

马甲子鲜叶干燥方法及提取工艺参数考察

武蕊娟^{1,2}, 詹雁², 谭镭², 阮佳², 徐超群^{2*}

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 四川省中医药科学院, 成都 610041)

[摘要] **目的:**研究不同干燥方法对马甲子鲜叶中抗肿瘤活性成分的影响,并优化其提取工艺参数。**方法:**采用 HPLC-ELSD 测定马甲子素和白桦脂酸的含量,流动相乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~10 min,55% A;10~35 min,55%~100% A),检测波长 320 nm。考察不同干燥方法对马甲子药材中有效成分含量的影响;以马甲子素和白桦脂酸提取量的综合评分为指标,通过正交试验考察乙醇体积分数、乙醇用量和提取时间对有效成分提取工艺的影响。**结果:**冷冻干燥和阴干法处理时,白桦脂酸和马甲子素的保存效果较好。最佳提取工艺为加 4 倍量 95% 乙醇冷浸提取 2 次,每次 48 h;此工艺下测得冷冻干燥样品中白桦脂酸和马甲子素平均质量分数分别为 4.61,0.077 4 mg·g⁻¹。**结论:**马甲子的干燥方法适宜采用冷冻干燥法,但考虑大生产成本,建议选择阴干法。优化的提取工艺稳定合理、有效成分提取率高,为马甲子药材资源的开发利用提供参考。

[关键词] 马甲子;白桦脂酸;马甲子素;抗肿瘤活性;冷冻干燥

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0032-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016080032

Investigation of Drying Methods and Extraction Process on Fresh Leaves of *Paliurus ramosissimus*

WU Rui-juan^{1,2}, ZHAN Yan², TAN Lei², RUAN Jia², XU Chao-qun^{2*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate influence of different drying method on contents of antitumor ingredients in fresh leaves of *Paliurus ramosissimus* and optimize its extraction process. **Method:** HPLC-ELSD was adopted to determine contents of betulinic acid and paliurusene with mobile phase of 1% formic acid-acetonitrile with gradient elution and detection wavelength of 320 nm. Take comprehensive score of contents of betulinic acid and paliurusene as index, orthogonal test was adopted to optimize extraction process with ethanol concentration, ethanol consumption and extracting time as factors. **Result:** It was better for conservation of betulinic acid and paliurusene by freeze drying and drying in shade. Optimal extraction conditions was as follows: extracted twice with 4 times the amount of 95% ethanol, 48 h for per time; yield of betulinic acid and paliurusene were up to 4.61, 0.077 4 mg·g⁻¹. **Conclusion:** Freeze drying is the best drying method for *P. ramosissimus*, but considering cost and mass production, drying in shade is better. This optimized extraction process is stable and reasonable with high yield of active constituents. It can provide a reference for development and utilization of *P. ramosissimus*.

[Key words] *Paliurus ramosissimus*; betulinic acid; paliurusene; antitumor activity; freeze drying

[收稿日期] 20150724(002)

[基金项目] 四川省科技支撑计划项目(15ZC1978);四川省科研院所科技成果转化项目(14010139);四川省公益性科研院所基本科研业务专项

[第一作者] 武蕊娟,在读硕士,从事中药新药与新型给药系统研究,Tel:18384256141,E-mail:344354319@qq.com

[通讯作者] *徐超群,博士,研究员,从事中药新药与新型给药系统研究,Tel:028-85213973,E-mail:chaoqun_xu@sina.com

马甲子又名铁篱笆等,《中药大辞典》及地方《药物志》均记载其叶有清热解毒的功效,外敷治眼热疼痛、痈疽溃脓,内服治疗无名肿痛^[1-2]。前期研究发现马甲子提取物具有抗肿瘤、调节免疫等作用,且安全性良好^[3-4]。目前已经从马甲子中分离得到2个单体成分,经鉴定其中之一为已知成分白桦脂酸,另一成分为未知成分,2 α ,27-二反式对羟基肉桂酰氧基-白桦脂酸,命名为马甲子素^[5],二者均属于五环三萜类化合物,体内外试验表明二者均具有明显的抗肿瘤活性^[6-7]。前期研究发现马甲子鲜品和干品的生物活性存在明显差异。进一步研究结果显示马甲子的生物活性与化学成分存在相关性。干品的部分化学成分含量明显低于鲜品,因此有必要全面研究干燥方法对药材中有效成分的影响,并考察马甲子的提取工艺,为该药材的临床应用提供参考。

1 材料

1200系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),3300型蒸发光散射检测器(Alltech),BS210S型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司),超越系列专业型XS分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),Y30s-657444-ZS型真空冷冻干燥仪(赛默飞世尔科技公司)。多年生马甲子于2014年7月采自四川省双流县牧马山,经四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定为鼠李科马甲子属植物马甲子 *Paliurus ramosissimus* 的鲜叶,白桦脂酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号111802-201001),马甲子素对照品(成都普瑞法科技开发有限公司,批号14070109),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

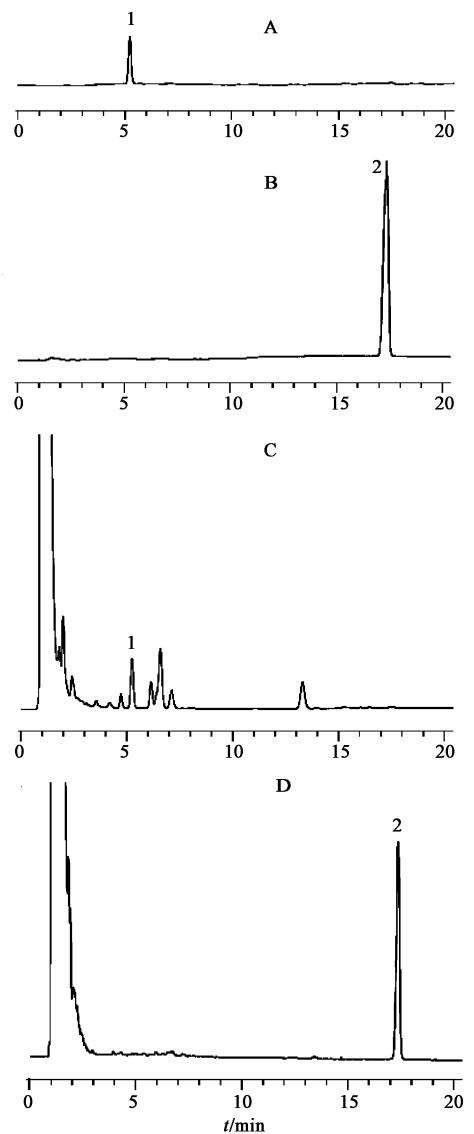
2 方法与结果

2.1 马甲子素和白桦脂酸的含量测定

2.1.1 色谱条件 BDS-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 2.4 μ m),流动相乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 55% A; 10~35 min, 55%~100% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μ L,柱温 30 $^{\circ}$ C,检测波长 320 nm,ELSD 漂移管温度 60 $^{\circ}$ C,载气流速 1.5 L·min⁻¹。见图1。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取马甲子素、白桦脂酸对照品 1.068, 4.040 mg, 分别置于不同 10 mL量瓶中,加无水乙醇制成质量浓度分别为 0.106 8, 0.404 0 g·L⁻¹的对照品贮备液。

2.1.3 供试品溶液的配制 精密称取马甲子药材粉末(过4号筛)约1g(按收率折合成鲜叶)置于10 mL量瓶中,加无水乙醇超声15 min并定容,摇匀,经0.22 μ m微孔滤膜滤过,即得。



A, B. 对照品; C, D. 供试品; 1. 马甲子素; 2. 白桦脂酸

图1 马甲子 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Paliurus ramosissimus*

2.1.4 标准曲线的绘制 精密移取 2.1.2 项下马甲子素、白桦脂酸对照品溶液,使马甲子素对照品溶液进样量分别为 0.021 4, 0.053 4, 0.106 8, 0.213 6, 0.534 0, 0.854 4 μ g,以进样量对峰面积进行线性回归;白桦脂酸对照品溶液进样量分别为 0.505, 1.01, 2.02, 3.03, 4.04, 7.07 μ g,以进样量自然对数对峰面积自然对数进行线性回归。得回归方程依次为 $Y = 2.396 \times 10^3 X - 4.758$ ($r = 0.9999$), $Y = 1.240X + 2.159$ ($r = 0.9994$),线性范围依次为 0.021 4~0.854 4, 0.505~7.07 μ g。

2.1.5 精密度试验 精密移取 2.1.2 项下马甲子素、白桦脂酸对照品溶液适量,按 2.1.1 项下色谱条件重复进样 6 次,计算马甲子素、白桦脂酸峰面积的

RSD 依次为 0.7%, 1.1%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批冷冻干燥样品 6 份, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 结果白桦脂酸和马甲子素的平均质量分数分别为 4.79, 0.075 mg·g⁻¹, RSD 依次为 1.0% 和 0.9%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取同一批冷冻干燥样品溶液, 分别于室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 后按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算马甲子素和白桦脂酸峰面积的 RSD 分别为 1.0% 和 1.5%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 取同一冷冻干燥样品粉末 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分别加入马甲子素对照品 0.037 38 mg 和白桦脂酸对照品 2.424 mg, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 结果见表 1。

表 1 马甲子素和白桦脂酸加样回收率试验

Table 1 Recovery tests of betulinic acid and paliurusene in *Paliurus ramosissimus*

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
马甲子素	0.037 41	0.037 38	0.073 60	96.82	98.76	1.5
	0.037 36	0.037 38	0.074 89	100.40		
	0.037 43	0.037 38	0.074 70	99.71		
	0.037 31	0.037 38	0.073 52	96.87		
	0.037 39	0.037 38	0.074 46	99.17		
	0.037 37	0.037 38	0.074 59	99.57		
白桦脂酸	2.429 1	2.424 0	4.860 1	100.29	99.67	0.8
	2.414 6	2.424 0	4.828 9	99.60		
	2.429 1	2.424 0	4.814 4	98.40		
	2.448 3	2.424 0	4.849 7	99.07		
	2.409 8	2.424 0	4.851 1	100.71		
	2.395 3	2.424 0	4.817 9	99.94		

2.2 干燥方法考察^[8-9] 取马甲子药材鲜品, 均分成 5 份, 取 4 份分别进行自然晾晒、室内通风阴干、烘箱 50℃ 烘干和冷冻干燥, 直至样品 2 次干燥后质量差异 < 0.3 mg, 记录干燥时间。4 份干燥样品和 1 份鲜品各用 10 倍量 95% 乙醇连续冷浸提取 72 h, 过滤, 合并滤液并浓缩成浸膏, 干燥后粉碎, 过 4 号筛, 置干燥器中备用。取不同干燥方法处理的马甲子粉末, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定 (n=3), 计算各成分含量。以鲜叶提取物的测定结果为标准, 根据样品含水量

计算马甲子鲜品析干后有效成分的含量及转移率, 见表 2。结果表明冷冻干燥时, 有效成分的转移率最高, 晒干法损失最大, 故选择冷冻干燥法进行干燥。

表 2 不同干燥方法对马甲子中有效成分含量的影响

Table 2 Effects of different drying methods on contents of effective components in *Paliurus ramosissimus*

样品	质量分数/mg·g ⁻¹		转移率/%	
	马甲子素	白桦脂酸	马甲子素	白桦脂酸
鲜品	0.082 7	5.01	-	-
冷冻干燥	0.075 1	4.81	90.8	96.0
阴干	0.071 2	4.81	86.1	96.0
50℃ 烘干	0.069 2	4.61	83.7	92.0
晒干	0.025 4	3.91	30.7	78.0

2.3 提取工艺考察 预试验考察了马甲子鲜叶冷冻干燥后的提取方法和提取溶剂, 分别采用冷浸, 超声, 回流 3 种方法提取, 计算马甲子素质量分数分别为 0.075 0, 0.064 4, 0.065 9 mg·g⁻¹, 白桦脂酸质量分数分别为 4.81, 4.43, 4.39 mg·g⁻¹; 均加等量甲醇、乙醇、水、乙酸乙酯提取, 结果马甲子素质量分数分别为 0.069 2, 0.074 7, 0.060 1 mg·g⁻¹, 白桦脂酸质量分数分别为 4.22, 4.78, 0.3.25 mg·g⁻¹。故选择加乙醇冷浸法提取。

2.3.1 单因素试验考察 通过单因素试验, 在影响马甲子有效成分提取的工艺条件中, 初步选定提取溶剂为体积分数 70% ~ 95% 的乙醇, 药材全部浸没需 4 倍量溶剂, 故提取溶剂用量选择 4 ~ 6 倍, 提取时间 24 ~ 72 h, 提取数 2 次。

2.3.2 正交试验设计^[10] 在单因素试验基础上, 选择乙醇体积分数、溶媒用量、提取时间为考察因素, 提取数定为 2 次, 以马甲子素和白桦脂酸提取量的综合评分为指标, 精密称取马甲子冷冻干燥药材 9 份, 每份 30 g, 按 L₉(3⁴) 正交表进行试验。以 9 个试验中各指标成分含量最大者计为 10 分, 其余 8 个按比例折算, 2 个指标得分之和为总评分, 试验安排及结果见表 3, 方差分析见表 4。由直观分析可知, 各因素对提取工艺的影响顺序为 A > C > B。方差分析表明因素 A, C 对有效成分含量均有显著性影响, 但从降低生产成本、缩短生产周期的角度考虑, 确定最佳提取工艺为 A₃B₁C₂, 即溶剂用量 4 倍, 乙醇体积分数 95%, 冷浸提取 2 次, 每次 48 h。

2.3.3 验证试验 取马甲子冷冻干燥药材 5 份, 每份 30 g, 按优选的工艺条件进行验证试验, 按 2.1 项

下色谱条件测定,计算白桦脂酸和马甲子素平均质量分数分别为 4.61, 0.077 4 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.1% 和 0.9%。说明该工艺稳定可行、重复性好。

表 3 马甲子提取工艺正交试验分析

Table 3 Orthogonal test analysis of extraction process of *Paliurus ramosissimus*

No.	A 乙醇 体积 分数 /%	B 溶媒 用量 /倍	C 提取 时间 /h	D (空白)	马甲 子素 /mg·g ⁻¹	白桦 脂酸 /mg·g ⁻¹	综合 评分
1	70	4	24	1	0.074 3	2.57	14.85
2	70	5	48	2	0.073 2	3.07	15.78
3	70	6	72	3	0.078 3	3.72	17.81
4	80	4	48	3	0.075 7	4.21	18.53
5	80	5	72	1	0.078 6	4.59	19.71
6	80	6	24	2	0.076 5	4.15	18.50
7	95	4	72	2	0.075 1	4.53	19.14
8	95	5	24	3	0.074 8	3.99	17.95
9	95	6	48	1	0.079 4	4.68	20.00

表 4 综合评分方差分析

Table 4 Analysis of variance for comprehensive score

方差来源	SS	MS	F	P
A	15.98	7.99	67.55	<0.05
B	2.61	1.30	11.01	>0.05
C	4.81	2.41	20.34	<0.05
D(误差)	0.237	0.12		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$ 。

3 讨论

白桦脂酸是抗肿瘤的有效活性单体,可选择性地抑制黑色素瘤细胞的生长,其对 HIV-1 型感染也有抑制作用。近期研究表明白桦脂酸对肿瘤细胞具有广谱性的细胞毒性,而对正常细胞基本无伤害。经实验证实马甲子素也具有一定的抗肿瘤活性。通过选取马甲子中白桦脂酸和马甲子素 2 种主要抗肿瘤活性成分的含量作为评价指标,考察不同干燥

方法对马甲子抗肿瘤活性成分含量的影响。结果表明晒干法处理的马甲子中马甲子素和白桦脂酸的损失最大,推测原因可能是因为 2 种活性成分遇光不稳定,在光照下易分解。冷冻干燥法是一种能长期保留马甲子抗肿瘤活性成分和药效的可靠方法。但考虑到大量药材的产地加工,阴干法操作更为简单便利些。建议大生产时采用自然阴干。

[参考文献]

[1] 丁磊,张东明. 铁篱笆果化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(24): 2049-2051.

[2] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 419.

[3] 高媛,宋连强,樊梅,等. 马甲子有效成分的提取及其抗肿瘤活性研究[J]. 华西药学杂志, 2015, 30(3): 303-304.

[4] 何颖,董珊,张春. 马甲子叶抑菌有效部位的筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(7): 159-162.

[5] 宋联强,武蕊娟,谭镭,等. HPLC 测定马甲子药材中马甲子 1[#] 的含量[J]. 中国测试, 2015, 41(4): 43-45.

[6] Xu T, Pang Q Y, Zhou D, et al. Proteomic investigation into betulinic acid-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells [J]. PLOS One, 2014, 9(8): e105768.

[7] 张园,张信文,陈光英. 五环三萜类化合物抗肿瘤作用的研究进展[J]. 海南师范大学学报:自然科学版, 2011, 24(1): 92-95.

[8] 罗云,金城,鄢丹,等. 不同干燥工艺对板蓝根水提物中有效成分的影响[J]. 中草药, 2011, 42(8): 1532-1536.

[9] 鲁文静,梁宗锁,吴媛婷,等. 不同干燥方法对猪苓中多糖及麦角甾醇含量的影响[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(4): 144-148.

[10] 孙乐,李春梅,郭迎迎,等. 人参花中总皂苷的提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 21-23.

[责任编辑 刘德文]