

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2018.02.007

超声辅助法提取杜仲鲜叶中的车叶草苷

刘俊伶¹,徐明²,杨学兵²,杨磊¹,莫开林^{2*}

(1. 东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150040;

2. 四川省林业科学研究院,四川 成都 610081)

摘要:以杜仲叶为原料,采用超声辅助法提取杜仲叶中的车叶草苷,影响提取率高低的4个主要因素为:提取剂乙醇的浓度、液料比、超声时间、超声功率,得到的最佳提取条件分别为70%、15 mL·g⁻¹、40 min和160 W。超声提取法可高效快捷地提取杜仲叶中的车叶草苷,与传统提取方法相比,具有稳定、高效、节能的优点。

关键词:杜仲;超声辅助提取;车叶草苷

中图分类号:S567.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5508(2018)02-0030-03

Ultrasonic-assisted Extraction of Asperuloside from *Eucommia ulmoides* Fresh Leaves

LIU Jun-ling¹ XU Ming² YANG Xue-bing² YANG Lei¹ MO Kai-lin^{1*}

(1. Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China;

2. Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, China)

Abstract: In this paper, studies were made of the operation parameters influencing the asperuloside yield, which was extracted from the leaves of *Eucommia ulmoides* by ultrasonic-assisted extraction. The main operation parameters, such as: the ethanol concentration, the liquid-solid ratio, the ultrasonic irradiation time and the ultrasonic irradiation power, were investigated in detail. And the highest yield of asperuloside was obtained in the condition of ultrasonic irradiation power of 160 W, 70% of ethanol concentration, 15 mL·g⁻¹ of liquid-solid ratio, and 40 min of ultrasonic irradiation time. As a conclusion, it was found that the ultrasonic-assisted extraction was a stable, efficient, and energy-saving technology, which could be used in the extraction of asperuloside from *Eucommia ulmoides*.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliver, Ultrasonic-assisted extraction, Asperuloside

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliver)为杜仲科杜仲属多年生落叶乔木,雌雄异株,为我国特有的经济树种之一^[1]。适宜生长在阳光充裕、湿润温和的地方,在我国分布广泛,主要分布在四川、云南、广西、贵州、河南和长江中下游等地^[2]。

杜仲传统以树皮入药,因其资源较为匮乏,属于我国名贵的中药材,生产成本高。自然生长周期长,

过度地剥皮会导致杜仲树死亡,导致杜仲树皮资源十分匮乏,远远不能满足市场需求^[3]。现代研究证实,杜仲叶与其皮的药用功能大致相同,提取物中有效成分也基本上相似,杜仲种植成活后,第3年就可以采收杜仲叶,且杜仲叶产量较大,资源丰富,因此,以叶代皮,可以弥补树皮资源不足。杜仲叶在2005年也正式被收载于《中国药典》,所以对杜仲叶的研

收稿日期:2017-12-21

基金项目:国家林业局林业公益性行业科研专项(20150470102)。

作者简介:刘俊伶(1992-),女,硕士研究生,研究方向:药物化学。

*通讯作者:莫开林,E-mail:mokailin@126.com。

究和生产应用研究备受关注^[4-6]。

目前,从杜仲叶和皮中现在已经分离出 15 种环烯醚萜类化合物,多以糖苷的形式存在。车叶草苷是杜仲叶中的一种环烯醚萜类化合物,具有降压、降血脂、保肝利胆、抗炎、镇痛、抗衰老等药用价值^[7-9]。

超声提取技术(UAE)作为一种比较先进的提取技术,相比传统的提取方法具有很多的优势和特点。如提取时间短、节约溶剂、提取率高、应用广泛等。这些优势和特点使得超声提取在中药化学成分提取方面获得了广泛应用。鉴于此,本文尝试采用超声辅助法从杜仲叶中提取车叶草苷,为杜仲叶的进一步深度利用提供技术支持^[10,11]。

1 材料及仪器

杜仲鲜叶由四川省林业科学研究院提供,经东北林业大学谷会岩副教授鉴定。车叶草苷(纯度 98%)、购于上海源叶生物科技有限公司,色谱级甲醇购于赛默非世尔科技(中国)有限公司,分析纯乙醇购于天津市天士力化学试剂有限公司。

安捷伦 1 260 Infinity II Prime 购于安捷伦科技(中国)有限公司;KQ-200VDB 三频数控超声波清洗机购于昆山超声仪器有限公司。

2 方法

2.1 原料的预处理

用碎菜机把新鲜的杜仲叶挤压成碎末,冷藏备用。

2.2 车叶草苷含量测定

标准曲线的绘制:分别配制 0.2 mg · mL⁻¹、0.3 mg · mL⁻¹、0.4 mg · mL⁻¹、0.5 mg · mL⁻¹、0.6 mg · mL⁻¹ 的车叶草苷对照品溶液,HPLC 检测,绘制标准曲线,线性拟合方程式为:

$$Y = 8\,897.1x + 638.3, R^2 = 0.9994 \quad (1)$$

式中: x 为对照品的浓度(mg · mL⁻¹), Y 为 1 mg · mL⁻¹ 标准液对应的峰面积。

车叶草苷含量测定的方法如下:称取杜仲叶碎末 1.2 g(折干重 0.33 g)溶于 5 mL 70% 的乙醇中,超声提取获得提取液,冷却至室温,HPLC 检测得峰面积。将峰面积代入标准曲线方程(1)得提取液中车叶草苷浓度。

杜仲叶中车叶草苷得率计算公式:

$$Y = vc/M \times 1000 \quad (2)$$

式中: Y 为得率($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$); v 为提取液的体积(mL); c 为提取液的浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); M 为杜仲碎末的干重重量(mg)。

2.3 HPLC 分析条件:

流动相为水(A)和甲醇(B)体系,梯度洗脱:0 min ~ 10 min,5% ~ 15% B;10 min ~ 45 min,15% ~ 32% B;45 min ~ 46 min,32% ~ 60% B;46 min ~ 56 min,60% ~ 60% B;56 min ~ 57 min,60% ~ 5% B;57 min ~ 70 min,5% ~ 5% B。

检测波长:238 nm,进样量:10 μL ,柱温:30 $^{\circ}\text{C}$,流速:1 mL · min⁻¹。

2.4 超声波辅助提取杜仲叶中的车叶草苷单因素试验

精确称取一定量碎菜机挤压所得的新鲜杜仲叶碎末,溶于乙醇水溶液(车叶草苷化合物分子量较小,具有极性官能团,偏亲水性。根据相似相容原理。提取车叶草苷应选择极性较强的溶剂,所以本实验以乙醇水溶液最为溶剂),超声辅助提取,得到提取液,冷却至室温,0.45 μm 滤膜过滤,HPLC 检测。在其他条件相同的情况下,分别改变提取时间、提取功率、乙醇的浓度、液料比,以得到最佳提取方案。

(1)乙醇浓度:选择不同浓度的乙醇水溶液,精确称取 1.8 g 杜仲碎末(折干重 0.5 g),分别加入 5 mL 所选的提取溶剂,混匀,超声功率 200 W 提取 30 min,冷却,过滤,滤液 HPLC 检测,代入公式,计算车叶草苷的得率。

(2)液料比:分别按照 5 mL · g⁻¹、10 mL · g⁻¹、15 mL · g⁻¹、20 mL · g⁻¹、25 mL · g⁻¹ 的液料比,精确称取,加入最佳浓度的乙醇水溶液,在 200 W 超声功率下,超声 30 min,滤出上清液,HPLC 检测,代入公式,计算车叶草苷的得率。

(3)超声功率和超声时间:选择最佳液料比以及乙醇浓度,依次超声 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min 和 60 min;选择不同的超声功率 80 W、120 W、160 W 和 200 W,滤出上清液,HPLC 检测,代入公式,计算车叶草苷的得率。

3 结果与讨论

3.1 乙醇浓度的影响

准确称取新鲜的杜仲叶碎末 1.8 g(折干重 0.5

g),加入 10 ml 的试管中,分别加入 10 倍($\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)的提取溶剂(纯水,10%乙醇,20%乙醇,30%乙醇,40%乙醇,50%乙醇,60%乙醇,70%乙醇,80%乙醇,90%乙醇),在相同的超声条件下(超声功率 200 W)超声提取 30 min,测定峰面积,并计算车叶草苷的得率。

实验结果(见图 1)可以看出得率随着乙醇浓度的增加而逐渐增高,当乙醇浓度达到 70% 时,得率至最高,但当乙醇浓度再提高时,得率却有下降的趋势。产生这种现象的原因可能是水对物料起溶胀作用。综合考虑,当乙醇浓度为 70% 时为最优提取浓度。

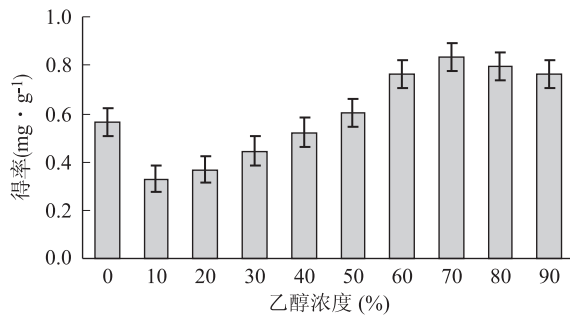


图 1 乙醇浓度的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration

3.2 液料比的影响

选择 70% 乙醇溶液,在超声功率为 200 W 条件下提取 30 min,通过改变液料比,研究液料比对车叶草苷的率的影响。由图 2 可以看出,随着液料比变大,车叶草苷的得率也提高,但是当液料比超过 15 时,车叶草苷的得率反而下降,故液料比为 15 时是最优条件。

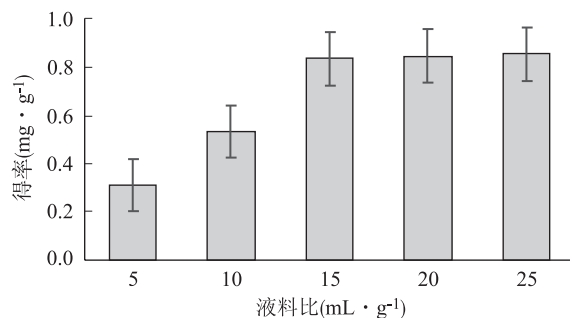


图 2 液料比的影响

Fig. 2 Effect of liquid-solid ratio

3.3 超声功率和超声时间的影响

提取溶剂为 70% 的乙醇溶液,液料比为 $15 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,在不同的超声功率条件下提取 30 min(见图

3),超声功率在 80 W ~ 200 W 时,车叶草苷的得率在超声功率为 160 W 时最高,超声功率过大或是太低,车叶草苷的得率都有所下降,因此选择 160 W 作为最佳超声功率。

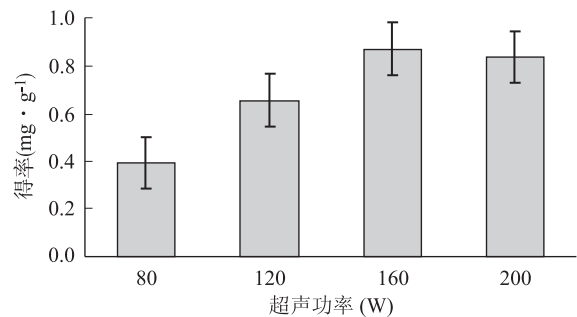


图 3 超声功率的影响

Fig. 3 Effect of ultrasonic irradiation power

提取溶剂为 70% 乙醇溶液,液料比为 $15 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,在超声功率 160 W 条件下通过改变超声时间,随着时间的延长,车叶草苷的得率提高,车叶草苷在 40 min 后增加的趋势变缓,综合考虑,超声辐射时间 40 min 为最佳时间(见图 4)。

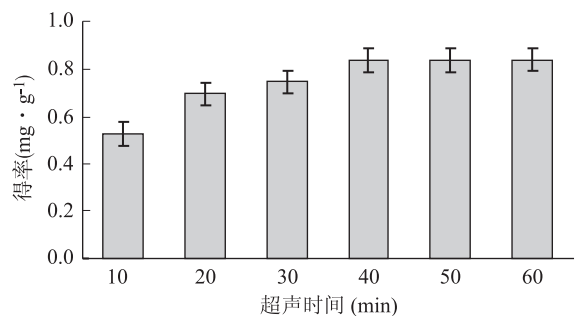


图 4 超声时间的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic irradiation time

4 结论

实验选择乙醇水作为提取溶剂,测试了乙醇浓度、液料比、超声功率、超声时间对车叶草苷得率的影响。通过单因素实验得到最佳工艺参数为乙醇浓度 70%、液料比 $15 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 、超声时间 40 min、超声功率 160 W。超声辅助提取方法具有时间短,提取效率高节约能源等优点,具有更广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 张华,车小凤,逯向东,等. 杜仲温室营养袋育苗技术[J]. 林业实用技术, 2006(11):22~22. (下转第 102 页)

技术入股、技术转让等方式参与基地建设,推广科技成果,提高科技成果转化,加快产业基地建设。四是加强标准化生产建设,依靠林业科技创新,大力推行林果产品的标准化生产,充分发挥龙头企业在推行标准化生产中的主体带动作用,带动基地农户走标准化生产、规范化经营之路,将无公害贯穿于生产加工全过程,努力开发绿色、无公害、有机林产品,争创名牌产品,提高产品的市场竞争力^[4]。五是创新培训模式,加强林业科技队伍建设和实用人才培养。

3.5 强化宣传和推进品牌创建、保护

一是通过互联网、电视、报刊、新闻媒体以及展览会等多形式、多层次、多渠道宣传林业产业,营造富民、惠民、改善民生、建设“和谐林区”的良好氛围,增强社会对林业产业的认识;加强对林业产业基地发展典型的宣传,引导全社会都来关心、支持和参与林业产业基地建设,宣传特色优势林产品、龙头企业及其品牌,提高产品和企业的知名度以及市场竞争力^[5]。二是加强对名优品牌的创建和保护。支

持龙头企业加快新产品的研发,提升产品质量,争创国内、省内名优品牌。加大对品牌的扶持力度,培育一批具有成都特色、在国内外市场有较高知名度的名优品牌和驰名商标,积极申报地理标志产品,增强对品牌的保护力度。对评为国家或省级农业产业化重点龙头企业、驰名商标的林业企业予以表彰和奖励。

参考文献:

- [1] 成都市林业和园林管理局. 成都市林业产业“十二五”总体规划[M]. 2011.
- [2] 文明,余小晏,胡尚贤,等. 成都市林业产业现状及可持续发展对策[J]. 四川林业科技,2013,34(5):90~91.
- [3] 王英俊,李波,张志全. 基于SWOT分析的白河林业局森林生态旅游发展研究[J]. 沈阳大学学报(社会科学版),2012,14(1):8~11.
- [4] 张中山,王雪飞,郭志耀,等. 广元市森林生态旅游的SWOT分析及发展对策[J]. 四川林业科技,2015,36(6):117~120.
- [5] 马捷,甘俊伟. 基于SWOT分析的四川森林康养旅游发展路径研究[J]. 四川林业科技,2017,38(2):132~135.
- [6] 卿艳. 杜仲对照药材标定技术及质量评价研究[D]. 成都中医药大学,2011.
- [7] 左月明,张忠立,王彦彦,等. 杜仲叶环烯醚萜类化学成分研究[J]. 中药材,2014,37(2):252~254.
- [8] 张前程. 杜仲叶中活性成分的积累规律及其提取物的制备[D]. 河南大学,2015.
- [9] 马伟,曾里,程健,等. HPLC法测定杜仲茶中车叶草苷含量的研究[J]. 食品与发酵科技,2016,52(3):93~96.
- [10] 黎桂燕. 超声技术在中草药成分提取中的应用[J]. 内蒙古中医药,2016,35(15):144~144.
- [11] 董嘉德. 超声技术在中草药提取中的应用[J]. 中国药业,2002,11(11):55~56.
- [12] 秦振栋,吴养曾,于子清,等. 杜仲皮与杜仲叶的比较研究—I 降压与毒性[J]. 西北大学学报:自然科学版,1977(2):67~75.
- [13] 唐光旭,唐仕斌,李勇,等. 杜仲叶、皮营养物质变化规律的研究[J]. 南方林业科学,2000(4):1~5.
- [14] 石根勇,吴金龙,王丽云. 杜仲叶致突变作用研究[J]. 江苏预防医学,1996(1):28~29.

(上接第32页)