



赶黄草中大环多酚类成分含量测定及其提取工艺

陈岚, 江圣圭, 史鹏杰, 蔡舒心, 董志颖, 孙连娜

Content determination and extraction process of macrocyclic polyphenols from *Penthorum chinense* Pursh

CHEN Lan, JIANG Shenggui, SHI Pengjie, CAI Shuxin, DONG Zhiying, SUN Lianna

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202009048>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

车前草中大车前苷的含量测定及提取工艺优选

Determination and optimization of extraction process of the content of plantamajoside in plantain

药学实践杂志. 2019, 37(1): 77-79,90 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.018

愈肠颗粒的提取工艺研究

Extraction process optimization for Yuchang granules by orthogonal experiment

药学实践杂志. 2018, 36(1): 46-49 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.01.009

基于正交试验和响应曲面法优化复方金钱草颗粒提取工艺

Optimization of the compound herba lysimachiae extraction process based on orthogonal experiment and response surface method

药学实践杂志. 2020, 38(1): 27-34 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201910001

巴戟天环烯醚萜苷类成分含量测定和提取方法的研究

Studies on content determination and extraction method of iridoid glycosides in *Morinda of ficinalis* How

药学实践杂志. 2017, 35(4): 328-333 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.010

口腔溃疡膜有效成分提取方法的考察及含量测定

Investigation of the extraction method and content determination of the active components from oral ulcer film

药学实践杂志. 2020, 38(5): 466-468, 480 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202003033

正交试验法优化车前子中槲皮素提取工艺

Optimization of extraction process of quercetin from *Semen Plantaginis* by orthogonal test

药学实践杂志. 2018, 36(4): 351-354 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.014



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

赶黄草中大环多酚类成分含量测定及其提取工艺

陈 岚¹, 江圣圭², 史鹏杰², 蔡舒心², 董志颖², 孙连娜² (1. 空军杭州特勤疗养中心疗养三区药械科, 浙江 杭州 310002; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

[摘要] 目的 建立 HPLC 法同时测定赶黄草中大环多酚类成分: 乔松素-7-O-[4", 6"-(S)-六羟基二苯甲酰基]- β -D-葡萄糖苷(PHG)、乔松素-7-O-[3"-O-没食子酰基-4", 6"-(S)-六羟基二苯甲酰基]- β -D-葡萄糖苷(PGHG)、乔松素二氢查耳酮-7-O-[3"-O-没食子酰基-4", 6"-(S)-六羟基二苯甲酰基]- β -D-葡萄糖苷(THA)的含量, 并优化其最佳提取工艺。方法 通过 HPLC 法测定 PHG、PGHG、THA 的含量, 以 PHG、PGHG、THA 的总提取率为指标对赶黄草提取物进行分析, 采用正交设计考察溶剂浓度、提取时间、溶剂用量、提取次数对提取率的影响, 从而优化赶黄草大环多酚类成分的最佳提取工艺。结果 在采用的含量测定方法下, PHG、PGHG、THA 在线性范围内线性关系良好, 加样回收率在 100.90%~102.04% 之间, RSD 值均小于 1.5%。最佳提取工艺为取赶黄草干药材, 切 3~5 cm 小段, 加入 10 倍体积、浓度为 80% 的乙醇水溶液, 回流 2 次, 每次 2 h。该工艺下, 大环多酚提取率超过 90%。结论 新建立的含量测定方法准确稳定, 重复性好; 经优化的提取工艺稳定可行, 可为该类成分的进一步开发利用打下基础。

[关键词] 赶黄草; 高效液相色谱; PHG; PGHG; THA; 正交设计; 提取工艺

[中图分类号] R284.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2021)04-0309-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202009048

Content determination and extraction process of macrocyclic polyphenols from *Penthorum chinense Pursh*

CHEN Lan¹, JIANG Shenggui², SHI Pengjie², CAI Shuxin², DONG Zhiying², SUN Lianna² (1. Sanatorium Area 3, Air Force Hangzhou Special Service Recuperation Center, Hangzhou 310002, China; 2. School of Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective** To establish an HPLC method for simultaneous assay of macrocyclic polyphenols from *Penthorum chinense Pursh*, pinocembrin-7-O-[4", 6"-(S)-hexahydroxydiphenyl]- β -D-glucose (PHG), pinocembrin-7-O-[3"-O-galloyl-4", 6"-(S)-hexahydroxydiphenyl]- β -D-glucose (PGHG) and pinocembrin dihydrochalcone-7-O-[3"-O-galloyl-4", 6"-(S)-hexahydroxydiphenyl]- β -D-glucoside or thoningianin A (THA), and optimize the extraction process. **Methods** The total extraction rate of PHG, PGHG, THA was used as an investigated index to analyze the extracts from *Penthorum chinense Pursh*. Orthogonal design was applied to evaluate solvent amount, extraction time, solvent concentration and extraction times as the influencing factors for the optimal extraction process of macrocyclic polyphenols from *Penthorum chinense Pursh*. **Results** When this content assay method was adopted, there were good linear relationships for PHG, PGHG, THA in the linear range. The recoveries were between 100.90% to 102.04% with the RSDs below 1.5%. The optimal extraction process was involved in cutting *Penthorum chinense Pursh* into 3-5 cm, adding 10 times 80% ethanol aqueous solution by volume and refluxing 2 hours twice. The extraction rate of macrocyclic polyphenols was above 90% with this process. **Conclusion** This assay method is accurate, stable, and repeatable. The optimized extraction process is stable and feasible for further development and utilization.

[Key words] *Penthorum chinense Pursh*; HPLC; PHG; PGHG; THA; orthogonal method; extraction process

赶黄草(*Penthorum chinense Pursh*)在民间又名

[基金项目] 国家重点研发计划资助(2019YFC1711000);上海市自然科学基金项目(13401900106)

[作者简介] 陈 岚, 副主任药师, 研究方向: 中药材质量研究及品质评价, Email: chenlan_999@163.com

[通信作者] 孙连娜, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药资源活性评价及新药研发, Email: sssnmr@163.com

水泽兰、水杨柳等, 以其为原料制成的单味成方制剂肝苏颗粒现收载于《中华人民共和国卫生部部颁标准中药成方制剂十三册》附录^[1]。赶黄草是苗族的传统药物, 主产于四川古蔺, 具有清热、利湿、解毒、活血、平肝、健脾等功效^[2], 可用于酒精性、非酒精性脂肪肝, 淤积性、酒精性及其他诱导因素引起的肝损伤的保护和治疗^[3-13]。赶黄草中化学成分

类型众多,以黄酮类、萜类、酚酸类为其主要活性成分^[14]。其中,具有以黄酮苷连接没食子酰基结构的大环多酚类化合物(图1)乔松素-7-O-[4",6"--(S)-六羟基二苯甲酰基]- β -D-葡萄糖苷(pinocembrin-7-O-[4",6"--(S)-hexahydroxydiphenoyl]- β -D-glucose, PHG)、乔松素-7-O-[3"-O-没食子酰基-4",6"--(S)-六羟基二苯甲酰基]- β -D-葡萄糖苷(pinocembrin-7-O-[3"-O-galloyl-4",6"--(S)-hexahydroxydiphenoyl]- β -D-glucose, PGHG)、乔松素二氢查耳酮-7-O-[3"-O-没

食子酰基-4",6"--(S)-六羟基二苯甲酰基]- β -D-葡萄糖苷(pinocembrin dihydrochalcone-7-O-[3"-O-galloyl-4",6"--(S)-hexahydroxydiphenoyl]- β -D-glucose orthonningianin A, THA)的肝保护及抗肝纤维化活性较强^[15-17],同时也具有较好的降糖活性^[18],有较高的开发价值,故本实验建立 HPLC 法同时测定该3种化合物的含量,并通过正交试验优选其提取工艺,为该类成分的进一步开发研究提供前期基础。

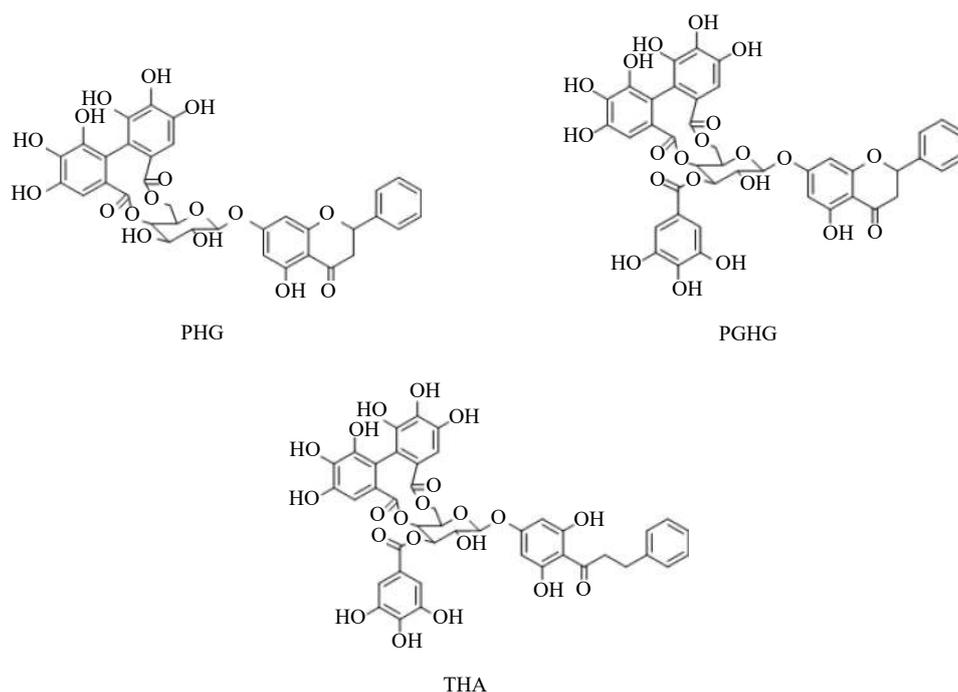


图1 赶黄草中大环多酚类成分的化学结构图

1 仪器与试剂

1.1 药材来源

从四川收集3批赶黄草药材(表1),药材经课题组孙连娜副教授鉴定为虎耳草科植物扯根菜(*Penthorum chinense* Pursh)的干燥地上部分。各批次药材均留样于上海中医药大学中药资源与生物技术研究中心。

表1 赶黄草药材来源信息表

样品编号	采集地区	批号	提供单位
S1	四川古蔺	18110803	四川古蔺肝苏药业有限公司
S2	四川古蔺	18110804	四川古蔺肝苏药业有限公司
S3	四川古蔺	19050701	四川新荷花中药饮片有限公司

1.2 仪器与试剂

XS105DU 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);XS104 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);HDM-10000B 数显电热套(上海利闻科学仪器有限

公司);N-1300 旋转蒸发仪(东京理化器械株式会社);Milli-Q 纯水机(美国 Millipore 公司);1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Centrifuge 5810R 高速台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

PHG 对照品(批号:20181117)、PGHG 对照品(批号:20181103)、THA 对照品(批号:20181103)均由本实验室制备,且经 HPLC 归一化法检测表明纯度均在 98% 以上;水为超纯水;甲酸(色谱纯,上海麦克林生化科技有限公司);乙腈(色谱纯,美国 Thermo Fisher 公司);乙醇、甲醇(分析纯,上海泰坦科技股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 大环多酚类成分的含量测定

2.1.1 对照品储备液的制备

精密称定 PHG、PGHG、THA 对照品,加 80% 甲醇分别制成对照品储备液,质量浓度分别为

0.610 4、0.604 4、0.485 2 mg/ml。

2.1.2 供试品溶液的制备

取赶黄草药材粉末(过3号筛)1 g,精密称定后转移至250 ml锥形瓶中,精密移取并加入80%甲醇水溶液100 ml,称重确定初始重量,回流提取1 h,放至常温,加溶剂补至初始重量,摇匀,取样,过膜,取续滤液作供试品溶液。

2.1.3 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.5%甲酸水溶液(B);洗脱条件:梯度洗脱(0~20 min,32%→50% A,20~25 min,50%→90% A,25~30 min:90%→32% A);其他参数:流速为1 ml/min,柱温为30℃,检测波长为280 nm,进样量为10 μl。在此色谱条件下,供试品溶液(图2)中PHG、PGHG、THA与其他成分均达到基线分离,分离度大于1.5,理论塔板数以PHG计不低于20 000。

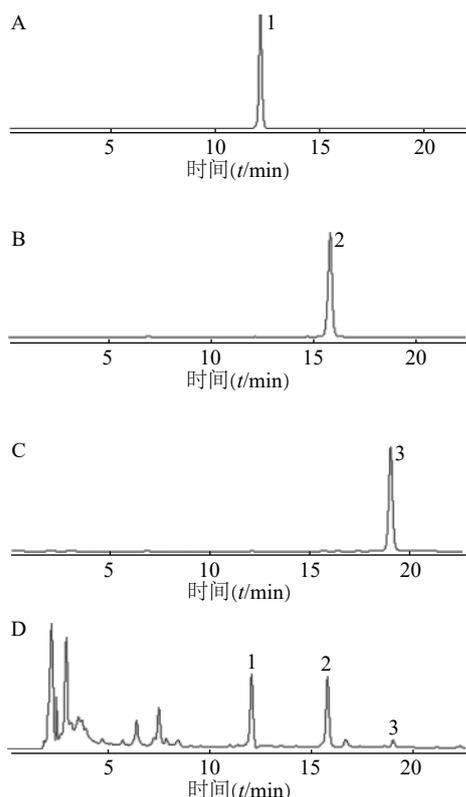


图2 标准品溶液(A-C)与药材提取液(D)HPLC图
1.PHG;2.PGHG;3.THA。

2.1.4 线性关系考察

取“2.1.1”项方法制备的混合对照品溶液,依次稀释2、4、10、50、100倍,分别按“2.1.3”项色谱条件进样测定,以3种成分的进样浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,分别进行HPLC检测,线性拟合得回归方程。PHG、PGHG、THA的回归方程

分别为: $Y=18\ 575.798X+5.091\ 9$ ($r=0.999\ 9$), $Y=21\ 923.382X+29.293\ 3$ ($r=0.999\ 9$), $Y=21\ 544.589X-13.093\ 6$ ($r=0.999\ 9$),线性范围依次是6.10~610.40、6.04~604.40、4.85~485.20 μg/ml,以上表明3种化合物线性关系良好。

2.1.5 精密度考察

取对照品溶液,按“2.1.3”项色谱条件进行HPLC检测,连续进样分析6次,记录峰面积。结果显示PHG峰面积的RSD为1.15%,PGHG峰面积的RSD为0.18%,THA峰面积的RSD为0.12%,表明所用仪器精密度良好。

2.1.6 重复性考察

取赶黄草药材(S3,过3号筛)6份,按“2.1.2”项方法制备供试品溶液,再分别按“2.1.3”项色谱条件进行HPLC检测,记录峰面积,计算含量。结果显示样品中PHG的平均含量为5.83 mg/g,RSD为1.03%;PGHG平均含量为9.99 mg/g,RSD为0.91%;THA平均含量为1.31 mg/g,RSD为0.50%,表明本方法重复性良好。

2.1.7 稳定性考察

取赶黄草药材(S3,过3号筛)1份,按“2.1.2”项方法制备供试品溶液,分别放置0、4、8、12、24 h后取样,按“2.1.3”项色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示样品中PHG、PGHG、THA峰面积的RSD分别为1.72%、2.44%和4.06%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.8 加样回收率考察

取同一批赶黄草药材(S3,过3号筛)6份,每份约0.5 g,精密称定,按照药材含有量1:1的比例,分别精密加入PHG、PGHG、THA对照品,按“2.1.2”项方法制备供试品溶液,再按“2.1.3”项条件进行HPLC分析,记录峰面积,计算回收率。结果显示PHG、PGHG、THA加样回收率分别为102.04%、100.90%、101.55%,对应的RSD值分别为0.88%、0.82%、1.43%,表明该方法可靠。

2.1.9 赶黄草药材的含量测定

取各批次赶黄草药材(S1~S3,过3号筛)各3份,按“2.1.2”项方法制备供试品溶液后按“2.1.3”项条件进行HPLC分析,记录峰面积并计算含量(表2)。

2.2 提取工艺的优化

2.2.1 提取方法考察

取赶黄草药材(S2)切成3~5 cm小段,称取50 g,加入60%乙醇溶液500 ml,分别采用浸渍法(浸渍24 h)、渗漉法(浸泡24 h后以5 ml/min的流

表2 赶黄草中3种化合物的含量 (n=3)

样品编号	PHG/ (mg/g)	PGHG/ (mg/g)	THA/ (mg/g)	总含量/ (mg/g)
S1	3.66	5.12	1.99	10.77
S2	7.06	8.26	1.77	17.09
S3	5.69	9.73	1.25	16.67

速收集渗漉液)、回流法(加热回流1h)提取。结果表明,浸渍法平均总提取率为36.67%,渗漉法平均总提取率为36.82%,回流法平均总提取率为71.99%。考察结果为回流法提取效果最佳,因此选择回流法作为提取方法。

2.2.2 正交试验^[19-21]

在确定提取方法为回流法的基础上,取赶黄草药材(S2),选择常规回流提取中对提取效果影响较大的因素:溶媒浓度(A)、提取时间(B)、溶媒用量(C)、提取次数(D)作为影响因素,每个因素各取3个水平,在平行操作条件下,设计L₉(3⁴)正交试验(表3)。

表3 正交试验因素水平表

水平	A因素	B因素	C因素	D因素
	溶媒浓度(%)	提取时间(t/h)	溶媒用量(倍)	提取次数(次)
1	40	1	10	1
2	60	2	20	2
3	80	3	30	3

以PHG、PGHG、THA的总提取率作为考察指标得正交试验结果(表4),根据极差大小可以看出各因素对赶黄草中大环多酚类成分的影响大小为A>B>D>C;进一步方差分析(表5)结果表明,溶媒浓度(A)对提取效果有显著影响(P<0.05),而其他3个因素无显著影响(P>0.05)。因此,根据正交试验得出的最佳组合为A₃B₁C₃D₂。

3 讨论与结论

本实验比较并优化了供试品溶液制备方法,并考察了不同型号色谱柱、不同检测波长、不同流动相组成,在此基础上建立了赶黄草中PHG、PGHG、THA的HPLC检测方法,该法能使样品中测定成分与其他成分达到有效分离,峰型好,可简便快速分析样品,检测结果准确可靠。

在建立含量测定方法的基础上进行提取工艺优化。从毒性大小、常用性角度选择乙醇为溶媒,单因素实验结果显示回流法提取效果最佳,因此选择乙醇热回流法作为提取方法,对常规热回流法影

表4 正交试验结果表

试验号	A因素	B因素	C因素	D因素	总提取率 (%)
	溶媒浓度 (%)	提取时间 (t/h)	溶媒用量 (倍)	提取次数 (次)	
1	1	1	1	1	32.27
2	1	2	2	2	46.67
3	1	3	3	3	50.47
4	2	1	2	3	50.40
5	2	2	3	1	70.53
6	2	3	1	2	80.07
7	3	1	3	2	92.86
8	3	2	1	3	89.79
9	3	3	2	1	87.56
K1	129.41	175.54	202.15	190.37	
K2	201.01	206.99	184.63	219.61	
K3	270.21	218.11	213.86	190.66	
极差R	46.93	14.19	9.74	9.75	

表5 方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F值	F临界值	P
A	3303.955	2	22.901	F _{0.05} (2,2)=19	<0.05
B	324.996	2	2.253	F _{0.10} (2,2)=9	>0.10
C	144.274	2	1.000		>0.10
D	188.129	2	1.304		>0.10
误差	144.274	2	-	-	-

响较大的4个因素进行3个水平设置,建立L₉(3⁴)正交试验组,以便考察不同参数设定值对赶黄草中大环多酚成分提取率的影响。通过极差及方差分析发现溶媒浓度(A)即乙醇浓度对提取率有显著性影响,而其他3个因素(B、C、D)均无显著性影响。经正交试验优选后的最佳提取工艺为A₃B₁C₃D₂,结合生产实际,从节约原料降低成本的角度,对无明显影响的3个因素进行适当调整,调整后的提取工艺为A₃B₂C₁D₂,即取赶黄草干药材,切3~5cm小段,加入10倍体积、浓度为80%的乙醇溶液,回流2次,每次2h。按照该工艺,取3批药材各5kg,进行3次放大验证试验,提取率均在90%以上,且RSD值为3.73%,说明该工艺稳定可行,可为赶黄草中该类成分的进一步开发研究打下基础。

【参考文献】

[1] 何述敏,李敏,吴众,等. 扯根菜的研究进展[J]. 中草药, 2002(6): 102-103.