

利用超临界 CO₂ 萃取法提取西藏白花杜鹃花中 活性成分及 GC-MS 初步分析

吴金措姆¹, 四郎玉珍¹, 班旦¹, 格桑卓嘎¹, 郝宝成², 拉巴次旦^{1*}

(1. 西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所, 西藏 拉萨 850000; 2. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 确定超临界 CO₂ 萃取西藏白花杜鹃花的最优工艺条件和初步鉴定其提取物的化学成分。以提取率为评价指标, 利用正交试验对西藏白花杜鹃花超临界 CO₂ 萃取有效成分条件进行了优化, 采用气相色谱-质谱联用技术 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 分析了萃取物的化学成分。结果表明, 超临界 CO₂ 萃取西藏白花杜鹃花的最优提取工艺为开花期白花杜鹃的花粉碎为 200 目、萃取压力 25 MPa、萃取温度为 40 ℃、反应时间 2.5 h, GC-MS 检测分离出 24 种含量较高的化合物。由此可得, 经与质谱谱图数据库比对, 初步鉴定主要为烷烃及其含氧衍生物 (62.32 %)、烯和醇 (8.09 %)、酯 (4.87 %) 等化合物, 其中含有提高机体免疫力和抗肿瘤作用的角鲨烯 (含量达 4.79 %) 等药用活性成分, 具有很好的研究开发前景。

关键词: 白花杜鹃; 超临界 CO₂ 萃取法; 化学成分; GC-MS

中图分类号: R284.1; R285

文献标识码: A

Supercritical Carbon Dioxide Extraction for Flowers of *Rhododendron mucronatum* (Blume) G. Don and Preliminary Analysis of Chemical Composition by Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS)

Wujincuomu¹, Silangyuzhen¹, Bandan¹, Gesangzhuoga¹, HAO Bao-cheng², Labacidan^{1*}

(1. Institute of Animal Science and Veterinary, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850000, China; 2. Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of Chinese Academy of Agriculture Sciences, Gansu Lanzhou 730050, China)

Abstract: The present paper aimed to determine the optimal extraction process of the flowers of *Rhododendron mucronatum* (Blume) G. Don, and preliminarily identify and analyze the main chemical components of the extract. Taking the extraction rate as the evaluation index, the flowers of *Rhododendron mucronatum* (Blume) G. Don were extracted with supercritical carbon dioxide by orthogonal optimization method. The chemical components of the extract were analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). Results showed that the optimum conditions for supercritical carbon dioxide extraction of the flowers of *Rhododendron mucronatum* (Blume) G. Don were as follows: crushing into 200 mesh, extraction pressure 25 MPa, extraction temperature 40 ℃, reaction time 2.5 hours. 24 compounds with high content were detected and separated by GC-MS. To conclude, compared with the mass spectrum database, supercritical carbon dioxide extraction for the flowers of *Rhododendron mucronatum* (Blume) G. Don was mainly composed of Alkanes and their oxygen-containing derivatives (62.32 %), alkenes and alcohols (8.09 %), esters (4.87 %), etc.

Key words: *Rhododendron mucronatum* (Blume) G. Don; Supercritical carbon dioxide extraction; Chemical composition; Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)

杜鹃属植物化学主要成分为土荆芥油素、异土荆芥油素、槲皮素、山奈素、金丝桃甙、红色素、谷甾

醇等。杜鹃花科植物活性成分有良好的抗菌消炎作用, 如秀丽杜鹃、汶川杜鹃、矮枇杷的抗菌作用就强于或相当于黄连, 但近年来, 其作为神经药理学基质而更受重视^[1]。

James A. Klock 等从黄杜鹃提取到的化学成分作为心血管药的治疗; Yoshiki 等从兴安杜鹃中提取出 2 种新的色原烷衍生物 1 和色原烷衍生物 2, 另一种化合物色原烯 3 具有潜在的抗艾滋病病毒活

收稿日期: 2020-05-15

基金项目: 西藏自治区财政涉农推广类项目: 藏兽药研发与示范

作者简介: 吴金措姆 (1980-), 女, 副研究员, 主要从事传统藏兽药的研究, E-mail: 54256938@qq.com; * 为通讯作者: 拉巴次旦 (1970-), 男, 副研究员, 主要从事藏兽药的研发, E-mail: 54256938@qq.com。

性;钟国华等以黄杜鹃作为麻醉剂,治疗温疟,有显著的减慢心率和降低血压作用^[2]。从华丽杜鹃叶分离的杜鹃素和 Matleucinal 能影响视觉。映山红的嫩叶是“红桃合剂”的主要成分,对慢性支气管炎有良好疗效,满山红、紫花杜鹃都有止咳化痰的功效。从大白花杜鹃叶中分离得到的木藜芦毒素 I 在低剂量(1~100 μg/kg)时有明显降压作用,还能诱发动物的传入神经、迷走神经、肌神经、颈神经、颈动脉神经和皮质神经产生强烈的突发效应,证明是一种高强度的肌兴奋剂^[3]。另外,杜鹃花科植物中的黄杜鹃药液喷雾防治桑螵、灌施防治地下害虫、浸渍处理蚜虫效果良好,熏蒸家蝇,致死时间与除虫菊粉相同,苏醒时间比除虫菊粉长,苏醒百分率比除虫菊粉低。据不完全统计,黄杜鹃对豆平蛾、甘蔗绵蚜、苎麻黄蛱蝶、菜粉蝶、稻瘿蚊、稻蝗、稻苞虫、负泥虫、叶蝉、甘薯金花虫、红蜘蛛等 10 科 50 余种重要经济害虫毒杀效果良好,因此,曾作为土农药在黄杜鹃产区广泛应用^[4]。杜鹃花属中很多种类的活性成分已被研究,如黄毛杜鹃、日本杜鹃等。目前已从黄杜鹃中分离并鉴定出结构的活性成分有 8 种:分别是闹羊花素-II、III、V, Rhodomollein-I、II、III, Kalmanol 和 Grayanotoxin-III。此外,还含有浸木毒素、石楠素、杜鹃花毒素、司帕拉沙酚、马醉木毒素等^[5]。

杜鹃花科植物分布广,品种多,其活性成分种类多,活性高,用途广,具有广阔的开发前景,尤其是西藏地区杜鹃花科植物资源丰富,亟待加强研究并加以开发应用。通过本实验,利用超临界 CO₂ 萃取法对西藏白花杜鹃花化学成分进行了初步的提取分离鉴定,初步明确了其化学成分组成,并鉴定出含有提高机体免疫力和抗肿瘤作用的角鲨烯等活性成分,为下一步药用价值的研究和开发奠定了基础。

1 材料及方法

1.1 仪器与试剂材料

气相质谱仪(Agilent 6890-5973 GC/MS,安捷伦

表 1 L₉(3³) 正交试验影响因素水平表

Table 1 Orthogonal factor level table of L₉(3³)

水平	A	B	C
	萃取压力(Mpa)	萃取温度(℃)	萃取时间(h)
1	15	45	2.5
2	20	40	2
3	25	35	1.5

科技(中国)有限公司);CO₂ 萃取仪(HAS-10-50, Applied Separation Inc.);红花杜鹃叶采摘自西藏那曲嘉黎县;氯仿等化学试剂均为色谱纯(西安三浦化学试剂有限公司)。

1.2 白花杜鹃花预处理

将采摘的白花杜鹃花自然条件下户外晾干,粉碎后过 200 目筛,备用。

1.3 三因素三水平 L₉(3³) 正交试验设计

以提取率为评价指标,选取萃取压力、萃取温度和萃取时间为因素,设计正交试验表(表 1)。

1.4 超临界 CO₂ 萃取法提取

精密称取 3.5 g 左右粉碎后的白花杜鹃花于萃取釜中,以 CO₂ 流体为萃取剂,进行提取提取物用氯仿溶解,4℃保存,备用。

1.5 GC-MS 检测条件

进样口温度:270℃,升温程序:60℃,以 10℃/min 速率升至 280℃,保持 5 min,以 5℃/min 速率升至 290℃,保持 3 min,分流进样,分流比:20:1,载气:高纯氦气,纯度≥99.999%,流速 1.0 mL/min。进样量:1 μl。

2 结果与分析

2.1 L₉(3³) 正交试验的提取条件优化结果

选用了总提取率有主要影响的 3 个因素(A:萃取压力 Mpa、B:萃取温度℃、C:萃取时间 h)考虑 3 个水平,以 L₉(3³) 正交表进行试验影响因素优化。优化结果见表 2~3。

表 2 L₉(3³) 正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results of L₉(3³)

试验号	A	B	C	提取率(%)
第 1 组	1	1	1	0.15
第 2 组	2	2	2	0.46
第 3 组	3	3	3	0.54
第 4 组	1	2	3	0.20
第 5 组	2	3	1	0.45
第 6 组	3	1	2	0.53
第 7 组	1	3	2	0.34

续表 2 Continued table 2

试验号	A	B	C	提取率(%)
第 8 组	2	1	3	0.35
第 9 组	3	2	1	0.79
K1	0.277	0.463	0.383	
K2	0.417	0.470	0.427	
K3	0.560	0.320	0.443	
R	0.283	0.150	0.060	

面积百分比报告

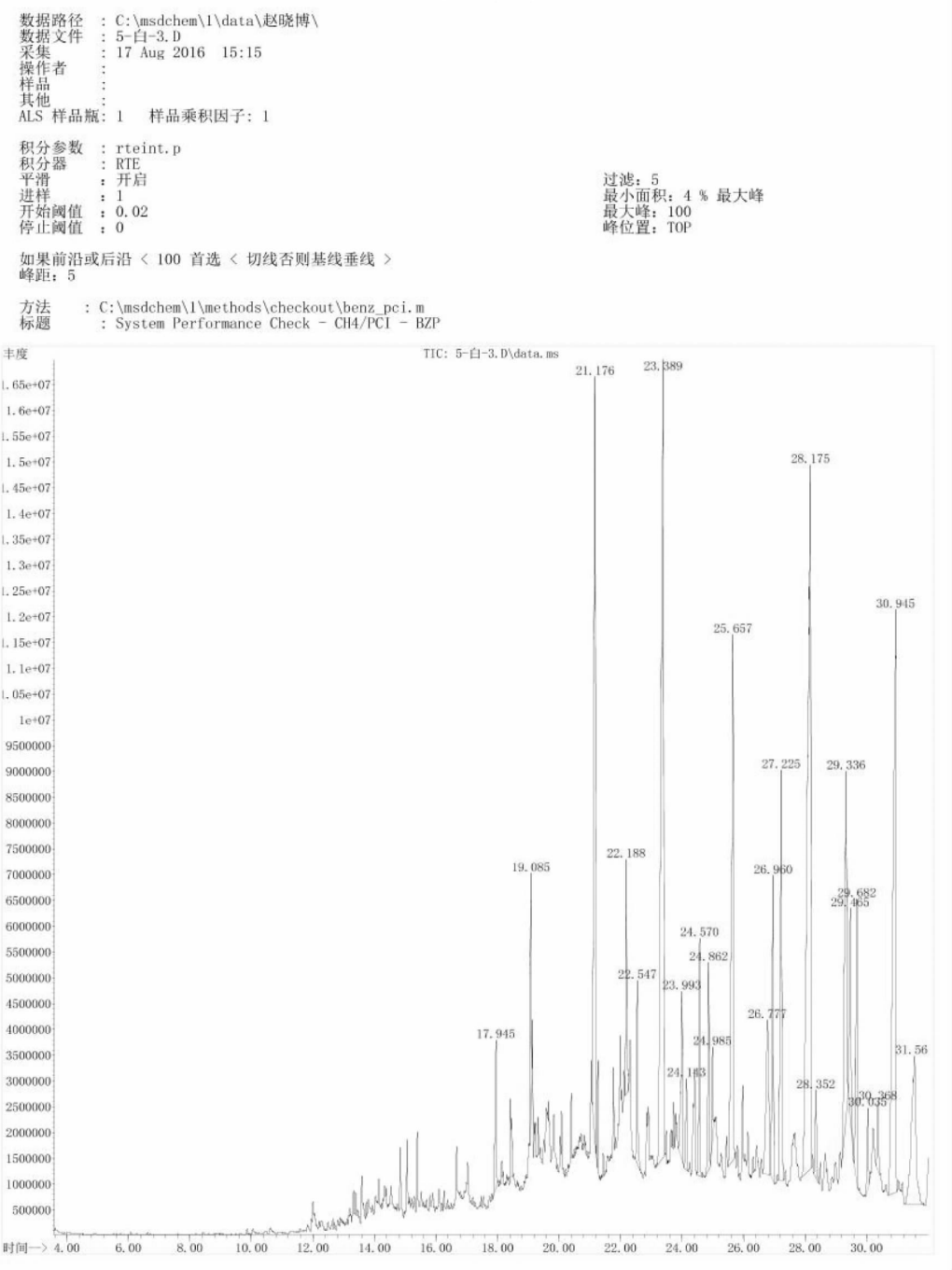


图 1 白花杜鹃的花 GC-MS 检测结果

Fig. 1 Detection of rhododendron tinctorius flowers by GC-MS

表 3 L₉(3³) 正交试验方差分析

Table 3 The variance analysis of orthogonal test of L₉(3³)

方差来源	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P
A	0.228	2	2.478	5.140	>0.05
B	0.031	2	0.337	5.140	>0.05
C	0.017	2	0.185	5.140	>0.05

在实验条件范围内,最佳提取条件是 A3B2C1,即开花期白花杜鹃花粉碎为 200 目、萃取压力 25 MPa、萃取温度为 40 ℃、反应时间 2.5 h 为最佳提取条件。

2.2 GC/MS 检测结果分析

将应用上述最优提取条件(即开花期白花杜鹃的花粉碎为 200 目、萃取温度为 35 ℃、萃取压力 15 MPa、反应时间 2 h)将白花杜鹃花提取物采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)进行测定,具体参见图 1,共检测分离出 24 种含量较高的化合物;经与质谱谱图数据库比对,初步鉴定主要为烷烃及其含氧衍生物(62.32 %)、烯和醇(8.09 %)、酯(4.87 %)等化合物,其中包含有提高机体免疫力和抗肿瘤作用的角鲨烯(含量达 4.79 %)等活性成分。

3 讨 论

藏医药著作《四部医典》所记载的藏药塔玛梅朵嘎布正是白花杜鹃。《度母本草》上记载杜鹃花为干脓药^[6]。到目前为止尚未见采用超临界 CO₂ 提取西藏白花杜鹃的花化学成分和 GC-MS 分析的报道,也未见有相关专利。药用植物的花、叶入药是

合理的可持续的利用药材资源的有效途径,不仅维护了生态平衡、而且提供了人类所需,可以使人与自然和谐发展。在大力提倡保护生态环境的大背景下,花和叶是药用植物最具有研究意义的部位。

通过本实验,利用超临界 CO₂ 萃取法对西藏白花杜鹃花化学成分进行了初步的提取分离鉴定,初步明确了其化学成分组成,并鉴定出含有提高机体免疫力和抗肿瘤作用的角鲨烯等活性成分,为下一步药用价值的研究和开发奠定了基础。

参考文献:

[1]李少泓,孙欣. 杜鹃属植物的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊,2010, 28(1):2435-2437.
[2]周三云,李蓉涛. 杜鹃花属植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 云南中医中药杂志,2008(5):51-53.
[3]张梅,潘大仁. 杜鹃属植物黄酮类化合物的研究进展[J]. 海峡科学,2012(5):3-4, 14.
[4]白霄霞,李志斌. 高山杜鹃病虫害防治[J]. 中国花卉园艺,2014(16):40-42.
[5]陈刚,金慧子,等. 杜鹃花属植物的化学成分及药理研究进展[J]. 药学实践杂志,2008, 26(4):255-257.
[6]希瓦措著,毛继祖,等译.《度母本草》[M]. 西宁:青海人民出版社,2016.