

白花蛇舌草中环烯醚萜苷类成分的提取工艺优选

张轲, 张东, 梁彩霞, 杨岚*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 优选白花蛇舌草中总环烯醚萜苷的提取工艺, 为该药材的资源开发与利用提供参考。方法: 以车叶草苷为指标成分, 采用紫外分光光度法测定总环烯醚萜苷的含量, 检测波长 548 nm。以浸膏得率和总环烯醚萜苷含量的综合评分为指标, 通过正交试验考察乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取次数对白花蛇舌草中总环烯醚萜苷提取工艺的影响。结果: 总环烯醚萜苷最佳提取工艺为乙醇体积分数 90%, 料液比 1:8, 提取时间 2 h, 提取数 2 次。总环烯醚萜苷质量分数 22.85%。结论: 优选的提取工艺稳定合理, 为白花蛇舌草中总环烯醚萜苷提取的工业化生产提供实验依据。

[关键词] 白花蛇舌草; 总环烯醚萜苷; 车叶草苷; 紫外分光光度法; 出膏率

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0038-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200038

Optimization of Extraction Process of Total Iridoid Glycosides from *Hedyotis diffusa* ZHANG Ke, ZHANG Dong, LIANG Cai-xia, YANG Lan* (Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of total iridoid glycosides from *Hedyotis diffusa*. **Method:** Spectrophotometry was adopted to determine the content of total iridoid glycosides with asperuloside as index ingredient. Taking composite score of extract yield and the content of total iridoid glycosides as index, orthogonal test was adopted to optimize extraction technology of total iridoid glycosides with ethanol concentration, material-liquid ratio, extraction time and times as factors. **Result:** Optimal extraction conditions were as follows: extracted twice with 8 times the amount of 90% ethanol, 2 h for per time; yield of total iridoid glycosides was 22.85%. **Conclusion:** This optimized extraction process is stable and reasonable, which can serve as references for industrial production of extraction of total iridoid glycosides from *H. diffusa*.

[Key words] *Hedyotis diffusa*; total iridoid glycosides; asperuloside; ultraviolet spectrophotometry; extract yield

白花蛇舌草功效清热解毒、利尿消肿、活血止痛^[1], 具有抗氧化、抗肿瘤、抗化学诱变、免疫调节、保肝利胆等药理活性, 主要含有黄酮类、环烯醚萜苷类、萜醌类、三萜类等化合物。环烯醚萜苷类化合物为白花蛇舌草的主要有效成分, 已知的该类化合物有 22 个^[2], 其中车叶草苷在体外抗癌筛选试验中对肺腺癌 A549 细胞株、宫颈癌 HeLaS3 细胞株、大肠癌 HT29 细胞株显示出了活性^[3]; 反式 6-O-对香豆酰鸡屎藤次苷甲酯对 PC3 人雄性激素非依赖性前列腺癌细胞有强烈的抑制增殖作用^[4]; 正、反式 6-O-对

香豆酰鸡屎藤次苷甲酯对大鼠大脑皮质神经元细胞具有保护作用^[5]。

已有研究报道了白花蛇舌草中总三萜酸^[6]、总黄酮^[7-8]、总多糖^[9-10]、三萜类^[11]的提取纯化工艺, 但未见其总环烯醚萜苷提取工艺研究的报道。车叶草苷具有抗癌活性, HPLC 测得其在白花蛇舌草中质量分数约 1.5%^[12], 故选择车叶草苷作为指标成分。为进一步研究与开发白花蛇舌草中环烯醚萜苷类成分的药理活性和药用价值, 本实验以浸膏得率、总环烯醚萜苷含量为综合评价指标, 采用正交试验优选白花蛇舌草中环烯醚萜苷类成分的提取工艺。

[收稿日期] 20150420(009)

[基金项目] 中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(ZZ060802-02)

[第一作者] 张轲, 在读硕士, 从事中药化学研究, Tel:15712809312, E-mail: xzhd1990@163.com

[通讯作者] * 杨岚, 硕士, 研究员, 从事中药有效成分和质量标准研究, Tel:13641137349, E-mail: ylan_66@163.com

1 材料

XS105DU型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),YP3001N型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),T6系列紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

白花蛇舌草(购于河南确山县药材公司,经北京中医药大学刘春生教授鉴定为白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* 的干燥全草),车叶草苷对照品(成都植化纯生物技术有限公司,批号14259-45-1),5%香草醛-冰乙酸溶液(自制,将5g香草醛溶于100mL冰乙酸溶液中,即得),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总环烯醚萜苷的含量测定

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取车叶草苷对照品适量,加甲醇溶解并配制成0.20 g·L⁻¹的对照品溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液制备 称取白花蛇舌草药材粉末(过40目筛,下同)50g,加8倍量50%乙醇回流提取1h,减压浓缩,60℃真空干燥至恒重。精密称取白花蛇舌草提取物粉末约50mg,置于50mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,过滤,即得。

2.1.3 线性关系考察 取对照品溶液加甲醇稀释,配成质量浓度分别为0.04,0.06,0.08,0.10,0.12,0.16,0.20 g·L⁻¹的溶液。分别精密量取系列对照品溶液0.4mL至试管中,各加入5%香草醛-冰乙酸溶液0.4mL和高氯酸0.8mL,于60℃水浴中加热显色25min,冰浴冷却3min,精密加入冰乙酸4.4mL,混匀,随行试剂作为空白对照,于548nm处测定吸光度A,以对照品质量浓度(C)为横坐标,A为纵坐标,得回归方程 $A = 1.888C + 0.0096 (r = 0.9994)$,线性范围0.016~0.08mg。

2.1.4 精密度试验 精密量取对照品溶液0.4mL置于试管中,按2.1.3项下方法处理后测定A,连续测定6次,计算总环烯醚萜苷含量的RSD 0.1%,说明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 精密称取白花蛇舌草提取物粉末6份,每份约50mg,分别置于50mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,取滤液作为供试品溶液,随行试剂空白。按2.1.3项下方法处理后测定A,计算总环烯醚萜苷含量的RSD 1.7%,说明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 精密量取供试品溶液0.4mL于试管中,按2.1.3项下方法处理后测定A,每隔10min测定1次,观察1h内的稳定性,计算总环烯

醚萜苷含量的RSD 0.2%,说明供试品溶液显色反应后在1h内稳定。

2.1.7 加样回收率试验 精密称取已知车叶草苷含量的提取物粉末约25mg,共6份,分别置于50mL量瓶中,精密加入0.5775 g·L⁻¹车叶草苷对照品溶液5.0mL,加甲醇定容至刻度线,按2.1.3项下方法测定A,计算样品中总环烯醚萜苷的含量,结果见表1。

表1 车叶草苷含量测定的加样回收率试验

Table 1 Recovery test of determination of asperuloside

称样量 /mg	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
25.06	2.8944	5.7838	100.07		
25.13	2.9025	5.8368	101.61		
25.05	2.8932	5.7309	98.28	101.37	1.8
25.13	2.9025	5.8633	102.53		
25.17	2.9071	5.8898	103.27		
25.15	2.9048	5.8633	102.44		

注:加入量均为2.8875mg。

2.1.8 样品测定 精密称取白花蛇舌草提取物粉末9份,每份约50mg,分别置于50mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,取滤液作为供试品溶液,按2.1.3项下方法处理后测定A,按 $[(A - 0.0096) / 1.888] \times 50 / m_{\text{称}} \times 100\%$ 计算总环烯醚萜苷含量。

2.2 浸膏得率的测定 白花蛇舌草提取液减压浓缩回收溶剂,转移至干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于60℃真空干燥浸膏至恒重,取出,置干燥器内冷却,迅速精密称定质量,计算出膏率。

2.3 提取工艺优化 通过单因素试验对提取溶剂进行考察,结果显示随着乙醇体积分数的增加,总环烯醚萜苷的提取率逐渐提高,由此确定了提取溶剂的水平。在此基础上,采用L₉(3⁴)正交试验优选提取工艺,选择乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取次数为考察因素,每个因素选取3个水平,以出膏率、总环烯醚萜苷质量分数的综合评分为评价指标,权重系数分别为0.3,0.7,综合评分 = 出膏率/出膏率最大值 × 30% + 总环烯醚萜苷质量分数/总环烯醚萜苷质量分数最大值 × 70%。称取白花蛇舌草药材粉末9份,每份50g,按试验设计加热回流提取,减压回收溶剂,60℃真空干燥,试验安排及结果见表2,方差分析见表3。

由直观分析可知,各因素对白花蛇舌草中总环烯醚萜苷提取量的影响顺序为A > D > C > B。以极差最小的B因素为误差项进行方差分析,结果显示因素A的影响具有显著性差异,因素C,D则无显著

表 2 白花蛇舌草中总环烯醚萜苷提取工艺正交试验分析

Table 2 Orthogonal test analysis of alcohol extraction process of total iridoid glycosides in *Hedyotis diffusa*

No.	A 乙醇体积分数/%	B 料液比	C 提取时间/h	D 提取数/次	出膏率/%	总环烯醚萜苷/%	综合评分/%
1	50	1:8	1.0	1	10.2	11.55	53.51
2	50	1:12	1.5	2	15.1	10.54	59.05
3	50	1:16	2.0	3	17.0	11.87	66.49
4	70	1:8	1.5	3	13.5	15.50	71.47
5	70	1:12	2.0	1	10.1	17.79	72.51
6	70	1:16	1.0	2	14.7	15.86	74.70
7	90	1:8	2.0	2	10.3	22.77	88.18
8	90	1:12	1.0	3	12.0	21.94	88.62
9	90	1:16	1.5	1	9.1	19.91	77.27

表 3 综合评分方差分析

Table 3 Variance analysis of composite score

变异来源	SS	f	MS	F	P
A	927.326	2	463.663	94.131	<0.05
B(误差)	9.851	2	4.926	1.000	
C	60.024	2	30.012	6.093	>0.05
D	102.782	2	51.391	10.433	>0.05

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

性差异,结合生产成本等,确定最佳提取工艺 $A_3B_1C_3D_2$,即加 8 倍量 90% 乙醇提取 2 次,每次 2 h。

2.4 验证试验 称取白花蛇舌草药材 100 g,共 3 份,按最佳工艺条件进行验证试验,按 2.1 和 2.2 项下方法测定,计算浸膏得率平均值 10.43%,RSD 1.6%,总环烯醚萜苷质量分数平均值 22.85%,RSD 1.8%,说明该工艺稳定可行、重复性好。

3 讨论

车叶草苷为白花蛇舌草中主要活性成分,采用高氯酸-5% 香草醛冰乙酸溶液显色后,在 400 ~ 700 nm 范围内扫描,样品和对照品于 548 nm 处均有最大吸收,故以车叶草苷为指标成分,选用 548 nm 为最佳吸收波长。此外,本文还比较了硫酸-5% 香草醛冰乙酸溶液和高氯酸-5% 香草醛冰乙酸溶液 2 种显色方法,结果表明后者较前者反应灵敏且稳定,适用于白花蛇舌草中总环烯醚萜苷的含量测定。因此,对高氯酸-5% 香草醛冰乙酸溶液显色方法中的显色剂用量[5% 香草醛冰乙酸溶液(0.1,0.2,0.4,0.6 mL),高氯酸(0.4,0.8,1.2 mL)],显色反应的温度(40,60,80 °C)和时间(5,10,15,20,25,30 min)作了进一步考察,结果显示 5% 香草醛冰乙酸溶液 0.4 mL,高氯酸 0.8 mL,60 °C 加热 25 min 为最佳反应条件。

环烯醚萜苷类是白花蛇舌草中具有重要药理活性的一类成分,通过本文研究确定了白花蛇舌草中

总环烯醚萜苷的提取工艺,建立了总环烯醚萜苷的含量测定方法,为进一步揭示白花蛇舌草的活性物质基础和资源开发提供参考。

[参考文献]

[1] 陈永康. 白花蛇舌草的化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 290-293.

[2] 纪宝玉, 范崇庆, 裴莉昕, 等. 白花蛇舌草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 235-240.

[3] 斯建勇. 白花蛇舌草的化学成分及其质量研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2004.

[4] Li M, Jiang R W, Hon P M, et al. Authentication of the anti-tumor herb Baihuasheshecao with bioactive marker compounds and molecular sequences[J]. Food Chem, 2010, 119(3): 1239-1245.

[5] Kim Y G, Park E J, Kim J W, et al. Neuroprotective Constituents from *Hedyotis diffusa*[J]. J Nat Prod, 2001, 64(1): 75-78.

[6] 蒙瑞波, 汤庆发, 曾永长, 等. 白花蛇舌草中总三萜酸的提取纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 65-68.

[7] 曾永长, 梁少瑜, 邢学峰, 等. 白花蛇舌草总黄酮的大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 26-29.

[8] 刘军海. 白花蛇舌草中总黄酮微波辅助提取工艺研究[J]. 化工科技, 2013, 21(3): 23-26.

[9] 沈鸿. T 型关联度分析法优化白花蛇舌草中多糖提取工艺[J]. 中草药, 2008, 38(12): 1819-1820.

[10] 沈金辉, 杨春华, 刘静涵. 白花蛇舌草多糖提取工艺研究[J]. 海峡药学, 2009, 21(10): 83-85.

[11] 陆慧, 贾晓斌, 施峰, 等. 超临界 CO₂ 萃取白花蛇舌草中三萜类成分的工艺研究[J]. 中成药, 2011, 33(8): 1429-1432.

[12] 高丹, 赵呈呈, 李海燕, 等. 白花蛇舌草中车叶草苷的提取分离及含量测定的研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1654-1657.

[责任编辑 刘德文]