

· 研究报告 ·

恩施巴戟环烯醚萜苷类成分提取工艺优选及抗氧化活性研究

段金辉^{1,2}, 刘 阳^{1,2}, 黄容吉¹, 胡 杨¹, 阮金兰^{1,2} (1. 武昌理工学院生命科学学院, 湖北 武汉 430223; 2. 武汉工程大学环境生态与生物工程学院, 湖北 武汉 430205)

[摘要] 目的 优化恩施巴戟中主要环烯醚萜苷类成分提取工艺, 评价恩施巴戟体外抗氧化活性。方法 选择经典的加热回流提取法, 以乙醇体积分数、溶剂倍量、提取时间为考察因素, 以浸膏得率和水晶兰苷含量的综合评分为评判指标, 设计正交试验筛选最佳提取工艺条件; 测定总还原能力、DPPH清除率、羟自由基清除率, 检测其体外抗氧化活性。结果 最佳提取工艺条件为6倍量的60%的乙醇加热回流2 h; 恩施巴戟具有一定的抗氧化能力, 乙酸乙酯部位活性最佳。结论 优化的提取工艺稳定可行, 可用于提取恩施巴戟的环烯醚萜苷类成分, 该研究初步证明了恩施巴戟具有一定的抗氧化活性。

[关键词] 恩施巴戟; 水晶兰苷; 正交试验; 高效液相色谱法; 抗氧化

[中图分类号] R284.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)04-0346-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.201911013

Study on extraction process and antioxidant activity of iridoid glycosides in *Damnacanthus officinarum* Huang

DUAN Jinhui^{1,2}, LIU Yang^{1,2}, HUANG Rongji¹, HU Yang¹, RUAN Jinlan^{1,2} (1. School of Life Science, Wuchang University of Technology, Wuhan 430223, China; 2. School of Environmental Ecology and Biological Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the extraction process of main iridoid glycosides in *Damnacanthus officinarum* Huang and evaluate the antioxidant activity of *Damnacanthus officinarum* Huang *in vitro*. **Methods** The classical heating-reflux extraction method was selected. The volume fraction of ethanol, the volume of solvent and extraction time were taken as the evaluation factors. The comprehensive score of extraction yield and the monotropein content were used as the evaluation indexes. An orthogonal test was designed to select the best extraction conditions. The total reducing capacity, DPPH clearance rate and hydroxyl radical scavenging rate were measured to determine its antioxidant activity *in vitro*. **Results** The optimal extraction process was the reflux with 6 times volume of 60% ethanol for 2 hours. *Damnacanthus officinarum* Huang has certain antioxidant capacity, and the activity of ethyl acetate part had the best effect. **Conclusion** The optimized extraction process is stable and feasible, which can be used for extraction of the iridoid glycosides from *Damnacanthus officinarum* Huang. This study has proved that *Damnacanthus officinarum* Huang has certain antioxidant activity.

[Key words] *Damnacanthus officinarum* Huang; Monotropein; orthogonal test; HPLC; antioxidant activity

恩施巴戟, 也叫湖北巴戟、鄂西巴戟, 系茜草科虎刺属植物四川虎刺 (*Damnacanthus officinarum* Huang) 的干燥根, 它与茜草科巴戟天属的南药巴戟天 (*Morinda officinalis* How) 在成分和功效上有诸多相似之处^[1-4], 在湖北恩施地区常被作为巴戟天的替代品用于临床^[5], 并作为土家族药材被收载进《湖北省中药材质量标准》(2009年版)^[6]。由于产地偏僻、资源贫乏等原因^[7], 使得恩施巴戟的药用价

值没有得到应有的重视和合理的开发, 应用范围十分有限, 相关研究所见甚少。为了更好地开发和利用恩施巴戟的药用价值, 本实验研究了恩施巴戟环烯醚萜苷类成分的最佳提取条件, 并对其体外抗氧化活性进行初步探讨。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪; UV-1800 紫外-可见分光光度计; BS 224 S 型万分之一天平; CPA225D 型十万分之一天平; HH-S 型水浴锅。

1.2 材料

恩施巴戟采于湖北省恩施市, 经本课题组阮金

[作者简介] 段金辉, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物药效物质基础及作用机制, Email: 474546607@qq.com

[通讯作者] 阮金兰, 教授, 博士生导师, 研究方向: 天然药物药效物质基础及作用机制, Email: jinlan8152@163.com

兰教授鉴定为茜草科虎刺属植物四川虎刺 (*Damnacanthus officinarus* Huang)的根;水晶兰苷对照品(批号:111870-201303)购自中国食品药品检定研究院;DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼,批号:W30O8E46572)购自源叶生物;甲醇、磷酸为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 水晶兰苷的含量测定^[8-10]

2.1.1 色谱条件与系统适应性试验

色谱柱:Ultimate LP-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸水溶液(5:95);检测波长:231 nm;流速1 ml/min;柱温:25 °C;进样量:5 μl。在上述条件下,供试品溶液中水晶兰苷色谱峰与其他峰分离良好,分离度大于1.5,峰形对称,保留时间约为8.5 min。理论板数按水晶兰苷峰计不低于3 000。

2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取水晶兰苷对照品9.40 mg,加水定容至10 ml,配制成0.940 mg/ml的水晶兰苷对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备

取恩施巴戟药材粗粉10.0 g,精密称定,用6倍量60%的乙醇浸泡过夜后,80 °C加热回流提取1 h,放冷过滤,滤液减压浓缩后60 °C真空干燥至恒重。浸膏以水定容至50 ml,从中取出1 ml以水稀释至25 ml,即得。

2.1.4 线性关系考察

精密吸取“2.1.2”项中对照品储备液100、200、300、400、500 μl分别加水稀释至1 ml,配成系列对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样5 μl,记录对照品的峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标,水晶兰苷的质量浓度(X, mg/ml)为横坐标,进行线性拟合,得回归方程为 $Y=5 \times 10^6 X + 11\ 555$, $r=1.000\ 0$,水晶兰苷在0.089 6~0.447 9 mg/ml范围内呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验

取同一对照品溶液按上述色谱条件连续进样6次,测定水晶兰苷峰面积,计算得峰面积RSD为0.65%,表明仪器的精密度良好。

2.1.6 重复性试验

精密称取同一恩施巴戟药材粗粉6份,按“2.1.3”项下制备供试品溶液,测得水晶兰苷峰面积,RSD为1.54%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验

取同一供试品溶液,室温放置,分别在0、2、

4、8、12、24 h后测定峰面积,RSD为0.33%,结果表明样品溶液在24 h内稳定。

2.1.8 加样回收率试验

精密吸取已知含量的供试品溶液6份,分别与已知浓度的水晶兰苷对照品溶液等体积混合,测定混合后水晶兰苷的峰面积并计算平均回收率为100.29%,RSD为0.66%。

2.2 提取工艺优化^[11-12]

本试验采用常用的加热回流提取法,结合L₉(3³)正交试验表,优选提取工艺。选择乙醇体积分数(A)、溶剂倍量(B)、提取时间(C)为考察因素,每个因素选取3个水平,以浸膏得率、水晶兰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=浸膏得率/浸膏得率最大值×30%+水晶兰苷质量分数/水晶兰苷质量分数最大值×70%。药材取样量及提取液的处理同“2.1.3”项。具体试验方案见表1,正交试验设计及结果见表2,方差分析见表3。

表1 因素水平表

水平	因素		
	A(%)	B(倍)	C(h)
1	60	6	1
2	70	8	2
3	80	10	3

表2 正交试验设计及结果

试验序号	A	B	C	浸膏得率(%)	水晶兰苷含量(%)	综合评分
1	1	1	1	6.98	1.650	0.895
2	1	2	2	7.59	1.854	0.996
3	1	3	3	7.70	1.768	0.968
4	2	1	2	7.21	1.761	0.946
5	2	2	3	6.07	1.655	0.861
6	2	3	1	6.70	1.749	0.922
7	3	1	3	5.88	1.614	0.838
8	3	2	1	5.59	1.401	0.747
9	3	3	2	5.92	1.620	0.842
K ₁	2.858	2.679	2.563			
K ₂	2.728	2.603	2.784			
K ₃	2.427	2.731	2.677			
R	0.431	0.128	0.220			

由直观分析可知,各因素对恩施巴戟环烯醚萜苷类成分提取效果的影响大小排序为A>C>B。方

表3 方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F	P
A	0.016 3	2	0.032 6	9.398 2	<0.05
B	0.001 4	2	0.002 8	0.797 7	>0.05
C	0.004 0	2	0.008 1	2.341 8	>0.05
误差	0.001 7	4			

注: $F_{0.01}(2,4)=18.00, F_{0.05}(2,4)=6.94$

差分析中发现极差最小的B因素的离均差平方和小于误差效应,故将其合并到误差效应中,用合并后的误差效应做F检验,自由度变大,灵敏度更高。分析结果显示,A因素的影响具有显著性差异,因素B和C则无显著性影响,结合生产成本等,确定最佳提取工艺为A₁B₁C₂,即6倍量的60%乙醇回流提取2h。

称取3份恩施巴戟药材粗粉,按所得最优工艺条件进行验证试验,结果浸膏得率平均值为6.93%,RSD为1.31%,水晶兰苷得率平均值为1.872%,RSD为1.06%。说明该工艺稳定可行,具有较好的提取效果。

2.3 体外抗氧化活性研究

2.3.1 不同极性样品溶液的制备

恩施巴戟提取液减压浓缩后,与硅藻土均匀拌样,分别用乙酸乙酯、正丁醇、甲醇进行固液萃取得到3个不同极性部位,减压浓缩后得到乙酸乙酯

部位(F1)、正丁醇部位(F2)、甲醇部位(F3)以及总膏(E)共4个样品。称取适量样品溶于70%的乙醇得到一定浓度的样品溶液用于后续实验。抗氧化试验均以抗坏血酸Vc作为阳性对照。

2.3.2 总还原能力测定

参照文献^[13]方法,于700nm处测定吸光度值,吸光度越高,说明还原能力越强,结果如图1。由图1可知,恩施巴戟不同极性的提取物均有不同程度的还原能力,且呈明显的量效关系。以吸光度为0.5时的样品浓度为EC₅₀,E、F1、F2、F3的EC₅₀分别为3.299、2.003、3.493、4.205mg/ml,抗坏血酸的EC₅₀为0.06792mg/ml,即各极性提取物的还原能力大小顺序为F1>E≈F2>F3,结果表明乙酸乙酯部位的还原能力最强。

2.3.3 DPPH自由基清除率测定

参照文献^[13-14]方法,测定恩施巴戟对DPPH自由基的清除能力,结果如图2。由图2可知恩施巴戟不同极性的提取物都对DPPH自由基有一定的清除能力,且呈一定的量效关系。以清除率为50%的样品浓度为EC₅₀,E、F1、F2、F3的EC₅₀分别为2.045、0.6485、1.971、2.812mg/ml,抗坏血酸的EC₅₀为0.01979mg/ml,可见恩施巴戟不同极性提取物对DPPH清除能力的大小顺序为F1>F2≈E>F3,即乙酸乙酯部位对DPPH有最佳清除效果。

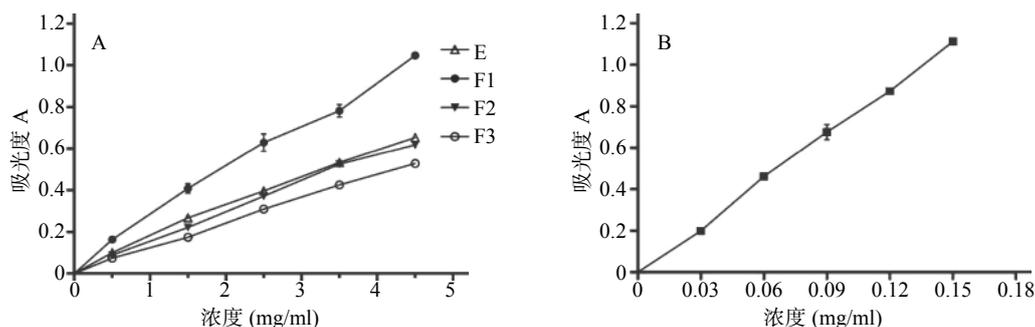


图1 恩施巴戟提取物(A)及抗坏血酸(B)的总还原能力

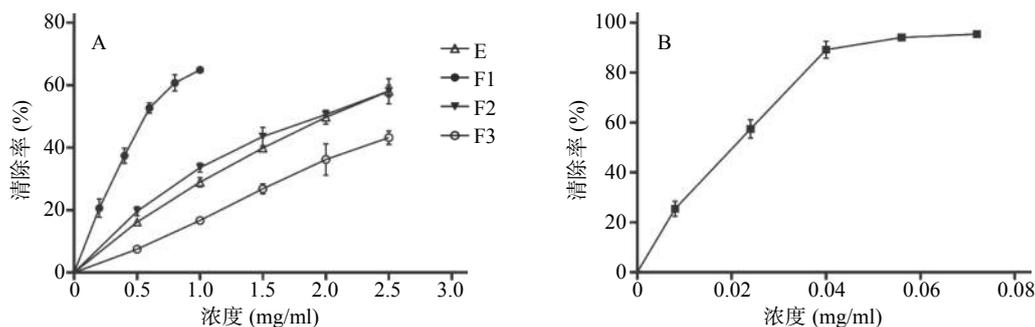


图2 恩施巴戟提取物(A)及抗坏血酸(B)对DPPH自由基的清除作用

2.3.4 羟自由基清除率测定

参照文献^[15-16]方法,并做适当改进。取1 ml不同浓度样品溶液于试管中,分别加入0.2 mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)、1.5 mmol/L邻菲罗啉、1.5 mmol/L硫酸亚铁溶液各1 ml,最后加入10 mmol/L的过氧化氢溶液1 ml,37℃水浴保温1 h,于510 nm处测定吸光度为 A_x ,样品以溶剂代替测得吸光度为 $A_{损伤}$,样品和过氧化氢均以对应溶剂代替测得吸光度为 $A_{未损伤}$ 。清除率 $= (A_x - A_{损伤}) / (A_{未损伤} - A_{损伤})$,结果如图3。由图3可知,在所选浓度范围(0.25~1.25 mg/ml)内,恩施巴戟提取物中只有F1表现出对羟自由基的清除能力,其 EC_{50} 为1.576 mg/ml,阳性对照抗坏血酸的 EC_{50} 为0.576 7 mg/ml,可见恩施巴戟提取物中仅乙酸乙酯部位对羟自由基有较好的清除效果。

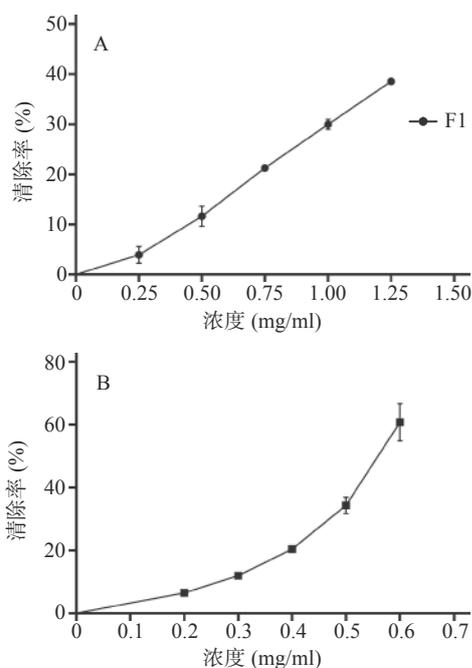


图3 恩施巴戟提取物(A)及抗坏血酸(B)对羟自由基的清除作用

3 讨论

环烯醚萜苷类物质为恩施巴戟的主要活性成分之一,本研究以水晶兰苷为指标性成分结合浸膏得率,采用综合评分,设计正交试验对加热回流过程中的几个关键因素进行了考察,确定了恩施巴戟环烯醚萜苷类成分的最佳提取工艺,同时建立了恩施巴戟中水晶兰苷含量测定的方法,为相关质量标准的建立奠定了基础。

体外抗氧化试验对恩施巴戟不同极性部位的总还原能力、清除DPPH自由基和清除羟自由基

的能力分别进行了考察,得出了较一致的结果,即恩施巴戟具有一定的抗氧化活性,且主要活性部位在乙酸乙酯部位,为恩施巴戟的活性物质基础研究和资源开发利用提供了参考。

【参考文献】

- [1] 饶鸿宇,陈滔彬,何彦,等.南药巴戟天化学成分与药理研究进展[J].中中药学,2018,16(11):1567-1574.
- [2] ZHANG J H, XIN H L, XU Y M, et al. *Morinda officinalis* How. - A comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 213: 230-255.
- [3] YANG X L, ZHANG P, WU J Z. Chemical constituents from the root of *Damnacanthus officinarum* Huang[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2014, 52: 49-52.
- [4] YANG X L, ZHANG P, WU J Z, et al. The neuroprotective and lifespan-extension activities of *Damnacanthus officinarum* extracts in *Caenorhabditis elegans*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(1): 41-47.
- [5] 杨曦亮.湖北巴戟天抗衰老化学成分及作用机制的研究[D].武汉:华中科技大学,2012.
- [6] 葛月宾,万定荣.《湖北省中药材质量标准》拟收载部分土家族药材的成分和药理研究进展[J].中南民族大学学报(自然科学版),2008,27(4):50-55.
- [7] 乔智胜,苏中武,李承祜.巴戟天应用的名实沿革考[J].广西植物,1993,13(3):252-256.
- [8] 张建华,许月明,何玉琼,等.巴戟天环烯醚萜苷类成分含量测定和提取方法的研究[J].药实践杂志,2017,35(4):328-333.
- [9] 赵明波,屠鹏飞.RP-HPLC法测定鹿衔草中水晶兰苷[J].中草药,2010,41(10):1725-1726.
- [10] 刘东阳,张雨晨,刁婷婷,等.桂籽环烯醚萜苷的提取纯化及含量测定[J].湖北科技学院学报(医学版),2018,32(3):188-191,180.
- [11] 谭朝阳,尤昭玲.茜草提取工艺的研究[J].中草药,2004,35(4):399-401.
- [12] 张轲,张东,梁彩霞,等.白花蛇舌草中环烯醚萜苷类成分的提取工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(20):38-40.
- [13] 杨阳,巫永华,陈安徽,等.黄精提取物不同极性组分的体外抗氧化活性研究[J].食品工业,2016,37(4):42-45.
- [14] 韦献雅,殷丽琴,钟成,等.DPPH法评价抗氧化活性研究进展[J].食品科学,2014,35(9):317-322.
- [15] 程艳刚,李国艳,谭金燕,等.锦鹤养心方总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性考察[J].中华中医药学刊,2018,36(5):1157-1160.
- [16] 孙兰凤,李本俊,潘琦.分光光度法测定羟自由基的捕捉剂比较研究[J].辽宁化工,2013,42(12):1503-1506.

【收稿日期】2019-11-04 【修回日期】2020-03-09

【本文编辑】陈盛新