

多指标评分法优选野马追抗动脉粥样硬化有效部位的乙醇提取工艺^Δ

李卿^{1*}, 贺宗毅^{1,2,3}, 杜洪飞¹, 周兴¹, 梁旭明^{1#} (1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2. 重庆市中药资源学重点实验室, 重庆 400065; 3. 中国中医科学院中药资源中心重庆分中心, 重庆 400065)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)06-0753-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.06.08

摘要 目的: 优化野马追抗动脉粥样硬化有效部位的乙醇提取工艺。方法: 以金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素含量为指标, 考察乙醇体积分数、液料比、提取时间、提取次数对野马追药材乙醇提取工艺的影响; 采用多指标评分法, 设计正交试验法优选提取工艺, 并进行验证试验。结果: 优化的提取工艺为采用70%乙醇为提取溶剂, 按液料比12:1加入, 回流提取3次, 每次2h; 3批次验证试验结果显示, 所得4种指标成分的含量均较高, 平均值分别为5.305 3、1.560 1、1.986 5、6.703 6 mg/g (RSD < 1.1%, n = 3), 结果稳定可靠, 且与正交试验结果一致。结论: 优化的野马追乙醇回流提取工艺稳定可靠, 可操作性好, 能源消耗与成本更适合工业化生产, 为下一步纯化、富集野马追抗动脉粥样硬化有效成分提供了工艺基础。

关键词 野马追; 抗动脉粥样硬化; 提取工艺; 正交试验; 多指标评分法

Optimization of Eethanol Extraction Technology of Anti-atherosclerosis Effective Fraction in *Lindley eupatorium* by Multiple Index Scoring Method

LI Qing¹, HE Zongyi^{1, 2, 3}, DU Hongfei¹, ZHOU Xing¹, LIANG Xuming¹ (1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 2. Chongqing Key Lab of Chinese Medicine Resources, Chongqing 400065, China; 3. Chongqing Sub-center of the National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Chongqing 400065, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the ethanol extraction process of anti-atherosclerosis effective fraction of *Lindley eupatorium*. METHODS: Using the contents of hyperin, quercetin, kaempferol and jaceosidin as indexes, the effects of ethanol volume fraction, liquid-solid ratio, extraction time and extraction times on ethanol extraction technology were investigated. By multiple index scoring method, orthogonal test was designed to optimize extraction technology, and validation test was conducted. RESULTS: The optimal extraction technology was 70% ethanol as extraction solvent with solid-liquid ratio of 12:1, reflux extracting for 3 times, 2 h each time. Results of 3 batches of validation tests showed that the contents of 4 marker components were in high level, being 5.305 3, 1.560 1, 1.986 5, 6.703 6 mg/g in average (RSD < 1.1%, n = 3). Results of validation tests were stable and reliable, and were in good agreement with the results of orthogonal tests. CONCLUSIONS: The optimized ethanol

综上所述, 本研究所建标准可用于复视明胶囊的质量控制。

参考文献

- [1] 王蕾, 王英平, 许世泉, 等. 西洋参化学成分及药理活性研究进展[J]. 特产研究, 2007, 3(3): 73-77.
- [2] 王作书, 李晓华, 明月. 人参皂苷 Rb₁ 对人视网膜色素上皮细胞 DNA 合成的抑制作用[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(9): 1553-1555.
- [3] 刘德丽, 包华音, 刘杨. 近 5 年黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品与药品, 2014, 16(1): 68-70.

Δ 基金项目: 重庆市重点产业共性关键技术创新专项 (No. cstc2016zdcy-ztxx10004); 重庆市基本科研业务费计划项目 (No. 2016cstc-jbky-01904)

* 副主任药师。研究方向: 中药新药开发及质量标准研究。电话: 023-89029065。E-mail: qingl666@sina.com

通信作者: 副研究员, 硕士。研究方向: 中药新产品开发。电话: 023-89029065。E-mail: liangxuming2014@yahoo.com.cn

- [4] 蔡琳. 葛根的化学成分、药理及临床作用的研究进展[J]. 山东化工, 2014, 43(8): 40-41.
- [5] 倪同上, 刘相和, 迟焕芳. 枸杞子提取液对 RCS 大鼠视网膜色素变性的保护作用[J]. 青岛大学医学院学报, 2008, 44(5): 416-418.
- [6] 尹辉. 当归化学成分及药理活性研究进展[J]. 重庆科技学院学报(自然科学版), 2015, 17(1): 100-101, 112.
- [7] 孔祥锋, 臧恒昌. 决明子化学成分及药理活性研究进展[J]. 药学研究, 2013, 32(11): 660-662.
- [8] 袁红霞, 张莉芹, 马瑾, 等. 水蛭药用成分及主要药理功效研究进展[J]. 甘肃医药, 2013, 32(4): 270-273.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 57.
- [10] 江旭锋. 枸杞子化学成分及其药理学研究概况[J]. 江西中医学院学报, 2013, 25(3): 98-100.

(收稿日期: 2017-05-23 修回日期: 2017-06-29)

(编辑: 张静)

reflux extraction technology of *L. eupatorium* is stable and reliable, and performs well. Energy consumption and cost are suitable for industrial production. The results provide technology basis for further purification and enrichment of anti-atherosclerosis effective components of *L. eupatorium*.

KEYWORDS *Lindley eupatorium*; Anti-atherosclerosis; Extraction technology; Orthogonal test; Multiple index scoring method

野马追为菊科泽兰属植物轮叶泽兰(*Eupatorium lindleyanum* DC.)的干燥地上部分,味苦,性平,有化痰止咳平喘的功能,常用于治疗痰多咳嗽气喘^[1]。野马追药材含有多种生物活性成分,包括黄酮、生物碱、挥发油和香豆素等^[2]。作为江苏省特产中药材,野马追曾被收入1977年版《中国药典》(一部)、江苏省地方药材标准(1988年版),现收载于2015年版《中国药典》(一部)。随着对野马追药材的不断深入研究,相关报道指出其还具有降血脂、抗动脉粥样硬化的功能^[3-5]。本课题组前期对野马追药材不同溶剂提取物的研究发现,野马追抗动脉粥样硬化的有效部位为乙醇回流提取、大孔树脂富集纯化的乙醇洗脱部分,该组分抗动脉粥样硬化效果与辛伐他汀相当,某些效果指标甚至优于辛伐他汀,试验结果将另文发表。有研究以棕矢车菊素、槲皮素、山柰素为测定指标,对野马追的乙醇提取法进行工艺优化^[6]。本试验在前期工作中,发现野马追药材中含有金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素,其中金丝桃苷相对含量较高,且具有抗炎、止咳、降压、降低胆固醇、保护脑血管等多种生理活性,是一种重要的天然活性成分^[7]。基于此,本研究以金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素等黄酮类成分为检测指标,采用正交试验法对野马追乙醇回流提取工艺进行考察,优化提取工艺参数,为进一步纯化、富集野马追抗动脉粥样硬化有效成分,进而为提高后续开发的相关制剂产品质量及临床效果提供技术支持。

1 材料

1.1 仪器

Shimadzu-2010A 高效液相色谱仪,包括四元梯度泵、可变波长紫外检测器、自动进样器(日本岛津公司);KQ-700DB 型数控超声清洗器(苏州江东精密仪器有限公司);AE240 电子分析天平[瑞士梅特勒-托利多仪器(中国)有限公司]。

1.2 试剂

金丝桃苷对照品(批号:1521-200303,供含量测定用)、槲皮素对照品(批号:100081-200406,供含量测定用)、山柰素对照品(批号:0861-200304,供含量测定用)、棕矢车菊素对照品(批号:110817-200305,供含量测定用)均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

1.3 药材

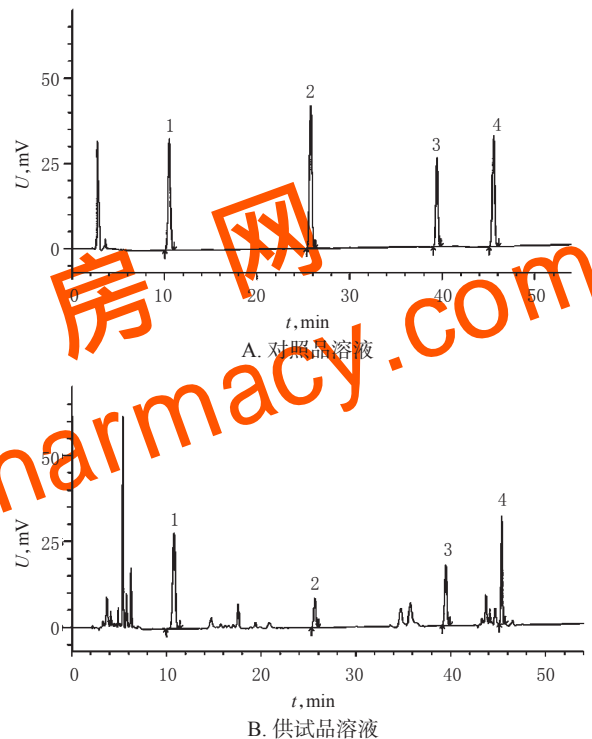
野马追药材(批号:140601)购自重庆慧远药业有限公司,经重庆市中药研究院肖铭玉副研究员鉴定为菊科泽兰属植物轮叶泽兰(*Eupatorium lindleyanum* DC.)的

干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamondsil-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.4%磷酸(B),梯度洗脱(0~25 min, 20% A→25% A; 25~35 min, 25% A→32% A; 35~50 min, 32% A→40% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:370 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。理论板数以槲皮素峰计应不低于3 000。色谱图见图1。



注:1. 金丝桃苷;2. 槲皮素;3. 山柰素;4. 棕矢车菊素

Note: 1. hyperin; 2. quercetin; 3. kaempferide; 4. jaceosidin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2 对照品溶液的制备

精密称取金丝桃苷对照品10.58 mg、槲皮素对照品9.42 mg、山柰素对照品9.37 mg、棕矢车菊素对照品10.25 mg,分别置于100 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,作为对照品贮备溶液。分别精密吸取上述对照品贮备液各5.0 mL,置于25 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

称取野马追药材粗粉(批号:140601,以下同),按“2.5”项下正交试验中的条件进行提取,滤过,合并滤液,浓缩至适量,用95%乙醇定容至100 mL,摇匀;精密量

取5.0 mL,置于25 mL量瓶中,加入80%甲醇适量,超声(功率:200 W,频率:50 kHz)处理15 min,放冷,用80%甲醇定容至刻度,摇匀,用0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素对照品溶液2、4、8、16、20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以各对照品进样量(x , μg)为横坐标、峰面积为纵坐标(y)进行回归分析,得金丝桃苷回归方程为 $y=11\ 076.7x-593.52(r=0.999\ 9)$;槲皮素回归方程为 $y=10\ 068.5x-458.36(r=0.999\ 9)$;山柰素回归方程为 $y=9\ 928.31x-476.06(r=0.999\ 9)$;棕矢车菊素回归方程为 $y=11\ 243.8x-417.22(r=0.999\ 9)$ 。结果表明,金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素进样量分别在0.042 32~0.423 2 μg、0.037 68~0.376 8 μg、0.037 48~0.374 8 μg、0.041 00~0.410 0 μg范围内与峰面积均呈良好的线性关系。

2.4.2 精密度试验 精密吸取金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素对照品溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果,金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素峰面积的RSD分别为0.72%、0.78%、0.80%、0.73% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于室温下放置0、1、4、8、16、20 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素峰面积的RSD分别为0.68%、0.75%、0.88%、0.79% ($n=6$),表明供试品溶液室温放置20 h内较稳定。

2.4.4 重复性试验 取同批野马追药材粗粉适量,共6份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素含量的RSD分别为0.83%、0.68%、0.85%、0.87% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 称取同批野马追药材粗粉适量,共9份,精密称定,分别精密加入低、中、高3种质量浓度的金丝桃苷(0.012 8、0.016 0、0.019 2 mg/mL)、槲皮素(0.005 6、0.007 0、0.008 4 mg/mL)、山柰素(0.006 4、0.008 0、0.009 6 mg/mL)、棕矢车菊素(0.014 4、0.018 0、0.021 6 mg/mL)对照品溶液,按“2.3”项下方法制成供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件下进样测定,计算加样回收率。结果,金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素平均加样回收率分别为98.59%、99.16%、98.38%、98.85%,RSD分别为1.20%、1.06%、1.27%、1.19% ($n=6$),表明本方法准确度良好。

2.5 正交试验优化提取工艺

2.5.1 试验设计 前期单因素试验结果表明,影响金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素提取效果较显著的因素为乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数,故本

试验选取乙醇体积分数(A)、液料比(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为考察因素,采用正交试验法对野马追提取工艺进行优选。每个因素选取3个水平,以金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 表安排试验。正交试验因素水平见表1。

表1 正交试验因素水平

Tab 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A, %	B, mL/g	C, h	D, 次
I	60	8 : 1	1.0	1
II	70	12 : 1	1.5	2
III	80	15 : 1	2.0	3

2.5.2 试验方案与结果 采用4种指标成分为考察指标,运用综合加权评分法进行数据处理。对试验结果进行综合加权评分计算:设定满分为100分,金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素含量的权重系数均为25,以各个指标成分含量的最大值为参照,计算综合评分(综合评分=25 $X_{\text{金丝桃苷}/X_{\text{金丝桃苷max}}}+25X_{\text{槲皮素}/X_{\text{槲皮素max}}}+25X_{\text{山柰素}/X_{\text{山柰素max}}}+25X_{\text{棕矢车菊素}/X_{\text{棕矢车菊素max}}$)。正交试验各指标成分含量测定结果见表2(表中max为最大值);正交试验安排与综合评分结果见表3;综合评分方差分析结果见表4。

表2 正交试验指标各成分含量测定结果(mg/g)

Tab 2 Results of content determination of marker components by orthogonal test(mg/g)

试验号	金丝桃苷	槲皮素	山柰素	棕矢车菊素
1	3.102 2	0.692 3	1.317 4	4.118 2
2	4.520 1	1.176 1	1.488 4	5.500 4
3	4.758 5	1.380 9	1.886 6	6.642 6
4	5.395 4(max)	1.506 3	1.935 7	6.892 7(max)
5	4.375 4	1.217 9	1.710 1	5.528 6
6	4.547 0	1.326 4	1.666 7	6.430 6
7	4.845 9	1.386 3	1.848 4	5.921 0
8	5.187 5	1.588 1(max)	2.074 0(max)	6.222 7
9	4.291 6	1.265 3	1.540 9	5.878 6

表3 正交试验安排与综合评分结果

Tab 3 Orthogonal test design and comprehensive scoring results

试验号	因素				综合评分
	A, %	B, mL/g	C, h	D, 次	
1	60	8	1	1	56.11
2	60	12	1.5	2	77.35
3	60	15	2	3	90.62
4	70	8	1.5	3	97.04
5	70	12	2	1	80.11
6	70	15	1	2	85.36
7	80	8	2	2	88.03
8	80	12	1	3	96.61
9	80	15	1.5	1	79.70
$K_1/3$	74.69	80.39	79.36	71.97	
$K_2/3$	87.50	84.69	84.70	83.58	
$K_3/3$	88.11	85.23	86.25	94.76	
R	13.42	4.83	6.89	22.78	

由表3、表4中的极差值直观分析和方差分析可得:野马追提取工艺的各因素影响大小依次为D(提取次

表4 综合评分方差分析结果

Tab 4 Results of comprehensive scoring variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均差	F	P
A	344.56	2	172.28	172.280	<0.01
B	42.11	2	21.06	21.060	<0.01
C	78.42	2	39.21	39.210	<0.01
D	778.71	2	389.36	389.360	<0.01
误差	0.009	9	0.001		

注: $F_{0.01}(2,9)=8.02$ Note: $F_{0.01}(2,9)=8.02$

数) $>A$ (乙醇体积分数) $>C$ (提取时间) $>B$ (液料比),各因素皆为提取过程中的极显著性影响因素($P<0.01$);最优提取工艺为 $D_3A_3C_3B_3$,即按料液比15:1加入80%乙醇回流提取3次,每次2 h。由于采用70%乙醇与80%乙醇、液料比12:1与15:1提取效果差异极小(因素A、B的水平II、III对应的 $K_{II}/3$ 、 $K_{III}/3$ 分别为87.50、88.11和84.69、85.23,差值仅为0.61、0.54),考虑到工业化生产过程中的能源消耗和生产成本,拟确定野马追的提取工艺为:按料液比12:1加入70%乙醇,回流提取3次,每次2 h。

2.5.3 验证试验 称取野马追药材粗粉250 g,共3份,按料液比加入70%乙醇,回流提取3次,每次2 h,按“2.1”项下色谱条件测定各指标成分含量,结果见表5。结果表明,按上述优化工艺提取后,野马追各指标成分的含量均较高;正交试验优化所得工艺符合生产实际,结果稳定可靠($RSD<1.1\%$)。

表5 验证试验的含量测定结果(mg/g)

Tab 5 Results of content determination of validation tests(mg/g)

样品号	金丝桃苷	槲皮素	山柰素	棕矢车菊素
1	5.312 4	1.560 1	1.986 8	6.716 5
2	5.293 4	1.558 5	1.964 7	6.693 0
3	5.310 1	1.561 4	2.008 0	6.701 2
平均值	5.305 3	1.560 1	1.986 5	6.703 6
RSD, %	0.20	0.09	1.09	0.18

3 讨论

野马追的提取工艺已有文献报道采用水煎煮法和乙醇提取法^[8-11]。本课题组在前期筛选试验过程中发现,水煎煮提取液中金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素的含量远低于乙醇回流提取液中相关指标成分含量。亦有文献报道采用乙醇回流提取法,按料液比12:1加入90%乙醇进行回流提取^[6],但在工业化大生产过程中,乙醇体积分数作为生产成本是受到严格管控的,乙醇体积分数过高,既不利于安全生产,且挥发损失大、回收消耗大,也不利于再次利用。因此,笔者进行正交试验设计,优化提取工艺,提取野马追药材后测定4种指标成分的含量结果显示,上述指标的转移率[转移率(%)=提取后指标成分含量/药材中指标成分含量×

100%]均达到85%以上。由此表明,本研究既充分考虑工业化生产过程中的实际问题,又使得野马追中的有效指标成分能被充分提取。

正交试验结果显示,金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素这4个指标成分在提取溶剂乙醇不同体积分数条件下,表现出不同的提取效果;4个指标成分并不是随乙醇体积分数的变化呈现同时增加或降低的趋势,这可能与4个指标成分在不同体积分数乙醇中的溶解性差异有关。

综上所述,本试验以金丝桃苷、槲皮素、山柰素、棕矢车菊素4种成分为考察指标,优选野马追药材的乙醇提取工艺,评价方法更合理,所优选的提取工艺可操作性更好,为下一步纯化、富集野马追抗动脉粥样硬化有效成分提供了工艺基础。本研究不足之处在于仅以4种黄酮类成分作为野马追抗动脉粥样硬化有效部位提取工艺的检测指标,可能未全面反映野马追有效部位的物质作用基础。故笔者下一步拟对野马追药材中含量也较高的生物碱、萜内酯类等成分开展分离纯化等工作,并进行相关的药理学、毒理学比较研究,以期对野马追药材的全面利用开发奠定基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 313.
- [2] 于绍帅, 陈明苍, 李志雄. 中药野马追的研究进展[J]. 中国医药导报, 2012, 9(3): 19-20.
- [3] 王柯静, 秦剑, 陈万一, 等. 野马追改善高脂血症大鼠血液流变性及抗氧化作用研究[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(2): 80-82.
- [4] 王柯静, 程渝, 周远大. 野马追提取液对动脉粥样硬化家兔炎症反应的防治作用[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(18): 1853-1856.
- [5] 陈万一, 秦剑, 何海霞, 等. 野马追总黄酮对实验性高脂血症大鼠脂代谢的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(16): 1589-1591.
- [6] 张威峰, 杨念云. 正交试验法优选野马追提取工艺研究[J]. 安徽医药, 2005, 9(5): 333-334.
- [7] 李敏芳, 李慧, 王学美. 金丝桃苷药理作用研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(4): 102-104.
- [8] 王卫东, 王乃馨, 李姣姣, 等. 野马追类黄酮的超声提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 50-54.
- [9] 刘全德, 李超. 纤维素酶辅助提取野马追总黄酮的工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2011(5): 78-81.
- [10] 李音, 吕秀阳. 野马追总生物碱提取工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(B8): 130-133.
- [11] 仲欢欢, 方诗琦, 陈亚军, 等. 野马追化学成分及其抗炎活性[J]. 中成药, 2017, 39(2): 329-333.

(收稿日期:2017-10-14 修回日期:2018-01-26)

(编辑:段思怡)