

正交试验优化独子藤果实中雷公藤红素的醇提工艺^Δ

许启荣*,周琼,张紫萍,陈 纠(广州市第十二人民医院药剂科,广州 510620)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2677-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.24

摘要 目的:优选独子藤果实中雷公藤红素的醇提工艺。方法:采用高效液相色谱法测定雷公藤红素的含量。以提取时间、提取次数、料液比为考察因素,以雷公藤红素的提取率为考察指标设计正交试验,并进行验证试验。结果:最优醇提工艺为45%甲醇提取3次、每次2 h、料液比1:8;验证试验中,雷公藤红素的平均提取率为0.917 mg/g(RSD=2.85%,n=3)。结论:本研究优化的醇提工艺稳定可行、提取率较高,适用于独子藤果实中雷公藤红素的提取。

关键词 独子藤;雷公藤红素;单因素;正交试验;高效液相色谱法

Optimization of Methanol Extraction Technology for Tripterine in the Fruit of *Celastrus monospermus* by Orthogonal Design

XU Qirong, ZHOU Qiong, ZHANG Zhiping, CHEN Jiu (Dept. of Pharmacy, Guangzhou 12th Hospital, Guangzhou 510620, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the methanol extraction technology of tripterine in the fruit of *Celastrus monospermus*. METHODS: HPLC was adopted to determine the content of tripterine. Using extraction time, extraction times, solid-liquid ratio as investigation factors, extraction rate of tripterine as investigation index, orthogonal test was designed, and verification test was conducted. RESULTS: The optimal methanol extraction technology was as follow as 45% methanol extracting 2 h each time with solid-liquid ratio of 1:8 for 3 times. In the verification test, the average extraction rate of tripterine was 0.917 mg/g (RSD=2.85%, n=3). CONCLUSIONS: The optimized methanol extraction technology is stable and feasible with high extraction rate, and is suitable for the extraction of tripterine in the fruit of *C. monospermus*.

KEYWORDS *Celastrus monospermus*; Tripterine; Single factor; Orthogonal test; HPLC

独子藤(*Celastrus monospermus* Roxb.)为卫矛科南蛇属植物,分布于越南、印度及我国福建、广东、云南、贵州、广西等省区的林带中^[1]。研究表明,独子藤含有一定量的生物碱和三萜类成分,其中木栓烷型三萜类化合物具有显著的抗癌活性^[2]。

雷公藤红素又名南蛇藤醇/素,外观呈红色针状结晶,不溶于水,易溶于有机溶剂,分子式为C₂₉H₃₈O₄,分子量为450,能与半胱氨酸的巯基发生迈克尔加成反应^[3],具有抗炎、免疫抑制及抗肿瘤等多种药理活性^[4]。目前,对独子藤中雷公藤红素的提取报道较少,其优化提取工

艺报道更少。本文对独子藤果实中雷公藤红素提取工艺的主要影响因素进行单因素和正交试验研究,为更合理有效地提取藤果实中的雷公藤红素提供参考。

1 材料

1.1 仪器

SartoriusBP211D电子天平(德国赛多利斯公司);1100高效液相色谱(HPLC)仪,包括G1315B二极管阵列检测器(DAD)、1100色谱工作站(美国安捷伦公司)。

1.2 药材、对照品与试剂

雷公藤于2008年10月采自广东阳春地区,由广东

版.北京:中国医药科技出版社,2015:77-78.

- [5] 吴绍康,沈先荣,梅威威,等.大孔吸附树脂分离纯化枇杷花总黄酮工艺研究[J].中华中医药学刊,2014,32(9):2185-2188.
- [6] 汪怡.酸性染料比色法测定黄连解毒汤中总生物碱的含量[J].安徽医药,2013,17(5):759-762.
- [7] 梅威威,吴绍康,张浩,等.铁皮石斛多糖提取工艺及脱蛋白方法研究[J].中华中医药学刊,2014,32(12):2869-2872.
- [8] 杜晨晖,闫艳,冯前进,等.葛根芩连汤发酵前后总黄酮和总生物碱含量变化研究[J].中华中医药杂志,2016,31

(11):4850-4853.

- [9] 吴玉仙,刘书珍,孙晋营.五苓散临床应用三则[J].浙江中医杂志,2012,47(4):292.
- [10] 王引弟,张智龙应用抵挡汤临床经验举隅[J].中国中医药信息杂志,2011,18(5):87-88.
- [11] 郭晓庆,孙佳明,张辉.水蛭的化学成分与药理作用[J].吉林中医药,2015,35(1):47-50.
- [12] 李军德,黄璐琦,陈敏,等.中药虻虫研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(8):228-230.
- [13] 王仁芳,范令刚,高文远,等.桃仁化学成分与药理活性研究进展[J].现代药物与临床,2010,25(6):426-429.
- [14] 胡永淑.大黄炮制前后物质基础变化研究[J].中国药房,2014,25(11):1016-1018.

Δ 基金项目:广东省自筹经费类科技计划项目(No.粤科规财字[2015]110号)

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:020-38981270。E-mail:x82521326@126.com

(收稿日期:2016-10-08 修回日期:2016-12-15)
(编辑:刘 萍)

药学院中药学院李书渊教授鉴定为独子藤(*Celastrus monospermus* Roxb.)的果实;雷公藤红素对照品(上海纯优生物科技有限公司,批号:P0259,纯度:≥98%);甲醇、磷酸均为色谱纯。

2 独子藤果实中雷公藤红素醇提液的制备和含量测定

2.1 雷公藤红素醇提液的制备

称取独子藤果实约15.0 g,粉碎,精密称定,甲醇回流提取3次,提取液过滤后合并,回收甲醇,干燥至无醇味。将样品用三氯甲烷超声溶解,在硅胶柱上用三氯甲烷洗脱,回收洗脱液,残渣用甲醇溶解并定容于100 mL量瓶中,用0.45 μm微孔滤膜过滤,取滤液,即得。

2.2 雷公藤红素的含量测定

2.2.1 对照品贮备液的制备 称取雷公藤红素对照品5.03 mg,精密称定,甲醇溶解,定容至25 mL量瓶中,即得质量浓度为0.201 2 mg/mL的对照品贮备液。

2.2.2 色谱条件与系统适应性试验 色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-5%磷酸(80:20, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:426 nm;柱温:25 ℃;进样量:20 μL。在此色谱条件下,取“2.1”和“2.2.1”项下溶液进样测定,结果,理论板数以雷公藤红素计不低于18 076,分离度>1.5。色谱图见图1。

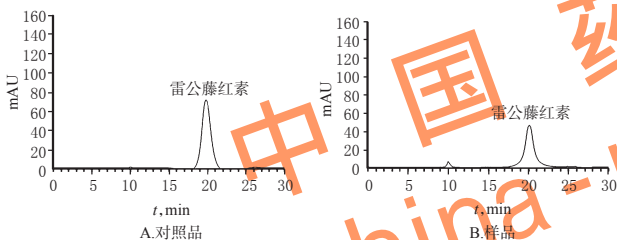


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2.3 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”项下的对照品贮备液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL于5 mL量瓶中,甲醇定容,摇匀,制得系列对照品工作液。依次吸取对照品工作液各20 μL,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。以雷公藤红素质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程为 $y=3.377 8 \times 10^3 x - 1.852 3 \times 10^4$ ($r=0.999 3$)。结果表明雷公藤红素在40.24~200.12 μg/mL范围内线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 精密吸取雷公藤红素对照品贮备液,按“2.2.2”项下色谱条件进样,同日内连续测定6次,结果峰面积的RSD=3.03%($n=6$);连续6 d分别进样1次测定,结果峰面积的RSD=4.38%($n=6$)。结果表明日内、日间精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 取同一批次的雷公藤果实,按“2.1”项方法处理后,分别于室温放置0、1、2、4、6 h后按“2.2.2”项下色谱条件进样测定。结果,峰面积的RSD=3.37%($n=5$),表明样品于室温环境下6 h稳定性良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批次的雷公藤果实,共5份,按“2.1”项下方法处理后,按“2.2.1”项下色谱条件进样测

定,结果峰面积的RSD=4.46%($n=5$),表明重复性良好。

2.2.7 准确度试验 取同一批次的雷公藤果实,按“2.1”项方法处理后,分别按高、中、低质量(1.0、0.5、0.1 mg)加入雷公藤红素对照品,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果,平均加样回收为95.38%(RSD=4.26%, $n=9$),表明该方法准确度良好。

3 单因素考察及正交试验

3.1 单因素考察

3.1.1 甲醇体积分数 固定提取时间为2 h、提取1次、料液比为1:10,分别考察甲醇体积分数为25%、35%、45%、55%、65%、75%时雷公藤红素的提取率(提取到的雷公藤红素的质量/处理前雷公藤果实的质量)。结果,甲醇体积分数在25%~45%之间雷公藤红素提取率呈上升趋势,45%之后开始下降,45%时提取率最高。故本试验确定45%甲醇为固定的提取溶剂。

3.1.2 提取时间 固定提取次数为1次、料液比为1:10,分别考察提取时间为1、1.5、2、2.5、3 h条件下雷公藤红素的提取率。结果,提取时间在1~2 h内雷公藤红素提取率呈明显上升趋势,2.5 h之后基本趋于平稳并几乎没有增加。故确定以提取时间1.5~2.5 h为正交试验的考察水平。

3.1.3 提取次数 固定料液比为1:10,提取时间为2 h,分别考察提取次数为1、2、3、4、5次时雷公藤红素的提取率。结果,提取1~3次时雷公藤红素提取率明显增加,提取4~5次时提取率增加甚微。考虑到提取3次可能已经将雷公藤红素基本提取完全,故确定以提取1~3次为正交试验的考察水平。

3.1.4 料液比 固定提取时间为2 h、提取1次,分别考察料液比为1:4、1:6、1:8、1:10、1:12时雷公藤红素的提取率。结果,随着料液比的增加,雷公藤红素提取率有所增加,而料液比为1:8~1:12时提取率增加趋势不明显。考虑到今后的生产成本,故确定以料液比1:8~1:10为正交试验的考察水平。

3.2 正交试验

以提取时间(A)、提取次数(B)、料液比(C)为考察因素,以雷公藤红素提取率为考察指标设计3因素3水平正交试验。正交试验因素与水平见表1,设计安排与结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 因素与水平表

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(提取时间),h	B(提取次数)	C(料液比),g/mL
1	1.5	1	1:8
2	2.0	2	1:9
3	2.5	3	1:10

由表2可知,极差R值显示因素作用主次为B>A>C,即提取次数是重要影响因素。方差分析结果表明,提取次数对提取率的影响达到显著水平($P<0.05$)。结合环境保护与经济考量,确定最优提取工艺组合为A₃B₃C₁,即提取2 h、提取3次、料液比为1:8。此条件下雷公藤红素的提取率为0.995 mg/g。

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and result of orthogonal test

编号	因素				雷公藤红素提取率,mg/g
	A(提取时间)	B(提取次数)	C(料液比)	D(空白)	
1	1	1	1	1	0.649
2	1	2	2	2	0.754
3	1	3	3	3	0.919
4	2	1	3	2	0.833
5	2	2	1	3	0.917
6	2	3	2	1	0.911
7	3	1	2	3	0.659
8	3	2	3	1	0.910
9	3	3	1	2	0.995
K_1	0.774	0.714	0.854	0.823	
K_2	0.889	0.860	0.774	0.860	
K_3	0.855	0.942	0.887	0.832	
R	0.115	0.228	0.113	0.037	

表3 方差分析结果

Tab 3 Result of variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
A	0.021 0	2	0.010 5	9.197	
B	0.080 2	2	0.040 1	35.420	<0.05
C	0.022 0	2	0.011 0	8.910	
D(误差)	0.002 0	2	0.001 0		

注: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$ Note: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$

3.3 验证试验

按照最优提取工艺,称取适量的独子藤果实共3份,按“2.1”项下方法处理后,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果,平均提取率为0.917 mg/g(RSD=2.85%, $n=3$),表明此条件具有良好的重复性、工艺稳定,可用于雷公藤红素的提取。

4 讨论

近年来,雷公藤红素的多种药理活性不断被发现,如抗炎及免疫抑制、抗纤维化、抗肿瘤血管生成、增强瘦素敏感性等^[5]、有望用于治疗类风湿性关节炎^[6]、糖尿病^[7]、阿尔茨海默病^[8]、肥胖症^[9]和多种癌症^[10]。雷公藤红素的抗肿瘤机制一直不明确,直至2006年中美科学家联合发现雷公藤红素的抗癌新机制后,其抗白血病作用得到越来越多的重视^[11]。

本试验在文献[12-13]的基础上,比较了两种流动相[乙腈-5%磷酸(80:20)、甲醇-5%磷酸(80:20)],结果发现第2种流动相下对照品的峰形更好。比较了3种检测波长(425、426、544 nm),结果发现426 nm波长处有较好的吸收,干扰少;筛选了3种流速(0.8、1.0、1.2 mL/min),结果发现流速为1.0 mL/min时分离效果较好,流速低时有拖尾现象,流速高时分离不完全。

目前,对雷公藤中活性成分的提取溶剂主要有水、甲醇、乙醇、二氯乙烷,本试验在文献[14-16]的基础上,选择了甲醇提取;因素与水平的设计参考文献[17],并对甲醇体积分数对提取效率的影响进行了单因素考察,最终确定45%甲醇作为提取溶剂。比较了直接进样和经硅胶柱层析纯化再进样的色谱图。结果显示,前者杂质峰较多,对色谱柱的污染较大;而后者能有效去除其他

极性杂质,雷公藤红素分离较好,可有效排除其他干扰。

本试验优选得到的独子藤果实中雷公藤红素的最佳提取工艺为45%甲醇回流提取3次,每次2 h,料液比为1:8。该法简便易行、工艺稳定,可用于独子藤中雷公藤红素的提取。

参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所.中国高等植物图鉴:第二册[M].北京:科学出版社,1980:661.
- [2] 陈铭洋,李国成,魏佳纯,等.独子藤化学成分研究[J].中成药,2011,33(4):651-655.
- [3] Salminen A, Lehtonen M, Paimela T, et al. Celastrol: molecular targets of thunder god vine[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(3):439-442.
- [4] 夏玲红,崔岚.雷公藤红素的药理作用研究进展[J].医药导报,2009,28(6):730-732.
- [5] Greenhill C. Obesity: celastrol identified as a leptin sensitizer and potential novel treatment for obesity[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11(8):444.
- [6] Cascao R, Vidal B, Raquel H, et al. Effective treatment of rat adjuvant-induced arthritis by celastrol[J]. *Autoimmun Rev*, 2012, 11(12):856-862.
- [7] Grant CW, Moran-Paul CM, Duclos SK, et al. Testosterone for prevention or reversal of type 1 diabetes in rodents[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e72989.
- [8] Paris D, Ganey NJ, Laporte V, et al. Reduction of β -amyloid pathology by celastrol in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Neuroinflammation*, 2010, doi: 10.1186/1742-2094-3-17.
- [9] Liu J, Lee J, Hernandez MAS, et al. Treatment of obesity with celastrol[J]. *Cell*, 2015, 161(5):999-1011.
- [10] Liu Z, Ma L, Zhou GB. The main anticancer bullet of the Chinese medicinal herb, thunder god vine[J]. *Molecules*, 2011, 16(6):5283-5297.
- [11] Uttarkar S, Dassé E, Coulibaly A, et al. Targeting acute myeloid leukemia with a small molecule inhibitor of the Myb/p300 interaction[J]. *Blood*, 2016, 127(9):1173-1182.
- [12] 刘慧琼,李国成,卢绮雯,等. HPLC法测定独子藤中雷公藤红素的含量[J].广东药学院学报,2010,26(5):489-491.
- [13] 刘法千,金芳,俞晓兰,等.高效液相色谱法测定雷公藤多苷片中雷公藤红素的含量[J].医药导报,2016,35(s1):117-118.
- [14] 何昱,石森林,张茹萍,等.雷公藤多苷提取物中主要有效部位的含量比较[J].中国中医急诊,2014,23(5):812-815.
- [15] 周琼,王定勇,张彦,等.独子藤叶的二氯甲烷部位化学成分分析[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(14):64-69.
- [16] 张贺,江莹,孟楣,等. HPLC法测定不同产地雷公藤药材中雷公藤类脂甲的含量[J].中药分析与鉴定,2014,25(31):2916-2918.
- [17] 赵之丽,赵平,邓光锐,等.多指标正交试验优化复方江南卷柏散提取工艺[J].中国药房,2016,27(28):3996-3998.

(收稿日期:2017-01-12 修回日期:2017-05-01)

(编辑:刘明伟)