

# 雪莲十味片总黄酮提取工艺研究

苏苗 红梅 阿拉腾敖日格勒 包勒朝鲁

(内蒙古医科大学蒙医药研究院, 呼和浩特, 010110)

**摘要** 目的:研究雪莲十味片总黄酮的超声提取工艺。方法:以总黄酮含量为考察指标,采用正交实验筛选出雪莲十味片提取总黄酮最佳路线,以芦丁为对照品,紫外可见分光光度法测定复方片总黄酮的含量。结果:雪莲十味片总黄酮提取最佳方法为75%的乙醇溶液,在55℃下,超声提取50 min。平均提取量12.27 mg/g。结论:优选出的最佳工艺简单易行,能够大大提高雪莲十味片的总黄酮提取率。

**关键词** 雪莲十味片;总黄酮;正交实验;紫外分光光度法

## Study on the Extraction of Total Flavonoids in Xuelian Shiwei Tablets

Su Miao, Hong Mei, Alatan Aorigele, Bao Lechaolu

(Mongolian Medicine Research Institute of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

**Abstract Objective:** To study the ultrasonic extraction process of total flavonoids in Xuelian Shiwei tablet. **Methods:** Taking the total content of flavonoids as the detect index, and the orthogonal experiment design was adopted to investigate the best route for extracting the total flavonoids from Xuelian Shiwei tablets. Taking rutin as reference, and ultraviolet spectrophotometry was applied to determine the content of flavonoids. **Results:** The best method of extraction is 75% ethanol as solvent, at 55℃, for 50 mins under ultrasonic. The average extraction volume was 1.287 mg/g. **Conclusion:** This method is easy to operate, and can enhance the extraction rate in a large deal.

**Key Words** Xuelian Shiwei tablets; Total flavonoids; Orthogonal experiment; Ultraviolet spectrophotometry

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.06.041

雪莲十味片为蒙医传统验方,由苞叶雪莲花、甘青乌头、红花等10味药组成,具有清瘟解热、止痛之功效,主要用于疼痛性亚甲炎、扁桃体炎、上呼吸道感染等。本研究旨在测定复方中主要活性成分总黄酮的含量,实验以黄酮类化合物为考察指标,采用正交实验优化雪莲十味片中总黄酮提取方法,并进行了含量测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 仪器设备 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);JA5003N型电子分析天平(上海菁海仪器有限公司);HH-S8 电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司);DFT-200 万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司);KQ250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.1.2 药材 雪莲十味片:从市场购置苞叶雪莲、红花、甘青乌头等10味药材,经蒙医药研究院那生

桑教授鉴定均为真品后,粉碎过30目筛,按处方比例进行混合制粒,压片即可。

1.1.3 试剂 芦丁对照品(BR含量 $\geq 98\%$ ,购于中国药品生物制品检定所,批号:100080-200707);石油醚(天津永晟精细化工有限公司,批号:20130125);乙醇(天津市化学试剂三厂,批号:20130120);亚硝酸钠(天津市盛富江化工销售有限公司,批号:20050405);氢氧化钠(天津市风船化学试剂科技有限公司,批号:20101020);硝酸铝(天津市博迪化工有限公司,批号:20050518)等。

### 1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品20.75 mg,置于100 mL容量瓶中,用75%乙醇溶解并稀释到刻度,摇匀,得浓度为 $0.2075 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦丁标准溶液,备用。

1.2.2 供试品溶液的制备 精密称取样品约1.05 g,置100 mL具塞锥形瓶中,加入25 mL石油醚,加热回流1 h。弃去石油醚,挥干溶剂,加入10倍量

基金项目:内蒙古自治区蒙中药重点实验室提升计划项目资助课题(编号:20090902)

作者简介:苏苗(1989.8—),女,内蒙古包头市人,内蒙古医科大学在读研究生,研究方向:药理学,E-mail:15148039326@139.com

通信作者:包勒朝鲁(1976.10—),男,内蒙古锡林郭勒盟人,讲师,硕士研究生,研究方向:蒙医方剂剂型改革与安全性评价,Tel:(0471)6653173,E-mail:956613769@qq.com

75%乙醇溶液,超声提取 30 min<sup>[1-2]</sup>,冷却,抽滤,弃去药渣,滤液置于 50 mL 容量瓶中,加入 75%乙醇溶液将其定容,并作为样品溶液备用。

1.2.3 测定波长的选择 分别吸取对照品溶液、供试品溶液各 2 mL,置于 25 mL 的容量瓶中。各加 75%乙醇至 7 mL、5% NaNO<sub>2</sub> 溶液 1 mL 后放置 6 min,加 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 1 mL,摇匀静置 6 min,加 4% 的 NaOH 溶液 10 mL,最后用 75%乙醇溶液定容至刻度,密塞,摇匀放置 15 min<sup>[3]</sup>,用紫外可见分光光度法,扫描图谱(200~800 nm),在 510 nm 处有较强吸收。因此选择 510 nm 作为测定波长。

1.2.4 绘制标准曲线<sup>[4]</sup> 精密吸取上述配置对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置于 25 mL 容量瓶中,各加 75%乙醇至 7 mL 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液 1 mL,放置 6 min,加 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 1 mL,摇匀静置 6 min,加 4% 的 NaOH 溶液 10 mL,最后用 75%乙醇溶液定容至刻度,密塞,摇匀,放置 15 min 后,以相应的空白为参比,在 510 nm 处测定吸光度,并以吸光度为纵坐标,对照品浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程  $A = 0.012\ 3C - 0.001\ 6$  ( $r = 0.999\ 9$ ),表明对照品溶液在 8.30~41.5 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内与吸光度值之间呈良好线性关系。

1.2.5 样品含量测定 精密吸取样品溶液约 2.0 mL,按“1.2.4”项下方法显色,测定吸光度,计算总黄酮浓度。

## 2 结果

### 2.1 方法学考察

2.1.1 精密度试验<sup>[5]</sup> 精密吸取上述对照品溶液 2.0 mL,按“1.2.4”项下方法显色,测定吸光度,连续测定 6 次,结果吸光度测量值  $RSD$  为 0.82% ( $n = 6$ ),可表明仪器精密度良好。

2.1.2 稳定性试验<sup>[6]</sup> 取样品溶液,按“1.2.4”项下方法显色,每隔 1 h 测定吸光度,结果吸光度测量值  $RSD = 1.41%$  ( $n = 4$ ),可表明,供试品溶液在 4 h 内稳定,稳定性良好。

2.1.3 重复性试验<sup>[7]</sup> 精密称取同一批样品粉末 6 份,按“1.2.2”和“1.2.4”项下方法提取和显色,测定吸光度并计算,结果总黄酮以芦丁计算,平均含量为 (12.33 mg·g<sup>-1</sup>), $RSD$  为 1.33% ( $n = 6$ ),表明本方法重现性良好。

2.1.4 加样回收率试验<sup>[8]</sup> 精密称取同一批样品粉末 6 份,分别精密加入对照品,按照“1.2.2”和“1.2.4”项下方法提取和显色,测得吸光度并计算,结果平均回收率为 101.3%, $RSD$  为 2.99% (见表

1),表明本方法准确可靠。

表 1 总黄酮加样回收率

序号	取样量 /g	样品含量 /mg	对照品 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.049	12.94	10.28	23.41	101.8	101.3	2.999
2	1.050	12.95	10.37	23.85	105.1		
3	1.048	12.93	12.44	25.64	102.2		
4	1.050	12.95	12.17	24.61	95.8		
5	1.051	12.96	15.15	28.39	101.8		
6	1.050	12.95	15.45	28.54	100.9		

2.2 正交实验考察 根据雪莲十味片中各味药的理化性质及主要药效,结合单因素实验结果,选择乙醇浓度(A)、提取时间(B)、提取温度(C)3个因素,以芦丁含量为评价指标,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表安排实验,因素水平见表 2,正交实验结果见表 3、表 4。

表 2 因素水平表

水平	乙醇浓度(A)/%	提取时间(B)/min	提取温度(C)/℃
1	65	30	35
2	75	40	45
3	85	50	55

表 3 正交实验结果

实验号	A	B	C	D(空)	总黄酮含量/mg·g <sup>-1</sup>
1	1	1	1	1	9.09
2	1	2	2	2	9.09
3	1	3	3	3	12.09
4	2	1	2	3	11.91
5	2	2	3	1	12.18
6	2	3	1	2	12.00
7	3	1	3	2	11.91
8	3	2	1	3	11.63
9	3	3	2	1	11.59
$\bar{K}_1$	1.009	1.097	1.091		
$\bar{K}_2$	1.203	1.097	1.086		
$\bar{K}_3$	1.171	1.189	1.206		
R <sub>j</sub>	0.194	0.092	0.120		

表 4 方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	0.439	2	0.212	27.4	$P < 0.05$
B	0.017	2	0.009	1.13	$P > 0.05$
C	0.027	2	0.013	1.63	$P > 0.05$
误差 D	0.016	2	0.008		

注:F(0.05) = 19.0。

从表 3 中可知以总黄酮为指标的最佳条件为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>,影响次序为 A > C > B。从表 4 中可知三个因素中乙醇浓度对总黄酮含量有统计学意义( $P < 0.05$ ),提取时间和提取温度则无统计学意义( $P > 0.05$ )。综上,雪莲十味片最佳提取条件为乙醇浓度

75%,提取时间 50 min,提取温度 55 ℃。

2.3 最佳提取工艺条件的验证实验 精密称取不同批次雪莲十味片 3 份,每份约 1.05 g,石油醚脱脂,按最佳提取条件 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub> 平行操作,按“1.2.4”项下方法显色,测得吸光度并计算,结果见表 5,总黄酮平均含量为 12.27 mg·g<sup>-1</sup>,RSD 为 0.9652%。

表 5 总黄酮含量测定结果

批号	总黄酮含量/mg·g <sup>-1</sup>	平均含量/mg·g <sup>-1</sup>	RSD/%
20130305	12.20		
20130410	12.21	12.27	0.9652
20130518	12.41		

### 3 讨论

亚急性甲状腺炎(Subacute Thyroiditis, SAT),是临床常见的甲状腺疼痛性疾病<sup>[9]</sup>,多见于 30~50 岁的女性,是男性的 3~6 倍。发病有季节性,冬、春季是其发病的高峰。初期有上呼吸道感染症状,如发热,寒战、疲乏无力、食欲不振,续而出现甲状腺部位的疼痛和压痛常向颌下、耳后或颈部等处放射,咀嚼和吞咽时疼痛加重。临床上常予以非甾体类抗炎药、糖皮质激素治疗,同时适时给予甲状腺素缓解甲状腺功能减低<sup>[10-14]</sup>。这些药物均有不同程度的不良反应。

雪莲十味片为蒙医传统验方,临床应用多年,对治疗疼痛性亚甲炎、扁桃体炎、上呼吸道感染等疗效显著,不良反应较少,临床疗效显著。其君药苞叶雪莲花为菊科植物苞叶雪莲 *Saussurea Obvallata* (DC.)-Bip. 的干燥地上部分,主要活性成分为黄酮类化合物<sup>[15-19]</sup>,大量实验表明黄酮类等生物活性成分有抗癌作用,抗氧化清除自由基,抗炎,抗菌抗病毒作用<sup>[20]</sup>。本实验对雪莲十味片中的总黄酮的提取方法进行了考察,并对其含量进行测定,实验结果表明雪莲十味片的总黄酮提取最佳工艺条件为使用石油醚脱脂后加入 10 倍量 75% 乙醇溶液,温度为 55 ℃ 下超声提取 50 min。此提取方法不仅工艺简便快捷,还能提高雪莲十味片的总黄酮提取率,为雪莲十味片的深入研究和开发应用提供参考依据。

### 参考文献

- [1] 谢璟,陈永刚. 超声提取白花蛇舌草总黄酮工艺研究[J]. 医药导报,2012,31(5):640-642.
- [2] 黄艳萍,刘浩,王金香,等. 骨碎补总黄酮的超声提取工艺[J]. 医药导报,2007,26(7):793-794.
- [3] 韩红萍,王春发. 水母雪莲花中总黄酮的提取工艺及含量测定研究[J]. 青海师范大学学报(自然科学版),2010(3):69-79.
- [4] 张青青. 泡桐花总黄酮提取工艺的研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2014.
- [5] 吴现芳,赵成爱,余梅燕,等. 响应面法优化八宝景天叶总黄酮的超声提取工艺[J]. 食品工业科技,2013,34(1):224-228.
- [6] 林志钦. 莲子心总黄酮的提取纯化及其功能性研究[D]. 福州:福建农林大学,2012.
- [7] 韩雅慧,顾赛麒,陶宁萍,等. 甘草总黄酮提取工艺及总抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2012,33(2):239-242.
- [8] 甘琳,周芳,张越非,等. 葛根总黄酮提取工艺的比较[J]. 时珍国医国药,2010,21(4):929-931.
- [9] 吕鸣,周观彦,周锐. 亚急性甲状腺炎 19 例临床误诊分析[J]. 临床医学,2013,33(5):115-116.
- [10] 李娟,关小宏,杨彩碧. 亚急性甲状腺炎诊治研究进展[J]. 医学综述,2011,17(17):2647-2649.
- [11] 叶少玲. 清肝泻心汤治疗甲状腺机能亢进症心肝火旺证的临床研究和大鼠实验[D]. 南京:南京中医药大学,2013.
- [12] 鲁剑梅. 抗甲状腺药物治疗 Graves 病导致药物性甲状腺功能减退的临床研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2014.
- [13] 胡潇豪. 抗甲状腺药物联合左旋甲状腺素治疗 Grave's 病疗效观察及治疗后 2 年随访研究[D]. 广州:南方医科大学,2015.
- [14] 王平. 复方甲亢片治疗气阴两虚型亚临床甲亢状态的临床观察[D]. 武汉:湖北中医药大学,2012.
- [15] 谢宗波,姜国芳,廖夫生,等. 雪莲化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品科技,2007(6):254-257.
- [16] 波拉提·马卡比力,贾晓光,李宁,等. 天山雪莲花主要黄酮类成分初步研究[J]. 新疆中医药,2011,29(3):30-31.
- [17] 达娃卓玛,官艳丽,格桑索朗,等. 水母雪莲花挥发油的 GC-MS 分析[J]. 分析试验室,2007,26(7):27-30.
- [18] 李咏华,葛发欢,苏薇薇. 水母雪莲花研究进展[J]. 中药材,2004,27(4):297-299.
- [19] 达娃卓玛. 西藏产雪莲花的化学和药理研究进展[J]. 中国民族民间医药,2015(12):25-31.
- [20] 孟雪莲,徐成斌. 黄酮类化合物的药理学作用研究进展[J]. 宁夏农林科技,2012,53(2):63-64.

(2015-09-15 收稿 责任编辑:张文婷)