

杜仲叶中有效成分的闪式提取工艺优选

陈海莉¹, 张峰^{1,2,3}, 徐婧¹, 张京京¹, 许兰波¹, 李钦^{1,2,3*}

(1. 河南大学药学院, 河南 开封 475004; 2. 河南大学杜仲栽培与应用河南省工程实验室, 河南 开封 475004; 3. 河南大学中药研究所, 河南 开封 475004)

[摘要] 目的: 优选杜仲叶中有效成分的闪式提取工艺。方法: 采用 HPLC 测定绿原酸和京尼平苷酸含量, 流动相甲醇-水-冰乙酸(15:85:1), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 237 nm。以绿原酸和京尼平苷酸提取率为评价指标, 在单因素试验基础上, 通过正交试验考察乙醇体积分数、提取次数、提取时间、料液比对杜仲叶闪式提取工艺的影响。结果: 最佳提取工艺条件为加 25 倍量 70% 乙醇提取 3 次, 每次 6 min; 绿原酸、京尼平苷酸提取率分别为 1.82%、0.47%。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 为杜仲叶的资源开发提供参考。

[关键词] 杜仲叶; 绿原酸; 京尼平苷酸; 闪式提取法

[中图分类号] R284.2; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0019-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190019

Optimization of Flash Extraction Process of Active Ingredients from *Eucommiae Folium*

CHEN Hai-li¹, ZHANG Feng^{1,2,3}, XU Jing¹, ZHANG Jing-jing¹, XU Lan-bo¹, LI Qin^{1,2,3*}

(1. Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. Engineering Laboratory of Henan Province for *Eucommia ulmoides* Cultivation and Utilization, Kaifeng 475004, China; 3. Institute of Chinese Medicine of Henan University, Kaifeng 475004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize flash extraction process of active components from *Eucommiae Folium*. **Method:** HPLC was employed to determine contents of chlorogenic acid and geniposidic acid with mobile phase of methanol-water-glacial acetic acid (15:85:1), flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelength at 237 nm. Taking yields of chlorogenic acid and geniposidic acid as index, based on single factor tests, orthogonal test was adopted to optimize extraction process with ethanol concentration, liquid-solid ratio, extracting time and times as factors. **Result:** Optimal process conditions were as follows: extracted thrice with 25 times the amount of 70% ethanol for 6 min each time; yields of chlorogenic acid and geniposidic acid were 1.82% and 0.47%, respectively. **Conclusion:** This optimized process is simple, accurate and suitable for extracting active ingredients from *Eucommiae Folium*.

[Key words] *Eucommiae Folium*; chlorogenic acid; geniposidic acid; flash extraction

杜仲主要分布于长江中游及南部各省, 陕西、甘肃、河南等地亦有栽培^[1], 以干燥树皮入药。杜仲皮具有补肝肾、强筋骨、调血压等功效, 尤其对高血压具有独特疗效^[2-7], 但资源较为稀缺。杜仲叶的

药用有效成分与杜仲皮基本相同, 药用功能基本一致^[8], 故实际生产中常以杜仲叶代替杜仲皮入药。杜仲叶有效成分的提取主要采用加热回流法和超声波法。闪式提取法具有快速高效、节省能源的特点,

[收稿日期] 20140224(017)

[基金项目] 国家公益性行业专项基金项目(201004029)

[第一作者] 陈海莉, 在读硕士, 从事中药质量控制与新药开发研究, Tel:15203976367, E-mail: ccchenhaili@163.com

[通讯作者] *李钦, 博士, 教授, 从事中药质量控制和中药新药研究, Tel:15903785982, E-mail: liqin@henu.edu.cn

与传统提取方法相比具有显著优势。故本实验采用闪式法提取杜仲叶中绿原酸和京尼平苷酸,通过正交试验优化提取工艺,为杜仲叶有效成分的资源利用提供参考。

1 材料

JHBE-50A 型闪式提取器(北京金鼎科技发展有限公司),JHBE-50S 型闪式提取控制器(北京金鼎科技发展有限公司),1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦),AG135 型 1/100 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

杜仲叶由国家林业局泡桐研究开发中心提供,经河南大学药学院李钦教授鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的叶;绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110753-200212),京尼平苷酸对照品(日本和光纯药业株式会社,批号 PER2862),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Thermo Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水-冰乙酸(15:85:1),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 237 nm,柱温 25 °C^[9],进样量 5 μL,见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取京尼平苷酸、绿原酸对照品 1.77, 1.83 mg,置于同一 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,即得。

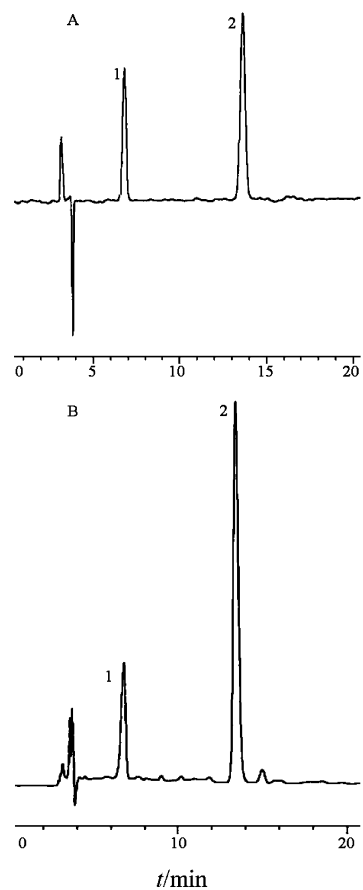
2.3 供试品溶液的制备 精密称取杜仲叶 20 g,置于提取容器瓶中,加入一定量提取溶剂,闪氏提取 6 min,滤过,滤液减压浓缩后置于 100 mL 量瓶中,加相应提取溶剂定容,即得。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取绿原酸、京尼平苷酸的混合对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6 μL,按 2.1 项下方法测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程分别为 $Y = 2\ 029.9X - 6.420$ ($r = 0.999\ 8$), $Y = 2\ 010.8X + 17.413$ ($r = 0.999\ 8$),线性范围依次为 0.183 ~ 1.098, 0.177 ~ 1.062 μg。

2.5 重复性试验 取杜仲叶 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下方法测定,计算绿原酸、京尼平苷酸峰面积的 RSD 分别为 1.45%, 1.31%,表明该方法重复性良好。

2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 按 2.1 项下方法测定,计算绿原酸、京尼平苷酸峰面积的 RSD 分别为 1.62%, 1.75%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验 精密移取已知含量的提取液 6 份,每份 1 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,各加入



A. 对照品; B. 供试品; 1. 京尼平苷酸; 2. 绿原酸
图 1 杜仲叶提取液 HPLC

2.2 项下混合对照品溶液 1 mL,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下方法测定,计算绿原酸和京尼平苷酸加样回收率分别为 99.60%, 98.86%, RSD 分别为 1.64%, 1.32%。

2.8 单因素试验考察^[10]

2.8.1 乙醇体积分数 精密称取杜仲叶 6 份,每份 20 g,分别置于不同提取容器中,加入 25 倍量 0, 20%, 40%, 60%, 80%, 95% 的乙醇溶液闪式提取 6 min,按 2.1 项下方法测定,计算提取率,绿原酸分别为 1.42%, 1.26%, 1.62%, 1.34%, 1.65%, 0.59%, 京尼平苷酸分别为 0.43%, 0.36%, 0.54%, 0.42%, 0.58%, 0.31%,说明乙醇体积分数对杜仲叶提取工艺的影响较大,80% 乙醇的提取效果最佳。

2.8.2 料液比 精密称取杜仲叶 5 份,每份 20 g,分别按料液比 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40 加入 80% 乙醇闪式提取 6 min,按 2.1 项下方法测定,计算提取率,绿原酸分别为 1.19%, 1.65%, 1.43%, 1.29%, 1.39%, 京尼平苷酸分别为 0.33%, 0.57%, 0.45%, 0.39%, 0.42%,说明料液比 1:25

时提取效果最好。

2.8.3 提取时间 精密称取杜仲叶 5 份,每份 20 g,分别加 25 倍量 80% 乙醇闪式提取 2,4,6,8,10 min,按 2.1 项下方法测定,计算提取率,绿原酸分别为 0.94%,1.29%,1.65%,1.29%,1.37%,京尼平苷酸分别为 0.28%,0.34%,0.58%,0.41%,0.40%,故选择提取时间 6 min。

2.8.4 提取次数 精密称取杜仲叶 5 份,每份 20 g,分别加入 25 倍量 80% 乙醇闪式提取 1,2,3,

4,5 次,每次 6 min,按 2.1 项下方法测定,计算提取率,绿原酸分别为 1.65%,1.80%,1.82%,1.83%,1.82%,京尼平苷酸分别为 0.58%,0.62%,0.63%,0.62%,0.63%,故提取数选择 2 次。

2.9 正交试验优选 在单因素试验基础上,选择乙醇体积分数、提取次数、提取时间、料液比为考察因素,绿原酸、京尼平苷酸提取率为评价指标,称取杜仲叶 9 份,每份 20 g,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

表 1 杜仲叶闪式提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 提取数/次	B 提取时间/min	C 料液比	D 乙醇体积分数/%	绿原酸/%	京尼平苷酸/%
1	1	4	1:20	70	1.50	0.39
2	1	6	1:25	80	1.49	0.42
3	1	8	1:30	90	1.09	0.37
4	2	4	1:25	90	1.19	0.33
5	2	6	1:30	70	1.52	0.40
6	2	8	1:20	80	1.49	0.34
7	3	4	1:30	80	1.67	0.41
8	3	6	1:20	90	1.34	0.39
9	3	8	1:25	70	1.82	0.47
绿原酸	K_1	1.360	1.453	1.443	1.613	
	K_2	1.400	1.450	1.500	1.550	
	K_3	1.610	1.467	1.427	1.207	
	R	0.250	0.017	0.073	0.406	
京尼平苷酸	K_1	0.393	0.377	0.373	0.420	
	K_2	0.357	0.403	0.407	0.393	
	K_3	0.423	0.393	0.393	0.363	
	R	0.066	0.026	0.034	0.057	

表 2 提取工艺方差分析

评价指标	方差来源	SS	F	P
绿原酸	A	0.11	231.86	<0.01
	B(误差)	0.00	1.00	
	C	0.01	19.00	0.05
	D	0.29	615.57	<0.01
京尼平苷酸	A	0.007	5.42	>0.05
	B(误差)	0.001	1.00	
	C	0.002	1.47	>0.05
	D	0.005	3.00	>0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,影响绿原酸提取率的因素排序分别为 $D > A > C > B$;以极差最小的因素 B 为误差项进行方差分析,发现因素 C 具有显著性影响,因素 A, D 具有极显著性影响,最佳提取工艺为 $A_3B_3C_2D_1$,提取次数为 3 次,提取时间为 8 min,料液比为 1:25,70% 乙醇提取。影响京尼平苷酸提取率

的因素依次为 $A > D > C > B$;以极差最小的因素 B 为误差项进行方差分析,发现各因素均无显著性影响,最佳提取工艺为 $A_3B_2C_2D_1$,即提取数 3 次,提取时间 6 min,料液比 1:25,乙醇体积分数 70%。

2.10 验证试验 称取杜仲叶 20 g,共 3 份,按最佳工艺条件进行 3 次验证性试验,结果绿原酸、京尼平苷酸平均提取率分别为 1.82%,0.47%,RSD 依次为 0.82%,0.93%,表明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

预试验比较了闪式、回流、超声波法共 3 种方法对杜仲叶有效成分提取率的影响,结果绿原酸提取率分别为 1.76%,1.63%,1.68%,京尼平苷酸的提取率分别为 0.60%,0.58%,0.59%,发现闪式提取效果较好。同时回流法受热长、效率低、成分容易破坏;超声波法耗时较长;而闪式提取具有效率高、提取时间短、提取速度快等优势,常温操作即可,可保护成分被破坏。闪式提取器是以组织破碎原理为基

野菊花总黄酮生物黏附双层缓释贴片中 蒙花苷体外释放与黏膜渗透考察

段晓颖^{1*}, 马秋莹², 闫艳仓², 程远方², 翟海容²

(1. 河南中医学院第一附属医院, 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 郑州 450000;

2. 河南中医学院药学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:考察野菊花总黄酮生物黏附双层缓释贴片中蒙花苷的体外释放规律与体外透膜机制。方法:选择蒙花苷为指标成分,考察野菊花总黄酮生物黏附双层缓释贴片的体外释放规律;采用牛蛙的腹皮,通过透皮扩散试验探索药物的透膜机制。结果:体外释放和黏膜渗透的拟合方程分别为 $\ln Q = 1.387 \ln t - 0.461$ ($r = 0.990$), $\ln Q = 0.969 \ln t + 3.240$ ($r = 0.9943$), 均符合 Ritger-Peppas 方程,该制剂在释放介质中释药体系为 Fick 扩散和凝胶骨架溶蚀的协同作用。结论:该缓释贴片的释药性较好且具有一定黏膜透过性。

[关键词] 野菊花总黄酮;生物黏附剂;双层缓释贴片;体外释放度;黏膜透过性

[中图分类号] R283.6;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0022-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190022

Investigation of *in vitro* Release and Mucosal Permeability of Linarin in Chrysanthemi Indici Flos Total Flavonoids Bioadhesive Bilayer Sustained-release Patches

DUAN Xiao-ying^{1*}, MA Qiu-ying², YAN Yan-cang², CHENG Yuan-fang², ZHAI Hai-rong²

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM),

[收稿日期] 20140210(014)

[基金项目] 郑州市科技攻关计划项目(10PTGS485-3)

[通讯作者] *段晓颖,主任药师,硕士生导师,从事中药新剂型新技术与新药研究, Tel:0371-66233639, E-mail:dxy137@sina.com

础,在室温及溶剂存在下数秒钟内把物料破碎至细微颗粒,使有效成分迅速达到平衡,通过过滤达到提取目的,能最大限度保留有效成分。除本文选择的指标成分外,杜仲叶中主要有效成分还有京尼平苷,但其含量较低,故未作为评价指标。

[参考文献]

[1] 张康健,王蓝,马柏林,等. 中国杜仲次生代谢物[M]. 北京:科学出版社,2002:3.

[2] 王军宪,郝秀华,雷海民,等. 杜仲叶化学成分研究[J]. 西北药学杂志,1996,11(增刊):13.

[3] 尉芹,王冬梅,马希汉,等. 杜仲叶总黄酮含量测定方法研究[J]. 西北农业科技大学学报:自然科学版,2001,29(5):110.

[4] Kim H Y, Moon B H, Lee H J, et al. Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 93

(2):227.

[5] 付佳明,万茵,张硕,等. 杜仲叶总黄酮超临界流体提取工艺优化及其成分的液质联用分析[J]. 食品科学,2007,28(12):128.

[6] 彭金年,刘丽华,程庚金生,等. 杜仲叶中杜仲醇含量的季节变化研究[J]. 赣南医学院学报,2009,29(4):494.

[7] 巩江,倪士峰,路锋,等. 杜仲叶挥发物质气相色谱-质谱研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(17):8998.

[8] 袁天翊,方莲花,吕扬,等. 杜仲叶的药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(6):781.

[9] 孙彦超,李钦,杜红岩,等. RP-HPLC 法测定杜仲叶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的含量[J]. 中成药,2009,31(10):1608.

[10] 兰小艳,黄敏,张学俊. 杜仲叶中绿原酸醇提法的工艺研究[J]. 中国农学通报,2009,25(18):84.

[责任编辑 刘德文]