

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.12.016

## 垂盆草水提工艺及产地优选\*

张 芹,钱 芳<sup>△</sup>

(江苏省中医院药学部,江苏 南京 210029)

**摘要:**目的 优选垂盆草水提工艺及产地。方法 以木犀草苷、槲皮素和异鼠李素的总含量为考察指标,以加水倍数、煎煮时间、煎煮次数为考察因素,采用正交试验法优选垂盆草水提工艺;采用高效液相色谱法,测定样品中木犀草苷、槲皮素和异鼠李素含量,并计算总含量,比较不同产地12批药材样品总含量。结果 优选的水提工艺为加8倍量水,煎煮2次,每次40 min。12批样品中木犀草苷、槲皮素和异鼠李素的总含量差异较大,其中湖南郴州、邵阳所产含量较高。结论 优选的水提工艺合理可行,可用于垂盆草的提取;湖南(郴州、邵阳)产垂盆草中木犀草苷、槲皮素、异鼠李素总含量较高,可根据需要优先选用。

**关键词:**垂盆草;木犀草苷;槲皮素;异鼠李素;正交试验;水提工艺;产地

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)12-0068-05

### Optimization of Water Extraction Process and Producing Areas of Sedi Herba

ZHANG Qin, QIAN Fang

(Department of Pharmacy, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China 210029)

**Abstract: Objective** To optimize the water extraction process and producing areas of Sedi Herba. **Methods** The water extraction process of Sedi Herba was optimized by the orthogonal test with the total content of luteolin-7-O-glucoside, quercetin and isorhamnetin as the index, and with the amount of water addition, decocting time and decocting times as the factors. The contents of luteolin-7-O-glucoside, quercetin and isorhamnetin in samples were determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method, and the total contents were calculated. The total contents of luteolin-7-O-glucoside, quercetin and isorhamnetin in the 12 batches of samples from different producing areas were compared. **Results** The optimal water extraction process was as follows: adding 8 times the amount of water, decocting twice, 40 min each time. The total contents of luteolin-7-O-glucoside, quercetin and isorhamnetin in the 12 batches of samples were significantly different, among which the contents of samples produced in Chenzhou and Shaoyang of Hunan Province were higher. **Conclusion** The optimal water extraction process is reasonable and feasible, which can be used for the extraction of Sedi Herba. The total contents of luteolin-7-O-glucoside, quercetin and isorhamnetin in Sedi Herba from Chenzhou and Shaoyang of Hunan Province are relatively high, which can be selected preferentially according to needs.

**Key words:** Sedi Herba; luteolin-7-O-glucoside; quercetin; isorhamnetin; orthogonal test; water extraction process; producing areas

垂盆草为景天科垂盆草 *Sedum Sarmentosum* Bunge 的干燥全草,有清热解毒、利湿退黄功效,临床用于治疗湿热黄疸、痈肿疮疡、小便不利等<sup>[1]</sup>,对药物性肝损伤、脂肪性肝病、病毒性肝炎等肝病有独特疗效<sup>[2-3]</sup>。垂盆草含黄酮类、生物碱、三萜等化学成分<sup>[4-5]</sup>,黄酮类为其主要有效成分<sup>[6]</sup>,具有保肝<sup>[7]</sup>、抗纤维化<sup>[8]</sup>、抗氧

化<sup>[9]</sup>、抗炎<sup>[10]</sup>、抗胆汁淤积<sup>[11]</sup>等作用。垂盆草分布较广,所含化学成分受产地和采收季节影响较大<sup>[12-13]</sup>。临床应用垂盆草以汤剂为主。本研究中通过正交试验法优选垂盆草的水提工艺,同时测定不同产地垂盆草有效成分含量,为其药材资源的优选提供参考。现报道如下。

\*基金项目:南京药学会-常州四药医院药学科研基金[2018YX020]。

第一作者:张芹,女,大学本科,副主任中药师,研究方向为中药质量标准,(电子信箱)zqjsszyy@126.com。

<sup>△</sup>通信作者:钱芳,女,大学本科,主任中药师,研究方向为中药制剂和新药研发,(电子信箱)qfss1024@126.com。

- [9] 秦三海,李 坤,周 玲,等. 地榆总皂苷抗肿瘤作用的实验研究[J]. 山东医药,2010,50(15):24-26.
- [10] 段丽云,连凤梅. 地榆的临床应用及其用量探究[J]. 长春中医药大学学报,2021,37(4):749-752.
- [11] 时圣明,潘明佳,王文倩,等. 虎杖的化学成分及药理作用研究进展[J]. 药物评价研究,2016,39(2):317-321.
- [12] 林 思,秦慧真,邓玲玉,等. 虎杖苷药理作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(22):241-250.
- [13] 黄贵莲,周月广,金 鑫,等. 紫草素体外抗菌活性的实验研究[J]. 三峡大学学报(自然科学版),2017,39(S1):8-10.
- [14] 贾永利,杨新明,张培楠,等. 基于活性氧/硫氧还蛋白结合蛋白通路探讨紫草素对布鲁氏菌感染小鼠的保护作用[J]. 中国医院用药评价与分析,2021,21(7):796-799.
- [15] 钱 薇,褚明亮. 基于网络药理学方法研究紫草对癌症疾病的作用机制[J]. 中外医学研究,2021,19(27):193-196.

(收稿日期:2021-11-03;修回日期:2022-01-18)

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Agilent 1100型高效液相色谱仪(含G1322A脱气机、G1311A四元泵、G1316A柱温箱、G1314A VWD检测器、Agilent ChemStation, 美国Agilent公司); BP-211D型电子分析天平(德国Sartorius公司, 精度为0.01 mg); Millipore-Q超纯水机(美国Millipore公司)。

### 1.2 试药

木犀草苷对照品(批号为111720-201501, 含量99.30%)、槲皮素对照品(批号为100081-201610, 含量97.4%)、异鼠李素对照品(批号为110860-201611, 含量99.0%), 均购于中国食品药品检定研究院; 垂盆草饮片(编号G1-G12)来源及批号见表1, 由江苏省中医院朱育凤主任中药师鉴定为正品; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯; 水为超纯水。

表1 垂盆草样品来源及批号

Tab. 1 Source and batch numbers of Sedi Herba

编号	批号	产地	编号	批号	产地	编号	批号	产地
G1	190501	安徽亳州	G5	190903	湖北黄冈	G9	200302	安徽池州
G2	191101	安徽亳州	G6	200301	湖北宜昌	G10	191103	湖南郴州
G3	200102	江苏南京	G7	191203	陕西汉中	G11	191201	湖南邵阳
G4	191001	江苏东台	G8	200101	陕西咸阳	G12	200102	云南玉溪

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定方法建立

#### 2.1.1 色谱条件

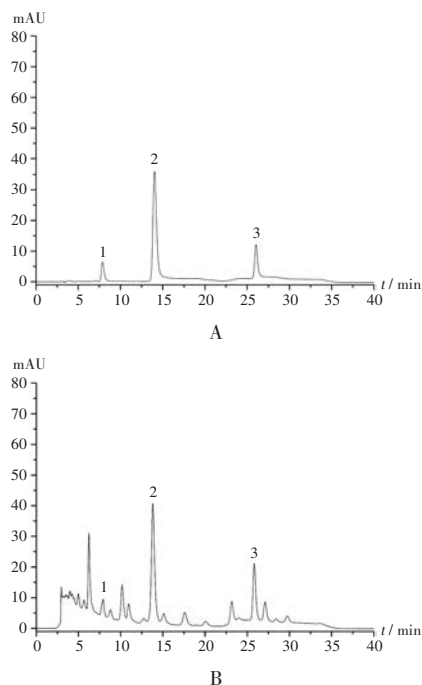
色谱柱: Phenomenex C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A) - 0.4% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~18 min时46%A, 18~20 min时46%A→55%A, 20~28 min时55%A, 28~30 min时55%A→46%A, 30~35 min时46%A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 360 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

#### 2.1.2 溶液制备

分别取木犀草苷对照品、槲皮素对照品和异鼠李素对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成每1 mL含木犀草苷20.12 μg、槲皮素61.7 μg、异鼠李素98.4 μg的单一对照品溶液。分别取各单一对照品溶液适量, 加甲醇稀释, 制成每1 mL含木犀草苷6.2875 μg、槲皮素36.634 μg、异鼠李素9.225 μg的混合对照品溶液。精密吸取垂盆草样品提取液(编号G1)1 mL, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇-25%盐酸溶液(4:1, V/V)混合液25 mL, 称定质量, 加热回流1 h, 放冷, 补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

#### 2.1.3 方法学考察

系统适用性试验: 取2.1.2项下混合对照品溶液和供试品溶液各10 μL, 按2.1.1项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果供试品溶液色谱中, 与对照品溶液相



1. 木犀草苷 2. 槲皮素 3. 异鼠李素  
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Luteolin-7-O-glucosid 2. Quercetin 3. Isorhamnetin  
A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

同位置处有相应色谱峰, 理论板数按木犀草苷、槲皮素和异鼠李素峰计均大于3 000, 分离度均大于1.5, 基线分离良好。详见图1。

线性关系考察: 精密吸取2.1.2项下混合对照品溶液3, 5, 10, 20, 30, 40 μL, 按2.1.1项下色谱条件进样测定, 以各待测成分进样量为横坐标(X, μg), 峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程, 木犀草苷为 $Y_1 = 13.245X_1 + 7.0826$  ( $r = 0.9999, n = 6$ ), 槲皮素为 $Y_2 = 126.67X_2 + 76.721$  ( $r = 0.9999, n = 6$ ), 异鼠李素为 $Y_3 = 27.355X_3 + 15.208$  ( $r = 0.9999, n = 6$ )。结果表明, 木犀草苷、槲皮素、异鼠李素进样量分别在0.0189~0.2515 μg、0.1099~1.4654 μg、0.0277~0.3690 μg范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限考察: 精密吸取混合对照品溶液适量, 分别以信噪比(S/N)为1:3和1:10时的质量浓度确定检测限和定量限。结果木犀草苷、槲皮素、异鼠李素的检测限分别为0.16, 0.12, 0.15 μg/mL, 定量限分别为0.63, 0.37, 0.46 μg/mL。

精密度试验: 精密吸取2.1.2项下混合对照品溶液适量, 按2.1.1项下色谱条件, 1 d内连续进样测定6次, 连续进样测定6 d, 记录峰面积。结果木犀草苷、槲皮素、异鼠李素日内精密度的RSD分别为0.74%,

表2 加样回收试验结果( $n=9$ )  
Tab.2 Results of the recovery test ( $n=9$ )

样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
68.71	498.78	124.93	54.32	345.52	88.56	126.15	830.24	211.72	105.74	95.93	98.00						
68.71	498.78	124.93	54.32	345.52	88.56	126.08	830.81	210.68	105.61	96.10	96.83						
68.71	498.78	124.93	54.32	345.52	88.56	125.56	826.62	210.69	104.66	94.88	96.84						
68.71	498.78	124.93	72.43	462.75	118.08	142.49	938.27	237.86	101.86	94.97	95.64						
68.71	498.78	124.93	72.43	462.75	118.08	146.06	939.65	236.94	106.79	95.27	94.86	103.46	95.89	96.65	2.57	0.78	1.45
68.71	498.78	124.93	72.43	462.75	118.08	140.71	942.02	238.56	99.41	95.78	96.23						
68.71	498.78	124.93	90.54	579.98	147.60	162.37	1059.91	270.15	103.45	96.75	98.39						
68.71	498.78	124.93	90.54	579.98	147.60	162.86	1058.12	270.01	103.99	96.44	98.29						
68.71	498.78	124.93	90.54	579.98	147.60	158.88	1060.96	264.75	99.59	96.93	94.73						

注:A为木犀草苷,B为槲皮素,C为异鼠李素。

Note:A is luteolin-7-O-glucoside,B is quercetin,and C is isorhamnetin.

0.58%,0.50% ( $n=6$ ),日间精密度的RSD分别为0.98%,1.01%,0.62% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液(编号G1),分别于室温下放置0,2,4,6,8,12 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果木犀草苷、槲皮素、异鼠李素峰面积的RSD分别为1.33%,1.27%,1.05% ( $n=6$ )。表明供试品溶液在室温下放置12 h内基本稳定。

重复性试验:精密吸取样品提取液(G1)适量,共6份,按2.1.2项下制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果木犀草苷、槲皮素、异鼠李素峰面积的RSD分别为1.46%,1.19%,1.77% ( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一供试品溶液(编号G1),分别加入不同质量浓度的木犀草苷、槲皮素、异鼠李素对照品溶液适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率。结果见表2。

## 2.2 正交试验

### 2.2.1 试验设计

以煎煮时间(因素A)、煎煮次数(因素B)、加水量(因素C)为考察因素,以木犀草苷、槲皮素、异鼠李素的总含量为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法,优选垂盆草水煎煮提取工艺。因素与水平见表3。

表3 因素与水平

Tab.3 Factors and levels

水平	因素A(min)	因素B(次)	因素C(倍)
1	30	1	8
2	40	2	10
3	60	3	12

### 2.2.2 试验结果

正交试验结果见表4,方差分析结果见表5。可见,仅因素B对结果有显著影响,影响强度为 $B > A > C$ ,最佳提取工艺为 $A_2B_3C_1$ ,即加8倍量水,煎煮3次,每次40 min。从节约能源和结合实际考虑,将煎煮次数减为2次。

表4  $L_9(3^4)$ 正交试验结果( $n=9$ )

Tab.4 Results of the  $L_9(3^4)$  orthogonal test ( $n=9$ )

序号	因素				含量( $\mu\text{g/g}$ )			
	A	B	C	D(空白)	木犀草苷	槲皮素	异鼠李素	总含量
1	1	1	1	1	28.34	167.23	80.11	275.68
2	1	2	2	2	54.17	228.97	106.63	389.77
3	1	3	3	3	59.92	290.04	126.72	476.68
4	2	1	2	3	33.93	209.60	94.42	337.95
5	2	2	3	1	71.21	402.54	183.78	657.53
6	2	3	1	2	82.57	400.16	183.75	666.48
7	3	1	3	2	42.07	222.34	102.53	366.94
8	3	2	1	3	62.68	401.59	183.28	647.55
9	3	3	2	1	71.81	397.62	175.11	644.54
$K_1$	1142.13	980.57	1589.71	1577.75				
$K_2$	1661.96	1694.85	1372.26	1423.19				
$K_3$	1659.03	1787.70	1501.15	1462.18				
R	173.28	269.04	72.48	51.52				

表5 方差分析结果

Tab.5 Results of ANOVA

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P
A	59 713.46	2	29 856.73	13.86	> 0.05
B	130 029.42	2	65 014.71	30.19	< 0.05
C	7 971.14	2	3 985.57	1.85	> 0.05
D	4 307.11	2	2 153.56		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00, F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

Note: $F_{0.05}(2,2) = 19.00, F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

### 2.2.3 验证试验

取样品(编号G1)50 g,精密称定,共3份,按上述优选的工艺提取。结果木犀草苷、槲皮素、异鼠李素总含量的RSD小于1.10%,表明此水提工艺可行。详见表6。

表6 验证试验结果( $\mu\text{g/g}$ ,  $n=3$ )

Tab. 6 Results of the verification test ( $\mu\text{g/g}$ ,  $n=3$ )

指标	1	2	3	$\bar{X}$	RSD(%)
木犀草苷含量	68.89	66.14	67.47	67.50	2.04
槲皮素含量	405.15	398.74	393.21	399.03	1.50
异鼠李素含量	185.25	189.76	184.69	186.57	1.49
总含量	659.29	654.64	645.37	653.10	1.09

### 2.3 样品含量测定

取12批次样品各适量,按优选工艺提取,得提取液样品,再按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项色谱条件进样测定,记录峰面积。并计算木犀草苷、槲皮素、异鼠李素总含量,平行测定3次。可见,编号G10, G11提取液样品中3种成分总含量较大。详见表7。

表7 样品含量测定结果( $\mu\text{g/g}$ ,  $n=3$ )

Tab. 7 Results of content determination of luteolin-7-O-glucoside, quercetin and isorhamnetin in samples ( $\mu\text{g/g}$ ,  $n=3$ )

编号	木犀草苷含量	槲皮素含量	异鼠李素含量	总含量
G1	69.14	402.48	188.23	659.85
G2	65.72	461.26	117.29	644.27
G3	76.44	532.52	57.33	666.29
G4	24.36	371.56	51.84	447.76
G5	84.93	490.77	104.69	680.39
G6	33.59	165.98	89.80	289.37
G7	36.59	245.76	92.44	374.80
G8	52.87	329.75	269.58	652.21
G9	63.37	252.92	107.54	423.82
G10	159.01	673.65	87.43	920.09
G11	39.38	547.55	263.14	850.07
G12	15.74	117.01	128.52	261.27

## 3 讨论

### 3.1 指标成分选择

垂盆草含有黄酮类、三萜类等化学成分,槲皮素、木犀草苷、异鼠李素为黄酮类主要化学成分。木犀草苷有调节胆固醇水平、抗炎、抗病毒等作用<sup>[14]</sup>,槲皮素有抗炎、抗菌、抗癌等作用,以三者为指标成分,可有效控制垂盆草药材的质量,以保证疗效<sup>[15-16]</sup>。

### 3.2 洗脱条件选择

本研究中参考2020年版《中国药典(一部)》<sup>[17]</sup>方法,在色谱条件中以甲醇-0.4%磷酸溶液(45:55, V/V)为流动相等度洗脱,但发现色谱峰不能完全分离。改为

梯度洗脱后色谱峰分离较好,故选择梯度洗脱。

### 3.3 耐用性考察

预试验中曾使用Phenomenex C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、Amethyst C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、Hedera C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )测定样品含量,结果表明,色谱条件在一定范围内调整,含量均无明显差异。

### 3.4 水煎煮工艺

垂盆草临床应用多为汤剂,根据药材性质以及为保持传统汤剂的有效成分,多以煎煮制成<sup>[18]</sup>。其影响因素主要有浸泡时间、加水量、煎煮时间和煎煮次数等<sup>[19-20]</sup>,采用正交试验法逐一优化水提工艺<sup>[21]</sup>。1)浸泡时间,预试验中考察了样品浸泡0, 30, 60, 90 min,发现浸泡与否对试验结果无明显影响,故正交试验时选择药材不浸泡。2)加水倍数,考察了加6, 8, 10, 12倍量水,发现加6倍量水时指标成分含量略低,而根据方差分析结果来看,加水量对试验结果无显著影响,加8倍量水含量最高,且更节约资源。因此,选择加8倍量水。3)煎煮时间,根据药材性质,选择煎煮时间为30, 40, 60 min,结果表明煎煮时间对试验结果无显著影响,以煎煮40 min时含量最高,故选择煎煮40 min。4)煎煮次数,选择煎煮次数为1, 2, 3次进行试验,结果发现,由煎煮1次的效果明显劣于2次或3次,而煎煮2次与3次时样品含量差异较小。从节约能源和生产实际考虑,选择煎煮2次。验证试验结果表明优选的工艺合理、可行。

### 3.5 不同产地药材样品含量测定

中药材的成分含量不同,会影响临床药效。不同产地垂盆草中木犀草苷、槲皮素、异鼠李素的含量存在较大差异,可能与产地的地理环境、雨水量、温度及采收加工等因素有关。本研究中发现,湖南(郴州、邵阳)产垂盆草样品含量较高,可根据实际情况按需选择。

综上所述,本研究中优选的水提工艺合理可行,可用于垂盆草的煎煮提取。湖南(郴州、邵阳)产垂盆草药材中木犀草苷、槲皮素、异鼠李素总含量较高,可根据需要优先选用。

### 参考文献

- [1] 霍 铭,袁继承. 垂盆草水提取物与醇提取物对腹腔肿瘤模型小鼠的抑癌作用[J]. 西部中医药, 2020, 33(2): 15-17.
- [2] 董亚男,陈逸云,叶青艳,等. 不同剂型的垂盆草对急性肝损伤大鼠的防治作用[J]. 药物评价研究, 2013, 36(6): 426-430.
- [3] 向华夏,康 权. 垂盆草苷对幼龄肝内胆汁淤积大鼠的作用机制[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(1): 84-91.
- [4] 江 涛,李 铁. 垂盆草本草考证[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(1): 100-101.
- [5] 李慧娟,杜成林,李 娜,等. 垂盆草的化学成分分离鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 76-80.