

· 研究报告 ·

## 车前草中大车前苷的含量测定及提取工艺优选

吕昂<sup>1</sup>, 范新<sup>1</sup>, 苏倩<sup>2</sup>, 俞文英<sup>3</sup>, 余陈欢<sup>3</sup> (1. 杭州市第一人民医院药学部, 浙江 杭州 310006; 2. 杭州市妇产科医院药学部, 浙江 杭州 310008; 3. 浙江省医学科学院, 浙江 杭州 310013)

**[摘要]** 目的 建立车前草中大车前苷的含量测定方法, 并优选其提取工艺。方法 采用 HPLC 法测定大车前苷的含量, 并通过正交设计考察乙醇浓度、用量及提取时间对车前草中大车前苷提取工艺的影响。结果 大车前苷在 12.51~125.10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  浓度范围内, 线性关系良好 ( $r=0.9996$ ), 平均加样回收率为 98.57%, RSD 为 1.45%; 最佳提取工艺为 10 倍量 60% 乙醇提取 2 次, 每次 1 h。结论 本研究建立的含量测定方法简便、准确、重复性好; 优选的提取工艺稳定可行。

**[关键词]** 车前草; 大车前苷; 高效液相色谱; 提取工艺; 正交试验

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)01-0077-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.018

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

LÜ Ang<sup>1</sup>, FAN Xin<sup>1</sup>, SU Qian<sup>2</sup>, YU Wenying<sup>3</sup>, YU Chenhuan<sup>3</sup> (1. Pharmaceutical Department, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China; 2. Pharmaceutical Department, Hangzhou Obstetrics and Gynecology Hospital, Hangzhou 310008, China; 3. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a method for determination and optimize the extraction process of the content of plantamajoside in plantain. **Methods** Plantamajoside content was determined by HPLC. The effects of ethanol concentration, ethanol amount and extraction time on the extraction of plantamajoside from plantain were studied by orthogonal design. **Results** The calibration curve was linear ( $r=0.9996$ ) over the range of 12.52-125.10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The average recovery was 98.57% (RSD=1.45%). The optimum extraction process was as follows: 60% ethanol, 10 times volumes, extracted 2 times, 1 h each time. **Conclusion** The established method was simple, accurate and reproducible for determination of the content of plantamajoside in plantain. The optimal extraction process was stable and feasible.

**[Key words]** plantain; plantamajoside; HPLC; extraction process; orthogonal test

车前草又名车前、猪耳草、车轮菜、钱串草等, 为车前科植物车前 *Plantago asiatica* L. 或平车前 *Plantago depressa* Willd. 的干燥全草。作为临床常用中药, 车前草具有清热利尿、渗湿通淋、止咳化痰、凉血、解毒等功效, 用于热淋涩痛、水肿尿少、暑湿泄泻、痰热咳嗽、吐血衄血及痈肿疮毒等<sup>[1-2]</sup>。

车前草的化学成分主要包括环烯醚萜、黄酮、苯乙醇苷、多糖等<sup>[3-5]</sup>。文献报道车前草中的苯乙醇苷类成分(如大车前苷)具有抑制糖基最终产物形成<sup>[6]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>、抗炎<sup>[7]</sup>、解痉<sup>[8]</sup>等作用, 与车前草的功效相吻合, 同时, 大车前苷为车前草的专属性成

分, 在车前草中含量较高, 为车前草质量控制的指标性成分。本实验采用 HPLC 法测定车前草中大车前苷的含量<sup>[1]</sup>, 并对影响提取车前草的因素进行了考察, 通过正交试验优选出最佳提取工艺, 将其研发为中药新药提供技术支持。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(配备 LC-20AT 泵、柱温箱、SPD-20A 紫外检测器、SIL-20AC 自动进样器、LCsolution 色谱工作站, 日本岛津公司), Dikma 微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ ), Sartorius BT125s 型电子分析天平(德国赛多利斯公司), BUCHI R-210 旋转蒸发器(瑞士步琦有限公司), DK-S22 型恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司), Beckman Coulter 64R 高速离心机(贝克曼库尔特商贸(中国)

**[基金项目]** 浙江省中医药科技计划项目(2013ZA103)

**[作者简介]** 吕昂, 本科, 主管药师, 研究方向: 泌尿系统药物研究, Tel: (0571)56005600, Email: lvang3153@sina.com

**[通讯作者]** 范新, 本科, 副主任药师, 研究方向: 泌尿系统药物研究, Tel: (0571)56005600, Email: haidi20000@sina.com

有限公司)。

## 1.2 试剂

大车前苷标准品(纯度>98%,批号:20141202,南京春秋生物工程有限公司),车前草(批号:150301,浙江中医药大学中药饮片有限公司),乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯(德国 Merck 公司),水为纯化水,磷酸等其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定方法的建立

#### 2.1.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil™ C<sub>18</sub> 分析柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%甲酸水溶液(16:84);检测波长:330 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;进样量:20 μl;理论塔板数以大车前苷峰计不低于3000,大车前苷与相邻组分色谱峰分离度大于1.5;该色谱条件下的对照品与样品色谱图见图1。

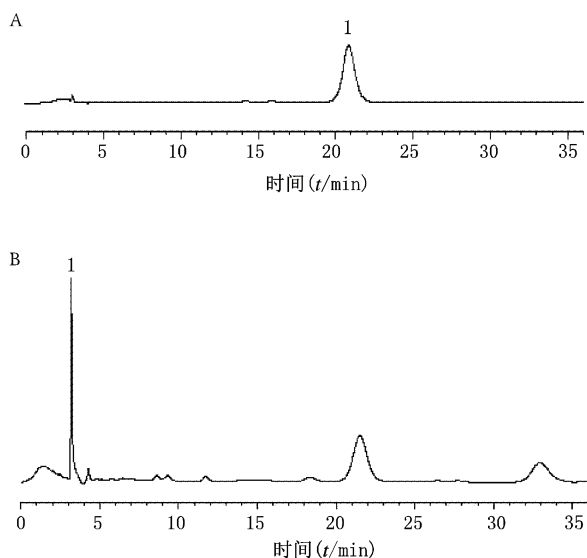


图1 大车前苷对照品(A)、车前草醇提取物(B)HPLC图

1. 大车前苷

#### 2.1.2 对照品溶液的配制

精密称取大车前苷对照品 12.51 mg,置 50 ml 棕色容量瓶中,加 60%甲醇溶解至刻度,配成浓度为 250.2 μg/ml 的对照品溶液。

#### 2.1.3 供试品溶液的制备

称取车前草饮片 10 g,置圆底烧瓶中,加入 10 倍量 70%乙醇,在恒温水浴槽中加热回流提取 3 次,每次 2 h,趁热过滤,合并提取液,并定容到一定体积,作为供试品溶液。

#### 2.1.4 线性关系考察

分别量取适量对照品储备液,加 60%甲醇稀释成浓度分别为 12.51、25.02、50.04、75.06、100.08、125.10 μg/ml 的对照品溶液,摇匀,按“2.1.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。以浓度为横坐标(X, μg/ml),峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程  $Y=15\,543X+52\,895$  ( $r=0.999\,6$ ),结果表明,大车前苷在 12.51~125.10 μg/ml 浓度范围内,有良好的线性关系。

#### 2.1.5 精密度试验

取浓度为 75.06 μg/ml 的大车前苷对照品溶液,按上述色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积,计算得大车前苷平均峰面积的 RSD 为 0.35%,表明该仪器精密度良好。

#### 2.1.6 重复性试验

取同一批车前草,平行制备 6 份供试品溶液,进样,测定峰面积,计算大车前苷含量,平均值为 12.26 mg/g, RSD 为 2.56%,表明该方法的重复性良好。

#### 2.1.7 稳定性试验

取同一批车前草饮片,制备供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,计算其峰面积的 RSD 为 0.86%,表明该样品溶液在 24 h 内稳定。

#### 2.1.8 加样回收率试验

精密称取已知大车前苷含量的样品 6 份,按含量的 1:1 加入对照品,按照上述供试品溶液的制备方法制备,测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 大车前苷的加样回收率试验结果(n=6)

原有量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
6.145	6.145	12.137	97.51	98.57	1.45
6.145	6.145	12.211	98.71		
6.145	6.145	12.325	100.57		
6.145	6.145	12.096	96.84		
6.145	6.145	12.281	99.85		
6.145	6.145	12.163	97.93		

结果表明,平均回收率为 98.57%, RSD 为 1.45%,表明该方法可靠性良好。

#### 2.1.9 样品的测定及浸膏得率计算

取适量车前草粉末,精密称定,制备供试品溶液,分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μl,按“2.1.1”项下色谱条件测定,采用外标一点法计算样品中大车前苷的含量。同时,精密吸取样品溶液 30 ml 于恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,放入烘箱中烘干至恒重,计算浸膏得率。

## 2.2 提取工艺考察

### 2.2.1 提取次数的确定

称取车前草饮片 10 g, 至圆底烧瓶中, 加 10 倍量 70%乙醇, 在恒温水浴槽中加热回流, 提取 4 次, 每次 2 h, 考察提取次数对车前苷含量的影响, 结果见表 2。

表 2 提取次数对车前草中大车前苷含量的影响

提取次数	大车前苷提取量(mg/g)
1次	6.88
2次	4.07
3次	1.31
4次	0.26

由表 2 可知, 4 次提取后, 大车前苷基本提取完全, 第 3 次提取得到的大车前苷已经很低, 以提取 4 次得到的所有大车前苷的量作为大车前苷的总含量时, 提取 2 次的大车前苷提取量为: 10.95 mg/g, 提取率达 87.5%。从工业化生产成本考虑, 提取 2 次更为经济, 因此选择提取 2 次即可。

### 2.2.2 正交试验设计和结果

采用  $L_9(3^4)$  重复正交试验设计, 以车前苷转移率和浸膏得率为评价指标, 考察乙醇浓度(A)、乙醇用量(B)、提取时间(C) 3 种因素对提取率的影响, 每种因素按照 3 个水平设计试验方案, 因素水平详见表 3。

表 3  $L_9(3^4)$  因素水平表

水平	A 因素	B 因素	C 因素
	乙醇浓度 (%)	乙醇用量(倍)	提取时间(t/h)
1	50	6	1.0
2	60	8	1.5
3	70	10	2.0

按正交表安排试验, 称取中药车前草饮片 10 g, 将称好的药材置于圆底烧瓶中, 加溶剂, 在恒温水浴槽里加热回流提取, 趁热过滤提取液, 并定容到一定体积, 得各样品溶液, 取样, 按照“2.1”项所述试验方法测定大车前苷转移率和浸膏得率, 并对试验结果进行分析, 结果见表 4~5。

表 4 正交试验方案和结果

试验序号	A	B	C	D	大车前苷转移率(%)	浸膏得率(%)
1	1	1	1	1	59.73	9.91
2	1	2	2	2	62.16	12.06
3	1	3	3	3	69.80	17.43
4	2	1	2	3	68.57	13.56
5	2	2	3	1	78.71	19.07
6	2	3	1	2	86.58	20.98
7	3	1	3	2	67.93	15.29
8	3	2	1	3	74.62	18.31
9	3	3	2	1	80.14	21.47
$K_1$	63.897	65.410	73.643	72.860		
$K_2$	77.953	71.830	70.290	72.223		
$K_3$	74.230	78.840	72.147	70.997		
极差	14.056	13.430	3.353	1.863		
$K_1$	13.133	12.920	16.400	16.817		
$K_2$	17.870	16.480	15.697	16.110		
$K_3$	18.357	19.960	17.263	16.433		
极差	5.224	7.040	1.566	0.707		

表 5 大车前苷转移率、浸膏得率方差分析表

方差来源	离均差平方和		自由度		方差		F 值		P 值	
	大车前苷转移率	浸膏得率	大车前苷转移率	浸膏得率	大车前苷转移率	浸膏得率	大车前苷转移率	浸膏得率	大车前苷转移率	浸膏得率
A	318.231	49.956	2	2	159.116	24.978	59.129	66.519	<0.05	<0.05
B	270.721	74.346	2	2	135.361	37.173	50.301	98.996	<0.05	<0.05
C	16.932	3.694	2	2	8.466	1.847	3.146	4.919		
误差	5.282	0.75	2	2	2.641					

$F_{0.05(2,2)} = 19.00$

(下转第 90 页)

- [21] KUO G M, TOUCHETTE D R, MARINAC J S. Drug errors and related interventions reported by United States clinical pharmacists: the American College of Clinical Pharmacy practice-based research network medication error detection, amelioration and prevention study [J]. *Pharmacotherapy*, 2013, 33(3):253-265.
- [22] BAO L, WANG Y, SHANG T, et al. A novel clinical pharmacy management system in improving the rational drug use in

department of general surgery[J]. *Indian J Pharm Sci*, 2013, 75(1):11-15.

- [23] YEH M L, CHANG Y J, YEH S J, et al. Potential drug-drug interactions in pediatric outpatient prescriptions for newborns and infants[J]. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 2014, 113(1): 15-22.

[收稿日期] 2018-05-08 [修回日期] 2018-10-25

[本文编辑] 陈盛新

(上接第 79 页)

由上述直观分析和方差分析结果可知,乙醇浓度、用量和提取时间这 3 种因素对车前草乙醇提取物的得率以及大车前苷转移率均有影响,其中乙醇浓度和乙醇用量的影响较为显著。从节约成本及有效成分转移率最大化原则考虑,选择 60%乙醇(A<sub>2</sub>)、10 倍量药材量(B<sub>3</sub>)、每次提取 1 h(C<sub>1</sub>)为最佳提取条件。

### 2.2.3 最佳工艺验证

取车前草药材,用 10 倍药材量的 60%乙醇提取 2 次,每次 1 h,3 次重复实验结果表明,大车前苷转移率分别为 84.77%、85.21%、86.33%,浸膏得率分别为 19.88%、21.71%、20.56%。

## 3 讨论

### 3.1 HPLC 条件的选择

在液相色谱条件优化实验中,比较了甲醇-水系统和乙腈-水系统的分离效果,结果发现乙腈-水系统的分离效果更优。由于大车前苷为弱酸性化合物,在水相中加入一定量酸后,大大改善了色谱峰的拖尾。与乙腈-0.5%磷酸水溶液相比,乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相时,色谱峰的对称性更好,拖尾因子  $\alpha=1.030$ 。在流动相比例的调整中,乙腈-0.1%甲酸水溶液从 17:83 调整到 16:84 时,样品中大车前苷的分离度得到极大改善。

### 3.2 提取方法的选择

在预实验中,以提取液中车前苷的含量和提取物的得率作为考察指标,考察了冷浸法、热回流法、超声提取法的提取效果,结果发现热回流法所提

取的指标性成分含量较高。在提取溶剂的选择上,由于苯乙醇苷类极性较大,一般选取水、乙醇、甲醇等溶剂提取,考虑到车前草在水中的提取效率较低,而溶剂甲醇的成本高、毒性大,故选择乙醇作为提取溶剂。

## 【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部): 2015 年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:69.
- [2] 张雪芹, 曲玮, 梁敬钰. 车前草化学成分和药理作用研究进展[J]. *海峡药学*, 2016, 25(11):1-8.
- [3] 杨亚军, 周秋贵, 曾红, 等. 车前草化学成分及新生物活性研究进展[J]. *中成药*, 2011, 33(10):1771-1776.
- [4] 陈家磊, 刘师旗, 冯君, 等. 车前草多糖对雏鸡新城疫疫苗免疫效果的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2015, 51(10):50-56.
- [5] 夏道宗, 刘杰尔, 陈佩佩. 车前草总黄酮清除自由基及对小鼠氧化损伤的保护作用[J]. *科技通报*, 2009, 25(6): 792-797.
- [6] CHOI S Y, JUNG S H, LEE H S, et al. Glycation inhibitory activity and the identification of an active compound in *Plantago asiatica* extract [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(3): 323-329.
- [7] WU H, ZHAO G, JIANG K, et al. Plantamajoside ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing NF- $\kappa$ B and MAPK activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 35: 315-322.
- [8] FLEER H, VERSPOHL E J. Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds[J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(6): 409-415.

[收稿日期] 2018-03-13 [修回日期] 2018-10-17

[本文编辑] 陈盛新