

返魂草有效成分的提取工艺研究

张宏梅¹ 姚 鑫² 崔佰吉¹ 马冬飞¹

(1 吉林医药学院, 吉林, 132013; 2 吉林敖东医药科技有限公司, 敦化, 133700)

摘要 目的:优化返魂草总黄酮的提取工艺。方法:以返魂草中总黄酮含量为考察指标,通过单因素实验考察超声时间、温度、功率等对返魂草有效成分含量的影响,采用正交设计实验法确定最佳提取工艺。结果:乙醇回流法提取最佳工艺为:提取时间 150 min,溶剂 70% 乙醇,液料比 22:1。结论:乙醇回流法提取返魂草总黄酮操作方便,工艺稳定,重现性好,适于工业化生产。

关键词 返魂草;黄酮;正交设计;提取工艺

Research on the Extracting Process of the Active Ingredient from *Senecio cannabifolius* Less

Zhang Hongmei¹, Yao Xin², Cui Baiji¹, Ma Dongfei¹

(1 Jilin Medical University, Jilin 132013, China; 2 Jilin Aodong Medicine Science and Technology Co Ltd, Dunhua 133700, China)

Abstract Objective: To optimize extracting process of flavonoids from *Senecio cannabifolius* Less. **Methods:** The ultrasonic time, the optimum extraction conditions and the material ratio were investigated by single element experiment; the optimum extraction conditions were investigated by orthogonal design and with flavonoids from *Senecio cannabifolius* Less as the content index by Uv results. **Results:** The best optimum extracting condition was under 70% ethanol, material ratio 22:1, and extracting time lasting for 150 mins. **Conclusion:** The method is simple, convenient and can be controlled easily, and suitable for the determination of *Senecio cannabifolius* Less.

Key Words *Senecio cannabifolius* Less; Flavonoids; Orthogonal design; Extracting process

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.09.032

返魂草为菊科千里光属植物返魂草的干燥全草,具有利气化痰、清热解毒等功效^[1-2]。上市的剂型返魂草颗粒和肺宁口服液等,在临床上广泛用于治疗病毒性感冒、急性呼吸道感染、慢性支气管炎等疾病^[3-4]。目前返魂草活性成分的研究主要有绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、多糖及黄酮类等多种化合物,但对于黄酮类研究的报道较少^[5-8]。黄酮类化合物显示出多种生物活性,故我们采用单因素考察和正交实验设计提取返魂草中的总黄酮,以含量为考察指标,优选最佳提取工艺。

1 仪器与试剂

紫外分光光度计(UV1800 日本·岛津);电子天平(CAP225D Sartorius);冷冻干燥机(Scientz-12SN 宁波生物科技股份有限公司);KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。芦丁对照品(100080-201409)购于中国食品生物制品鉴定研究院。返魂草购于吉林市宝恩大药房,经吉林医药学院李景华副教授鉴定为菊科千里光属植物返魂草(*Senecio cannabifolius* Less)。

2 方法与结果

2.1 返魂草总黄酮含量测定 精密称取芦丁对照品 16.42 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解,并稀释至刻度,得对照品储备液。精密吸取对照品储备液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg 置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,定容。分别精密吸取各对照品溶液 1.0 mL 置 25 mL 量瓶中,分别加入 30% 乙醇 5 mL,混匀,加入 1 mL 浓度为 5% 的亚硝酸钠溶液,混匀,放置室温 6 min,加入 1 mL 浓度为 5% 的硝酸铝溶液 0.3,混匀,放置室温 6 min,再分别加入浓度为 4% 的氢氧化钠溶液 10.0 mL,混匀,用 30% 乙醇稀释至刻度,混匀,室温放置 15 min 后于波长 510 nm 处测定吸光度。芦丁对照品的浓度 C 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 0.4818 C + 0.0562$ ($R = 0.9993$),表明芦丁在 0.16~0.64 mg/mL 的范围内线性关系良好。

2.2 供试品制备 返魂草药材粗粉,按照各处方要求称取适宜的药材,置于三角瓶中,按照各处方项下的参数进行设定,进行提取。提取液浓缩、冷冻干

燥、研成粉末,计算出膏率。精密称取提取物粉末适量,置 50 mL 具塞三角瓶中,精密加入 25 mL 30% 乙醇溶液,溶解,称定重量,超声处理 30 min,放至室温,用 30% 乙醇补足减失重量、混匀,过滤即得。按照标准曲线的测定方法进行总黄酮的含量测定。

2.3 单因素考察实验

2.3.1 溶剂浓度考察 按“2.2”项下的方法,称取适量的药材粗粉,提取时间 120 min,考察溶剂浓度为 40%、50%、60%、70%、80% 的乙醇时,返魂草总黄酮含量及出膏率的变化。含量及出膏率的变化见图 1。由实验结果可以看出,随着乙醇浓度的变化,总黄酮和出膏率也有明显的变化,但是当浓度达到约 60% 时,变化趋于稳定状态,所以选择乙醇浓度为 60%、70%、80% 3 个浓度进入正交实验设计,进一步优化实验条件。

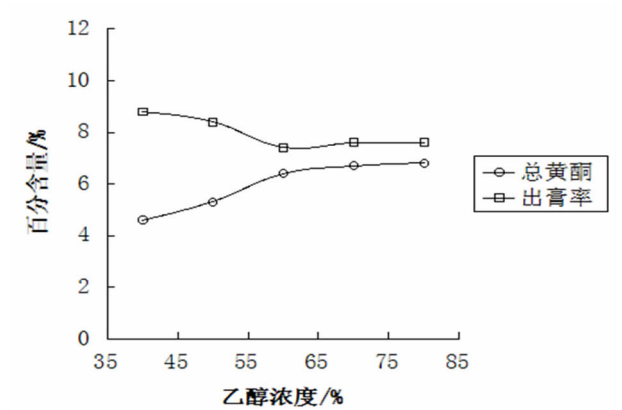


图 1 溶剂浓度考察结果图

2.3.2 溶剂用量考察 按照“2.2”项下方法,称取适量的药材粗粉,设定提取时间 120 min,乙醇浓度 60%,溶剂用量分别为药材量的 14、16、18、20、22 倍,考察返魂草总黄酮和出膏率的变化趋势。考察结果见图 2。由实验结果可以看出,随着乙醇用量的增加,总黄酮和出膏率都明显增加,且出膏率的增加趋势更加显著,总黄酮含量增加量不十分明显,根据结果选择 14、18、22 倍量进行正交实验设计的实验,以优化更佳理想的溶剂用量。

2.3.3 提取时间考察 按照“2.2”项下方法,称取适量的药材粗粉,加入 20 倍量浓度为 60% 乙醇溶液,设定提取时间分别为 45、60、90、120、150 min,考察返魂草总黄酮和出膏率的变化趋势。考察结果见图 3。由实验结果可知,随着提取时间的增加,总黄酮和出膏率均明显增加,当提取时间增加到 90 min 时,其增加达到顶点,即再增加提取时间对于整个总黄酮和出膏率的影响不大,所以选择 90、120、150 min 进行正交实验。

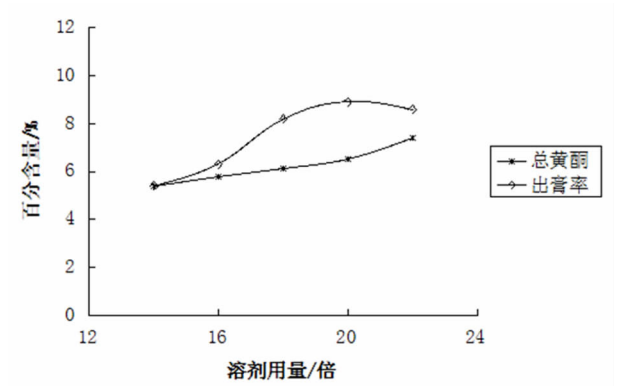


图 2 溶剂用量考察结果图

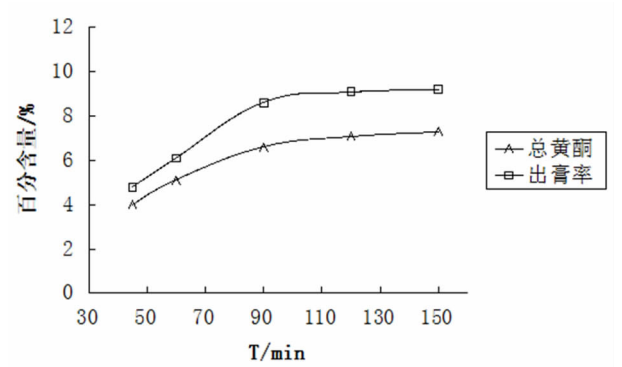


图 3 返魂草总黄酮和出膏率的变化趋势

2.4 正交设计实验 根据单因素实验的考察结果,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计实验进行研究,因素水平设置见表 1,按照“2.2”项下的方法分别进行各个实验,分别考察各个条件下的总黄酮和出膏率,以二者的总和作为提取效果的考察指标,考察结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 1 因素水平表

序号	A 乙醇浓度/%	B 溶剂倍数/倍	C 时间/min
1	60	14	90
2	70	18	120
3	80	22	150

表 2 正交设计表及结果

序号	A	B	C	含量/%	出膏率/%	综合
1	1	1	1	4.6	5.2	9.8
2	1	2	2	5.3	5.6	10.9
3	1	3	3	7.4	7.2	14.6
4	2	1	2	6.2	7.6	13.8
5	2	2	3	5.2	9.4	14.6
6	2	3	1	7.1	9.2	16.3
7	3	1	3	6.1	6.5	12.6
8	3	2	1	6.1	7.2	13.3
9	3	3	2	5.8	8.8	14.6
均值 1	11.8	12.1	13.1			
均值 2	14.9	12.9	13.1			
均值 3	13.5	15.2	13.9			
r	3.13	3.10	0.83			

表 3 方差分析结果表

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
乙醇浓度	14. 782	2	11. 530	9. 000	*
溶剂倍数	15. 349	2	11. 973	9. 000	*
时间	1. 336	2	1. 042	9. 000	
误差	1. 28	2			

由实验结果可知,对于乙醇回流法提取返魂草总黄酮的过程,乙醇浓度和溶剂的用量对整个结果的影响较大,3 个因素对于结果的影响大小程度分别为:乙醇浓度>溶剂用量>提取时间,且乙醇浓度和溶剂用量均具有显著性影响(a=0.1),从直观分析结果我们可以看出最佳的实验方案为 A2B3C3,即:乙醇浓度为 70%,溶剂用量为 22 倍量,提取时间为 150 min。

2.5 验证实验 按“2.4”项下返魂草总黄酮最佳提取工艺参数,按照“2.2”项下的过程进行 3 个批次的返魂草总黄酮的提取。返魂草总黄酮含量结果见表 4。结果表明,本工艺稳定,可操作性强,适合返魂草总黄酮的提取。

表 4 验证实验结果表

批次	150301	150302	150303	($\bar{x} \pm s$)
总黄酮/%	7. 22	7. 18	7. 24	7. 21 ± 0. 03
出膏率/%	9. 33	9. 24	9. 14	9. 24 ± 0. 10

3 讨论

本研究采用芦丁显色的方法进行总黄酮的含量测定,方法比较成熟,在经过预实验的过程中,我们

进行了该方法的稳定性、精密度、重复性、回收率等一系列的方法学研究,研究表明各项指标均能满足返魂草中总黄酮的含量测定的要求。

返魂草的成方制剂为“返魂草颗粒”,即“肺宁颗粒”主要用于肺部疾病的预防和治疗,具有悠久的用药历史,但返魂草的应用主要集中在返魂草水溶性酚酸类成分,据研究报道,返魂草的黄酮类成分也具有广泛的抗炎、抗氧化的作用,在肺部疾病的治疗过程中也起到一定的积极作用。本研究采用单因素结合正交设计的方法进行返魂草有效成分的提取研究,建立了简便、易行的工艺设计,为返魂草药材的合理化应用提供了一定的理论依据。

参考文献

[1] 孙佳丹,王晓波,姜爽,等. 返魂草素Ⅱ对全氟异丁烯致大鼠吸入性急性肺损伤的预防作用[J]. 国际药学研究杂志,2014,41(4): 444-448.

[2] 马鸿雁,杨莉,王长虹,等. HPLC 法同时测定返魂草颗粒中 6 种活性成分[J]. 中成药,2012,34(8): 1496-1500.

[3] 赵春芳,李庆杰,王莲萍,等. 返魂草的高效液相色谱法指纹图谱研究及成分分析[J]. 分析化学,2013,41(1): 133-136.

[4] 李丽静,王继彦,王岩,等. 返魂草提取物及其有效成分抗病毒作用的研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2005,11(8): 585-587.

[5] 马鸿雁,杨莉,王长虹,等. 返魂草药材的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13): 101-104.

[6] 周世友. 返魂草胶囊中绿原酸的含量测定[J]. 广西医科大学学报,2013,30(3): 355-357.

[7] 钟芳丽,王晓林,安媛,等. 返魂草中总黄酮提取工艺研究[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(22): 1937-1940.

[8] 王志兵,王力,姜海峰,等. 返魂草总黄酮的微波提取及响应面优化[J]. 食品工业,2012(3): 3-6.

(2015-07-08 收稿 责任编辑:王明)

(上接第 1412 页)

甲基维斯阿米醇苷无统计学意义,这可能与防风的内在生长机制有关,值得进一步探究。

参考文献

[1] 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》(2010 年版第一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2012.

[2] 钟芬. 栽培与野生防风的质量对比研究[D]. 北京:北京中医药大学,2008.

[3] 王喜军,曹玲,孙晖. 人工规范化种植防风药材的指纹图谱研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2004,6(3): 33-36.

[4] 马丽杰,杨滨,冯雪峰等. 野生和栽培防风升麻苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量测定及指纹图谱分析[J]. 中国中药杂志,2010,35(13): 1731-1734.

[5] 李鑫,孙晶波,张丽华. 防风总色原酮含量测定方法研究[J]. 中药材,2012,35(12): 1967-1969.

[6] 肖永庆,杨滨,姚三桃,等. 防风质量标准的研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(3): 185-187.

[7] 李丽,桂语歌,时东方,等. 防风中色原酮类化合物的抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(9): 2135-2137.

[8] 韩忠明,王云贺,李轶雯,等. 防风色原酮微波辅助提取及含量动

态变化研究[J]. 中药材,2011,34(3): 465-468.

[9] 孙晶波,郜玉钢,张秋菊,等. HPLC 法同时测定陇西地区防风中色原酮和香豆素类成分[J]. 中草药,2013,44(24): 3557-3560.

[10] 赵博,杨鑫宝,杨秀伟,等. HPLC 法同时测定防风中 6 个主要成分的含量药物分析杂志[J],2013,33(3): 382-387.

[11] 牛德斌. HPLC 测定防风通圣丸中 2 个色原酮苷类成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16): 113-115.

[12] 高森,李正翔,王志涛,等. 九龙化风丸中升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、羌活醇、异欧前胡素和细辛脂素的 HPLC 梯度洗脱法测定[J]. 中成药,2014,36(3): 541-547.

[13] 江月华. HPLC 梯度洗脱法同时测定复方荆芥熏洗剂中的升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、齐墩果酸和熊果酸含量[J]. 中南药学,2014,12(5): 472-475.

[14] 柴军,汪桂萍,谢浙裕. 高效液相色谱法同时测定明目蒺藜丸中黄芩苷、盐酸小檗碱、升麻素苷和甘草苷的含量[J]. 中华中医药学刊,2013,31(3): 652-654.

[15] 黄澜,陈惠玲,李玲玲. HPLC 同时测定正天丸中芍药苷、阿魏酸、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量[J]. 中国中药杂志,2013,38(13): 2114-2117.

(2014-09-28 收稿 责任编辑:张文婷)