

不同产地天山雪莲中绿原酸和芦丁含量测定及其煎煮提取工艺优化^Δ

王强^{1*}, 刘运权¹, 王涛², 刘学^{1,2}, 朱晶晶^{1,2}, 张亚洲^{2#}(1.贵阳中医学院附属第二医院神经内科, 贵阳 550001; 2.贵州理工学院制药工程学院, 贵阳 550003)

中图分类号 R285.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)25-3539-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.25.25

摘要 目的:测定不同产地天山雪莲中绿原酸和芦丁的含量,优化天山雪莲的煎煮提取工艺。方法:采用高效液相色谱法测定10批不同产地天山雪莲中绿原酸和芦丁的含量;以绿原酸和芦丁提取转移率的综合得分为指标,采用L₉(3¹)正交试验优化加水量、煎煮次数、煎煮时间的水平,并进行验证试验。结果:10批雪莲中绿原酸含量为0.380%~0.546%,芦丁含量为0.334%~0.617%;最优煎煮工艺条件为取天山雪莲药材100 g,浸泡20 min,煎煮3次,每次分别加12、10、10倍药材的水,分别煎煮45、30、30 min。验证试验中绿原酸和芦丁提取转移率分别为96.2%、89.3%(RSD分别为2.66%、3.31%,n=3)。结论:不同产地的天山雪莲有效成分含量存在一定的差异;优化后的煎煮提取工艺稳定、可行。

关键词 天山雪莲;不同产地;含量测定;芦丁;绿原酸;正交试验;煎煮提取工艺

Content Determination of Chlorogenic Acid and Rutoside in *Saussurea involucre* from Different Producing Areas and Optimization of Decoction and Extraction Technology

WANG Qiang¹, LIU Yunquan¹, WANG Tao², LIU Xue^{1,2}, ZHU Jingjing^{1,2}, ZHANG Yazhou²(1.Dept. of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Guiyang TCM College, Guiyang 550001, China; 2.School of Pharmaceutical Engineering, Guizhou Institute of Technology, Guiyang 550003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To detect the contents of chlorogenic acid and rutoside in *Saussurea involucre*, and to optimize the decoction and extraction technology of *S. involucre* from different producing areas. METHODS: The contents of chlorogenic acid and rutoside in 10 batches of *S. involucre* from different producing areas were determined by HPLC. L₉(3¹) orthogonal experiment was used to optimize the water amount, decoction times and decoction time using comprehensive score of extraction transport rate of chlorogenic acid and rutoside as index. The verification test was also conducted. RESULTS: The contents of chlorogenic acid and rutoside in 10 batches of *S. involucre* were 0.380%-0.546% and 0.334%-0.617%; the optimal decoction technology was as follows as the amount of crude material of *S. involucre* 100 g, soaking for 20 min, decocting for 3 times, 12, 10 and 10 fold of water, decocting 45, 30 and 30 min, respectively. The extraction transfer rates of chlorogenic acid and rutoside were 96.2% (RSD=2.66%, n=3) and 89.3% (RSD=3.31%, n=3) in verification test. CONCLUSIONS: For *S. involucre* from different producing areas, the contents of effective components are different; optimized decoction and extraction technology is stable and feasible.

KEYWORDS *Saussurea involucre*; Different producing areas; Content determination; Rutoside; Chlorogenic acid; Orthogonal test; Decoction and extraction technology

天山雪莲为菊科植物雪莲 *Saussurea involucre* (Kar. et Kir.) Sch.-Bip. 的干燥地上部分,又名新疆雪莲或大苞雪莲,系新疆维吾尔医习用药材。清代赵学敏所著《本草纲目拾遗》对其记载功效包括“散寒除湿、活血通经、强筋助阳、抗炎、镇痛、收缩子宫”等。民间主要用于治疗风湿性关节炎、妇女小腹冷痛、闭经、胎衣不下、麻疹不透、肺寒咳嗽、阳痿等症^[1-2]。

天山雪莲主要含蛋白质、氨基酸、芦丁等黄酮类,紫丁香苷等木脂素类,大苞雪莲内酯等内酯类,大苞雪莲碱等生物碱类以及多糖类等化学成分^[3-4]。为有效评价不同来源雪莲的质量并最大化提取出其有效成分,笔者对收集的10份不同产地的天山雪莲药材中的有效成分绿原酸和芦丁进行了含量测

定,并对其煎煮提取工艺条件进行了优化。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪、二级管阵列检测器(DAD)(美国Agilent公司);Royalstar全自动煎药壶(荣事达公司);KQ-300DB数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药材、对照品与试剂

10批天山雪莲药材均为笔者本人收集或购买的天山雪莲(批号见后文),均由贵阳中医学院董立莎教授鉴定为正品天山雪莲;绿原酸对照品(批号:20140721)、芦丁对照品(批号:20130916)均购于成都维克奇生物有限公司(纯度:均>98%);乙腈、甲醇为色谱级,磷酸为分析纯,水为自制纯净水。

2 方法与结果

2.1 绿原酸与芦丁含量测定^[5-7]

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Phenomenex Gemini C₁₈(250 mm×4.60 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(含0.4%

Δ 基金项目:贵州省科学技术基金项目(No.黔科合J字[2014]2042号)

* 副教授,博士。研究方向:神经性疾病的中药治疗。电话:0851-85284822。E-mail:liukangjing2006@163.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:天然药物的活性成分和代谢。电话:0851-88210126。E-mail:yazhou_zhang2009@163.com

磷酸),梯度洗脱;流速:1.0 ml/min;DAD,绿原酸、芦丁检测波长:254 nm;柱温:室温;进样量:10 μl。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间,min	水(含0.4%磷酸),%	乙腈, %	洗脱
0~6	85→85	15→15	等度
6~25	85→70	15→30	梯度
25~35	70→60	30→40	梯度
35~40	60→85	40→15	梯度

取“2.1.2”项下绿原酸、芦丁对照品混合溶液及“2.1.3”项下供试品(批号:TSXL-1)进样分析,结果绿原酸、芦丁与其相邻左右峰之间的分离度均大于1.5,详见图1。

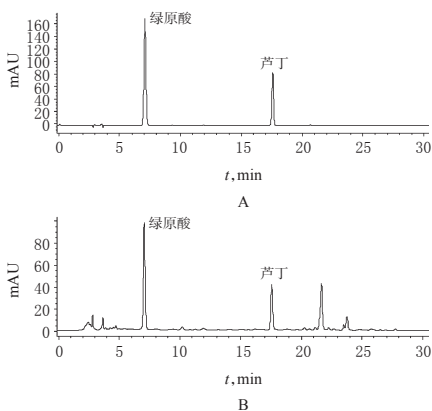


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test sample

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 32.3 mg 至 50 ml 量瓶中,用水溶解得绿原酸对照品溶液;称取芦丁 21.4 mg 至 50 ml 量瓶中,用甲醇溶解得芦丁对照品溶液。分别精密量取绿原酸对照品溶液 1 ml 和芦丁对照品溶液 2 ml 至 10 ml 量瓶中,用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀后即得。

2.1.3 样品处理 (1)溶剂的选择:通过查阅文献[5-7]及结合前期试验结果,发现芦丁溶于甲醇、绿原酸溶于水,故选取 50% 甲醇水为超声溶剂(功率:300 W,频率:40 kHz)。(2)超声时间的选择:经预试验发现,超声 30、45、60 min 后对 2 种成分的提取结果差别不大,故选取超声时间为 30 min。(3)供试品溶液制备:称取样品(批号:TSXL-1)适量至 100 ml 量瓶中,用 50% 甲醇水超声 30 min 后,再用 50% 甲醇水稀释至刻度,摇匀后用微孔滤膜过滤即得。

2.1.4 标准曲线的绘制及定量限试验 分别精密量取绿原酸、芦丁对照品溶液,用 50% 甲醇水稀释至 129.2、96.9、64.6、48.45、32.3、16.15、6.46 μg/ml (绿原酸)和 171.28、128.46、85.64、64.23、42.82、21.41、8.56 μg/ml (芦丁),各进样 10 μl,记录色谱图。将峰面积(y)对质量浓度(x)进行线性回归,得绿原酸的回归方程为 $x=0.042y-0.202$ ($r=0.9999$),芦丁的回归方程为 $x=0.073y-0.038$ ($r=0.9999$)。结果表明绿原酸和芦丁的检测质量浓度线性范围分别为 6.46~129.2、8.56~171.28 μg/ml,定量限分别为 6.46、8.56 μg/ml。

2.1.5 精密度、稳定性、准确度试验 按相关方法进行操作。结果精密度试验中绿原酸、芦丁峰面积 RSD 分别为 0.082%、

0.20% ($n=5$);稳定性试验中绿原酸、芦丁峰面积 RSD 分别为 0.83%、0.85% ($n=5$),溶液在 12 h 内稳定;准确度试验中绿原酸、芦丁的加样回收率平均值分别为 101.14% ($RSD=1.26%$, $n=3$)、100.80% ($RSD=1.85%$, $n=3$),均符合规定。

2.1.6 不同来源天山雪莲中绿原酸、芦丁含量测定 取 10 批次样品,同“2.1.3”项下方法处理,进样测定,计算含量。含量=有效成分质量浓度(μg/ml)×提取液体积(100 ml)/[称样量(g)×(1-水分)]×100%。测定结果见表 2。

表2 10批天山雪莲药材中绿原酸和芦丁含量测定结果

Tab 2 Content determination of chlorogenic acid and rutin in 10 batches of *S. involucrate*

编号	收集地(批号)	产地	称样量, g	水分, %	绿原酸质量浓度, μg/ml	绿原酸含量, %	芦丁质量浓度, μg/ml	芦丁含量, %
TSXL-1	贵阳花果园 (20141012)	阿克苏	1.0015	7.87	35.17	0.382	56.95	0.617
TSXL-2	玉林药市1 (20130718)	阿勒泰	1.0024	5.43	43.13	0.455	50.64	0.534
TSXL-3	玉林药市2 (20140123)	阿克苏	1.0022	8.29	50.20	0.546	53.45	0.582
TSXL-4	中医附二院药房 (20140405)	阿克苏	1.0006	6.52	35.52	0.380	49.37	0.529
TSXL-5	贵阳同仁堂 (20130922)	阿勒泰	1.0019	9.37	44.62	0.491	49.24	0.542
TSXL-6	南宁新农万秀药房 (20130824)	乌鲁木齐	1.0030	8.39	39.28	0.427	44.39	0.483
TSXL-7	长沙芝林药房 (20140321)	阿克苏	1.0007	7.50	40.35	0.436	49.13	0.531
TSXL-8	贵阳一品药店 (20140316)	乌鲁木齐	1.0012	8.48	41.87	0.457	30.61	0.334
TSXL-9	广州老百姓药房 (20130608)	博尔塔	1.0021	8.13	38.56	0.419	43.66	0.474
TSXL-10	广州杏园春药店 (20130813)	伊犁	1.0029	9.01	36.38	0.398	36.21	0.397

结果,10批产地不同的天山雪莲绿原酸含量为 0.380%~0.546%,芦丁含量为 0.334%~0.617%,表明不同产地天山雪莲药材之间含量差异较大,其中以产地为阿克苏和阿勒泰的天山雪莲质量为优。

2.2 正交试验优化天山雪莲的煎煮提取工艺¹⁸⁻⁹¹

选批号为 TSXL-5 的样品进行正交试验。经预试验选择加水量、煎煮次数、煎煮时间为考察因素,以芦丁和绿原酸提取转移率{提取液中有效成分含量×提取液总量(500 ml)/[药材总质量(100 g)×(1-水分)×药材中有效成分含量]×100%}的综合得分为指标(二者权重系数各为 50%,绿原酸的提取转移率(%)×50+芦丁的提取转移率(%)×50),采用 $L_9(3^4)$ 正交设计进行试验。

取 100 g 天山雪莲按正交试验安排进行操作,药材煎煮前泡统一浸泡 20 min 后处理。煎煮后合并煎煮液并稀释至 500 ml,摇匀后精密移取 5 ml 至 100 ml 量瓶中,用 50% 甲醇水稀释至刻度。分别取 10 μl 进样测定,计算煎煮提取后绿原酸与芦丁的提取转移率。

因素与水平见表 3,正交试验设计与结果见表 4,方差分析结果见表 5。

方差分析结果表明,B因素煎煮次数对结果具有显著影响,而 A 和 C 因素即加水量和煎煮时间对结果则无显著影响。

表3 因素与水平
Tab 3 Factors and levels

水平	因素		
	A(加水量),倍	B(煎煮次数)	C(煎煮时间),min
1	8,6,6	1	30,20,20
2	10,8,8	2	45,30,30
3	12,10,10	3	60,45,45

表4 正交试验设计与结果

Tab 4 Design and results of orthogonal test

水平	因素				指标		
	A	B	C	D	绿原酸提取转移率,%	芦丁提取转移率,%	综合得分
1	1	1	1	1	75.48	53.41	64.45
2	1	2	2	2	93.73	80.37	87.05
3	1	3	3	3	96.87	88.45	92.66
4	2	1	2	3	83.55	61.09	72.32
5	2	2	3	1	92.44	83.02	87.73
6	2	3	1	2	97.43	85.50	91.47
7	3	1	3	2	80.21	61.74	70.98
8	3	2	1	3	91.80	81.91	86.86
9	3	3	2	1	98.76	90.34	94.55
K_1	244.16	207.75	242.78	246.73			
K_2	251.52	261.64	253.92	249.50			
K_3	252.39	278.68	251.37	251.84			
R	8.23	70.93	11.14	5.11			

表5 方差分析结果

Tab 5 Results of variance analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	40.89	2	20.45	3.12	
B	2 741.85	2	1 370.93	209.51	<0.01
C	68.13	2	34.07	5.21	
误差	13.09	2	6.55		

注: $F_{0.01}(2,2)=99.00$

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

经综合考虑,确定最优煎煮提取工艺条件为 $A_3B_3C_2$,即取天山雪莲药材100 g,浸泡20 min,煎煮3次,分别加药材量12、10、10倍的水,每次煎煮时间分别为45、30、30 min。按以上优化工艺进行3次试验以验证工艺稳定性,结果3次试验中绿原酸提取转移率为96.2%(RSD=2.66%, $n=3$),芦丁提取转移率为89.3%(RSD=3.31%, $n=3$),表明该优化工艺稳定、可行。

3 讨论

笔者在试验中发现,在测定天山雪莲有效成分含量过程中的打粉处理操作时,花瓣部分较容易粉碎,而花柄由于其纤维性较强,则需要打粉过筛处理5次以上,否则会影响样品的均一性;另由于带花柄的单株雪莲质量最大可在100 g以上,在样品收集量不充足时,也应该每批样品尽量选取3~4株,以使打粉后样品的选取具有批次代表性。

对天山雪莲有效成分的含量测定结果表明,以绿原酸、芦丁为指标性成分进行样品质量控制,均可以达到限定标准。

但不同产地的药材中有效成分含量不同,在相关研究中建议研究者注意由此带来的对相关结果的影响。

由于绿原酸在水中溶解,而芦丁在水中溶解性小,故在样品提取中选择由一定比例的甲醇与水混合后的溶剂提取效果更好。

由于2种有效成分化学性质的差异,导致绿原酸保留时间短、易出峰,而芦丁相对出峰时间较晚。为达到二者较好的分析效果,笔者在预试验中曾比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-磷酸水、乙腈-冰醋酸水等不同的流动相条件,结果发现使用乙腈-磷酸水梯度洗脱时2种有效成分均出峰时间较合适、峰形较好且与杂质分离效果较好。

因芦丁在水中溶解性小,故在天山雪莲煎煮提取过程中以水为煎煮溶剂时可能对样品中芦丁的提取转移率有一定的影响,导致其提取转移率较低。若只煎煮1次,芦丁提取转移率一般仅为55%左右,而绿原酸基本可以达到80%左右,故建议应多煎煮几次。本试验最终的提取工艺也确定为煎煮提取3次。另外,笔者希望在后续试验中找到更合适的提取溶剂,以提高芦丁的提取转移率。

参考文献

- [1] 苏来曼·哈力克,凯赛尔·阿不拉,波拉提·马卡比力,等.天山雪莲花药材质量标准研究[J].新疆中医药,2011,29(5):37.
- [2] Chik WI, Zhu L, Fan LL, *et al.* Saussurea involucreta: a review of the botany, phytochemistry and ethnopharmacology of a rare traditional herbal medicine[J]. *J Ethnopharmacology*, 2015, 168(20):44.
- [3] 王晓玲,李启发,丁立生.天山雪莲的化学成分研究[J].中草药,2007,38(12):1 795.
- [4] 欧元,袁晓凡,徐春明,等.天山雪莲HPLC指纹图谱研究[J].中草药,2008,39(1):105.
- [5] 苏来曼·哈力克,凯赛尔·阿不拉,敏德. RP-HPLC测定不同产地不同采集期天山雪莲中绿原酸和芦丁[J].中草药,2007,38(9):1 412.
- [6] 董建辉,华卡.高效液相色谱法同时测定天山雪莲中绿原酸和芦丁的含量[J].中南药学,2008,5(4):333.
- [7] 贾丽华,凯赛尔·阿不拉. RP-HPLC法测定天山雪莲口服液中绿原酸及芦丁[J].中成药,2011,33(6):1 080.
- [8] 翟科峰,邢建国,何承辉.正交试验法优选天山雪莲提取工艺的研究[J].中成药,2008,30(10):1 455.
- [9] 刘桂花,何承辉,帕依曼·亥米提,等.多指标综合评分法优选复方双金感冒颗粒的提取工艺[J].中国药房,2016,27(4):510.

(收稿日期:2016-04-20 修回日期:2016-06-22)

(编辑:刘 萍)

《中国药房》杂志——《国际药理学文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅