈巴俄昔对照品, 分别连续进样 5 次进行精密度测定, 分别计算平均峰面积, 算出相对标准偏差, 结果哈巴昔的 RSD 为 1.07%, 哈巴俄昔的 RSD 为 0.94%, 都低于 2%, 表明该仪器的精密度良好。

取 5 份已知样品浓度的提取液 0.5 mL, 将已知浓度的哈巴昔与哈巴俄昔混合对照品分别按 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 分别加入到 5 份样品中, 定溶在 10 mL 的容量瓶中进行回收率实验, 得到峰面积, 换算浓度, 计算回收率, 得到哈巴昔的平均回收率为 99.10%, RSD 为 1.80%; 哈巴俄昔的平均回收率为 98.20%, RSD 为 1.70%。

的溶出很大, 抑制了哈巴昔的溶出, 但是哈巴俄昔未受影响。由于总昔的提取率是在溶剂为纯水时最高, 所以选择纯水做溶剂较宜。

3.2.2 料液比对玄参哈巴昔和哈巴俄昔提取率的影响

实验结果表明 (见图 2B): 在其他实验条件不变的情况下, 随着料液比的增加, 测得玄参哈巴昔及哈巴俄昔的提取率均升高, 且均在料液比 1:20 后随料液比升高提取率无明显变化。这是因为刚开始料液比小时, 随着料液比增大, 两相浓度差增大, 传质速度加快的较为明显, 即玄参提取率增加幅度大。继续增大料液比, 但传质动力增加不大, 所以提取率增

加不明显,考虑节约成本,所以选择相对较小的料液比 1:20 更合理。

3.2.3 微波温度对玄参哈巴昔与哈巴俄昔提取率的影响

实验结果可知(见图 2C):在其他实验条件不变的情况下,随着温度的增大,测得玄参哈巴昔及哈巴俄昔的提取率均升高,当温度为 50 ℃ 达到最高,继续增大温度总提取率反而降低。这是由于温度有助于传质过程,使分子扩散运动更激烈,加快溶质的扩散和溶剂的渗透,但随着温度升高,杂质溶解速度也显著加快,与哈巴昔和哈巴俄昔形成竞争,干扰其浸出速率,导致哈巴昔和哈巴俄昔的提取率降低。因此微波温度选择 50 ℃ 为宜。

3.2.4 微波时间对玄参哈巴昔与哈巴俄昔提取率的影响

实验结果表明(见图 2D):在其他实验条件不变的情况下,随着微波提取时间延长,测得玄参哈巴昔和哈巴俄昔的提取率升高,哈巴昔的提取率在 30 min 时达到最高,哈巴俄昔的提取率在 25 min 时达到最高,继续延长提取时间总提取率反而降低。这

是由于微波时间越长,对细胞膜的破坏作用越大,溶出的哈巴昔和哈巴俄昔越多,但是过于延长微波提取时间,一方面,细胞膜的破坏程度过大,其他杂质的溶出也会增加,抑制哈巴昔及哈巴俄昔的溶出;另一方面,辐射时间过长可能导致有效成分被破坏,因而提取率降低。又由于总苷的提取率在 30 min 时最高,因此微波时间选择 30 min 为宜。

3.2.5 微波功率对玄参哈巴昔与哈巴俄昔提取率的影响

实验结果显示(见图 2E):在其他实验条件不变的情况下,随着功率的增大,玄参哈巴昔及哈巴俄昔的提取率均升高,当在 600 W 的时候达到最高,继续增大功率总提取率反而降低。分析原因,因为微波功率越大时,物料吸收的微波能越多,细胞破坏程度越大,哈巴昔及哈巴俄昔溶出越多。但微波功率过大,一方面更多的易于被溶剂吸附的物质溶出,降低了哈巴昔及哈巴俄昔溶出率;另一方面,功率过高易使溶剂暴沸,促使溶剂挥发,降低哈巴昔和哈巴俄昔的提取率。因此微波功率选择 600 W 为宜。

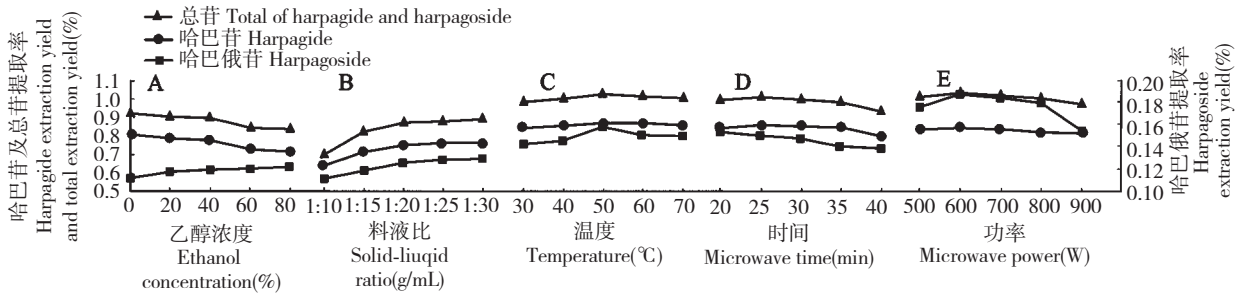


图 2 乙醇浓度(A)、料液比(B)、温度(C)、时间(D)、功率(E)对提取率的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration (A), solid-liquid ratio (B), temperature (C), microwave time (D) and microwave power (E) on extraction yield

3.3 玄参哈巴昔和哈巴俄昔提取优化实验研究

通过设计 $L_9(3^4)$ 正交实验发现,影响玄参哈巴昔和哈巴俄昔总提取率因素的主次顺序为微波温度 > 微波功率 > 乙醇浓度 > 微波时间,最佳水平为

A1B2C2D2, 即最优提取工艺参数为微波温度 50 ℃,微波功率为 600 W,乙醇浓度 0%,微波时间 30 min,料液比 1:20。在此最佳工艺条件下玄参哈巴昔和哈巴俄昔的总提取率为 1.1172%。

表 2 正交方案设计及结果

Table 2 Orthogonal experiment design and result

序号 No.	优化试验因素及水平 Optimization experiment of factors and levels				试验结果 Experimental result
	A	B	C	D	总提取率 Total extraction yield (%)
1	0	40	500	25	1.0538
2	0	50	600	30	1.1172

3	0	60	700	35	1.0961
4	20	40	600	35	1.0568
5	20	50	700	25	1.0845
6	20	60	500	30	1.0603
7	40	40	700	30	1.0841
8	40	50	500	35	1.0749
9	40	60	600	25	1.0650
K1	0.959	0.935	0.933	0.938	
K2	0.937	0.962	0.950	0.957	
K3	0.945	0.944	0.958	0.946	
R	0.022	0.027	0.025	0.019	

3.4 微波辅助提取法与直接加热水提法的比较

行比较,结果如表3。

以微波辅助提取最佳条件与直接加热水提法进

表3 微波辅助提取法与传统水提法结果对比

Table 3 Comparison of microwave-assisted extraction method with traditional water extraction method

提取方式 Extraction mode	微波时间 Microwave time (min)	提取温度 Temperature (°C)	料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	总提取率 Total extraction yield (%)
微波辅助提取法 Microwave-assisted extraction	30	50	1:20	1.1172
传统水提法 Traditional water extraction	90	50	1:20	0.7078

由上述结果可见,微波辅助提取法与直接水提法相比,具有缩短提取时间,提高哈巴昔和哈巴俄昔总提取效率的明显优势。

4 结论

由单因素及正交实验考察可知,微波提取玄参哈巴昔和哈巴俄昔的最佳提取工艺条件为:纯水提取、微波温度 50 °C,微波功率为 600 W,微波时间 30 min,料液比 1:20。此工艺条件下玄参哈巴昔和哈巴俄昔的总提取率为 1.1172%。微波辅助提取法比直接水提法更加省时,提取率更高。

参考文献

- Huang MM(黄萌萌), Qiao JJ(乔娟娟), Qiu YL(邱亚玲), *et al.* Optimal extraction of main constituent from Radix Scrophulariae based on response surface methodology. *Pharm Clin Res* (药学与临床研究), 2014, 22:34-38.
- Li Y(李媛), Song BA(宋宝安), Yang S(杨松), *et al.* Chemical constituents of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:47-51.
- Gao XM(高学敏). *Traditional Chinese Medicine* (中药学). Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2002. 168-169.
- Geu-Flores F, Sherden NH, Courdavault V, *et al.* An alterna-

tive route to cyclic terpenes by reductive cyclization in iridoid biosynthesis. *Nature*, 2012, 492:138-142.

- Gong YL(龚友兰), Yu SH(余三红), Yi ZX(易钊旭), *et al.* Bibliometric analysis of research of Scrophularia pharmaceutical 2002-2012. *Chin J Lib Infor Sci Tradit Chin Med* (中国中医药图书情报杂志), 2014, 38:21-23.
- Zhang ZQ(张召强), Li M(李明). 玄参的化学成分及药理作用的研究进展. *Guide Chin Med* (中国医药指南), 2013, 11(26):49-51.
- Gong YL(龚友兰), Pan QH(潘琦虹), Xiang DX(向大雄). Advances in studies on iridoids in plants of *Scrophularia* L and their bioactivity. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:406-413.
- Li GK(李攻科), Du FY(杜甫佑), Xiao XH(肖小华). Application of microwave assisted extraction in the modernization of Chinese traditional medicine. *Fine Chem* (精细化工), 2007, 24:1184-1191.
- Cao HB(曹洪斌), Shen JM(申金明), Chen HL(陈莲惠). Application of microwave extraction in Chinese traditional medicine. *Guangzhou Chem* (广州化学), 2013, 38:72-76.
- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. 108-109.