

小鼠抗缺氧活性实验结合正交试验优选藏紫菀中总黄酮的提取工艺^Δ

何 蕾*,马慧萍#,李兰茹,贾正平(兰州军区兰州总医院药材科,兰州 730050)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1832-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.30

摘要 目的:优选藏紫菀中总黄酮的提取工艺。方法:通过小鼠常压密闭缺氧耐力实验筛选提取藏紫菀中总黄酮的溶剂(水、60%乙醇、95%乙醇);以浸膏得率和总黄酮含量为指标,采用单因素和正交试验筛选提取溶剂加入量、提取时间和提取次数的最优水平,并进行验证试验。结果:提取溶剂为水时小鼠存活时间最长;最优提取工艺为加12倍量水,回流提取2次,每次2h;验证试验中总黄酮平均含量为29.70%(RSD=0.54%, $n=3$),浸膏得率平均为24.58%(RSD=0.48%, $n=3$)。结论:优选的提取工艺条件稳定、可行,可为藏紫菀总黄酮的开发利用提供科学依据。

关键词 藏紫菀;总黄酮;小鼠;常压密闭缺氧耐力实验;含量测定;正交试验;提取工艺

Optimization of the Extraction Technology of Total Flavonoids from *Aster souliei* by Orthogonal Test Combined with Anti-hypoxia Activity Test of Mice

HE Lei, MA Huiping, LI Lanru, JIA Zhengping (Dept. of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of total flavonoids from *Aster souliei*. METHODS: Atmospheric pressure closed hypoxia tolerance test of mice was used to screen the solvents (water, 60% ethanol, 95% ethanol) for the extraction of total flavonoids from *A. souliei*. Using extract yield and the content of total flavones as index, single factor test and orthogonal test were used to screen the amount of solvent, extraction time and extraction times. The validation test was also conducted. RESULTS: When the extraction solvent was water, the survival time of the mice was the longest. The optimized extraction technology was as follows as 12-fold water, extracting for 2 times, lasting for 2 h each time; average content of total flavonoids in validation test was 29.70% (RSD=0.54%, $n=3$) and extract yield was 24.58% (RSD=0.48%, $n=3$). CONCLUSIONS: The optimized extraction technology is stable and feasible, and can provide scientific evidence for the development and utilization of total flavonoids from *A. souliei*.

KEYWORDS *Aster souliei*; Total flavones; Mice; Atmospheric pressure closed hypoxia tolerance test; Content determination; Orthogonal test; Extraction technology

藏紫菀为菊科植物缘毛紫菀 *Aster souliei* Franch. 的干燥花序,多年生草本植物,生长在海拔3 000~4 500 m的高原地区,主要分布于西藏、青海、四川、甘肃、云南等地^[1-2]。其具有清热解毒、镇咳祛痰之效,临床上用于瘟疫病、中毒症、支气管炎、咳嗽气喘、咳吐脓血等的治疗^[3-5]。有关藏紫菀的化学成分,有文献进行了系统研究^[6-7],并从中分离得到包括芦丁、槲皮素等多种黄酮类化合物,但目前尚未见对藏紫菀总黄酮成分的活性进行深入研究文献报道。本课题组前期研究发现,藏紫菀具有抗高原缺氧的作用,且活性超过公认的抗缺氧药红景天胶囊和乙酰唑胺,并确定藏紫菀总黄酮成分是其抗缺氧作用的活性成分。为充分开发利用这一资源,本试验对藏紫菀总黄酮的提取工艺进行研究。

目前我国在中成药制备中,普遍注重提取的产量,往往忽视了最根本的药效因素。故本试验首先采用小鼠常压密闭缺氧耐力实验考察藏紫菀不同溶剂提取物的抗缺氧活性,再优选出提取溶剂,进而采用单因素和正交试验,以浸膏得率和总

黄酮含量为评价指标,优化藏紫菀总黄酮的提取工艺,以获得提取方法简便、提取率高、适合工业化大生产的提取工艺。

1 材料

1.1 仪器

UV2800SPC型紫外-可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);SK3300LH型超声清洗机(上海科导超声仪器有限公司);AE200型电子天平(上海梅特勒-托利多公司);H.HS型电热恒温水浴锅(北京长风仪器仪表公司);RE-52A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂);HWB-2型电热恒温培养干燥两用箱(厦门医疗电子仪器厂);BPZ-6033LC型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

藏紫菀[购自拉萨当雄商贸有限公司,批号:140712,经兰州大学药学院生药学研究所杨永建教授鉴定为菊科紫菀属植物缘毛紫菀(*Aster souliei* Franch.)的干燥花序];芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:10753-200413,供含量测定用);乙酰唑胺原料药(武汉远城科技发展有限公司,批号:100114,纯度:98%);乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF级BALB/c小鼠,♂,体质量为(20±2)g,购自甘肃中

^Δ 基金项目:全军医药卫生科研基金课题(No.CLZ11JA06);甘肃省自然科学基金计划项目(No.1107RJZA100)

* 药师,硕士。研究方向:药物分析、药理学。E-mail:helai800@163.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:天然药物化学、药理学。E-mail:360089525@qq.com

医学院,动物合格证号:SCXK(甘)2011-0001,在兰州军区总医院动物实验中心进行饲养。动物自由摄取水和饲料。实验开始前,正常饲养1周,以适应环境,自第2周开始实验。饲养室保持良好通风,控制环境温度在24~26℃、湿度50%~60%、12h循环光照。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量的测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品49.2 mg置于100 ml量瓶中,加60%乙醇使其溶解并定容。分别精密吸取0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml,置于25 ml量瓶中,各加60%乙醇定容,即得不同质量浓度的芦丁对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取藏紫菀提取物干粉0.10 g,置于50 ml量瓶中,加60%乙醇,超声(功率250 W,频率40 kHz)30 min,再用60%乙醇定容至刻度,混匀,即得。

2.1.3 标准曲线的制备 分别精密量取不同质量浓度对照品溶液1 ml,依次加入5%亚硝酸钠溶液1 ml、10%硝酸铝溶液1 ml、氢氧化钠试液10 ml、60%乙醇适量,摇匀,放置15 min后在510 nm波长处测定吸光度(A)。以A为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标进行线性回归,得线性回归方程: $A=0.0125c-0.0006$ ($r=0.9997$),表明芦丁检测质量浓度线性范围为9.84~59.04 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.1.4 稳定性、精密性、重复性、准确度试验 按相关方法进行试验。结果,稳定性试验中供试品溶液在50 min内稳定(RSD=0.53%, $n=6$),精密性和重复性试验的RSD分别为0.17%、1.18% ($n=6$),样品平均回收率为98.38% (RSD=2.01%, $n=6$)。

2.2 藏紫菀不同溶剂提取物的小鼠抗缺氧活性实验

分别选取水、60%乙醇和95%乙醇提取藏紫菀药材粗粉,采用真空干燥制得提取物干粉待用。将小鼠随机分成缺氧模型组、乙酰唑胺组(阳性对照药)、水提取组、60%乙醇提取组和95%乙醇提取组,每组10只。其中乙酰唑胺剂量为200 mg/kg(由前期实验筛选出的有效剂量),藏紫菀提取物剂量为500 mg/kg(由前期实验筛选出的有效剂量),缺氧模型组给予生理盐水。各组均灌胃给药,50 min后将小鼠放入250 ml广口瓶中(瓶中事先放入5 g碱石灰,用于吸收二氧化碳与水分,并且在瓶底放入适量滤纸吸取尿液与粪便),在瓶口涂抹凡士林进行密闭,随后开始计时,当小鼠呼吸停止时结束计时,记录小鼠在密闭实验瓶中的存活时间。结果,各藏紫菀提取物组小鼠存活时间均长于缺氧模型组,其中水提取组延长率[(实验组存活时间-缺氧模型组存活时间)/缺氧模型组存活时间 $\times 100\%$]达35.54%,表明藏紫菀水提取物的抗缺氧活性最优(各组数据采用 t 检验),故以下试验选取水为提取溶剂。各组小鼠抗缺氧活性比较详见表1。

表1 各组小鼠抗缺氧活性比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Comparison of anti-hypoxia activity of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	给药剂量,mg/kg	存活时间,min	延长率,%
缺氧模型组		31.23 \pm 2.57	
乙酰唑胺组	200	36.42 \pm 4.55*	16.62
水提取组	500	42.33 \pm 3.19**	35.54
60%乙醇提取组	500	37.60 \pm 3.48*	20.40
95%乙醇提取组	500	35.13 \pm 3.98*	12.49

注:与缺氧模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. hypoxia model group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.3 提取工艺的单因素试验

2.3.1 溶剂加入量对总黄酮含量的影响 精密称定5份藏紫菀药材粉末各20 g,以加水倍量为变量(8、10、12、14、16倍药材量),考察其对总黄酮含量的影响,结果见图1。

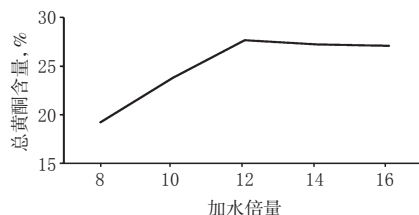


图1 加水倍量对藏紫菀总黄酮含量的影响

Fig 1 Effects of the amount of water on total flavonoids from *A. souliei*

由图1可见,不同加水倍量下总黄酮含量分别为19.21%、23.77%、27.68%、27.21%、27.11%。随着溶剂量的增加,总黄酮的含量也随之增加,这是因为溶剂量的增大会增加总黄酮的溶出;当溶出达到最大值后,随溶剂量的增加,含量略有下降,这可能是因总黄酮溶出达饱和而杂质物溶出相对增加所致。因此选取加水倍量为8、10、12倍药材量进行正交试验。

2.3.2 提取时间对总黄酮含量的影响 精密称定5份藏紫菀药材粉末各20 g,以提取时间为变量(1、1.5、2、2.5、3 h),其余条件为加水倍量10倍、提取3次,考察提取时间对总黄酮含量的影响,结果见图2。

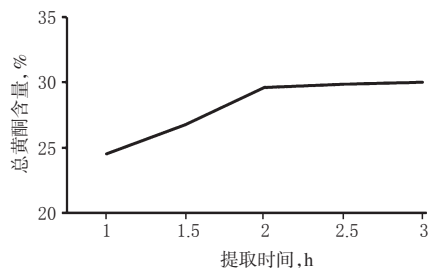


图2 提取时间对藏紫菀总黄酮含量的影响

Fig 2 Effects of extraction time on the content of total flavonoids from *A. souliei*

由图2可见,不同提取时间下总黄酮含量分别为24.54%、26.78%、29.62%、29.87%、30.03%。总黄酮含量随提取时间延长而增加,提取时间在2 h以后呈缓慢上升的趋势。因此选取提取时间1、1.5、2 h进行正交试验。

2.3.3 提取次数对总黄酮含量的影响 精密称定5份藏紫菀药材粉末各20 g,以提取次数为变量(1、2、3、4、5次),其余条件为加水倍量10倍、提取1.5 h,考察提取次数对总黄酮含量的影响,结果见图3。

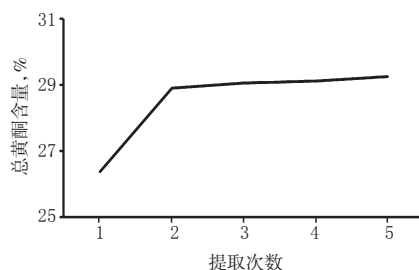


图3 提取次数对藏紫菀总黄酮含量的影响

Fig 3 Effects of extraction times on the content of total flavonoids from *A. souliei*

由图3可见,各提取次数下总黄酮含量分别为26.38%、28.91%、29.07%、29.12%、29.25%。总黄酮含量在提取3次后呈缓慢上升的趋势,但是上升程度不大。因此选取提取次数1、2、3次进行正交试验。

2.4 提取工艺的正交试验

选取加水倍量、提取时间、提取次数为考察因素,每个因素选取3个水平,因素与水平见表2。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素		
	A(加水倍量)	B(提取时间),h	C(提取次数)
1	8	1	1
2	10	1.5	2
3	12	2	3

采用 $L_9(3^4)$ 正交设计,取药材分别加水浸泡12 h后加热回流提取,过滤,合并药液,减压浓缩成稠膏,转移至干燥至恒质量的蒸发皿中,放入真空干燥箱中70℃干燥60 h,得干膏,精密称定质量,备用。

以藏紫菀提取物中浸膏得率、总黄酮含量为评价指标,采用综合评分法进行数据处理,权重系数分别为0.3和0.7。浸膏得率=浸膏干粉质量/药材质量 $\times 100\%$;综合评分=(浸膏得率/浸膏得率最大值) $\times 30$ +(总黄酮含量/总黄酮含量最大值) $\times 70$ 。正交试验结果见表3;方差分析结果见表4。

表3 正交试验结果

Tab 3 Results of orthogonal test

试验号	因素				指标		
	A	B	C	D(空白)	浸膏得率,%	总黄酮,%	综合评分
1	8	1	1	1	19.69	12.19	48.75
2	8	2	2	2	24.23	19.91	70.71
3	8	3	3	3	26.69	26.33	87.49
4	10	1	2	3	20.22	19.22	64.69
5	10	2	3	1	24.14	17.03	64.32
6	10	3	1	2	25.35	27.39	88.30
7	12	1	3	2	21.25	16.61	60.15
8	12	2	1	3	23.37	17.99	65.55
9	12	3	2	1	27.29	32.06	100.67
\bar{K}_1	68.98	57.86	67.53	71.25			
\bar{K}_2	72.44	66.86	78.69	73.05			
\bar{K}_3	75.46	92.15	70.65	72.58			
R	6.474	34.29	11.16	1.806			

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	均方差	F	P
A	62.950	2	31.411	1.000	
B	1 896.497	2	948.342	30.127	<0.05
C	198.794	2	99.735	3.158	
误差	62.950	2			

注: $F_{0.05}(2,2)=19$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19$

由表3和表4可知,各因素对综合评分的影响大小顺序为 $B>C>A$;每个因素3个水平之间的影响大小为 $A_3>A_2>A_1$, $B_3>B_2>B_1$, $C_2>C_3>C_1$,其中因素B(提取时间)对提取结果有显著性影响($P<0.05$)。综合直观分析与方差分析的结果,优选出最优提取工艺为 $A_3B_3C_2$,即加入12倍量的水,每次提取2 h,共提取2次。

2.5 验证试验

为验证该工艺的稳定性,据所筛选的最优工艺条件提取3批样品,取样量均为200 g。结果浸膏得率分别为24.12%、25.08%、24.54%($RSD=0.48\%$, $n=3$),总黄酮含量分别为29.18%、30.26%、29.66%($RSD=0.54\%$, $n=3$),综合评分分别为96.35、100、97.97($RSD=1.08\%$, $n=3$),表明优选的工艺条件稳定、可行。

3 讨论

黄酮类化合物因具有抗氧化、抗炎、镇痛、降脂等作用而成为近年来的研究热点^[8-10]。藏紫菀中已发现以芦丁、槲皮素为代表的大量黄酮类成分的存在,具有较好的开发利用价值。本课题组前期发现藏紫菀总黄酮具有良好抗缺氧活性,考虑到有利于药物研究开发,因此对其提取工艺进行优化。

目前总黄酮的含量测定方法主要原理是显色剂与黄酮类化合物可形成有色络合物,然后以芦丁为对照品,采用分光光度法进行比色测定。文献报道的显色方法中的显色剂主要有三氯化铝^[11]、二氯氧锆^[12]和亚硝酸钠-硝酸铝^[13]3种。笔者经过比较后发现,当测定藏紫菀总黄酮含量时,采用前2种显色剂显色后芦丁对照品和样品溶液的波形差异较大,而采用第3种显色剂显色后芦丁对照品和样品溶液在510 nm波长处均有最大吸收,故本试验选用亚硝酸钠-硝酸铝为显色剂测定总黄酮含量。试验中发现该方法显色稳定,线性关系良好,重复性、回收率及精密度均达到定量分析的方法学考察要求,且简便易行。

对不同溶剂提取的藏紫菀总黄酮进行抗缺氧药效实验,其中选取提取物来比较药效的原因是:在醇提物和水提物比较中,测定出总黄酮的含量有差异,水提物中总黄酮含量更高,表明水提取总黄酮更为有效;在后期实验中,笔者又对藏紫菀总黄酮进行富集和纯化,其纯化效果更优于水提物,表明了藏紫菀总黄酮确实是其有效部位。因此相同质量提取物药效的比较,可以优选提取溶剂来提取出有效成分。在小鼠密闭缺氧实验中发现,水提取物组的小鼠存活时间最长,优于不同体积分数的乙醇提取物组。这表明采用水为溶剂,能够将藏紫菀中有效成分总黄酮充分提取,从而发挥其最大抗缺氧药效;且水提取法溶剂为水,具有成本低、污染小的优点,可为其后续工业化大生产的推广应用提供便利。

在本试验中,以总黄酮含量和出膏率为评价指标,使该提取工艺同时兼顾理化指标与药理学指标,较单纯理化指标的提取筛选工艺相对更科学、合理。本试验结果为藏紫菀总黄酮的开发利用提供了科学依据。

参考文献

- [1] 强巴赤烈.中华本草:藏药卷[M].上海:上海科技出版社,2002:364.
- [2] 姚娟,马慧萍,贾正平.藏紫菀的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):286.
- [3] 余平,许翔鸿,张朝凤,等.藏紫菀化学成分及药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2014,10(12):9.
- [4] 丁锤,张伟,边樱,等.3种来源藏紫菀药材的形态学与薄层色谱鉴别研究[J].中国中药杂志,2015,40(12):2244.
- [5] 侯海燕,陈立,董俊兴.紫菀化学成分及药理活性研究进展[J].中国药学杂志,2006,41(3):161.

Box-Behnken 响应面法结合多指标综合加权法优选升麻中酚酸类成分的提取工艺^Δ

范孟雪^{1,2,3*}, 秦昆明^{1,2,3}, 丁 斐³, 黄雨婷^{1,2,3}, 蔡宝昌^{1,2,3#}(1.南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210046; 2.南京中医药大学国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京 210023; 3.南京海昌中药集团有限公司/江苏省企业研究生工作站, 南京 210061)

中图分类号 R983 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1835-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.31

摘要 目的:优化升麻中酚酸类成分的提取工艺。方法:在单因素试验的基础上,以乙醇体积分数、回流提取时间和液料比3个因素为自变量,以咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸含量和浸出物得率的综合评分为因变量,采用基于Box-Behnken设计的响应面法优化升麻中酚酸类成分的提取工艺。结果:最优提取工艺为以8倍药材量的70%乙醇提取2次,每次200 min。验证试验结果表明,综合评分指标的预测值与实测值相对偏差仅为2.20%。结论:优选的提取工艺方法简单、稳定可行,可为后续升麻药材的制剂生产提供参考。

关键词 升麻;咖啡酸;阿魏酸;异阿魏酸;含量;浸出物得率;Box-Behnken设计;响应面法;提取工艺

Optimization of the Extraction Technology of Phenolic Acids in *Cimicifugae foetidae* by Using Box-Behnken Response Surface Methodology Combined with Multi-index Comprehensive Weighted Method

FAN Mengxue^{1,2,3}, QIN Kunming^{1,2,3}, DING Fei³, HUANG Yuting^{1,2,3}, CAI Baochang^{1,2,3}(1.Jiangsu Key Lab of TCM Processing, Nanjing University of TCM, Nanjing 210046, China; 2.National Reengineering Research Center for Standardization of TCM Processing, Nanjing University of TCM, Ministry of Education, Nanjing 210023, China; 3.Nanjing Haichang TCM Group Company Limited/Enterprises Graduate Workstation in Jiangsu Province, Nanjing 210061, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of phenolic acids from *Cimicifugae foetidae*. METHODS: Based on single factor test, the extraction technology of phenolic acids from *C. foetidae* was optimized by response surface methodology based on Box-Behnken design using ethanol volume fraction, reflux extraction time and liquid to solid ratio as independent variables, comprehensive score of the content of caffeic acid, ferulic acid and isoferulic and extract yield as dependent variable. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as 8-fold 70% ethanol, extracting for 2 times, 200 min each time. Results of validation test indicated that the difference between predicted value of comprehensive score indicators and measured value was 2.20%. CONCLUSIONS: The optimal extraction technology is simple, stable and feasible, and can provide reference for following production of *C. foetidae* preparation.

KEYWORDS *Cimicifugae foetidae*; Caffeic acid; Ferulic acid; Isoferulic acid; Content; Extract yield; Box-Behnken design; Response surface methodology; Extraction technology

- [6] 程成立,时岩鹏,种小桃,等.藏紫菀化学成分的研究[J].食品与药品,2009,11(1):33.
- [7] 程成立,时岩鹏,种小桃,等.藏紫菀化学成分的研究:II[J].中草药,2011,42(1):42.
- [8] 黄秋洁,叶勇,欧贤红,等.两种药用植物总黄酮体外抗氧化活性比较[J].医药导报,2013,32(5):576.
- [9] 李茂星,尉丽力,邱建国,等.镰形棘豆黄酮类成分提取工艺与体外抗氧化活性研究[J].医药导报,2012,31(9):1195.
- [10] 曹秦,吴辉,张蓓蓓,等.黄酮类化合物在防治神经退行性疾病中作用的研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2015,29(3):457.
- [11] 吴晓青,陈丹,黄群.玳玳黄酮自微乳化微丸的性能评价及总黄酮含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(24):53.
- [12] 潘冬梅,张巧萍,沈斌,等.超声波辅助提取鸭跖草中总黄酮的工艺优化[J].中国药房,2015,26(7):976.
- [13] 杨浩,郭允,陈永超,等.三种开封观赏菊与怀菊中总黄酮的含量比较[J].沈阳药科大学学报,2014,31(9):726.

(收稿日期:2015-09-08 修回日期:2015-11-18)

(编辑:刘 萍)

^Δ基金项目:江苏省科技项目(No.BK20141093)

* 硕士研究生。研究方向:中药炮制机制及质量标准。E-mail: fandana@126.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:中药炮制机制及质量标准。电话:025-68193567。E-mail:bccai@126.com