

秋鼠曲草花部分有效成分提取工艺优选

骆冲¹, 孙慧², 陈芳¹, 赖家平^{1*}

(1. 华南师范大学化学与环境学院, 广州 510006; 2. 广州大学环境科学与工程学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 优选秋鼠曲草花中主要成分的提取工艺。方法: 以槲皮素和芹菜素含量为综合评价指标, 采用 HPLC 测定指标成分含量, 采用单因素试验考察提取方式、料液比、提取次数及乙醇体积分数; 选取提取次数、提取时间、料液比及乙醇体积分数为考察因素, 正交设计试验优选提取工艺。结果: 最佳提取工艺为超声提取, 加入 30 倍量 60% 乙醇超声提取 2 次, 每次 40 min。结论: 优选的提取工艺简单、稳定可行, 可为秋鼠曲草花部分有效成分的定量分析提供可靠的提取方法。

[关键词] 秋鼠曲草花; 槲皮素; 芹菜素; 正交试验; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0053-04

Optimization of Extraction Technology for Main Components from Flower of *Gnaphalium hypoleucum*

LUO Chong¹, SUN Hui², CHEN Fang¹, LAI Jia-ping^{1*}

(1. School of Chemistry and Environment, South China Normal University, Guangzhou 510006, China;

2. College of Environmental Science & Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of main components from flower of *Gnaphalium hypoleucum*. **Method:** With the contents of quercetin and apigenin as comprehensive evaluation index, which were determined by HPLC. Extraction method, ratio of solid-liquid, extraction times and the concentration of ethanol were investigated by single factor test; orthogonal design test was used to optimize extraction technology with extraction time, extraction times, ratio of solid-liquid and the concentration of ethanol. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: ultrasonic extracted 2 times with 30 times the amount of 60% ethanol, 40 min per time. **Conclusion:** This optimized process was simple, stable and feasible. It could provide reliable extraction method for quantitative analysis of main components from flower of *G. hypoleucum*.

[Key words] flower of *Gnaphalium hypoleucum*; quercetin; apigenin; orthogonal design; HPLC

黄酮类化合物是在植物界分布最广的一类成份, 其常以游离态或与糖结合成苷的形式存在^[1]。具有抗氧化^[2-3]、抗过敏、抗炎、保护心脑血管系统等生理活性^[3-5]。在医药、食品化妆品等领域具有广阔的应用前景^[7]。鼠曲草全世界共约 200 种, 我国有鼠曲草属植物 19 种, 南北方均产, 大部分分布

于长江流域和珠江流域^[8], 民间在清明节前后利用鼠曲草嫩尖叶加工饵料, 做成清明团子或饺子, 故有“清明菜”之称。鼠曲草中含较多的黄酮类化合物, 包括槲皮素、芹菜素等, 且黄酮类成分为鼠曲草中抗炎、抗氧化作用主要活性成分之一^[9-11]。秋鼠曲草系菊科鼠曲草属植物之一, 目前对其主要化学成分和提取方法的研究报道较少, 本文以鼠曲草属共有的成分槲皮素和芹菜素为指标, 对秋鼠曲草花的主要化学成分的提取工艺进行考察, 旨在为后续进一步研究秋鼠曲草的化学成分和指纹图谱提供实验基础和理论依据。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津), DHG-

[收稿日期] 20120423(029)

[第一作者] 骆冲, 硕士研究生, 从事中药指纹图谱研究, Tel: 020-39311568, Fax: 020-39310187, E-mail: candy61705489@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 赖家平, 博士, 教授, 从事药物分析研究, Tel: 020-39310257, E-mail: laijp@senu.edu.cn

9070A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司), G80N25YSL-501A 型微波炉(格兰仕), TC-15 套式恒温器(海宁市新华医疗器械), 500 型摇摆式高速中药粉碎机(浙江温岭市创力药材器械厂制造), FA1104 型电子分析天平(上海民桥电子天平厂), 湘仪 TD3 型低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。中药材秋鼠曲草产自广西玉林, 经广州中医药大学刘军民教授及周劲松教授鉴定为植物秋鼠曲草 *Gnaphalium hypoleucum* DC. 的全草, 芹菜素、槲皮素对照品(四川省维克奇生物科技有限公司, 批号分别为 110907, 110307), 甲醇为色谱纯, 水为二次去离子水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 槲皮素和芹菜素 HPLC 测定

2.1.1 色谱分析条件 Sinochrom ODS-BP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 大连依利特有限公司), 流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 10% A; 10 ~ 55 min, 10% ~ 50% A; 55 ~ 100 min, 50% ~ 80% A), 柱温 25 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 320 nm, 进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称量槲皮素和芹菜素各 1.00 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解, 摇匀, 定容至刻度, 即得。

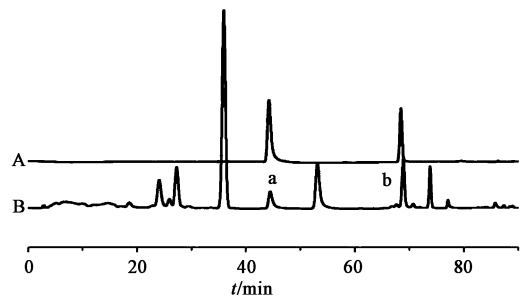
2.1.3 供试品溶液的制备 秋鼠曲草花经 60 °C 烘干至恒重, 粉碎。精密称取 10.00 g 样品, 按不同条件进行提取, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩滤液至浸膏状, 加 100 mL 水溶解, 用正丁醇萃取, 样品溶液-正丁醇 1:1, 萃取 3 次, 合并正丁醇萃取液, 减压浓缩蒸干, 将萃取物置于烧杯中, 用移液管移取 50% 甲醇水溶液 15 mL 将其溶解, 将所得提取液在 3000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 取上清液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.1.4 标准曲线的建立 分别精密吸取槲皮素对照品溶液 1 mL, 加甲醇稀释至质量浓度分别为 0.1, 10, 20, 33, 40, 50, 66, 100 mg·L⁻¹, 按上述色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 得槲皮素的回归方程为 $Y_1 = 1.36 \times 10^3 + 1.55 \times 10^8 X_1$ ($r = 0.9994$), 结果表明槲皮素在 0.1 ~ 100 mg·L⁻¹ 与峰面积有良好的线性关系。分别精密吸取芹菜素对照品溶液 1 mL, 分别将其用甲醇稀释至质量浓度为 7, 20, 25, 50, 100 mg·L⁻¹, 按上述色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 得芹菜素回归方程 $Y_2 = 1.11 \times 10^6 + 8.99 \times 10^7 X_2$ ($r = 0.9998$), 芹菜素在 7 ~ 100 mg·L⁻¹ 与峰

面积有良好的线性关系。

2.1.5 加样回收率试验 取已知含量的供试品 6 份, 分别精密加入一定量的槲皮素和芹菜素对照品, 按 2.1.1 项下方法测定, 计算回收率。结果表明槲皮素平均加样回收率 98.68%, RSD 1.22%; 芹菜素平均加样回收率 97.74%, RSD 1.52%, 表明该方法具有很好的准确性。

2.1.6 样品测定 精密吸取上述对照品及供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; a. 槲皮素; b. 芹菜素

图 1 秋鼠曲草花提取物 HPLC

2.2 单因素试验考察

2.2.1 提取方式考察 精确称取秋鼠曲草花粉 10.00 g, 加 25 倍量 60% 乙醇溶液 300 W 提取 30 min, 提取 3 次, 分别用微波辅助提取、回流提取、超声辅助提取。按 2.1.3 项下条件制备样品, 按 2.1.1 方法测定槲皮素和芹菜素的提取率。结果槲皮素分别为 0.690, 1.110, 3.100 mg; 芹菜素分别为 5.178, 3.296, 11.360 mg。超声提取时芹菜素、槲皮素提取率最高, 故本试验采用超声提取方式。

2.2.2 料液比考察 精确称取秋鼠曲草花粉 10.00 g, 超声 30 min, 提取 3 次, 功率 300 W, 溶剂为 60% 乙醇, 料液比分别为 1:10, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40 按 2.1.3 项下条件制备样品, 按 2.1.1 项下方法测得槲皮素和芹菜素含量, 结果槲皮素分别为 0.516, 2.226, 3.100, 2.619, 2.981 mg; 芹菜素分别为 5.256, 7.140, 11.360, 14.052, 12.024 mg。由结果可知, 1:25 时槲皮素和芹菜素的总提取率最高, 故料液比考察水平定为 1:20, 1:25, 1:30。

2.2.3 提取次数考察 精确称取秋鼠曲草花粉 10.00 g, 加 25 倍量 60% 乙醇于 300 W 功率下超声 30 min, 分别提取 1, 2, 3 次, 按 2.1.3 项下条件制备样品, 按 2.1.1 项下方法测定槲皮素和芹菜素的含量, 结果槲皮素提取量分别为 1.892, 1.619, 2.045 mg; 芹菜素提取量分别为 8.193, 8.998, 8.188 mg。

说明总提取率在提取 2 次最高,之后增加提取次数,总提取率的变化不大,表明提取基本完全。故本试验提取次数考察水平定为 1,2,3 次。

2.2.4 乙醇体积分数考察 精确称取秋鼠曲草花粉 10.00 g,加 25 倍量不同体积分数(30%,45%,60%,75%,80%)乙醇于 300 W 功率下超声 30 min,提取 3 次,按 2.1.3 项下条件制备样品,按 2.1.1 方法测定槲皮素和芹菜素的提取率。结果槲皮素提取量依次为 0.12,0.78,1.84,0.28,0.23 mg;芹菜素提取量分别为 1.464,4.866,8.508,0.556,0.440 mg。结果表明乙醇体积分数为 60% 时总提取率最好,之后体积分数增加提取率反而大大降低,原因可能是随乙醇体积分数增高,醇溶性杂质溶出也增多,与黄酮类物质竞争与乙醇-水分子结合,从而导致黄酮类物质的溶出减少^[12]。由此可知当溶剂浓度太高反而不利于槲皮素和芹菜素的提取溶出。故本试验中乙醇体积分数考察水平定为 45%,50%,60%。

2.3 正交试验优选 根据单因素试验结果,进一步考察对超声提取影响的因素的显著性,以确定最佳提取工艺条件,采用 $L_9(3^4)$ 设计试验,以料液比、乙醇体积分数、提取时间和提取次数为指标进行比较,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 秋鼠曲草花中主要成分提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A 料液比	B 提取次数/次	C 提取时间/min	D 乙醇体积分数/%
1	1:20	1	20	45
2	1:25	2	30	50
3	1:30	3	40	60

由极差结果可知,影响秋鼠曲草花中槲皮素和芹菜素的提取率的主次因素分别为料液比 > 乙醇体积分数 > 提取时间 > 提取次数。以极差最小的 B 因素为误差项进行方差分析,结果 A,C,D 因素均有显著影响,故确定最佳提取条件为 $A_3B_2C_3D_3$ 。即料液比 1:30,提取 2 次,提取时间 40 min,乙醇体积分数 60%。按该最佳提取工艺进行 3 次验证试验,结果槲皮素和芹菜素提取量分别为 (3.21 ± 0.05) , (12.89 ± 0.05) mg,说明该提取工艺稳定,方法合理可行。

3 讨论

超声提取是一种提取效率高的现代提取技术,

表 2 秋鼠曲草花中主要成分提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	槲皮素 /mg	芹菜素 /mg	综合评分
1	1	1	1	1	0.186	1.464	9.40
2	1	2	2	2	0.426	2.028	16.22
3	1	3	3	3	1.326	4.728	44.66
4	2	1	2	3	0.642	5.184	32.84
5	2	2	3	1	0.516	5.256	30.62
6	2	3	1	2	0.558	4.428	28.25
7	3	1	3	2	2.890	10.321	97.42
8	3	2	1	3	3.020	9.345	96.22
9	3	3	2	1	1.781	8.315	67.61
K_1	23.427	46.553	44.623	35.877			
K_2	30.570	47.687	38.890	47.297			
K_3	87.083	46.840	57.567	57.907			
R	63.656	1.134	18.677	22.030			

注:综合评分 = (槲皮素含量/最大槲皮素含量) × 100 × 0.6 + (芹菜素含量/最大芹菜素含量) × 100 × 0.4^[13]。

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	7 296.95	2	3 648.48	3 502.31	<0.01
B(误差)	2.08	2	1.04		
C	549.20	2	274.60	263.61	<0.01
D	728.30	2	364.15	349.57	<0.01

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

能有效降低生产成本,提高经济效益,与常规回流提取法相比,具有明显的优势,提取时间大大缩短。

[参考文献]

[1] 涂华,陈碧琼,张燕军.天然类黄酮物质的提取工艺研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6):277.

[2] 罗超,刘霁明,邢惟青,等.石参总黄酮抗氧化活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(13):198.

[3] 王倩,常丽新,唐红梅.黄酮类化合物的提取分离及其生物活性研究进展[J].河北理工大学学报:自然科学版,2011,33(1):110.

[4] 程悦,王志宇,王冬梅,等.不同溶剂对鸡血藤提取物总黄酮含量及抗肿瘤活性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):142.

Z-综合评分法优化葛粉速溶颗粒制备工艺

时军*, 林婉婷, 廖华卫
(广东药学院中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:探讨和优化葛粉速溶颗粒的制备工艺。方法:采用正交试验,选取糖粉-葛粉比例、泡打粉-葛粉比例、干燥温度为考察因素,以颗粒溶化时间和颗粒中总黄酮含量为指标,用Z-综合分析法优选制备工艺。按优选工艺制备3批样品,考察其性状、水分含量、溶化性及糊化试验等。Al(NO₃)₃显色法测定总黄酮含量。结果:最佳制备工艺为等量递增法往研钵中依次加入泡打粉1.2g,糊精1.8g,糖粉24g和葛粉33g混合均匀,加约5mL温水(35~40℃)混匀,捏成团块状,在35℃环境下放置40min,使其内部充满多而密的孔洞,体积膨大,质地松软,挤压过筛(10~14目),60℃干燥40min,整粒,即得葛粉速溶颗粒。制得3批样品,大小均匀,呈乳白色,色泽一致,无吸潮、结块、潮解现象,溶化性试验合格,85℃左右热水冲溶全部糊化。颗粒水分含量<6.0%,总黄酮含量0.327mg·g⁻¹。结论:葛粉速溶颗粒的制备工艺简便可行、稳定,总黄酮含量测定方法可用于其质量评价。

[关键词] 速溶颗粒; Z-综合评分法; 溶化时间; 总黄酮

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0056-04

Optimization of Preparation Technology for Gefen Instant Granule by Z-comprehensive Scoring Method

SHI Jun*, LIN Wan-ting, LIAO Hua-wei
(College of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate and optimize preparation technology of Gefen instant granule. **Method:** With dissolution time and the content of total flavonoids of this granule as indexes, ratio of sugar-*Pueraria lobata*, ratio of baking powder-*P. lobata*, drying temperature were chosen as investigation factors, preparation technology was optimized by orthogonal test with Z-comprehensive analysis method. Three samples

[收稿日期] 20120504(002)

[通讯作者] *时军,博士,讲师,从事中药新剂型及新技术研究, Tel:020-39352169, E-mail:shijun8008@163.com

- [5] 朱英环,孟宪生,包永睿,等. 余甘子总酚酸和总黄酮配伍抑制肝癌细胞增殖及对免疫功能的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3):132.
- [6] 郭姗姗,高英杰,时宇静,等. 一枝蒿总黄酮体外抗乙型肝炎病毒作用机理的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(10):72.
- [7] 黄松,丁婕,郭云凤,等. 凉粉草总黄酮提取工艺优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):5.
- [8] 席忠新,王燕,刘波,等. 鼠曲草属植物化学成分与药理作用研究进展[J]. 医药导报, 2010, 29(11):1463.
- [9] Aquino R, Morelli S, Tomaino A, et al. Anti-oxidant and photo-protective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* HBK leaves and their major flavonoids[J]. J Ethnopharma, 2002, 79(2): 183.
- [10] Meragelman T L, Silva G L, Mongelli E, et al. Ent-Pimarane type diterpenes from *Gnaphalium gaudichaudianum*[J]. Phytochem, 2003, 62(4): 569.
- [11] 李超,王孟楚. 鼠曲草总黄酮的抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2012, 23(1):111.
- [12] 王世宽,冉然,侯华. 超声波强化提取鼠曲草中总黄酮的研究[J]. 四川理工学院学报, 2008, 8(4):61.
- [13] 冯丽敏,赵瑞芝,王银洁,等. 银屑灵片中芍药苷和甘草酸的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2):25.

[责任编辑 全燕]