

白花蛇舌草中总三萜酸的提取纯化工艺优选

蒙瑞波¹, 汤庆发¹, 曾永长², 郭阳¹, 傅钧庭¹, 范昊宁¹, 罗佳波^{1*}

(1. 南方医科大学中药新药实验室广东省中药制剂重点实验室, 广州 510515;
2. 扬子江药业集团广州海瑞药业, 广州 510633)

〔摘要〕 目的: 优选白花蛇舌草中总三萜酸的提取纯化工艺。方法: 以总三萜酸提取率为指标, 选取乙醇用量、乙醇体积分数及回流时间为考察因素, 采用正交试验优选白花蛇舌草中总三萜酸的提取工艺; 通过静态吸附和解吸试验筛选树脂型号, 采用单因素试验考察总三萜酸的大孔树脂纯化工艺。结果: 最佳提取工艺为加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 1.5 h。采用 AB-8 型大孔树脂, 其纯化工艺为上样流速 2 BV·h⁻¹, 上样液 pH 5, 上样液质量浓度 0.25 g·L⁻¹, 洗脱剂 pH 7, 洗脱乙醇体积分数 80%, 洗脱速度 2 BV·h⁻¹。结论: 优选的工艺操作简单、稳定可行、重复性好, 可推广于工业化生产应用。

〔中图分类号〕 R283.6 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)24-0065-04

Optimization of Extraction and Purification Technology for Total
Triterpene Acid from *Hedyotis diffusa*

MENG Rui-bo¹, TANG Qing-fa¹, ZENG Yong-chang², GUO Yang¹,
FU Jun-ting¹, FAN Hao-ning¹, LUO Jia-bo^{1*}

〔收稿日期〕 20120810(008)
〔第一作者〕 蒙瑞波, 中药师, 在读硕士, 从事中药新制剂开发研究, Tel: 15521285030, E-mail: mengruiibo2005@126.com
〔通讯作者〕 * 罗佳波, 教授, 博士生导师, 从事中药复方与新制剂开发研究, Tel: 020-61648266, E-mail: ljb@fimm.com

总量为 25% 时, 其透皮性能最佳。进一步增加 PVA 和 CMC-Na 的总量, 透皮性能反而有所降低。

3 讨论

凝胶剂的优良特性与所选用的凝胶材料有关。合适的凝胶材料首先要保证透皮系统与皮肤充分、紧密的接触, 使药物顺利扩散, 迅速透过皮肤, 同时要作为药物的贮存或载体材料^[9]。因此选择合适的凝胶材料是丁香罗勒油透皮凝胶制备的关键问题之一。本文选择 PVA 和 CMC-Na 为凝胶材料, 两者用量比为 1:5~5:1。经试验确定用量比为 2:4 时, 制得的丁香罗勒油透皮凝胶具有较高的透皮速率。选择 PVA 和 CMC-Na 作为凝胶材料可防止丁香罗勒油的挥发, 增大丁香罗勒油的载药量, 从而使丁香罗勒油的透皮量达到最大。

〔参考文献〕

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 365.
[2] Pessoa L M, Morais S M, Bevilacqua C M L, et al. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum*

gratissimum Linn. and eugenol against *Haemonch useoniortus*[J]. Vet Parasitol, 2002, 109(1/2): 59.
[3] 周建新, 许华, 金浩. 丁香油抑菌效果和抑菌成分的研究[J]. 食品工业, 2003, 3(3): 24.
[4] Rempelberg C J M, Vogels J E, de-Vogel N, et al. Effect of short term dietary administration of eugenol in human [J]. Hum Exp Toxicol, 1996, 15(2): 129.
[5] 李鸣宇, 朱彩莲, 刘正. 天然植物提取液对变链菌胞外多糖的抑制[J]. 现代口腔医学杂志, 2004, 18(6): 481.
[6] 郑俊民. 经皮给药新剂型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 78.
[7] 崔福德. 药剂学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 545.
[8] 董平, 孟现民, 沙先谊, 等. 两种吡罗昔康凝胶体外经皮行为的比较[J]. 上海医药, 2010, 31(8): 377.
[9] 邢建国, 王新春, 赵媛, 等. 复方卡力孜然凝胶剂主要活性成分体外经皮渗透[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 19.

〔责任编辑 全燕〕

(1. Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) and New Drug, Southern Medical University, Guangdong Provincial Key Laboratory of TCM Preparation, Guangzhou 510515, China;
2. Yangtze River Pharmaceutical Group Guangzhou Harris Pharmaceutical Co. Ltd, Guangzhou 510633, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction and purification technology of total triterpene acid from *Hedyotis diffusa*. **Method:** With extraction rate of total triterpene acid as index, the amount and concentration of ethanol, reflux time were chosen as factors, extraction technology of total triterpene acid from *H. diffusa* was optimized by orthogonal test; Resin model was screened by static adsorption and desorption test, purification technology of total triterpene acid was investigated by single factor test. **Result:** Optimum extraction technology was: reflux extracted 1.5 h with 10-fold 70% ethanol. Optimum purification technology of AB-8 macroporous resin was: sample flow rate 2 BV·h⁻¹, the concentration of sample liquid 0.25 g·L⁻¹, pH 5, the concentration of elution was 80% ethanol, eluting velocity 2 BV·h⁻¹ with pH 7. **Conclusion:** Optimized technology was simple, stable with good reproducibility, which was suitable for industrial production of total triterpene acid.

[Key words] *Hedyotis diffus*; triterpenes acid; orthogonal test; extraction and purification

白花蛇舌草具有清热解毒、利尿消肿、活血止痛之功,同时具有增强非特异性免疫及抗氧化作用,临床用于治疗各种癌症及炎症^[1-2],且对多种耐药肿瘤细胞有效^[3]。本课题组对白花蛇舌草(HD)提取物抗肿瘤有效部位筛选研究并进行成分分析,结合文献确定有机酸类成分是 HD 抗肿瘤的活性成分之一^[4]。而关于 HD 中有机酸的提取纯化研究至今未见报道。本试验采用正交试验优选 HD 中总三萜酸的提取工艺,单因素试验考察其大孔树脂纯化工艺,为下一步研究提供试验依据。

1 材料

UV-HP8453 型紫外-可见光分度仪(美国惠普),CP2250 型微量电子天平(德国 sartoring),白花蛇舌草(HD,广东省药材公司,批号 20110101),经南方医科大学中药鉴定室张宏伟教授鉴定为茜草科耳草属植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的全草;齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110709-200505),香草醛(上海易利生物科技有限公司),HPD-862,AB-8,D101 型大孔树脂均由广州东巨试剂公司提供,试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 总三萜酸含量测定^[5] 采用香草醛-冰乙酸-高氯酸比色法。

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的齐墩果酸对照品适量,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,得 0.236 g·L⁻¹ 齐墩果酸溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备^[6] 取 HD 粗粉 20 g,加入一定体积分数的乙醇适量,回流提取一定时间,趁

热滤过,滤液浓缩至无醇味,冷却,用氢氧化钠溶液调 pH 12~13,石油醚萃取至醚层近无色,取水层,用盐酸溶液调 pH 2~3,用乙酸乙酯萃取至乙酸乙酯层无色,取乙酸乙酯层,水浴蒸干,放冷后用无水甲醇溶解并定容于 100 mL 量瓶中,即得。

2.1.3 标准曲线的制备 精密吸取对照品溶液 0.0,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,70℃水浴蒸干,精密加入 5% 香草醛-冰乙酸溶液 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,置 70℃水浴中反应 15 min,取出,置冰水中冷却 5 min,后加冰乙酸 5 mL,摇匀,静置 5 min,置紫外分光光度计中全波长扫描,发现在 550 nm 处均有最大吸收。故检测波长定为 550 nm,以吸光度(A)为横坐标,齐墩果酸质量(m)为纵坐标,得回归方程 $m = 37.77A - 0.818$ ($r = 0.9998$),线性范围 3.6875~36.875 μg。

2.2 提取工艺优选 采用单因素试验考察了乙醇体积分数、乙醇用量、回流时间及提取次数对总三萜酸提取率的影响,结果发现提取次数对提取率影响不大。故本试验选择乙醇体积分数、乙醇用量及回流时间为考察因素,精密称取 HD 粗粉 9 份,各 20 g,按 L₉(3⁴) 正交表安排试验,每个因素取 3 个水平。因素水平表见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

直观分析表明,各因素对三萜酸提取率影响的主次程度为乙醇体积分数>提取时间>乙醇用量,最佳提取工艺为 A₂D₂B₃。方差分析显示,乙醇体积分数和提取时间对提取率的影响具有显著性,而醇用量对提取率的影响无显著性。考察了工艺

表 1 HD 中总三萜酸提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A	B	C	D
	乙醇体积分数 /%	乙醇用量 /倍	空白项	提取时间 /h
1	55	10	—	1
2	75	12	—	1.5
3	85	14	—	2

表 2 HD 中总三萜酸提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	提取率 /mg·g ⁻¹
—	1	1	1	1	1.158
2	1	2	2	2	1.276
3	1	3	3	3	1.549
4	2	1	3	2	2.499
5	2	3	2	1	2.177
6	2	2	1	3	2.203
7	3	1	2	3	2.158
8	3	2	3	1	1.766
9	3	3	1	2	2.443
K ₁	3.983	5.814	5.904	5.010	
K ₂	6.879	5.245	5.610	6.218	
K ₃	6.466	6.269	5.814	5.910	
R	2.896	1.024	0.294	1.118	

表 3 提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	1.592	2	0.796	181.643	0.005
B	0.145	2	0.072	16.517	0.057
D	0.222	2	0.111	25.363	0.038
C(误差)	0.009	2	0.004		

A₂D₂B₃ 与 A₂D₂B₁ 的三萜类有机酸提取率,依次为 2.589,2.539 mg·g⁻¹,说明 2 种工艺的总三萜酸提取率差异较小。结合生产成本考虑,最终确定提取工艺为 A₂D₂B₁,即药材加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 1.5 h。按优选的提取工艺条件进行 3 次验证试验,结果总三萜酸提取率分别为 2.527,2.526,2.624 mg·g⁻¹。表明该工艺稳定可行。

2.3 大孔树脂纯化工艺优选

2.3.1 上样液的制备 同 2.1.2 项。

2.3.2 大孔吸附树脂的预处理 将 HPD-826,AB-8,D101 型树脂依次用 5% NaOH 水溶液 4 BV 浸泡 24 h,去离子水洗至中性,5% 盐酸溶液 4 BV 浸泡 24 h,去离子水冲洗至中性,乙醇浸泡 24 h,用 95% 乙

醇洗脱,至流出乙醇液与水混合不产生白色浑浊为止,用足量去离子水洗至无醇味,备用。

2.3.3 大孔树脂的筛选

2.3.3.1 静态吸附试验 准确称量 3 种处理好的树脂适量(相当于 1 g 干树脂),置具塞锥形瓶中,加入已知质量浓度的 HD 粗提液 50 mL,摇床振摇 24 h,过滤并测定滤液中总三萜酸含量,计算总三萜酸吸附量分别为 6.12,6.53,7.45 mg·g⁻¹;吸附率分别为 50.60%,62.66%,77.23%。

2.3.3.2 静态解吸附试验 取静态吸附后树脂,加 95% 乙醇 100 mL,置摇床上震摇 24 h,过滤并测定滤液中总三萜酸含量,计算解吸附率分别为 50.09%,45.81%,70.07%。

每克吸附量 = (C₀V₀ - C₁V₁)/W
吸附率 = (C₀V₀ - C₁V₁)/C₀V₀ × 100%
解吸附率 = C₂V₂/(C₀V₀ - C₁V₁) × 100%

式中 C₀ 为上样质量浓度;C₁ 为吸附后剩余液的质量浓度;C₂ 为解吸附液的质量浓度;V₀ 为上样液体积;V₁ 为吸附后剩余溶液体积;V₂ 为解吸附液体积;W 为树脂质量。

由结果可知,AB-8 型大孔树脂对 HD 中总三萜酸的分离较理想,故选择 AB-8 型树脂。

2.3.4 静态吸附时间考察 准确称取预处理好的 AB-8 型树脂(湿)5.0 g,置于 100 mL 锥形瓶中,加样品液 40 mL,摇床震摇,以药液与树脂接触时间定为 0 h,分别于上样 0,1,2,3,4,5 h 时取样,测定各时间点药液中总三萜酸含量,结果药液中总三萜酸质量浓度分别为 1.55,0.88,0.87,0.78,0.76,0.71 g·L⁻¹。AB-8 型树脂对 HD 中总三萜酸的吸附在 3 h 时基本达到平衡,表现出良好的静态吸附动力学特性。

2.3.5 静态吸附工艺参数优选 准确称取预处理好的 AB-8 型树脂(湿),每份 5.0 g,分别湿法装入(1 cm × 40 cm)具阀玻璃柱中,考察上样液流速、质量浓度、pH,洗脱剂体积分数,洗脱剂 pH 等参数对纯化 HD 总三萜酸的影响。

2.3.5.1 上样液质量浓度考察 量取已知总三萜酸质量浓度的 HD 提取液,分别用去离子水配置成不同质量浓度(0.06,0.12,0.24,0.37,0.49,0.55 g·L⁻¹)上样液,以相同速度通过树脂柱(树脂体积 30 mL)进行动态吸附试验,测得吸附率分别为 32.41%,35.37%,64.24%,41.33%,36.64%,35.07%。故选择上样液质量浓度为 0.24 g·L⁻¹。

2.3.5.2 上样流速考察 其他条件固定,0.24 g·

L⁻¹上样液分别以 0.5,1,2,3,4 BV·h⁻¹ 流速上样,测得吸附率分别为 95.63% 95.86% ,96.28% ,87.87% ,87.76% 。应选择上样流速为 2 BV·h⁻¹。

2.3.5.3 上样液 pH 考察 酸碱度可直接影响总三萜酸的存在形式,进而影响吸附效果。将 0.24 g·L⁻¹上样液调 pH 分别为 4,5,6,7,8,以 2 BV·h⁻¹ 流速上样,用相应 pH 去离子水冲柱,测得吸附率分别为 91.06% ,90.89% ,72.41% ,60.03% ,48.34% 。表明随 pH 减小,吸附率越大,当 pH 4 时,解吸附液中总三萜酸含量最高;pH≥7,吸附量急剧下降。可能与被分离成份的酸碱度有关(HD 提取物为弱酸性,pH 6.0)。综合考虑酸液对化学成分、树脂使用寿命、吸附效率的影响,确定最佳吸附 pH 为 5。

2.3.6 动态解吸附参数优化

2.3.6.1 乙醇体积分数 按优选的静态吸附工艺上样后,选取不同体积分数乙醇(40% ,50% ,60% ,70% ,80% ,90%)进行洗脱,结果解吸率分别为 45.65% ,61.27% ,67.87% ,72.64% ,83.67% ,84.52% 。说明当乙醇体积分数<80% 时,随乙醇体积分数增大,解吸率增大;之后趋于平衡。故选择 80% 乙醇。

2.3.6.2 洗脱液酸碱度 以 80% 乙醇为洗脱液,调 pH 分别为 5,6,7,8,9,测得解吸率分别为 56.64% ,60.03% ,78.95% ,78.86% ,78.63% 。说明解吸率随洗脱液 pH 增大而增加,当 pH 7 时,解吸率最大,之后趋于稳定。故洗脱液 pH 定为 7。

2.3.6.3 洗脱流速 将样品溶液按优化的吸附条件上柱吸附,淋洗,用 pH 7 的 80% 乙醇分别以 0.5,1,2,3,4,5 BV·h⁻¹ 流速洗脱,每 1BV 收集 1 次,以三氯甲烷-浓硫酸反应(Salkowski 反应)判断终点,计算洗脱液的用量分别为 4,5,7,9,10,13 BV。说明洗脱流速越快,洗脱液用量越大,当流速为 2 BV·h⁻¹,用 7 BV 即可洗脱完全,流速为 5 BV·h⁻¹ 时需 13 BV。综合考虑解吸效率和成本等因素,选择洗脱速度为 2 BV·h⁻¹。

2.4 工艺验证及放大试验 准确称量干燥白花蛇舌草粗粉 500.0 g,加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 1.5 h,过滤,滤液减压回收乙醇,制备上样液,按优化工艺进行纯化,通过 2 000 g AB-8 型树脂柱(6 cm×120 cm),测定 HD 提取物纯化前后总三萜

酸的吸光度。计算纯化前总三萜酸纯度 5.96% ,纯化后则达到 21.83% 。说明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

目前关于白花蛇舌草中总三萜酸的提取纯化工艺研究未见报道,本课题组属于首次研究。研究发现白花蛇舌草中有机酸类含量较少,过柱前对 HD 提取物进行酸碱萃取处理,可有效除掉大部分非酸性成分,使目标成分纯度升高近 3 倍,同时损失率维持在 30% ~40% ,萃取过程使用石油醚及乙酸乙酯等有机试剂,速度缓慢,且萃取不完全,有无更合理有效的前处理方法,还有待进一步探讨。

试验过程中发现,上样液和洗脱剂 pH 是影响吸附和解析的重要因素。以酸性 pH 上样,中性或碱性洗脱剂洗脱,才能达到良好分离效果。可能与 pH 对三萜酸类存在状态影响较大有关,继而推测 AB-8 型大孔树脂对分子形式的化合物吸附作用强于离子形式,而洗脱能力正好相反。在试验过程中,曾尝试强碱性阴离子交换树脂进行分离研究,结果发现离子交换树脂分离效果不理想,可能与白花蛇舌草中有机酸存在形式及酸性较弱有关。

[参考文献]

[1] Qing F H, Xie S S, Zhang W R, et al. The enhancing effect of *Hedyotis diffusa* Willd. on immunological function of mice [J]. Shanghai J Immun, 1990, 10 (6):321.

[2] Yu X, Du Z J, Chen Y Q. Studies on antioxidation effect from *Oldenlandia diffusa* Willd [J]. Food Ferment Indus, 2002,28(3):10.

[3] 于春艳,李薇,刘玉和,等. 白花蛇舌草体外对人肝癌多药耐药细胞 Bel-7402 抗肿瘤活性的研究[J]. 北京大学学报:自然科学版,2004,5(3):221.

[4] 陈康永. 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.

[5] 张雁冰,王克让,刘宏民. 马桑叶中总三萜酸的含量测定[J]. 时珍国医国药,2006,17(4):529.

[6] 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.

[责任编辑 仝燕]