

湖北地黄梓醇超声波提取及含量测定

田春莲¹, 丁文² (1. 吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南吉首 416000; 2. 吉首大学城乡资源与规划学院, 湖南张家界 427000)

摘要 [目的]采用超声波法对湖北地黄中梓醇的提取工艺进行研究。[方法]在单因素试验基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察乙醇浓度、提取时间、料液比对湖北地黄中梓醇提取效果的影响;运用薄层色谱分析(TLC)法分别对湖北地黄根、茎、叶和生地黄中梓醇含量进行测定。[结果]优化的工艺参数为:乙醇浓度70%,提取时间30 min,料液比1:40。TLC分析结果表明,张家界产湖北地黄叶中梓醇含量最高,为1.84%,其次是茎,为1.35%,根为1.29%,生地黄中梓醇含量最低,为0.44%。[结论]为深入研究和开发湖北地黄提供依据。

关键词 湖北地黄;生地黄;梓醇;超声波提取;薄层色谱扫描法

中图分类号 S567.23*9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)28-13788-02

Extraction with Ultrasonic and Determination of Catalpol Content in *Rehmania henryi* Brown

TIAN Chun-lian et al (College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou, Hunan 416000)

Abstract [Objective] The research aimed to study the technology of ultrasonic of catalpol from *Rehmania henryi* Brown. [Method] Based on the single-factor experiment, an orthogonal experiment of $L_9(3^4)$ was made to study the effects of ethanol concentration, reaction time and the ratio of material to ethanol on the yield of catalpol. The TLC method was used to determine the contents of catalpal in the *Rehmania henryi* Brown's root, stem, leaf and *Radix rehmanniae*. [Result] The optimum extracting technology was as follow: the ethanol concentration 70%, reaction time 30 min and the ratio of material to ethanol 1:40. The analysis result by TLC showed that the catalpal contents of *Rehmania henryi* Brown's root, stem, leaf and *Radix rehmanniae* was in order: leaf(1.84%) > the stem(1.35%) > the root(1.29%) > the *Radix rehmanniae* (0.44%). [Conclusion] The study can provide the basis for researching and developing deeply *Rehmania henryi* Brown.

Key words *Rehmania henryi* Brown; *Radix rehmanniae*; Catalpol; Ultrasonic extraction; Thin layer chromatography scanning method(TLC)

湖北地黄(*Rehmania henryi* Brown)为玄参科(Scrophulariaceae)多年生草本植物,其干燥块茎具清热凉血、养阴、生津之功效^[1]。目前,地黄在我国河南、山东、山西及陕西等地均有大面积栽培,以河南主产而质优^[2]。地方品种湖北地黄分布在湖南、湖北,主要生长在河流冲积土等砂质土壤上,喜光。梓醇(Catalpol)是一种存在于地黄中的环烯醚萜葡萄糖苷类化合物,主要有抗癌、神经保护、抗炎、利尿、降血糖及抗肝炎病毒等作用^[3]。目前,梓醇的分析常用HPLC法进行^[4-8]。旨在已有文献基础上,建立了梓醇的薄层色谱扫描法,探讨湖北地黄中梓醇超声提取工艺条件,并就梓醇含量与中药材生地黄进行对比分析,旨在为深入研究和开发湖北地黄提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 主要仪器:CS-9000薄层扫描仪,日本岛津生产;YAMOTO-800超声波清洗器,日本YAMOTO生产;RE-540旋转蒸发仪,日本岛津生产;AE100电子天平,日本岛津生产;微量点样器,上海医用激光机械厂生产。

主要试剂:氯仿、甲醇、乙酸乙酯、正丁醇、硅胶G等试剂均为国产AR;梓醇对照品(>98%),由中国药品生物制品检定所检定。

湖北地黄采自张家界市,经吉首大学廖博儒研究员鉴定;生地黄,片状根,购自张家界三角坪大药房。分别于60℃烘干,粉碎(过40目筛),贮藏备用。

1.2 方 法

1.2.1 梓醇标准曲线的制备。采用薄层色谱分析法进行。用20 cm×20 cm薄层硅胶G板,以正丁醇-乙酸乙酯-甲醇(20:10:5)为展开剂,室温展开55 min;挥干试剂后,用10%

硫酸-乙醇喷雾,并于105℃下烘5 min进行显色,以 $\lambda_s = 385 \text{ nm}$, $\lambda_R = 400 \text{ nm}$ 进行双波长反射直线扫描。用甲醇溶解并配制成浓度为0.429 $\mu\text{g/ml}$ 的梓醇对照品溶液;精密吸取该溶液1、3、5、7、9、11 μl ,点于同一薄层板上展开,在上述条件下进行测定。以梓醇的点样量 $x(\mu\text{g})$ 为横坐标,斑点峰面积 y 为纵坐标进行线性回归,结果表明:在0.429~4.419 μg 范围内,线性关系良好,线性回归方程为: $y = 2369.9x + 518.95$, $r = 0.9991$ 。

1.2.2 梓醇的提取及测定。称取一定量原料(湖北地黄根、茎、叶或生地黄),采用超声法对提取剂浓度、提取时间、料液比等单因素进行考察,并在此基础上进行正交试验,以优化提取参数。提取液过滤,定容,按“1.2.1”的方法分析检测,代入回归方程计算样品中梓醇含量,每个样分别作3个平行。

1.2.2.1 乙醇浓度的选择。称取湖北地黄叶1.000 g,以1:30的料液比加入不同浓度的乙醇水溶液(10%、30%、50%、70%、95%),超声提取30 min,过滤,定容至50 ml。精密吸取提取液4 μl ,点样,按“1.2.2”的方法求出梓醇的含量。

1.2.2.2 提取时间的选择。称取湖北地黄叶1.000 g,以1:30的料液比加入70%乙醇水溶液,超声提取不同时间(10、20、30、40、50 min),过滤,定容至50 ml。精密吸取提取液4 μl ,点样,按“1.2.2”的方法求出梓醇的含量。

1.2.2.3 料液比的选择。称取湖北地黄叶1.000 g,以不同的料液比分别加入浓度为70%乙醇水溶液10、20、30、40、50 ml,超声波提取30 min,过滤,定容至50 ml。精密吸取提取液4 μl ,点样,按“1.2.2”的方法求出梓醇的含量。

1.2.3 正交试验。在单因素试验的基础上,采用正交试验进一步考察乙醇浓度、提取时间、料液比对提取效果的影响。每因素选择3个水平,以原料中梓醇的含量为考核指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。

1.2.4 湖北地黄根、茎、叶和生地黄中梓醇含量的比较。称

基金项目 吉首大学科研基金资助项目。

作者简介 田春莲(1970-),女,土家族,湖南张家界人,硕士,副教授,从事资源植物栽培及相关领域研究。

收稿日期 2009-05-27

取湖北地黄根、茎、叶和生地黄各 1.000 g,按最佳工艺条件分别进行提取,精密吸取提取液 4 μ l,点样,求出梓醇的含量。

2 结果与分析

2.1 展开剂的选择 以对照品溶液进行定位,取湖北地黄叶提取液精密点样于硅胶 G 薄层板上,对展开剂进行筛选,优化出对梓醇的分离效果最佳的展开剂。由表 1 可知,展开剂极性不同,对梓醇的分离效果不一样。1、2、3 号展开剂极性过大,梓醇和杂质的 *R_f* 值均较大,且拖尾严重,分离效果不佳。经过反复调整展开剂极性,4、5 号的分离效果较好,但从时间和整体效果考虑,5 号效果最佳,梓醇与其他杂质能够得到快速、完全分离。

表 1 不同展开剂的分离效果

Table 1 Effects of different developing solvent on separation

序号 Serial No.	展开剂 Developing solvent	分离现象 Separation effect
1	氯仿-甲醇-水(14:8:1)	分离效果较好,拖尾
2	氯仿-甲醇-水(14:6:11)	分离效果不好,拖尾严重
3	正丁醇-乙酸乙酯-甲醇(20:10:10)	分离效果较好,但稍有拖尾
4	正丁醇-甲酸乙酯-甲醇(20:10:5)	分离效果好,不拖尾,展开时间长
5	正丁醇-乙酸乙酯-甲醇(20:10:5)	分离效果好,不拖尾,且展开时间较短

2.2 单因素试验结果

2.2.1 乙醇浓度的选择。由图 1 可知,乙醇浓度在 10% ~ 70% 时,随着乙醇浓度的增加,湖北地黄中梓醇的提取量增加,大于 70% 时,则有下降趋势。这可能是由于乙醇浓度过高,提取剂极性减小,反而不利于梓醇的提取。故乙醇浓度以 70% 为宜。

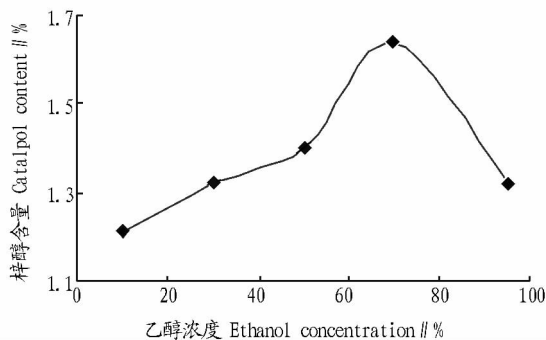


图 1 不同乙醇浓度对梓醇提取效果的影响

Fig.1 Effects of ethanol concentration on extraction

2.2.2 提取时间的选择。由图 2 可知,超声法提取梓醇时,提取时间对梓醇提取有一定的影响。随着提取时间的延长,梓醇的提取率首先不断增加,30 min 时梓醇提取率最大;大于 40 min 影响不显著。原因可能是梓醇不稳定,提取时间过长反而导致分解。故提取时间以 30 min 为宜。

2.2.3 料液比的选择。由图 3 可知,当料液比在 1:10 ~ 1:30 时,随着提取剂体积的增加,提取液中梓醇的含量逐渐升高,当高于 1:30 时,开始缓慢下降。因此,从经济、节约、减少回

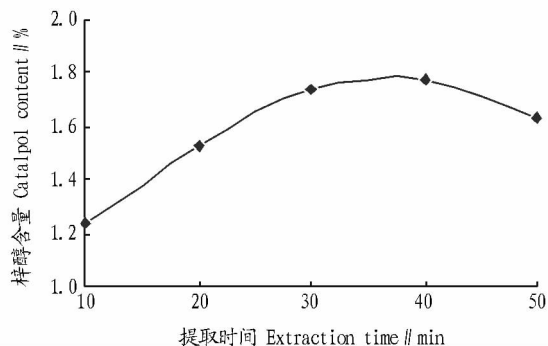


图 2 不同提取时间对梓醇提取效果的影响

Fig.2 Effects of extraction time on extraction

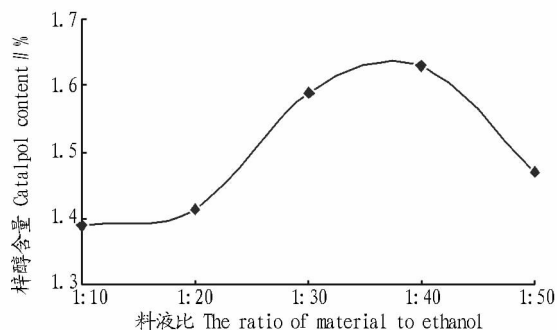


图 3 不同料液比对提取效果的影响

Fig.3 Effects of different ratio of material to ethanol on extraction

收带来困难等角度出发,选择料液比为 1:30。

2.3 正交试验结果 由表 2 可知,3 种因素对梓醇提取效果的影响程度依次为: A > C > B, 其中,料液比对梓醇提取率的影响最不显著,而提取剂浓度的影响达到显著水平。根据试验结果,最佳组合为 A₂B₃C₃D₂, 即乙醇浓度为 70%,料液比为 1:30,提取时间为 30 min。在此条件下进行试验,湖北地黄中梓醇含量可达 1.76%,证明确实是较优条件。

表 2 L₉(3⁴) 正交试验结果

Table 2 Result of orthogonal test L₉(3⁴)

试验号 Test No	乙醇浓度 A // % Ethanol concentration	提取时间 B // min Extraction time	料液比 C // g/ml Ratio of material to ethanol	D(空白) Blank	梓醇含量 % Catalpol content
1	50	20	1:20	1	1.24
2	50	30	1:30	2	1.47
3	50	40	1:40	3	1.54
4	70	20	1:30	3	1.60
5	70	30	1:20	1	1.67
6	70	40	1:40	2	1.76
7	95	20	1:40	2	1.48
8	95	30	1:30	3	1.47
9	95	40	1:20	1	1.59
R	0.260	0.190	0.073	0.073	

2.4 湖北地黄根、茎、叶和生地黄中梓醇含量的比较 由表 3 可知,分布在张家界的湖北地黄各部位梓醇的含量都远远高于生地黄,其叶中梓醇的含量是根的 1.43 倍,是生地黄的 4.23 倍。而且,湖北地黄各部位中以叶的梓醇含量最高,其

(下转第 13792 页)

性,超声提取时间对总黄酮得率影响的差异性不明显。影响总黄酮得率的主次因素 $B > A > C$,即料液比 $>$ 乙醇浓度 $>$ 超声提取时间,单次最佳提取工艺为 $A_2B_1C_1$,即使用 70% 乙醇,料液比 1:30,提取 50 min。

表3 方差分析结果

Table 3 Variance analysis result

方差来源	离散平方和	自由度	方差估计值	F 值	P
Variance	Discretized	Degree of	Variance	F value	
resource	square sum	freedom	estimated value		
A	0.703	2	0.352	19.604	<0.05
B	1.198	2	0.599	33.399	<0.05
C	0.264	2	0.132	7.368	>0.05
D	0.036	2	0.018		
误差 Error	0.036	2	0.018		

2.4 提取次数确定和最终得率计算 取 3 份晾干后样品,按上述 $A_2B_1C_1$ 进行超声提取,各提取 3 次,计算总黄酮得率平均值。结果表明,超声次数越多总黄酮累计得率越高,提高幅度降低较快。第 3 次总黄酮得率仅为 0.006%,因此超声提取 2 次即可达到满意效果,总黄酮得率为 0.465%,总提

(上接第 13789 页)

次为茎和根。因此,张家界地区湖北地黄品种优良,梓醇含量很高,极具开发利用价值。

表3 湖北地黄根、茎、叶和生地黄中梓醇含量

Table 3 The contents of catalpol in the *Rehmannia henryi* Brown's root, stem, leaf and *Radix rehmanniae* %

名称 Name	梓醇含量 Catalpol content
湖北地黄根	1.29
湖北地黄茎	1.35
湖北地黄叶	1.84
生地黄	0.44

3 结论

(1) 分布于张家界的湖北地黄通过超声波提取梓醇的较优工艺条件为:以 1:30 的液料比加入 70% 的乙醇水溶液,在超声波条件下提取 30 min,此时,梓醇含量高达 1.76%。

(2) 对分布于张家界的湖北地黄叶、茎、根和生地黄中的梓醇分别进行提取,其含量分别为 1.84%、1.35%、1.29% 和 0.44%。

取率为 98.73%。

3 结论

(1) 超声波提取总黄酮的提取率要明显高于回流提取和浸提,因此选择超声波提取为理想的提取方法。此方法为酸枣仁总黄酮的工业化生产提供了依据,超声波对中药有效成分的提取也是未来中药提取的趋势。

(2) 超声波提取总黄酮的最佳提取工艺为:70% 乙醇,料液比 1:30,提取 2 次,每次 50 min。

参考文献

- [1] 中国药典大全编辑委员会. 中国药典大全·中药卷[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:277.
- [2] 曾路,张如意,王序. 酸枣仁化学成分研究 II[J]. 药学学报,1987,22(2):114.
- [3] 袁冒鲁,王中博,焦莹,等. 酸枣仁中黄酮类镇静催眠有效成分的研究[J]. 中药通报,1987,9(12):34-36.
- [4] 王延峰,李延清,郝永红,等. 超声波法提取银杏叶黄酮的研究[J]. 食品科学,2002,23(8):166-167.
- [5] 冯涛. 竹叶总黄酮提取及纯化工艺的研究[D]. 天津:天津科技大学,2003:19-22.
- [6] 周斌. 用超声波提取中药材[J]. 安徽科技,2005(4):23-24.
- [7] 胡忠泽,谭志静,杨久峰,等. 超声法提取姜黄素最佳工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(2):6-7.

(3) 梓醇等环烯醚萜类物质结构相似,极性较大,采用薄层色谱扫描法测定地黄中梓醇含量,方法简便、灵敏,且具有较好的精密度和准确性。

参考文献

- [1] 张留记,屈凌波,赵玉芬. 不同产地地黄中地黄苷 A 的含量比较[J]. 时珍国医国药,2007,18(8):1809-1810.
- [2] 王太霞,李景原,李建军,等. 不同产区地黄的比较研究[J]. 河南农业科学,2005(10):69-73.
- [3] 刘彦飞,赵宇,温学森,等. 梓醇的药效学及化学转化研究现状[J]. 中国中药杂志,2007,32(12):1128-1130.
- [4] 楼之岑,秦波. 常用中药材品种整理和质量研究(北方编)(II)[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1995.
- [5] LUO Y Y, ZHANG S Q, SUO J Z. Determination of catalpoli *Radix rehmanniae* by high performance liquid chromatography[J]. Chin Pharm J, 1994,29(1):38-39.
- [6] WANG H J, BIAN B L, YANG J. A study on catalpol conten changes in *Rehmannia glutinosa*(Gaertn.)Libosch. under certain conditions [J]. China J Chin Mater Med,1997,22(7):408-409.
- [7] LI X E, YANG S L, YANG J S, et al. Study on content o catalpol in varieties and earthnuts of *Rehmannia glutinosa* [J]. Chin Pharm J,2002,37(11):820-823.
- [8] LI J P, ZHOU F J, JIA J W, et al. Effects of different stor time and condition on the contents of catalpol in *Rehmanni glutinosa* [J]. Chin Tradit Herb Drugs,2003,3(3):273.