

正交试验优选昆仑雪菊总皂苷的提取工艺

刘厚赫*, 王 振#, 刘兆明, 时亚博, 高俊鹏(临沂大学药学院, 山东临沂 276000)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4415-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.31

摘要 目的:优化昆仑雪菊总皂苷的提取工艺。方法:采用乙醇浸提法;以提取温度、乙醇体积分数、提取时间、料液比为考察因素,以总皂苷提取率为考察指标,在单因素试验基础上设计正交试验进行提取工艺的优化,并进行验证试验。结果:最优提取工艺为昆仑雪菊与60%乙醇液料比为1:30,在50℃下提取2h;验证试验表明此工艺下总皂苷平均提取率为6.8%(RSD=0.85%,n=3)。结论:优化工艺可用于昆仑雪菊总皂苷的提取,且工艺稳定。

关键词 昆仑雪菊;总皂苷;单因素试验;正交试验;提取工艺

Optimization of the Extraction Technology of Total Saponins from *Coreopsis tinctoria* by Orthogonal Test
LIU Hou-he, WANG Zhen, LIU Zhao-ming, SHI Ya-bo, GAO Jun-peng (College of Pharmacy, Linyi University, Shandong Linyi 276000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of total saponins from *Coreopsis tinctoria*. METHODS: Ethanol leaching technology was adopted. Based on single factor test, the extraction technology was optimized by orthogonal test using extraction temperature, ethanol volume fraction, extraction time, solid-liquid ratio as factors, extraction rate of total saponins as index. The optimized technology was validated. RESULTS: The optimal technology was that ratio of solid to liquid was 1:30 (*C. tinctoria*-60% ethanol), extracting for 2 h at 50 °C. Validation test showed that average extraction rate of total saponins was 6.8% (RSD=0.85%, n=3). CONCLUSIONS: The optimized technology can be used for the extraction of total saponins from *C. tinctoria* and keep stable.

KEYWORDS *Coreopsis tinctoria*; Total saponins; Single factor experiment; Orthogonal test; Extraction technology

雪菊(*Coreopsis tinctoria* Nutt.)学名为蛇目菊,别名为双色金鸡菊,由于其生长环境海拔高、污染少,且含有多种对人体有益的成分,所以早已经作为一种茶饮普及使用^[1]。目前,国内外研究者在雪菊化学成分的分离、鉴定以及生物活性等方面做了大量研究工作,取得了一些阶段性成果,为雪菊药食两用功能产品的开发提供了初步理论背景^[2]。雪菊中含有铜、硒、铁、锌等微量元素,以及黄酮类、菊色素、氨基酸、胆碱、水

苏碱、腺嘌呤和维生素等活性成分^[3-7],其药理作用有降血脂、降血压、抗衰老、抗癌等^[8-9]。雪菊总皂苷是雪菊的主要活性成分之一,主要功效表现为抗缺氧、抗疲劳、抗低温应激、双向调节免疫、预防和治疗糖尿病等^[10]。近年市场对昆仑雪菊的需求越来越大,但昆仑雪菊的生长环境特殊,采摘艰难且产量小,因此,对其利用效率要求提高。

在本文中,笔者通过单因素和正交试验方法,拟探讨雪菊

好;若水分含量过低,则膏体萎缩、性能改变,会失去皮肤黏附性。因此,在涂布后,样品需在室温除湿环境下放置一定时间,一方面可以调整膏体含水量;另一方面,膏体熟化,会使其物理性质更稳定。经笔者试验测得,涂布后巴布贴需在室温除湿环境下放置6~8h,直至表面保护膜可以很好地与膏体分离。

参考文献

- [1] 石召华,黄志军,熊登科,等.促渗剂对小儿牛黄退热巴布贴中栀子苷透皮吸收的影响[J].中国中药杂志,2008,33(18):2061.
- [2] 张一帆,黄俊山,李星,等.正交实验法优选交泰巴布剂的基质配方[J].中国现代药物应用,2013,7(22):5.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录74.

* 本科生。研究方向:中药及天然药物活性成分研究。电话:0539-8766719。E-mail:726426891@qq.com

通信作者:讲师。研究方向:神经药理学。电话:0539-8766719。E-mail:wangzhen@lyu.edu.cn

- [4] 王琳芝.六和丹巴布贴制备工艺及质量标准研究[D].武汉:华东科技大学,2009:45.
- [5] 刘宣麟,何承辉,邢建国,等.复方没食子凝胶膏剂制备工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(20):39.
- [6] 白才堂,吕竹芬,谢清春,等.正交试验优选竭红跌打巴布贴基质处方[J].中国药房,2011,22(31):2911.
- [7] 尹华,章建华,许丛辉,等.三黄散瘀巴布贴中黄柏的提取工艺研究[J].中华中医药学刊,2011,29(2):235.
- [8] 楼步青,何伟棠.中药巴布贴研究思路探讨[J].时珍国医国药,2001,12(7):617.
- [9] 李智勇,罗霄山,孙冬,等.痹痛巴布贴中多元复合透皮吸收促进剂的优选[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(10):42.
- [10] 徐晖,王绍宁,谷野,等.巴布膏剂研制的一些问题[J].中医外治杂志,2005,12(14):3.

(收稿日期:2015-01-28 修回日期:2015-06-08)

(编辑:刘 萍)

总皂苷的最优提取工艺,为高效开发利用雪菊提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

SP-2102 UV型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司);RE52-99型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);GR-202型电子天平(日本A&D公司);SYC-15C型超级恒温水浴锅(南京桑力电子设备厂)。

1.2 药材、药品与试剂

昆仑雪菊,由新疆雪菊生物科技有限公司提供(批号:20140712),经临沂大学药学院许俊杰博士鉴定为菊科(*Asteraceae*)金鸡菊属(*Coreopsis* Linn.)一年生草本植物双色金鸡菊(*Coreopsis tinctoria* Nott.)的头状花聚。雪菊经烘干、粉碎,过60目筛备用。

齐墩果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110709-200304,纯度:≥98%);无水乙醇、甲醇、乙酸乙酯、硫酸、石油醚、正丁醇均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 昆仑雪菊中总皂苷的提取

提取工艺流程:(1)准确称取昆仑雪菊10 g,加入一定料液比的乙醇,在一定温度下水浴浸提。(2)将浸提液过滤后加入等体积的石油醚萃取,以除去滤液中的脂溶性成分,得上清液。(3)将上清液浓缩,再用蒸馏水溶解,备用。

2.2 昆仑雪菊中总皂苷提取率的测定^[11]

2.2.1 供试品溶液的制备 将“2.1”项下所得浓缩液用蒸馏水饱和正丁醇溶解,得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称量齐墩果酸对照品5.00 mg,用甲醇溶解后置于50 ml量瓶中,甲醇定容至刻度,充分振荡摇匀,即得0.100 mg/ml的对照品溶液,置于冰箱中冷藏备用。

2.2.3 最大吸收波长的确定 取1支10 ml具塞试管,加入齐墩果酸对照品溶液适量,于70℃水浴加热;待溶剂挥干后加入1 ml浓硫酸摇晃混匀,再于70℃水浴加热15 min;冷水冷却后,加入乙酸乙酯4 ml,摇匀。取该溶液于200~600 nm波长扫描,得到最大吸收波长为367 nm。

2.2.4 标准曲线的建立 准确量取齐墩果酸对照品0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 ml,分别置于8支10 ml具塞试管中,于70℃水浴加热;等到溶剂挥干后,再向每个试管中加入1 ml浓硫酸摇晃混匀,置于70℃水浴加热15 min后,冷水冷却;再加入乙酸乙酯4.0 ml,摇晃混匀,得质量浓度为0、4、8、12、20、24、28 μg/ml的对照品溶液,于367 nm波长处测定吸光度(A)。以齐墩果酸对照品质量浓度(c)为横坐标、A为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $A=20.938c-0.0237$ ($r=0.9913$)。结果表明雪菊总皂苷检测质量浓度线性范围为4~28 μg/ml。

2.2.5 精密度、稳定性、重复性、回收率试验 按相关方法进行试验,得精密度、重复性试验的RSD分别为0.42%、0.35%($n=5$),稳定性试验中供试品溶液在24 h内稳定(RSD=1.32%, $n=5$);低、中、高质量浓度样品平均回收率为101.38%(RSD=0.90%, $n=3$)。

2.2.6 样品含量测定 取供试品溶液在367 nm波长处测定其A值,根据回归方程计算总皂苷含量。

2.2.7 昆仑雪菊总皂苷提取率计算 总皂苷提取率(%)= $c \times$ 稀释倍数 \times 提取液体积/昆仑雪菊质量(g) $\times 100\%$ 。式中,c为供试品溶液中总皂苷的质量浓度。

2.3 单因素试验考察提取因素与水平

对昆仑雪菊总皂苷的提取过程中料液比、提取温度、乙醇浓度(体积分数)、提取时间等影响因素进行单因素试验,初选各因素与水平。

2.3.1 提取温度对昆仑雪菊总皂苷提取效果的影响 取料液比为1:20的昆仑雪菊与40%乙醇,按“2.1”项下方法进行提取。提取温度分别为20、40、60、80℃,提取2 h,计算提取率。结果表明,提取温度在60℃时,雪菊总皂苷提取率最高;之后总皂苷提取率随着温度的增加而降低,详见图1A。最终选择60℃为提取温度。

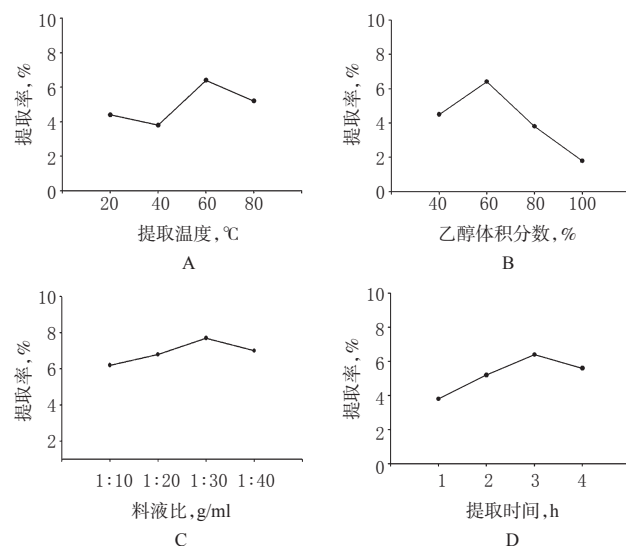


图1 各因素对雪菊总皂苷提取效果的影响

A.提取温度;B.乙醇体积分数;C.料液比;D.提取时间

Fig 1 Effect of each factor on the extraction of total saponins from *C. tinctoria*

A. extraction temperature; B. ethanol volume fraction; C. solid-liquid ratio; D. extraction time

2.3.2 乙醇体积分数对昆仑雪菊总皂苷提取效果的影响 取料液比为1:20的昆仑雪菊与乙醇,按“2.1”项下方法进行提取。在60℃温度下提取时间2 h,乙醇体积分数分别为40%、60%、80%、100%,计算提取率。结果当乙醇体积分数为60%时,皂苷提取率最高;随着乙醇体积分数的增加,雪菊总皂苷提取率呈先增加后降低的趋势,详见图1B。最终选择乙醇体积分数为60%。

2.3.3 料液比对昆仑雪菊总皂苷提取效果的影响 雪菊与60%乙醇料液比分别设立为1:10、1:20、1:30、1:40,在60℃下按“2.1”项方法提取2 h,计算提取率。结果,料液比为1:30时提取率达到最高;随料液比增加,提取率呈先增加后降低的趋势,但总的变化趋势并不明显,详见图1C。最终选择料液比为1:30。

2.3.4 提取时间对昆仑雪菊总皂苷提取效果的影响 取料液比为1:30的昆仑雪菊与60%乙醇,按“2.1”项下方法进行提取。在60℃温度下分别提取1、2、3、4 h,计算提取率。结果,随着提取时间的延长,雪菊总皂苷提取率增加;在提取3 h时达到最高,之后随着提取时间的延长而降低,详见图1D。最终选择提取时间为3 h。

经过上述单因素考察,初步确定正交试验选择的考察因素及水平分别为提取温度50~70℃、乙醇体积分数50%~70%、提取时间2~4 h;料液比因影响不大不再进行正交试验

的优化,其水平固定为1:30。

2.4 正交试验优化提取因素与水平

正交试验因素与水平见表1,药材取样量为10 g;以乙醇体积分数(A,%)、提取温度(B,℃)、提取时间(C,h)为考察因素,总皂苷提取率为考察指标,设计正交试验。因素与水平见表1;正交试验设计与结果见表2。

表1 因素与水平
Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(乙醇体积分数),%	B(提取温度),℃	C(提取时间),h
1	50	50	2
2	60	60	3
3	70	70	4

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and result of orthogonal test

编号	A	B	C	D(空白列)	总皂苷提取率,%
1	1	1	1	1	5.775
2	1	2	2	2	4.219
3	1	3	3	3	5.064
4	2	1	2	3	6.061
5	2	2	3	1	5.876
6	2	3	1	2	7.526
7	3	1	3	2	4.911
8	3	2	1	3	5.802
9	3	3	2	1	4.993
K_1	15.058	16.747	19.103	16.644	
K_2	19.463	15.897	15.273	16.656	
K_3	15.706	17.583	15.851	16.927	
R	4.405	0.836	3.83	0.283	

由表2可知,各因素对昆仑雪菊总皂苷提取率的影响程度大小顺序依次为A>C>B。对试验结果进行方差分析和F检验,结果见表3。

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	均方	F	P
A	3.771	2	1.885	220.850	0.005
B	0.474	2	0.237	27.747	0.035
C	2.842	2	1.421	166.446	0.006
D(误差)	0.017	2	0.009		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$; $F_{0.01}(2,2)=99.00$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$; $F_{0.01}(2,2)=99.00$

由表3可以看出,因素A、C对提取率有显著性影响;因素B影响不显著,从节约成本、环境保护、工业化生产方便考虑,B水平选择为50℃。最终得最优工艺为A₂B₁C₁,即昆仑雪菊与60%乙醇料液比1:30,50℃下提取2h。

2.5 验证试验

取10 g样品,按上述优选工艺A₂B₁C₁平行提取3次,测定总皂苷提取率,结果分别为6.8%、6.8%、6.7%,平均值为6.8%(RSD=0.85%,n=3),表明优选的工艺用于提取总皂苷,提取率相近、工艺稳定。

3 讨论

由于《中国药典》中无昆仑雪菊总皂苷含量测定的相关内容,而本试验也不适合借鉴《中国药典》中人参皂苷或三七皂苷的测定方法,故笔者建立了以雪菊总皂苷类似物齐墩果酸为对照品、紫外分光光度法测定昆仑雪菊主要的水溶性成分

总皂苷的方法。紫外分光光度法是测定三萜皂苷的通用方法。该方法应用较广,适应范围也较广,如王洪兰等^[12]采用该法测定瓜子金总皂苷的含量,王立业等^[13]等采用该法测定七叶莲中总皂苷的含量,张彦丽等^[14]采用以高氯酸为显色剂、人参皂苷Rb₁为对照品的分光光度法测定昆仑雪菊中总皂苷的含量。

有研究报道,昆仑雪菊中的皂苷类物质含量较其他菊类药材含量高^[15]。皂苷难溶于丙酮、乙醚等有机溶剂,而易溶于热甲醇、水和乙醇等极性较大的溶剂,这是因为多数皂苷极性较大所致。乙醇是一种常用的提取溶剂,具有无毒、易回收等特点,所以本试验选用乙醇为提取剂^[16]。但应注意当提取温度升高至70℃以上时,雪菊中皂苷苷键可能断裂造成皂苷提取率降低,同时该温度下乙醇易挥发也会给操作带来不便,所以提取温度宜选取70℃以下。

参考文献

- [1] 孙自增,毕肯·阿不都克力木,张彦丽,等.不同产地雪菊化学成分含量测定及模式识别研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):174.
- [2] 过利敏,张平,张谦,等.雪菊化学成分分析、提取、鉴定及其生物活性研究进展[J].食品科学,2014,35(7):298.
- [3] 钱宗耀,安冉,华震宇,等.固相微萃取气质联用分析新疆雪菊的挥发性成分[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(7):82.
- [4] 兰卫,赵保胜,李玉清,等.昆仑雪菊中多种成分的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(10):101.
- [5] 木合布力·阿布力孜,张兰,张敏,等.昆仑雪菊中氨基酸的含量分析[J].医药导报,2011,30(4):431.
- [6] 茹克娅·胡加阿不都拉,斯依提尼沙汗·吾满尔.雪菊花药用功能及临床应用体会[J].中国民族民间医药,2011,20(19):41.
- [7] 孔燕芳,周艳梅,闫艳仓,等.正交试验优选野菊花中总黄酮的提取工艺[J].中国药房,2013,24(43):4068.
- [8] 李冬明.昆仑雪菊的药学研究进展[J].浙江中医杂志,2012,47(10):776.
- [9] Zhang Y, Shi SP, Zhao MB, et al. A novel chalcone from *Coreopsis tinctoria* Nutt[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2006, 34(10):766.
- [10] 马超,贺翠,王燕芳,等.响应曲面法优化昆仑雪菊皂苷提取[J].中国酿造,2013,32(9):109.
- [11] 高娅,苏力坦·阿巴白克力,古兰班尔·阿布都米吉提.玉米须总皂苷的提取工艺研究[J].中国酿造,2011,30(2):482.
- [12] 王洪兰,张亚楠,陈丽红,等.瓜子金总皂苷的含量测定及其纯化工艺研究[J].中国药房,2014,25(39):3670.
- [13] 王立业,贾强,阎玺庆,等.紫外分光光度法测定七叶莲中总皂苷的含量[J].中国药房,2008,19(15):1175.
- [14] 张彦丽,韩艳春,阿依吐伦·斯马义,等.分光光度法测定维吾尔药昆仑雪菊中总皂苷的含量[J].西北药学杂志,2011,26(2):87.
- [15] 方瑞萍,唐辉,黄剑,等.雪菊的药理作用及营养成分的分析方法研究进展[J].材料导报,2014,28(19):143.
- [16] 李肇奖,吕晓玲,姚秀玲,等.油茶总皂苷提取工艺优化[J].中国食品添加剂,2004(5):1.

(收稿日期:2015-04-13 修回日期:2015-06-26)

(编辑:刘萍)