

旋覆花中两种倍半萜内酯提取方法研究

郭伟琳¹, 余文怡², 施建莲², 母多², 徐兴梦², 郭亚东², 邓亮^{2*}

(1. 云南省玉溪市人民医院 科教科, 云南 玉溪 653100;

2. 昆明医科大学药学院 暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘要:采用超声、回流和微波3种方法,探讨提取旋覆花中两种倍半萜内酯的最佳提取方法和条件,并通过单因素实验和正交设计方法研究超声提取的影响因素,确定最佳提取条件为:乙醇溶液体积分数70%,提取时间45 min,料液比(g/mL)1:15.验证实验结果表明,正交实验所得最佳条件切实可取.

关键词:旋覆花;倍半萜内酯;提取方法;超声提取

中图分类号:R96 **文献标识码:**A **文章编号:**1674-5639(2016)06-0072-04

DOI:10.14091/j.cnki.kmxyxb.2016.06.016

Study on Extract Methods of Two Sesquiterpene Lactones in *Inula Japonica* Thunb

GUO Weilin¹, YU Wenyi², SHI Jianlian², MU Duo², XU Xingmeng², GUO Yadong², DENG Liang^{2*}

(1. Science and Education Department, People's Hospital of Yuxi City, Yuxi, Yunnan, China 653100;

2. College of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China 650500)

Abstract: Three methods of ultrasonic, reflux and microwave were used to study the best extracting method and condition. The influence of ultrasonic was investigated through single factor test and orthogonal design test to get the best extract conditions: optimized parameters of ethanol/water (70:30, v/v), 45 min extract time and 1:15 of solute to solvent ratio. The result showed that the best condition established by orthogonal design test was proved to be practical.

Key words: *Inula japonica* Thunb.; sesquiterpenes; extract method; ultrasonic extraction

旋覆花 (*Inula japonica* Thunb.) 系菊科多年生草本, 主要分布于我国北部、中部、东部等地, 其具有平喘、镇咳, 健胃祛痰、行水、止吐之效, 并治刀伤, 疗毒。^[1-2] 旋覆花中含有旋覆花素、倍半萜内酯、槲皮素、异槲皮素、菊糖、绿原酸、咖啡酸及蒲公英甾醇等物质, 其中倍半萜内酯为本属植物的特征性成分^[3-5]. 倍半萜内酯类化合物具有多种生物活性, 是当今学者研究的热点问题之一. 据报道^[6-8], 旋覆花的抗氧化活性与其含有的倍半萜内酯有关.

目前, 已有文献报道旋覆花中黄酮类成分^[9]、旋覆花多糖^[10]的提取工艺研究, 但尚未见

到有关旋覆花中倍半萜内酯提取工艺的研究报道. 本文以旋覆花次内酯及 ivangustin 的含量为指标, 探讨旋覆花中倍半萜内酯的最佳提取方法和条件.

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

超高效液相色谱仪(带二极管阵列检测器, 美国 Waters 公司); 微波提取器(上海新仪微波化学科技有限公司); 超声波提取器(上海科导超声仪器有限公司).

乙腈和甲醇为色谱纯(TEDIA 公司); 乙醇为分

收稿日期: 2016-06-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31400303); 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2015C016Y).

作者简介: 郭伟琳(1980—), 女, 云南墨江人, 主管药师, 主要从事药物分析研究.

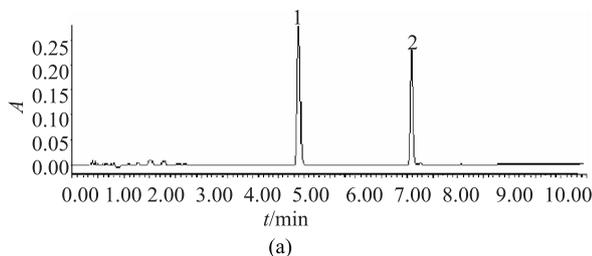
* 通讯作者: 邓亮(1979—), 女, 湖北恩施人, 讲师, 主要从事药物分析研究, E-mail: dengliangkmmc@163.com.

析纯(天津市风船化学试剂科技有限公司);水为超纯水。

旋覆花样品取自云南省红河州,经粉碎机粉碎,过筛,备用;旋覆花次内酯及 ivangustin 对照品为自制,经 HPLC 峰面积归一化法测定质量分数均大于 99.0%。

1.2 色谱条件

色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C18



1: 旋覆花次内酯; 2: Ivangustin.

(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 以乙腈—水为流动相, 流速为 0.4 mL/min, 检测波长为 205 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 5 μL。

1.3 对照品溶液的配制

准确称取旋覆花次内酯和 ivangustin 适量, 用乙醇溶解并定量稀释得每 1 mL 含旋覆花次内酯 67 μg 及 ivangustin 55 μg 的对照品混合溶液。在选定的色谱条件下, 混合对照品及样品色谱图见图 1。

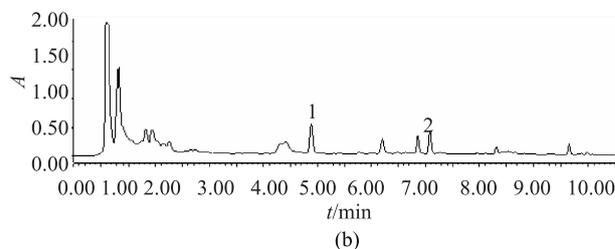


图1 混合对照品 (a) 及样品 (b) 色谱图

2 结果与讨论

2.1 3种提取方法的比较

超声提取:取药材粉末 1 g, 精密称定, 置 100 mL 磨口锥形瓶中, 加入体积分数为 60% 的乙醇 25 mL, 盖上磨口塞, 称定其质量, 置于超声波清洗器中超声 45 min, 放冷, 用体积分数为 60% 的乙醇补足其质量。

回流提取:取药材粉末 1 g, 精密称定, 加入体积分数为 60% 的乙醇 100 mL, 称定其质量, 70 °C 下回流 2 h, 放冷, 用体积分数为 60% 的乙醇补足其质量, 摇匀后经 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

微波提取:取药材粉末 1 g, 精密称定, 加入体积分数为 60% 的乙醇 25 mL, 称定其质量, 70 °C 下微波提取 45 min, 放冷, 用体积分数为 60% 的乙醇补足其质量。

上述提取液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 测定倍半萜的含量(质量分数, 下同), 结果见表 1。结果表明: 3 种方法提取的质量分数相近, 但回流时间较长, 而微波提取器不如超声提取器简单方便, 因此选定超声法提取。

表 1 不同提取方法所得倍半萜的质量分数

| 提取方法 | 提取组分及质量分数/(mg · g ⁻¹) | |
|------|-----------------------------------|------------|
| | 旋覆花次内酯 | ivangustin |
| 超声法 | 1.580 | 1.417 |
| 回流法 | 1.622 | 1.433 |
| 微波法 | 1.617 | 1.440 |

2.2 超声提取的单因素实验

2.2.1 溶剂对有效成分提取的影响

采用 1:25(g/mL) 料液比, 提取 45 min, 改变溶剂体积分数, 观察不同溶剂对旋覆花内酯及 ivangustin 提取的影响, 结果见图 2。实验结果表明, 用体积分数为 60% 的乙醇作提溶剂时, 两种倍半萜的提取量均最大。

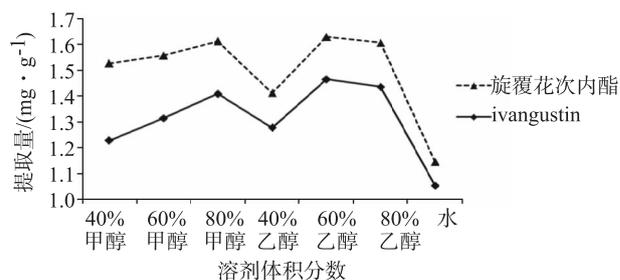


图2 溶剂对有效成分提取的影响

2.2.2 时间对有效成分提取的影响

采用 1:25(g/mL) 料液比, 体积分数为 60% 的乙醇溶液, 改变提取时间, 观察提取时间对旋覆花次内酯及 ivangustin 提取的影响, 结果见图 3。实验结果表明, 超声 30 min 两种倍半萜的提取量达到最高值。

2.2.3 料液比对有效成分提取的影响

采用体积分数为 60% 的乙醇溶液, 提取 45 min, 改变料液比, 观察料液比对旋覆花次内酯及 ivangustin 提取的影响, 结果见图 4。由图可见, 两种倍半萜的提取量先增加后减少, 而在料液比(g/mL) 为 1:20 时提取量均最大。

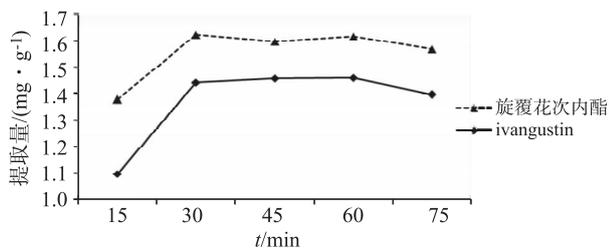


图3 时间对有效成分提取的影响

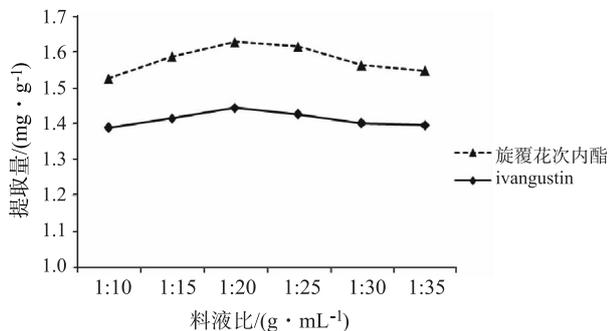


图4 料液比对有效成分提取的影响

2.3 正交实验

由单因素实验可见料液比、乙醇体积分数、超声时间均对提取率有一定的影响,为了全面考察这3个因素的交叉影响,设计了正交实验,以旋覆花次内酯和 ivangustin 提取量为考察指标,选用 $L_9(4^3)$ 正交表(表2)设计正交实验对提取工艺进行优选,并确定最佳参数,试验结果见表3和表4.

表2 正交实验表

| 因素 | A/% | B/min | C/(g·mL ⁻¹) |
|----|-----|-------|-------------------------|
| 1 | 50 | 30 | 1:15 |
| 2 | 60 | 45 | 1:25 |
| 3 | 70 | 60 | 1:35 |

注:A为乙醇体积分数;B为提取时间;C为料液比.下表同.

表3 超声提取正交实验设计及极差分析结果

| 序号 | A/% | B/min | C/(g·mL ⁻¹) | 旋覆花次内酯/ (mg·g ⁻¹) | ivangustin/ (mg·g ⁻¹) |
|----|-------|-------|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1.551 | 1.443 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 1.572 | 1.441 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 1.541 | 1.418 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 1.576 | 1.388 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1.539 | 1.406 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 1.602 | 1.410 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 1.537 | 1.395 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 1.629 | 1.419 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1.590 | 1.415 |
| K1 | 8.966 | 8.890 | 9.054 | | |
| K2 | 8.921 | 9.006 | 8.982 | | |
| K3 | 8.985 | 8.976 | 8.836 | | |
| R | 0.064 | 0.116 | 0.218 | | |

由表3可看出,3个因素中对极差贡献最大的是料液比,其次是提取时间,而乙醇溶液体积分数对提取量影响最小,因此,最佳提取条件为 $A_3B_2C_1$,即乙醇溶液体积分数为70%,提取45 min,料液比为1:15(g/mL).

从表4可以看出,料液比和提取时间对旋覆花中有效成分的提取量差异有统计学意义($P < 0.05$),而乙醇溶液体积分数对旋覆花中有效成分的提取量差异无统计学意义.

表4 方差分析

| 来源 | 离差平方和 | 自由度 | 方差 | F值 | P值 |
|--------|-------|-----|-------|--------|-------|
| 乙醇体积分数 | 0.001 | 2 | 0.000 | 5.925 | 0.144 |
| 提取时间 | 0.002 | 2 | 0.001 | 19.883 | 0.048 |
| 料液比 | 0.008 | 2 | 0.004 | 67.664 | 0.015 |
| 误差 | 0.000 | 2 | 0.000 | | |

2.4 验证性实验

在正交实验的基础上,选定乙醇溶液体积分数

为70%,提取45 min,料液比为1:15(g/mL)做验证实验,结果见表5.

表5 验证实验测定结果

| 实验号 | 旋覆花次内酯/(mg·g ⁻¹) | ivangustin/(mg·g ⁻¹) |
|-----|------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 1.608 | 1.438 |
| 2 | 1.612 | 1.425 |
| 3 | 1.598 | 1.419 |
| 4 | 1.615 | 1.433 |
| 5 | 1.590 | 1.408 |

由表5可知,旋覆花次内酯及 ivangustin 超声提取的最佳条件为 A₃B₂C₁,经实验验证,旋覆花次内酯的 RSD 为 0.647%, ivangustin 的 RSD 为 0.829%,重复性良好.

3 结论

1)采用超声、回流和微波3种方法提取旋覆花中旋覆花次内酯及 ivangustin 所得质量分数相近.考虑到超声提取较回流提取和回流提取更节省时间和人力,因此选定超声为正交实验提取方法.在单因素的基础上进行提取因素的正交实验,极差分析结果显示,对极差贡献最大的是料液比,其次是提取时间,而乙醇溶液体积分数的影响较小.方差分析结果表明,料液比和提取时间对旋覆花中有效成分的提取量差异有统计学意义($P < 0.05$),而乙醇溶液体积分数对旋覆花中有效成分的提取量差异无统计学意义.

2)通过正交实验可确定旋覆花中覆花次内酯及 ivangustin 的最佳工艺参数为:乙醇溶液体积分

数70%,提取45 min,料液比(g/mL)1:15.验证实验结果表明,正交实验所得最佳条件切实可取.

[参考文献]

- [1]中国科学院植物研究所.中国高等植物图鉴:第4册[M].北京:科学出版社,1975:478.
- [2]国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:325.
- [3]钱名坤,陈泽乃,秦国伟,等.线叶旋覆花化学成分研究[J].化学学报,1983,41(3):254-255.
- [4]YU N J,ZHAO Y M,ZHANG Y Z,et al. Japonicins A and B from the flowers of *Inula japonica* [J]. J Asian Nat Prod Res,2006,8(5):385-390.
- [5]郭伟琳,冷红琼,郭亚东,等. UPLC 法同时测定旋覆花属植物中2种倍半萜内酯成分的含量[J]. 昆明医科大学学报,2012,339(12):4-6.
- [6]王萍,吴冬青,李彩霞.旋覆花乙醇提取物的抗氧化性与抑菌作用研究[J]. 中国医学理论与实践,2005,15(1):142-143.
- [7]于峰,王思明,董玫,等.三种倍半萜类化合物体外抗肿瘤细胞增殖活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(3):506-509.
- [8]李睿,刘彬,郑斌,等.旋覆花内酯抑制炎症因子介导的内皮细胞与单核细胞的黏附[J]. 细胞生物学杂志,2008,30(6):755-760.
- [9]耿红梅,张婧群,王云志,等.欧亚旋覆花总黄酮提取与富集工艺研究[J]. 天然产物研究与开发,2006,18(4):643-646.
- [10]陈永亮,蔡建琦,李丽,等.微波法提取旋覆花多糖工艺研究[J]. 甘肃科技,2006,22(5):113-115.

