

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.08.10

# 穿心莲超声提取工艺研究

周汝顺, 江 燕, 陈启友, 李 裕

(湖南省兽药饲料监察所, 长沙 410006)

[收稿日期] 2019-04-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 08-0066-05 [中图分类号] S853.7

**[摘 要]** 优选穿心莲药材的提取工艺。通过单因素和正交试验, 测定穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、新穿心莲内酯三种二萜内酯类的总含量, 确定最佳超声提取工艺。确定穿心莲药材的最佳超声提取工艺为乙醇浓度 60%, 超声时间 1 h, 料液比为 1:15, 此条件下穿心莲二萜内酯类的总含量为 2.27%。该试验确定的超声提取工艺稳定可行, 方法可靠, 可为穿心莲有效成分的提取提供理论依据。

**[关键词]** 穿心莲; 二萜内酯类; 超声提取; 提取工艺; 单因素; 正交试验

## Study on Ultrasonic Extraction Process of *Andrographis paniculata*

ZHOU Ru-shun, JIANG Yan, CHEN Qi-you, LI Yu

(Hunan Provincial Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Changsha 410006, China)

**Abstract:** The optimal extraction process of *Andrographis paniculata* has been determined. Through single factor and orthogonal tests, the total contents of andrographolide, dehydroandrographolide and neoandrographolide were detected to determine the optimal ultrasonic extraction process. The optimal ultrasonic extraction process of *Andrographis paniculata* was determined as follows: ethanol concentration 60%, ultrasonic time 1 h, solid-liquid ratio 1:15. Under these conditions, the total content of *Andrographis paniculata* diterpenoids was 2.27%. The ultrasonic extraction process determined by this experiment is stable and feasible, with reliable method, which can provide theoretical basis for the extraction of effective components of *Andrographis paniculata*.

**Key words:** *Andrographis paniculata*; diterpene lactones; ultrasonic extraction; extraction process; single factor; orthogonal test

穿心莲是爵床科穿心莲属植物, 又名榄核莲、一见喜, 为一年生草本植物。药用穿心莲为植物穿心莲 [*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees] 的干燥地上部分, 具有清热解毒, 消肿止痛的功效<sup>[1]</sup>。穿心莲中的成分复杂, 已从中分离出多种二萜内酯

类、黄酮类以及其他成分<sup>[2]</sup>。其中二萜内酯类成分是其用于治疗急性痢疾、胃肠炎、咽喉炎、扁桃体炎、感冒发热等的有效成分, 但由于穿心莲内酯等二萜内酯类成分水溶性较差且遇热不稳定<sup>[3-4]</sup>, 在传统生产提取过程中易被破坏, 提取率低, 因此本

文通过试验旨在探索超声提取最佳生产工艺,为穿心莲有效成分的提取提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** Agilent 1200 高效液相色谱仪(含四元梯度泵,紫外检测器,自动进样器,柱温箱,色谱工作站),梅特勒 MS205DU 电子天平,QYTC 型台式超声波清洗机,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯;穿心莲内酯(批号 110797-200307,来源中国药品生物制品检定所),脱水穿心莲内酯(批号 110854-201308,含量 99.7%,来源中国食品药品鉴定研究院),新穿心莲内酯(批号 B21392,含量  $\geq 98\%$ ,来源上海源叶生物科技有限公司)。穿心莲药材及穿心莲叶和茎均由湖南绿亨世源动物药业有限公司提供,产于广西贵港。

## 1.2 方法

**1.2.1 色谱条件与系统适应性试验** Agilent TC-C18 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m),流动相:乙腈-水(38:62),流速:1.0 mL/min,柱温 25  $^{\circ}$ C,进样量:10  $\mu$ L,检测波长:穿心莲内酯为 225 nm,新穿心莲内酯为 210 nm,脱水穿心莲内酯为 254 nm;理论塔板数按穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯峰计算均应不低于 2000。

**1.2.2 对照品溶液的制备** 取穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 各含 0.1 mg 的混合溶液,即得。

**1.2.3 供试品溶液的制备** 精密称取本品 10 g,按不同的提取方法提取后制成 100 mL 提取液。取 5 mL 过中性氧化铝柱,用 50% 乙醇定容至 100 mL,摇匀,即得。

**1.2.4 单因素实验设计** 分别考察不同提取方法,不同乙醇浓度,不同料液比,不同超声时间,不同药用部位等因素对穿心莲二萜内酯类成分总含量(穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯的总和)的影响。

**1.2.5 正交试验设计** 在单因素研究的基础上,以二萜内酯类成分总含量为测定指标,对影响提取工艺的主要因素(A 乙醇含量、B 提取时间、C 料液比)设计正交试验,优化超声提取穿心莲中二萜内

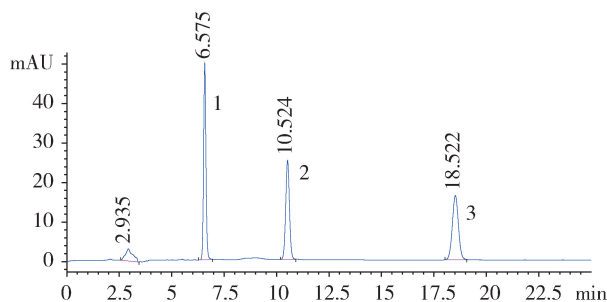


图 1 对照品液相色谱图(1 为穿心莲内酯峰, 2 为新穿心莲内酯峰, 3 为脱水穿心莲内酯峰)

Fig 1 HPLC chromatogram of reference substance (1 is andrographolide peak, 2 is Neoandrographolide peak, 3 is dehydroandrographolide peak)

酯类成分的最佳工艺条件。

**1.2.6 数据处理** 分析所有的样品均采用随机取样的方法,所有实验数据均为两次测定的平均值,并计算标准偏差。采用 EXCEL 进行作图。正交试验数据统计分析采用 SPSS18.0 数据处理软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

**2.1.1 提取方法的选择** 准确称取穿心莲 10 g,加 60% 乙醇 100 mL 做提取液,分别用浸渍 24 h、50 $^{\circ}$ C 热浸 6 h、超声 1 h、加热回流 1 h 及水煎煮 2 h 的方法提取,计算不同提取方法下二萜内酯类总含量,结果见图 2。

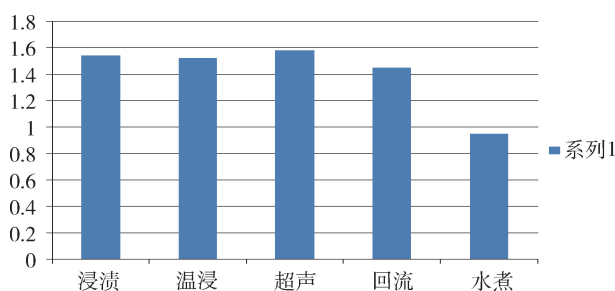


图 2 不同提取方法提取二萜内酯类总含量的比较

Fig 2 Comparison of total diterpene lactones extracted by different extraction methods

从图 2 可知,不同方法提取二萜内酯类总含量以超声工艺 > 浸渍工艺 > 温浸工艺 > 回流工艺。

超声提取的得率略高,但四者的差异不显著,考虑到超声提取的快捷性和工艺提取的可操作性,超声提取最合适。

**2.1.2 乙醇浓度的选择** 准确称取穿心莲 10g,分别用 100 mL30% 乙醇、40% 乙醇、50% 乙醇、60% 乙醇、70% 乙醇、80% 乙醇、90 乙醇、无水乙醇浸泡 1 h 后超声提取 1 h,计算不同乙醇浓度下提取二萜内酯类总含量,结果见图 3。

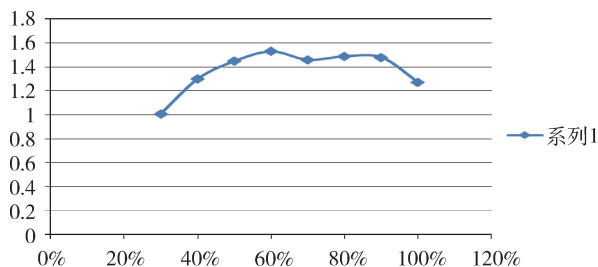


图 3 不同乙醇浓度提取二萜内酯类总含量的比较

Fig 3 Comparison of total diterpene lactones extracted with different ethanol concentrations

从图 3 可知,随着乙醇浓度的增加,二萜内酯类含量逐渐增大,60% 浓度时达到最高,而后含量稍有下降,但维持在一个稳定的水平。因此选择 60% 乙醇作为提取溶剂。

**2.1.3 提取时间的选择** 准确称取穿心莲 10 g,分别用 100 mL 60% 乙醇浸泡 1 h 后超声提取 30 min,1、1.5、2、3 h,计算不同超声时间下提取二萜类总含量,结果见图 4。

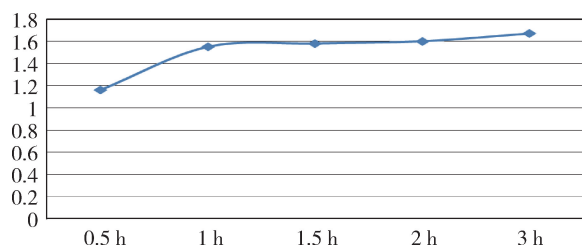


图 4 不同超声时间提取二萜内酯类总含量的比较

Fig 4 Comparison of total diterpene lactones extracted at different ultrasonic times

从图 4 可知,随着提取时间的延长,二萜类总含量逐渐增大,在 1 h 后增长放缓,考虑到提取工

艺的经济性和高效性,选择超声提取时间 1 h。

**2.1.4 料液比的选择** 准确称取穿心莲 10 g,分别用 50、100、200、300 mL60% 乙醇超声提取 1 h,计算不同料液比下二萜内酯类总含量,结果见图 5。

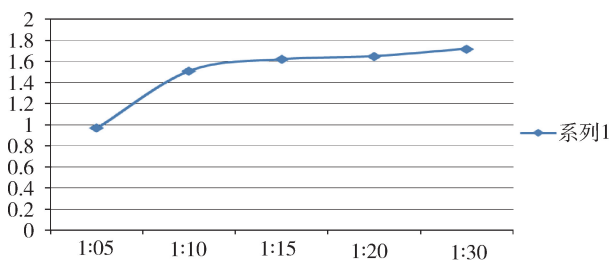


图 5 不同料液比提取二萜内酯类总含量的比较

Fig 5 Comparison of total content of diterpene lactones extracted by different solid-liquid ratios

从图 5 可知,随着料液比的增大,二萜类总含量逐渐增大,在 1:10 后增长放缓,考虑到提取工艺的经济性和高效性,选择料液比为 1:10。

**2.1.5 不同药用部位对二萜内酯总含量的影响**

准确称取穿心莲叶、穿心莲茎、穿心莲药材(叶不少于 30%)各 10 g,加 100 mL60% 乙醇超声提取 1 h,计算不同药材部位下二萜类总含量,结果见图 6。

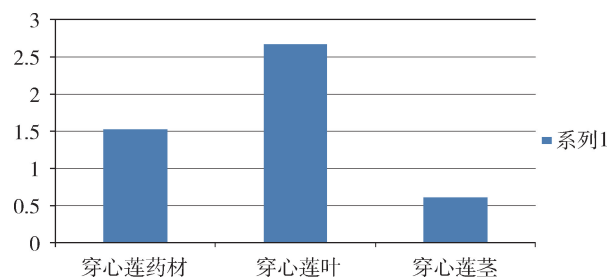


图 6 不同药用部位提取二萜内酯类总含量的比较

Fig 6 Comparison of total content of diterpene lactones extracted from different medicinal parts

**2.2 正交试验优选提取工艺参数**

**2.2.1 正交试验供试品制备及测定** 根据单因素试验确定的提取条件,对影响提取工艺的主要因素(A 乙醇含量、B 提取时间、C 料液比)按 3 因素 3 水平进行 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 正交试验<sup>[11-12]</sup>(见表 1)。

表 1 正交试验考察因素与水平

| Tab 1 Factor and level of orthogonal test |          |           |             |
|-------------------------------------------|----------|-----------|-------------|
| 水平                                        | A(乙醇含量%) | B(提取时间 h) | C(料液比 g/mL) |
| 1                                         | 40       | 0.5       | 1:10        |
| 2                                         | 50       | 1.0       | 1:15        |
| 3                                         | 60       | 1.5       | 1:20        |

2.2.2 正交试验结果 对正交试验样品测得结果,采用 SPSS 18.0 统计软件进行直观分析及方差分析,结果见表 2,表 3。

表 2 L9(3\*3) 正交试验结果

| Tab 2 The results of Orthogonal test |      |      |      |      |
|--------------------------------------|------|------|------|------|
| 试验号                                  | A    | B    | C    | 总含量  |
| 1                                    | 1    | 1    | 1    | 1.18 |
| 2                                    | 1    | 2    | 2    | 1.56 |
| 3                                    | 1    | 3    | 3    | 1.43 |
| 4                                    | 2    | 1    | 2    | 1.64 |
| 5                                    | 2    | 2    | 3    | 1.72 |
| 6                                    | 2    | 3    | 1    | 1.56 |
| 7                                    | 3    | 1    | 3    | 1.78 |
| 8                                    | 3    | 2    | 1    | 1.62 |
| 9                                    | 3    | 3    | 2    | 1.80 |
| k1                                   | 4.17 | 4.6  | 4.36 |      |
| k2                                   | 4.92 | 4.9  | 5.0  |      |
| k3                                   | 5.2  | 4.79 | 4.93 |      |
| l1                                   | 1.39 | 1.53 | 1.45 |      |
| l2                                   | 1.64 | 1.63 | 1.67 |      |
| l3                                   | 1.73 | 1.60 | 1.64 |      |
| R                                    | 0.34 | 0.10 | 0.21 |      |

表 3 方差分析表

| Tab 3 The table of Variance analysis |       |     |      |      |        |
|--------------------------------------|-------|-----|------|------|--------|
| 方差来源                                 | 偏差平方和 | 自由度 | 均方   | F    | 显著性    |
| A                                    | 0.19  | 2   | 0.10 | 5.31 | P<0.05 |
| B                                    | 0.02  | 2   | 0.01 | 0.16 | P>0.05 |
| C                                    | 0.08  | 2   | 0.04 | 0.15 | P>0.05 |

从上表可知,影响穿心莲二萜内酯类总含量的各因素主次关系为 A>C>B,即乙醇浓度>料液比>超声时间。经过方差分析,乙醇浓度对总含量有显著影响,超声时间和料液比对总含量的影响不显著。由此可得最佳提取工艺为 A3B2C2,即乙醇浓度

60%,超声时间 1 h,料液比为 1:15 下提取率最高。  
2.2.3 验证试验 按优选的最佳提取工艺进行试验,即乙醇浓度 60%,超声时间 1 h,料液比1:15,测定穿心莲二萜类总含量,结果见表 4。

表 4 验证试验结果

| Tab 4 The results of validation test |       |       |       |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|
| 编号                                   | 总含量/% | 平均值/% | RSD/% |
| 1                                    | 1.70  |       |       |
| 2                                    | 1.68  | 1.68  | 1.2   |
| 3                                    | 1.66  |       |       |

3 讨论与结论

3.1 质量控制方法的选择 穿心莲含多种二萜内酯类成分,主要有穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、新穿心莲内酯和去氧穿心莲内酯等 4 种。穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯是目前穿心莲药材及相关产品的质量控制成分<sup>[5]</sup>,有文献报道新穿心莲内酯有较好的药理活性<sup>[6-8]</sup>。参照路新华<sup>[9]</sup>的研究,因此本试验通过测定穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯三种二萜内酯类成分的总含量来评价和控制穿心莲药材的质量,保证其疗效。本试验通过切换波长法同时测定上述三种二萜内酯类成分,穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯和新穿心莲内酯经紫外分光光度计扫描分别在 225、254、203 nm 处有最大吸收,考虑到 203 nm 为近紫外区,干扰较大,基线不稳定,因此选取 210 nm 作为新穿心莲内酯的检测波长。

3.2 超声提取方法的选择 不同方法提取二萜内酯类总含量以超声工艺>浸渍工艺>温浸工艺>回流工艺,这与张建强的研究基本一致<sup>[4]</sup>。而水煎煮法提取的二萜内酯类总含量明显低于醇提法,这主要是因为穿心莲中的成份具有热不稳定性,上述二萜内酯类成分水溶性较差且遇热不稳定。根据聂凌云等<sup>[3]</sup>的研究表明,短时间内加热对内酯类稳定性影响不大,温度升高至 85 ℃,穿心莲内酯含量随加热时间增加而下降明显,脱水穿心莲内酯含量会略有提高,但两者之和也呈下降趋势。长时间加热会导致内酯环的结构破坏,从而使两者含量

的总和下降,这说明穿心莲二萜内酯类成分受热不稳定,不适宜用加热提取的方法。

根据不同药用部位提取的二萜类总含量结果显示,穿心莲茎和叶中穿心莲内酯类成分含量相差很大,茎中总含量不到叶中三分之一,这与陈敏武的研究一致<sup>[10]</sup>。穿心莲药材根据叶含量的不同,价格各不相同,据调查,市场上穿心莲叶和茎大多分开销售,只有极少数是一起销售的。所以《中国兽药典》中规定穿心莲药材中叶的含量不得低于 30% 是有必要的。一些以穿心莲为原料药的制剂应加大叶的投料比例,以提高疗效和产品质量。

**3.3 结论** 本文以乙醇浓度,提取时间,料液比 3 个因素,应用超声波提取法进行单因素试验及正交试验,得到最佳提取条件:即乙醇浓度为 60%,提取时间 1 h,料液比为 1:15。在该条件下穿心莲二萜内酯总含量为 2.27, *RSD* 值为 1.3%。本研究所优化的提取工艺简便,稳定,可行,提取率高,可为穿心莲有效成分的提取提供理论依据。

## 参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典. 2015 年版二部[S]. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. The second volume of Chinese Veterinary Pharmacopoeia, 2015 Edition[S].
- [2] 张 晓,唐力英,吴宏伟,等. 穿心莲现代研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018(18):222-234  
Zhang X, Tang L Y, Wu H W, *et al.* Development of modern research on andrographis paniculate [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae. 2018. 18:222-234
- [3] 聂凌云,罗兴平. 穿心莲提取工艺的研究及热稳定性考察[J]. 解放军药学学报,2005,01:32-33  
Nie L Y, Luo X P. Study on the extractive process of kalmegh and its heat stability[J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army. 2005,01:32-33
- [4] 张建强,张 玲,王 欢,等. 穿心莲提取工艺研究[J]. 食品与药品,2005,01:37-40.  
Zhang J Q, Zhang L, Wang H, *et al.* Study on extraction process of Andrographis paniculata [J]. Food and Drug. 2005,01:37-40
- [5] 中国兽药典委员会. 兽药质量标准 2015 年版中药卷[S]. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Drug Quality Standards, 2015 Edition[S].
- [6] 谭 非,罗炳德,杨 光,等. 新穿心莲内酯治疗中暑作用的研究[J]. 中国工业医学杂志,2007,01:36.  
Tan F, Luo B D, Yang G, *et al.* Study on treatment of heatstroke by neoandrographolide [J]. Chinese Journal of Industrial Medicine. 2007,01:36
- [7] 刘 峻,唐庆九,王峥涛. 新穿心莲内酯对小鼠巨噬细胞呼吸爆发及淋巴细胞增殖的影响[J]. 中国新药与临床杂志,2005,03:206.  
Liu J, Tang Q J, Wang Z T. Effects of neoandrographolide on breathing outbreak and lymphocyte proliferation in mouse macrophages [J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies. 2005,03:206.
- [8] 刘 峻,王峥涛. 新穿心莲内酯对体外活化小鼠巨噬细胞的影响[J]. 中国天然药物,2005,05:308-311.  
Liu J, Wang Z T. Effect of neoandrographolide on activated mouse macrophages *in Vitro* [J]. Chinese Journal of Natural Medicines. 2005,05:308-311.
- [9] 路新华,龙晓英,罗佳波,等. 穿心莲注射液制备工艺过程中 3 种穿心莲内酯含量变化追踪[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,09:43-46.  
Lu X H, Long X Y, Luo J B, *et al.* Tracking the content changes of three andrographolides in the preparation process of andrographis paniculata injection [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae. 2014,09:43-46.
- [10] 陈敏武,徐德然,王铮涛,等. RP-HPLC 法测定不同产地及采收期的穿心莲中穿心莲内酯、新穿心莲内酯的含量[J]. 中国药科大学学报,1999,04:4.  
Chen M W, Xu D R, Wang Z T, *et al.* RP-HPLC determination of andrographolide and neoandrographolide in andrographis paniculata from different producing areas and harvesting periods [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 1999,04:4.
- [11] 蒋珍藕,邱宏聪,黄明桂,等. 穿心莲提取物质量控制方法研究[J]. 时珍国医国药,2011,06:1411-1412  
Jiang Z O, Qiu H C, Huang M G, *et al.* Study on quality control of andrographis paniculata extract [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research. 2011,06:1411-1412.
- [12] 李益坤,王文文,丘富安,等. 正交试验法优选穿心莲口服液提取工艺研究[J]. 中兽医医药杂志,2017,2:8-10.  
Li Y K, Wang W W, Qiu F A, *et al.* Study on the extraction process of herba andrographis oral liquid by orthogonal design [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine. 2017,02:8-10.

(编辑:陈 希)