

·工艺研究·

枇杷叶紫珠苯乙醇苷类成分提取工艺的优选

毛菊华, 陈德金, 宁 媛, 夏玉英, 林朝展, 祝晨蓁(广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要: 目的 筛选枇杷叶紫珠苯乙醇苷类成分的最佳提取工艺条件。方法 采用反相高效液相色谱法测定枇杷叶紫珠提取液中毛蕊花糖苷及连翘酯苷的含量, 以浸膏得率和毛蕊花糖苷及连翘酯苷得率为评价指标, 通过正交设计法优选最佳提取工艺。结果 最佳提取工艺为 70 % 乙醇, 料液比为 1 : 15, 回流提取 3 次, 每次 1.5 h。结论 优选出的提取工艺简单可行, 结果稳定可靠, 可用于提取枇杷叶紫珠苯乙醇苷类成分。

关键词: 枇杷叶紫珠; 苯乙醇苷; 正交试验; 提取工艺

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)03-0309-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.027

Optimization of Extraction Technology of Phenylethanoid Glycosides in *Callicarpa kochiana* Makino with Orthogonal Design

MAO Juhua, CHEN Dejin, NING Yu, XIA Yuying, LIN Chaozhan, ZHU Chenchen (College of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To optimize the extraction technology for phenylethanoid glycosides in *Callicarpa kochiana* Makino. **Methods** The content of verbascoside and forsythiaside was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Orthogonal design was used to optimize the extraction technology, and yield rates of total phenylethanoid glycosides, verbascoside and forsythiaside were adopted as evaluation indexes. **Results** The optimum technology was circumfluence extracting for three times by 70 % alcohol with solid-liquid ratio at 1 : 15, 1.5 hours every time. **Conclusion** The optimum extraction technology is simple and feasible, the results are stable and reliable, and the technology can be used for the extraction of phenylethanoid glycosides in *Callicarpa kochiana* Makino.

Keywords: *Callicarpa kochiana* Makino; Phenylethanoid glycosides; Orthogonal design; Extraction technology

枇杷叶紫珠为马鞭草科紫珠属植物枇杷叶紫珠 (*Callicarpa kochiana* Makino) 的干燥叶, 又名劳莱紫珠 (*Callicarpa loureiri*), 为岭南地区常用止血中药, 具有散瘀消肿、止血镇痛、祛痰止咳的功效, 用于治疗咳血、吐血、鼻出血、创伤出血等出血症及风湿痛、扭挫伤、喉炎、结膜炎等^[1]。紫珠属植物化学成分研究^[2-3]表明, 苯乙醇苷类成分是该属植物的主要成分分类群之一。本课题组在前期化学成分分离研究的基础上, 从枇杷叶紫珠中分离并鉴定出 6 种苯乙醇苷类化合物, 其中, 以毛蕊花糖苷及连翘酯苷

的含量最高^[4]。现代药理研究^[5]表明, 苯乙醇苷类化合物具有抗血栓、降血脂、抗氧化和调节非特异性免疫反应等多方面的药理作用。本研究采用正交设计, 以浸膏得率、毛蕊花糖苷及连翘酯苷得率^[6]为指标, 综合评价、筛选枇杷叶紫珠苯乙醇苷类成分的提取工艺, 为枇杷叶紫珠的进一步开发利用提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 依利特 P230 型液相色谱仪, 大连依利特分析仪器有限公司; sartorius 电子分析天平, 北京赛

收稿日期: 2012-12-06

作者简介: 毛菊华, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药及天然药物活性成分与质量评价研究。Email: maomaotou198712@163.com。通讯作者: 林朝展, 男, 副教授, 主要从事中药与天然药物药效物质基础研究。Email: linchaozhan@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目资助课题(81001613); 广东省中医药管理局资助项目(2010396); 广州市珠江科技新星专项(2012J2200038); 广东省大学生创新实验项目(1057210010)。

多利斯仪器有限公司；真空干燥箱，天津市德固特科技发展有限公司；旋转蒸发仪，巩义市予华仪器有限责任公司；中草药粉碎机，天津市泰斯特仪器有限公司。

1.2 试药 枇杷叶紫珠样品于2010年10月采自广东省从化流溪河森林公园，经广州中医药大学中药鉴定学教研室黄海波副教授鉴定为马鞭草科紫珠属植物枇杷叶紫珠(*C. kochiana*)，又名劳莱紫珠(*C. loureiri*)，凭证标本(批号:CKM101005)现保存于广州中医药大学中药学院药物分析研究室。毛蕊花糖苷及连翘酯苷对照品为自制，经HPLC归一化法检测，纯度在99%以上。液相所用甲醇为色谱纯，水为超纯水，其余试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 正交试验因素和水平选择^[7-8] 在选择回流法作为提取方法的基础上，根据单因素初筛试验结果，本试验选定乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取次数(C)和提取时间(D)作为考察的4个因素，每个因素各取3个水平，选用L₉(3⁴)正交试验表安排试验，因素与水平设计见表1。

表1 正交试验因素水平表

水平	因素			
	乙醇浓度(A)/%	料液比(B)/倍	提取次数(C)/次	提取时间(D)/h
1	70	1:10	1	0.5
2	40	1:15	2	1
3	95	1:20	3	1.5

2.2 试验方法 精密称取枇杷叶紫珠干燥药材粉末9份(过40目筛)，每份10g，依次编为1~9号试验组，按L₉(3⁴)正交试验表中规定的条件回流提取，过滤，合并滤液，减压浓缩后分别加水定容至100mL，摇匀，静置，分别吸取上清液适量，微孔滤膜(0.45μm)滤过，取续滤液作为供试品。

2.3 浸膏得率的测定^[9] 精密量取2.2项下各试验组提取液适量，于恒重的蒸发皿中，水浴挥干，并于105℃下干燥至恒重，称定质量，根据公式：浸膏得率=浸出物质量/取样量×稀释倍数×100%，计算各试验组提取液的浸膏得率。

2.4 含量测定方法

2.4.1 色谱条件 色谱柱：Kromasil C₁₈ (4.6mm×250mm, 5μm)；流动相：甲醇-0.1%醋酸水溶液

(40:60)；流速：1.0mL·min⁻¹；检测波长：334nm；进样量：10μL；理论塔板数按毛蕊花糖苷计算应不低于10000，按连翘酯苷计算应不低于8000；毛蕊花糖苷及连翘酯苷的保留时间分别为11.45min和9.14min，与其他组分分离良好。

2.4.2 线性关系考察 精密称取毛蕊花糖苷和连翘酯苷对照品适量，置10mL量瓶中，加甲醇配制成毛蕊花糖苷和连翘酯苷浓度分别为480, 540μg·mL⁻¹的混合对照品溶液。分别精密吸取混合对照品溶液1, 2, 4, 8, 10, 15, 20μL，按照2.4.1项下色谱条件进行测定，以峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归，得回归方程分别为毛蕊花糖苷Y=1233.6X-401.06, r=0.9994, 线性范围0.48~9.60μg；连翘酯苷Y=702.22X-208.82, r=0.9997, 线性范围0.54~10.80μg。

2.4.3 精密度试验 取同一混合对照品溶液，精密吸取10μL，按照2.4.1项下色谱条件进行测定，重复进样6次，记录毛蕊花糖苷及连翘酯苷峰的峰面积并计算含量，其RSD分别为1.41%、0.96%，结果表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 精密称定枇杷叶紫珠干燥药材粉末10g，按照2.2项下2号试验组提取方法平行制备6份供试品，精密吸取10μL，按照2.4.1项下色谱条件进行测定，记录毛蕊花糖苷及连翘酯苷峰的峰面积并计算含量，其RSD分别为1.69%、2.13%，结果表明该分析方法的重现性良好。

2.4.5 稳定性试验 精密吸取2.4.4项下供试品10μL，分别于0, 1, 2, 4, 8, 12h按2.4.1项下色谱条件进行测定，记录毛蕊花糖苷及连翘酯苷峰的峰面积并计算含量，RSD分别为1.12%、1.57%，表明供试品在室温下12h内稳定性良好。

2.4.6 回收率试验 采用加样回收法，精密称定枇杷叶紫珠药材粉末1.0g，共6份，分别精密加入与药材中含量相等的毛蕊花糖苷及连翘酯苷对照品，按2.2项下2号试验组提取方法制备供试品，精密吸取10μL，按2.4.1项下色谱条件进行测定，记录毛蕊花糖苷及连翘酯苷峰的峰面积并计算含量，计算可得毛蕊花糖苷的平均回收率为96.74%，RSD为1.61%；连翘酯苷的平均回收率为98.03%，RSD为1.80%。

2.4.7 样品测定 取2.2项下各试验组供试品，精密吸取10μL，按2.4.1项下色谱条件进行测定，记录毛蕊花糖苷及连翘酯苷峰的峰面积并计算含量。

2.5 正交试验结果 选择对试验结果影响较大的4个

表 2 提取工艺正交试验结果

Table 2 Arrangement and result of $L_9(3^4)$ orthogonal design

序号	因素				结果			
	A	B	C	D	浸膏得率 / %	毛蕊花糖苷得率 / %	连翘酯苷得率 / %	综合评分 *
1	1	1	1	1	7.674	0.065	0.093	1.212
2	1	2	2	2	12.938	0.138	0.200	4.373
3	1	3	3	3	15.050	0.143	0.200	5.162
4	2	1	2	3	11.446	0.134	0.180	3.594
5	2	2	3	1	12.410	0.149	0.207	4.418
6	2	3	1	2	9.554	0.064	0.086	1.433
7	3	1	3	2	8.708	0.160	0.226	3.361
8	3	2	1	3	5.890	0.103	0.148	1.478
9	3	3	2	1	7.706	0.136	0.184	2.466
K1	10.747	8.167	4.123	8.096				
K2	9.445	10.269	10.433	9.167				
K3	7.305	9.061	12.941	10.234				
R	3.442	2.102	8.818	2.138				

注：* 综合评分^[6]=(毛蕊花糖苷得率 + 连翘酯苷得率) × 浸膏得率；K 为同一水平相加；R 为极差。

因素，即乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取次数(C)和提取时间(D)，按照 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验，结果见表 2。

以综合评分为考察指标，表 2 极差值显示，影响提取含量的因素排序为 $C > A > D > B$ 。说明提取过程中提取次数对苯乙醇苷类成分的含量影响最大，料液比及提取时间的影响则相对较小。从 K1、K2、K3、K4 的数值比较来看， $A_1 > A_2 > A_3$ ， $B_2 > B_3 > B_1$ ， $C_3 > C_2 > C_1$ ， $D_3 > D_2 > D_1$ ，所得最佳工艺为： $A_1B_2C_3D_3$ 。因此，以浸膏得率、毛蕊花糖苷和连翘酯苷得率为评价指标，考察枇杷叶紫珠中苯乙醇苷类成分的最佳提取工艺，结果确定最佳提取工艺为 70 % 乙醇，料液比为 1 : 15，回流提取 3 次，每次 1.5 h。

2.6 验证试验 精密称定枇杷叶紫珠干燥药材粉末 10 g，按以上试验得出的工艺平行制备 3 份供试品，按 2.3 项下方法测定浸膏得率，得到平均浸膏得率为 13.56 % (RSD = 2.37 %， $n = 3$)；分别精密吸取 10 μ L，按 2.4.1 项下色谱条件进行测定，记录毛蕊花糖苷及连翘酯苷峰的峰面积并计算含量，得到平均毛蕊花糖苷及连翘酯苷得率分别为 0.15 % (RSD = 2.01 %， $n = 3$)，0.22 % (RSD = 1.89 %， $n = 3$)。3 份样品测定结果差异较小，表明该工艺稳定可行。

3 讨论

试验考察了水煮、超声、加热回流等提取方法，发现回流提取得到的苯乙醇苷类成分含量最高，所以，采用加热回流提取法。试验采用 HPLC 法测定毛

蕊花苷和连翘酯苷的含量，方法成熟可行，具有一定的准确度和精密度，重现性好，数据准确可信。采用正交设计法，以总浸膏得率、毛蕊花糖苷得率及连翘酯苷得率为指标，结合综合评分法^[7]，对枇杷叶紫珠中苯乙醇苷类成分的提取工艺进行研究，确定了提取工艺为：70 % 乙醇，料液比为 1 : 15，回流提取 3 次，每次 1.5 h。该工艺简单可行，经验证其结果稳定可靠，可为枇杷叶紫珠中苯乙醇苷类成分的提取提供参考。

参考文献：

[1] 吴德邻. 广东植物志 (第 3 卷)[M]. 广州：广东科技出版社，1995：350.
[2] Kyung AK, Sang HS, Jong HP, et al. In vitro neuroprotective activities of phenylethanoid glycosides from *Callicarpa dichotoma*[J]. Planta Medica, 2005, 71(8): 778-780.
[3] Chunhua LU, Shen YM. Water soluble constituents from *Callicarpa pedunculata*[J]. Chin J Nat Med, 2008, 6(3): 176-178.
[4] 林朝展, 祝晨蓁, 邓贵华, 等. 枇杷叶紫珠中苯乙醇苷类成分研究[J]. 中药材, 2010, 33(6): 897-900.
[5] 靖会, 佐建锋, 李教社. 苯乙醇苷类化合物的药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 440-441.
[6] 陈德金, 祝晨蓁, 林朝展, 等. HPLC 法测定裸花紫珠片中毛蕊花糖苷及连翘酯苷的含量[J]. 中成药, 2011, 33(3): 82-85.
[7] 王宁, 王建新, 宋崎, 等. 正交设计多指标综合评分法优化救心速释片处方[J]. 中成药, 2003, 25(3): 179.
[8] 孟庆艳, 谢枏飞, 罗锋, 等. 管花肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学, 2011, 17(2): 28-31.

(编辑：宋威)