

# 藏药甘肃马先蒿有效成分提取工艺研究<sup>△</sup>

曹馨元<sup>1,2\*</sup>,李茂星<sup>1,2#</sup>,毛婷<sup>1,2</sup>,陶锐<sup>3</sup>,王先敏<sup>1</sup>,刘延彤<sup>1</sup>,马强<sup>4</sup>(1.兰州军区兰州总医院药剂科/全军高原环境损伤防治重点实验室,兰州 730050;2.兰州大学药学院,兰州 730000;3.银川市妇幼保健院药剂科,银川 750001;4.兰州军区兰州总医院消化科,兰州 730050)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1357-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.16

**摘要** 目的:优化藏药甘肃马先蒿提取工艺并比较不同产地甘肃马先蒿中2种成分毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的含量差异。方法:以毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷及干膏得率为综合评价指标,通过单因素试验及正交试验对提取溶剂、溶剂量、提取时间及提取次数进行考察以优化提取工艺,并进行验证试验。比较甘肃、青海及四川3个产地的甘肃马先蒿中2种成分毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的含量。结果:最优提取工艺为加8倍量的50%乙醇提取3次,每次90 min。验证试验中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷含量及干膏得率平均值分别为3.49%、1.26%、37.99%(RSD分别为1.28%、1.32%、1.97%,n=3)。以青海产甘肃马先蒿中毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷含量相对较高。结论:优化的提取工艺合理、稳定、可行,不同产地的甘肃马先蒿中指标成分的含量存在一定的差异。本试验可为甘肃马先蒿提取物的开发利用、药材品质评价的深入研究提供依据。

**关键词** 甘肃马先蒿;毛蕊花糖苷;异毛蕊花糖苷;正交试验;提取工艺;含量比较

## Study on the Extraction Technology for Active Constituents of Tibetan Medicine *Pedicularis kansuensis*

CAO Xinyuan<sup>1,2</sup>, LI Maoxing<sup>1,2</sup>, MAO Ting<sup>1,2</sup>, TAO Rui<sup>3</sup>, WANG Xianmin<sup>1</sup>, LIU Yantong<sup>1</sup>, MA Qiang<sup>4</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA & Key Laboratory of the Prevention and Cure for the Plateau Environment Damage, PLA, Lanzhou 730050, China; 2.College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 3.Dept. of Pharmacy, Yinchuan Maternity and Child-care Hospital, Yinchuan 750001, China; 4. Dept. of Gastroenterology, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Tibetan medicine *Pedicularis kansuensis* and compare content of verbascoside and isoverbascoside differences in *P. kansuensis* from various habitats. METHODS: Using verbascoside and isoverbascoside and dry paste yield as comprehensive evaluation indexes, single factor test and orthogonal test were used to investigate the extraction solvent, solvent dosage, extraction time and times to optimize extraction technology, and the verification test was conducted. Contents of the 2 constituents verbascoside and isoverbascoside in *P. kansuensis* from Gansu, Qinghai and Sichuan were

of oxidative stress and antioxidant therapies in inflammatory bowel disease: clinical aspects and animal models[J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2016, 22(1):3-17.

[7] Randhawa PK, Singh K, Singh N, et al. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014, 18(4): 279-288.

[8] Goyal N, Rana A, Ahlawat A, et al. Animal models of inflammatory bowel disease: a review[J]. *Inflammopharma-*

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81374019);甘肃省中医药管理局科研课题(No.GZK-2015-59);全军医药卫生科研基金课题(No.CLZ15JA05)

\* 硕士研究生。研究方向:天然药物化学、中药新药研究与开发。电话:0931-8994676。E-mail:caoxy2014@aliyun.com

# 通信作者:副教授,博士。研究方向:中药活性成分研究与开发。电话:0931-8994676。E-mail:limaox2005@aliyun.com

cology, 2014, 22(4):219-233.

[9] 桑力轩,高楠,常冰,等. DSS、TNBS、OXZ诱导结肠炎动物模型的对比[J]. *胃肠病学与肝病学杂志*, 2013, 12(22):1221-1224.

[10] Algieri F, Rodriguez-Nogales A, Garrido-Mesa N, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of the Serpylli herba extract in experimental models of rodent colitis[J]. *J Crohns Colitis*, 2014, 8(8):775-788.

[11] 贺海辉,沈洪,朱宣宣,等. 2,4,6-三硝基苯磺酸/乙醇法诱导建立溃疡性结肠炎大鼠模型[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(15):4138-4140.

[12] 聂朝宏,温克,赵敏,等. 溃结康对三硝基苯磺酸诱导大鼠炎症性肠病的作用研究[J]. *药物评价研究*, 2016, 39(1): 57-60.

(收稿日期:2016-08-18 修回日期:2016-11-10)

(编辑:邹丽娟)

compared. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as 8-fold 50% ethanol, extraction for 3 times, 90 min each time. The verification results showed that the average contents of verbascoside and isoverbacoside were 3.49% (RSD=1.28%, n=3), 1.26% (RSD=1.32%, n=3), and average dry paste yields were 37.99% (RSD=1.97%, n=3). The contents of verbascoside and isoverbacoside in *P. kansuensis* from Qinghai were relatively higher. CONCLUSIONS: Optimized extraction technology is reasonable, stable, feasible; the contents of index constituents in *P. kansuensis* from different habitats have certain differences. The study can provide scientific evidence for the development and utilization of extraction, and the in-depth study of quality evaluation for medicinal material.

**KEYWORDS** *Pedicularis kansuensis*; Verbascoside; Isoverbacoside; Orthogonal test; Extraction technology; Content comparison

藏药甘肃马先蒿是玄参科马先蒿属植物,广泛分布在甘肃省、青海省及四川省海拔1 825~4 000 m的地区<sup>[1]</sup>。对该植物进行的化学成分研究表明,该植物富含苯乙醇苷、环烯醚萜苷、黄酮、生物碱等多种化合物,同时具有滋阴补肾、补中益气、健脾和胃、清热解毒、利尿、保肝等作用<sup>[2-5]</sup>。毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷是苯乙醇苷类的主要成分,因具有抗炎、抗肿瘤、保肝、抗病毒、增强记忆等多种药理作用<sup>[1,6-9]</sup>,受到广大学者的关注。目前关于甘肃马先蒿中苯乙醇苷类成分定量测定的文献报道较少,笔者以毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的含量及干膏得率为综合评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验<sup>[10-12]</sup>,考察其最优提取工艺;同时,对3种不同产地甘肃马先蒿中的毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的含量进行比较,以期为该藏药材的开发利用及品质评价提供参考,为其单体生物活性的进一步研发奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

600-996系列高效液相色谱(HPLC)仪,包括1525四元梯度泵、2998二极管阵列检测器、2707自动进样器、TCM柱温箱(美国Waters公司);BP210S电子天平(德国Sartorius公司)。

### 1.2 药材、药品与试剂

3种不同产地甘肃马先蒿分别于2014年8月采自甘肃省武威市天祝县天堂乡、青海省西宁市、四川省诺尔盖草原,经兰州大学药学院马志刚教授鉴定为玄参科马先蒿属甘肃马先蒿(*Pedicularis kansuensis* Maxim)的干燥根茎;毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷对照品(均由本实验室于2015年8月自制,经质谱、核磁共振确定其结构,HPLC法测定其含量均大于97.5%);75%乙醇(山东利尔康消毒科技股份有限公司,批号:130619);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC法测定毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的含量

参考文献<sup>[13-14]</sup>方法测定。

2.1.1 色谱条件 色谱柱为SinoChrom ODS-BP(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-水(B)(35:65)等度洗脱,流速为1 mL/min;检测波长为330 nm;柱温为25℃;进样量为10 μL。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取10 g天堂乡甘肃马先蒿药材,按照正交试验设计方案提取后合并乙醇提取液,过滤,即得。

2.1.3 混合对照品溶液的制备 精密称取毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷对照品5.00 mg,分别置于10 mL量瓶中,以35%甲醇溶解定容至刻度,并将2种对照品溶液等量混合即得。

2.1.4 专属性试验 取混合对照品与供试品溶液(正交试验3号)各适量,进样测定。结果表明,供试品中的毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷谱峰与相邻成分的色谱峰可达到基线分离,其他成分对测定无干扰。理论板数以毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷计均大于3 000,目标成分与相邻峰间的分离度大于1.5。色谱图见图1。

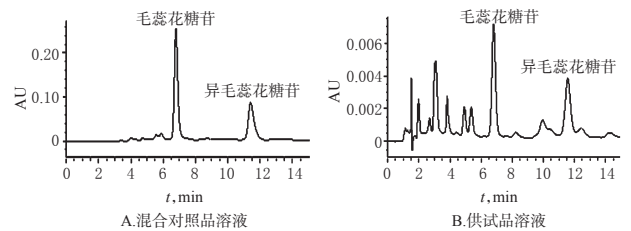


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.5 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液100、300、500、900、1 100、1 300 μL定容至5 mL,进样测定。分别以毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷对照品溶液的质量浓度(μg/mL)为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)绘制标准曲线,得回归方程分别为 $y=1\ 387\ 714.03x-238\ 358.05$  ( $r^2=0.999\ 6$ )、 $y=849\ 105.78x-351\ 765.15$  ( $r^2=0.999\ 7$ )。结果表明二者检测质量浓度线性范围为5~65 μg/mL。

2.1.6 精密度、稳定性、重复性、准确度试验 按相关方法学要求进行试验。精密度试验中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷峰面积的RSD分别为1.75%、0.27% (n=6);24 h稳定性试验中RSD分别为1.80%、1.38% (n=6);重复性试验中RSD分别为1.92%、1.51% (n=6);准确度试验中加样回收率分别为102.32%、99.65% (RSD分别为2.03%、1.94%, n=6)。

2.1.7 样品含量测定 取供试品溶液3份,以“2.1.1”项下色谱条件测定,计算含量即得。

### 2.2 干膏得率的测定

参考文献[15]方法测定。精密量取供试品溶液 10 mL,置于干燥至恒质量的蒸发皿中,水浴蒸干,105 ℃烘干至恒质量,取出,冷却后精密称定,计算干膏得率(干膏质量/药材质量×100%)。

### 2.3 提取工艺单因素考察试验

2.3.1 提取溶剂的考察 分别称取天堂乡甘肃马先蒿 6 份,每份 10 g,分别加入 10 倍量 10%、30%、50%、70%、90%的乙醇及水,加热回流提取 2 次,每次 60 min,滤过,合并 2 次滤液。精密量取 10 mL 滤液,以相应的溶剂定容至 100 mL,进样,测定提取液中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的含量。结果各体积分数乙醇及水提取后毛蕊花糖苷的含量分别为 1.06%、1.87%、2.17%、1.99%、1.89%、1.01%,异毛蕊花糖苷的含量分别为 0.74%、0.88%、0.85%、0.76%、0.74%、0.59%。这提示 50% 乙醇提取液中 2 种成分含量相对较高,故采用 50% 乙醇为提取溶剂进行后续正交试验。

2.3.2 提取溶剂量的考察 除提取溶剂选取 50% 乙醇外,其余操作及条件同“2.3.1”项,考察分别加入 6、8、10、12、15、20 倍量 50% 乙醇后提取液中 2 种成分的含量。结果毛蕊花糖苷的含量分别为 2.37%、3.09%、2.43%、2.10%、1.82%、1.61%,异毛蕊花糖苷的含量分别为 0.74%、0.89%、0.84%、0.81%、0.73%、0.66%。采用 8~12 倍量乙醇进行后续正交试验。

2.3.3 提取时间的考察 除提取溶剂选取 8 倍量 50% 乙醇外,其余操作及条件同“2.3.1”项,考察每次分别提取 30、60、90、120、150、180 min 后提取液中 2 种成分的含量。结果毛蕊花糖苷的含量分别为 2.11%、2.59%、3.17%、2.02%、1.89%、1.77%,异毛蕊花糖苷的含量分别为 0.84%、0.97%、1.18%、0.81%、0.76%、0.60%。采用提取 30~90 min 进行后续正交试验。

2.3.4 提取次数的考察 除提取溶剂选取 8 倍量 50% 乙醇、每次提取 90 min 外,其余操作及条件同“2.3.1”项,分别考察加热回流提取 1、2、3、4、5 次后提取液中 2 种成分的含量。结果毛蕊花糖苷的含量分别为 2.02%、2.14%、2.58%、1.95%、1.70%,异毛蕊花糖苷的含量分别为 0.83%、0.97%、1.21%、0.86%、0.72%。采用提取次数 1~3 次进行后续正交试验。

### 2.4 正交试验优化提取工艺

分别称取天堂乡甘肃马先蒿 6 份,每份 10 g,根据单因素考察结果,以 50% 乙醇为提取溶剂,以溶剂量(A,倍)、提取时间(B,min)、提取次数(C)为考察因素,选用  $L_9(3^4)$  正交试验设计。以干膏得率、毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷的含量 3 项考察指标的综合评分优化工艺,权重系数分别为 0.2、0.4、0.4,综合评分=(毛蕊花糖苷含量/最高毛蕊花糖苷含量)×0.4×100+(异毛蕊花糖苷含量/最高毛蕊花糖苷含量)×0.4×100+(干膏得率/最高干膏得率)×0.2×100。各因素与水平见表 1,正交试验设计

与结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(溶剂量),倍	B(提取时间),min	C(提取次数),次
1	8	30	1
2	10	60	2
3	12	90	3

表 2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D(误差)	毛蕊花糖苷, %	异毛蕊花糖苷, %	干膏得率, %	综合评分
1	1	1	1	1	3.52	0.94	33.14	85.96
2	1	2	2	2	2.05	0.86	46.27	72.15
3	1	3	3	3	1.79	0.89	38.81	66.94
4	2	1	2	3	1.41	0.73	32.67	54.47
5	2	2	3	1	3.26	1.13	31.07	88.40
6	2	3	1	2	2.19	1.05	40.52	77.78
7	3	1	3	2	1.86	1.12	35.54	74.04
8	3	2	1	3	1.28	0.82	31.86	55.83
9	3	3	2	1	3.12	1.19	31.87	89.21
$K_1$	75.015	71.491	73.189	87.857				
$K_2$	73.552	72.126	71.945	74.657				
$K_3$	73.027	77.976	76.459	59.080				
R	1.988	6.485	4.514	28.777				

表 3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

误差来源	偏差平方和	自由度	均方差	F	P
A	6.385	2	3.19	1.000	>0.05
B	76.705	2	38.35	12.013	<0.05
C	32.647	2	16.32	5.113	>0.05
D(误差)	6.380	2	3.19		

注:  $F_{0.05}(2,2)=19.0, F_{0.01}(2,2)=99.0$

Note:  $F_{0.05}(2,2)=19.0, F_{0.01}(2,2)=99.0$

直观分析结果显示,3 个因素的主次关系为  $B>C>A$ ; 每个因素的 3 个水平之间的趋势为  $A_1>A_2>A_3, B_3>B_2>B_1, C_3>C_1>C_2$ 。故确定最优工艺为  $A_1B_3C_3$ , 即 8 倍量 50% 乙醇提取 3 次, 每次 90 min。

### 2.5 验证试验

为了保证提取工艺的重复性及可行性,对优化的方案进行验证试验。称取天堂乡甘肃马先蒿 3 份,每份 200 g,分别加入 8 倍量的 50% 乙醇溶液,提取 3 次,每次 90 min,滤过,合并 2 次滤液。精密量取 10 mL 滤液,以相应的溶液定容至 100 mL,取样测定,计算得提取液中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的含量,详见表 4。

表 4 验证试验结果

Tab 4 Results of verification test

批号	药材量, g	毛蕊花糖苷, %	异毛蕊花糖苷, %	干膏得率, %
1	200.0	3.52	1.21	39.56
2	200.0	3.56	1.35	37.14
3	200.0	3.39	1.23	37.28
$\bar{x}$		3.49	1.26	37.99
		RSD=1.28%	RSD=1.32%	RSD=1.97%

表 4 结果表明,该优化的醇提工艺稳定、重复性好。

## 2.6 不同产地甘肃马先蒿毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷含量测定

分别称取甘肃天堂乡、青海西宁及四川诺尔盖的甘肃马先蒿各10 g,按照“2.4”项确定的提取工艺进行提取,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定各成分的峰面积,计算含量。结果表明,不同产地甘肃马先蒿中毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷含量存在一定的差异,详见表5。

表5 不同产地甘肃马先蒿中指标成分的含量测定结果 (n=6)

Tab 5 Determination results of index constituents in *P. kansuensis* from different habitats (n=6)

产地	含量,%	
	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷
甘肃天堂乡	3.59	1.26
青海西宁	4.16	1.35
四川诺尔盖	4.06	1.39

## 3 讨论

考虑到苯乙醇苷类成分化学结构中含有多个酚羟基基团,提取溶剂的极性大小对该类化合物的提取率影响显著,故本试验在单因素考察过程中优先选用了10%、30%、50%、70%、90%的乙醇及水为提取溶剂,结果显示毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的含量随着乙醇体积分数的增大而增加,且以50%乙醇提取所得目标成分含量最高。同时考察了不同提取溶剂用量、提取时间、提取次数对目标成分提取率的影响,并以毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷及干膏得率为综合评价指标,采用正交试验优化藏药甘肃马先蒿中目标成分的醇提工艺。结果表明,提取时间及提取次数影响显著,提取溶剂的量影响较小。优化所得的最优工艺为8倍量50%乙醇提取3次,每次90 min。本试验在测定过程中严格控制了各因素水平,确保了试验结果的准确性及可靠性。

本文以藏药甘肃马先蒿中主要苯乙醇苷类成分毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷为检测指标,筛选出提取工艺,较以单一成分为指标进行筛选更为科学合理、省时节能,为藏药甘肃马先蒿苯乙醇苷类成分的进一步开发利用提供了重要依据。

本试验采用HPLC法考察了3个不同产地甘肃马先蒿的品质差异,结果指标成分含量均有差异,可能与药材所生长的地区海拔、气候等因素有关。此结果可为进一步保护资源、开发扩大用药部位及资源的可持续利用提供一定的科学依据。

## 参考文献

[1] Li MX, He XR, Tao R, *et al.* Phytochemistry and phar-

macology of the genus *Pedicularis* used in traditional Chinese medicine[J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(5): 1071-1098.

- [2] 李茂星,曹馨元,陶锐,等. HPLC测定马先蒿属植物中的桃叶珊瑚苷[J]. 华西药学杂志, 2015, 30(6): 718-719.
- [3] 曹馨元,曹文龙,陶锐,等. HPLC法测定不同产地马先蒿属植物中的毛蕊花苷[J]. 中成药, 2016, 38(1): 126-129.
- [4] Zhang BB, Shi K, Liao ZX, *et al.* Phenylpropanoid glycosides and triterpenoid of *Pedicularis kansuensis* Maxim [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(6): 854-860.
- [5] Hongbiao C, Ninghua T, Yumei Z. Chemical constituents from *Pedicularis rex* C. B. Clarke[J]. *Zeitschrift Für Naturforschung*, 2007, 62(11): 1465-1470.
- [6] Arthur H, Joubert E, De Beer D, *et al.* Phenylethanoid glycosides as major antioxidants in *Lippia multiflora* herbal infusion and their stability during steam pasteurisation of plant material[J]. *Food Chem*, 2011, 127(2): 581-588.
- [7] Laleh K, Abbas D, Farzaneh L, *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of *Pedicularis sibthorpii* Boiss. and *Pedicularis wilhelmsiana* Fisch ex[J]. *Adv Pharm Bull*, 2012, 2(1): 89-92.
- [8] Zhou B, Li M, Cao X, *et al.* Phenylethanoid glycosides of *Pedicularis muscicola* Maxim ameliorate high altitude-induced memory impairment[J]. *Physiol Behav*, 2016, 157: 39-46.
- [9] Luo X, Li JY, Xu YH, *et al.* Preventive effect of phenylethanoid glycosides from *Cistanche Salsa* on rats with high-altitude cerebral edema[J]. *Central South Pharmacy*, 2014, 12(7): 747-750.
- [10] 黄木土,廖怀回,肖俊峰,等. 肾衰康颗粒的提取纯化工艺研究[J]. 中药材, 2015, 38(6): 1306-1308.
- [11] 于宁,何承辉,黄伟,等. 香青兰有效成分提取工艺考察及不同产地香青兰中有效成分量的比较[J]. 中草药, 2015, 46(6): 846-852.
- [12] 李玲,王冰,张彤,等. 正交试验法优选左归丸的醇提和水提工艺[J]. 中药材, 2015, 38(8): 1724-1727.
- [13] 李茂星,张超,乌兰,等. HPLC法测定藏药螃蟹甲中苯乙醇苷类化合物的含量[J]. 药学实践杂志, 2011, 29(5): 379-381.
- [14] 杨素德,胡军华,李家春,等. HPLC法同时测定芙蓉总苷胶囊中松果菊苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的含量[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2015, 17(3): 609-613.
- [15] 沈涛,李季文,梁海宁,等. 多指标优选益气固本颗粒澄清工艺[J]. 中国药房, 2016, 27(1): 76-79.

(收稿日期:2016-06-02 修回日期:2016-07-28)

(编辑:刘 萍)