

• 药学 •

文章编号: 1002-0217(2019) 01-0021-04

## 大叶冬青叶中 8 种活性成分提取工艺研究

陈颖,王存琴,汪雷,郑婷,郑述梁,黄超

(皖南医学院 药学院,安徽 芜湖 241002)

**【摘要】**目的: 选用四因素三水平正交实验设计, 探究不同因素、水平对大叶冬青叶中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 8 种主要活性成分含量和浸出物含量的影响, 优选大叶冬青叶的最佳提取工艺。方法: 采用高效液相色谱(HPLC) 同时检测大叶冬青叶中 8 种主要活性成分, 得出总峰面积, 将总峰面积和大叶冬青叶浸出物含量作为考察指标。通过因素分析和方差分析, 对提取工艺中溶剂浓度、溶剂倍数、提取温度、提取次数 4 个因素进行考察。结果: 所建立的 HPLC 检测方法快速、准确, 大叶冬青叶中 8 种活性成分均有良好的分离度; 最佳提取工艺为超声提取法, 提取溶剂 70% 甲醇, 溶剂倍数 50 倍, 提取温度 60 ℃, 提取次数 1 次, 提取时间 50 min, 其中溶剂浓度和提取温度对提取效率具有显著性影响。结论: 优化后的提取工艺稳定可靠, 评价指标易于控制, 可用于规范大叶冬青的提取工艺, 为大叶冬青药材的质量控制提供理论参考。

**【关键词】**大叶冬青; 高效液相色谱; 正交试验; 多酚类; 提取工艺

**【中图分类号】**R 284.1 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2019.01.006

Study on the extraction technology of 8 active components in the leaves of *Ilex latifolia*

CHEN Ying, WANG Cunqin, WANG Lei, ZHENG Ting, ZHENG Shuliang, HUANG Chao

College of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To observe the effect of different factors and levels on the extraction efficiency of 8 kinds of major active components, including the neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin, isoquercitrin, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C, in the leaves of *Ilex latifolia* in order to obtain the optimum extraction process for the leaves of *Ilex latifolia*. **Methods:** Orthogonal factorial experiments at three levels were performed and high performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect the 8 sorts of important active components in the leaves of *Ilex latifolia*. Total peak area concluded by HPLC and the extract of *Ilex latifolia* leaves were included as indicators. Then the factors, including solvent concentration, solvent multiple, extraction temperature and extraction times in the extracting process were examined through factor and variance analysis. **Results:** The established HPLC protocol in our experiment was quick and accurate in extracting the 8 kinds of active component in *Ilex latifolia* leaves. Ultrasound extraction should be the optimal technique with 70% methanol as extraction solvent, solvent multiple by 50 times, extraction temperature at 60 ℃ and single extraction at 50 min. The solvent concentration and extraction temperature mostly affected the extraction efficiency. **Conclusion:** The optimized extraction process is stable and reliable, and the evaluation index is easy to control, suggesting that our technology can be used to regulate the extraction process for *Ilex latifolia* and provide theoretical evidence for quality control in extracting the active components in the leaves of *Ilex latifolia*.

**【Key words】***Ilex latifolia*; high performance liquid chromatography; orthogonal experiment; polyphenols; extraction process

大叶冬青(*Ilex latifolia*) 又名苦丁茶, 系冬青科冬青属常绿乔木, 多分布于浙江、福建、广西等长江流域以南的地区<sup>[1]</sup>。现代化学成分及药理活性研究发现, 大叶冬青含有三萜及其皂苷、黄酮、多酚等多种化学物质<sup>[2-3]</sup>, 具有降血脂、降血糖、抗氧化等

多种生物学活性<sup>[4-7]</sup>。由于中药的化学成分和作用机制复杂, 虽有文献报道大叶冬青黄酮类成分的提取工艺<sup>[8]</sup>, 但此方法主要针对黄酮类成分, 应用范围有限。而对大叶冬青多酚类成分的提取工艺研究还未见报道, 且大叶冬青多酚类化学成分具有显著

基金项目: 国家自然科学基金项目(81402818); 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(GXYQZD2016177); 安徽省高等学校省级自然科学基金项目(2014A268); 皖南医学院博士科研基金项目(201401)

收稿日期: 2018-08-24

作者简介: 陈颖(1994-), 女, 2016 级硕士研究生, (电话) 15755370327, (电子信箱) 15755370327@163.com;

王存琴, 女, 副教授, 硕士生导师, (电子信箱) wcq5188b@163.com, 通信作者。

的抗氧化活性<sup>[9]</sup>,具有深入研究的价值。因此本实验拟探讨大叶冬青叶多酚类化学成分的最佳提取工艺,选用大叶冬青叶指纹图谱中的 8 个主要活性成分的总峰面积和浸出物含量作为评价指标,采用正交设计方法优选出最佳提取工艺,为大叶冬青叶有效物质提取和质量控制提供理论参考。

### 1 材料

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪 Agilent Technologies 1260 Infinity II (配二极管阵列检测器、四元泵、自动进样器),KQ5200E 型超声波清洗机(工作频率 40 kHz,昆山市超声仪器有限公司),AUW220D 型 1/10 万电子天平(日本岛津),色谱乙腈(德国,默克股份有限公司),色谱甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司),水为娃哈哈饮用纯净水。

1.2 试药 新绿原酸(PS13122601-1)、绿原酸(PS14050901)、隐绿原酸(PS14011403)、芦丁(PS160113-02)、异槲皮苷(PS13061301)、异绿原酸 B(PS13111502)、异绿原酸 A(PS13111501)和异绿原酸 C(PS13110401)对照品均购自成都普思生物科技有限公司,实验用大叶冬青叶采自安徽省祁门县,经安徽中医药大学汪荣斌副教授鉴定为冬青科冬青属植物大叶冬青 *I. latifolia* 的叶。标本均存放于皖南医学院药学院。

### 2 方法与结果

2.1 试验设计 采用正交试验法对大叶冬青药材提取工艺进行优选。以甲醇浓度(A)、溶剂倍数(B)、提取温度(C)、提取次数(D)为考察因素,每个因素选取 3 个水平(见表 1),以大叶冬青叶中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 8 个指标性成分的总峰面积和浸出物含量为评价指标。

表 1 大叶冬青叶提取工艺正交试验因素水平

水平	A 甲醇浓度/%	B 甲醇倍数	C 提取温度/℃	D 提取次数
1	30	30	40	1
2	50	40	60	2
3	70	50	80	3

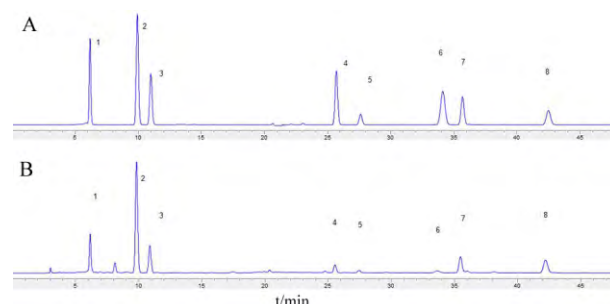
### 2.2 HPLC 含量测定

2.2.1 配制对照品溶液 精密称取对照品新绿原酸 8.40 mg,绿原酸 11.40 mg,隐绿原酸 8.40 mg,芦丁 22.9 mg,异槲皮苷 3.90 mg,异绿原酸 B 8.70 mg,异绿原酸 A 4.45 mg,异绿原酸 C 3.15 mg,分别置 5 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇超声溶解并定容至

刻度,作为单标对照品储备液。分别吸取 1 mL 至 10 mL 容量瓶中,50% 甲醇定容至刻度作混合对照品溶液,浓度分别为 0.168 g/L、0.228 g/L、0.168 g/L、0.458 g/L、0.078 g/L、0.174 g/L、0.089 g/L、0.063 g/L。4℃ 冷藏保存备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称定大叶冬青叶粉末(100 目) 2.0 g,精密称定相同的 9 份,根据 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计表采用超声提取法进行提取,每次提取时间 50 min,滤过,所得提取液水浴蒸干分别以相应的提取溶剂定容至 25 mL 容量瓶作为样品溶液。

2.2.3 色谱条件 采用 Agilent HC-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm 5 μm) 色谱柱;流动相为 0.2% 磷酸乙腈(A)-0.2% 磷酸水(B)进行梯度洗脱,梯度洗脱程序:0~15 min,10% A;15~30 min,16% A;30~50 min,18% A;流速 1.0 mL/min,柱温 40℃,检测波长 320 nm。在上述色谱条件下,样品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 色谱峰的分离度>1.5,保留时间与对照品保持一致,混合对照品及大叶冬青供试品色谱图见图 1。



1.新绿原酸;2.绿原酸;3.隐绿原酸;4.芦丁;5.异槲皮苷;6.异绿原酸 B;7.异绿原酸 A;8.异绿原酸 C。

图 1 大叶冬青对照品(A)与样品 HPLC(B)图

2.2.4 精密度试验 精密称定大叶冬青叶粉末 2.0 g,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,重复进样 6 次,记录 HPLC 图。结果表明 8 个指标成分色谱峰相对保留时间的 RSD 均<1.44%,相对峰面积的 RSD 均<1.90%。

2.2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进行色谱分析。记录 HPLC 图,结果表明 8 个指标成分色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.34%,相对峰面积的 RSD 均<1.64%。

2.2.6 重复性试验 取同批大叶冬青粉末 6 份,每份约 2.0 g,精密称定,同法制备供试品溶液,重复进样 6 次,记录 HPLC 图。结果表明 8 个指标成分色谱峰相对保留时间的 RSD 均<1.86%,相对峰面积

的 RSD 均 < 2.28%。

2.3 浸出物含量的测定 按照 2.2.2 项下步骤制备样品溶液 精密移取 20 mL 置已干燥至恒重并称重的蒸发皿中 在水浴上蒸干 于 105 °C 干燥 3 h 移置干燥器中 冷却 30 min 迅速精密称定质量。

2.4 正交试验方案及结果 选择  $L_9(3^4)$  正交试验表 以选择的 8 个指标成分总峰面积为最终评价指标 对其结果进行数据处理。大叶冬青叶 8 个指标成分的峰面积见表 2。同时参考 9 组实验浸出物含量 对结果进行综合评价。分析结果见表 3~5。

结合表 4、5 对大叶冬青叶 8 个指标成分总峰面积和浸出物含量两个指标进行分析。在所选因素水平范围内 根据总峰面积指标的因素分析 影响大叶冬青叶提取工艺的因素依次为 A>C>D>B 而在方差分析中 溶剂浓度和提取温度的差异有统计学

意义 其中溶剂浓度为主要影响因素 溶剂倍数与提取次数对试验结果没有显著性影响。而在以浸出物为指标的因素分析中影响大叶冬青提取工艺的因素依次为 A>B>C>D 且在其方差分析中 A、B、C、D 4 个因素差异无统计学意义。在以总峰面积为指标的直观分析中  $A_3>A_2>A_1$  ,  $B_3>B_2>B_1$  ,  $C_2>C_1>C_3$  ,  $D_1>D_3>D_2$  选择  $A_3B_3C_2D_1$  为最佳提取条件 即提取溶剂为 70% 甲醇 溶剂倍数为 50 倍 提取温度为 60 °C 提取次数为 1 次 提取时间 50 min。

2.5 工艺验证 根据正交试验筛选出的最佳工艺条件 进行 3 批工艺验证 结果见表 6。根据优选出的大叶冬青叶最佳制备方法制备出的大叶冬青叶提取液中 8 个主要成分的峰面积均较高。正交试验所得结论与实际提取结果相符合 且结果稳定可信。

表 2 HPLC 色谱图主要峰峰面积

编号	色谱峰峰面积							
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	芦丁	异槲皮苷	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
1	3644.4	10323.5	3466.6	875.8	219.7	505.8	1631.5	1922.0
2	3725.8	10008.9	3873.5	814.8	347.6	831.1	1364.8	2172.1
3	3373.9	9179.0	4067.6	740.0	245.3	961.2	1175.0	1814.9
4	4167.8	11981.2	4032.0	985.0	347.1	805.1	2012.3	2948.1
5	3230.2	12095.1	3856.8	987.2	411.7	665.2	2378.3	3073.5
6	4140.8	11187.4	3994.2	882.3	298.4	818.3	1689.5	2592.7
7	4068.7	12344.3	3799.5	936.4	296.3	499.9	1684.5	2481.0
8	3703.9	12069.6	3674.9	986.7	371.9	637.9	2437.4	3065.9
9	3582.6	13824.2	3941.4	1111.4	434.8	700.2	2921.4	3361.9

表 3 大叶冬青叶正交实验方案与总峰面积和浸出物含量表

编号	因素				总峰面积	浸出物含量(g/g)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	22589.3	0.259
2	1	2	2	2	23138.6	0.274
3	1	3	3	3	21556.9	0.258
4	2	1	2	3	27278.7	0.283
5	2	2	3	1	26698.0	0.339
6	2	3	1	2	25603.7	0.269
7	3	1	3	2	26110.6	0.284
8	3	2	1	3	26948.1	0.278
9	3	3	2	1	29877.9	0.271

表 4 总峰面积与浸出物含量直观分析表

考察项	均值、极差	A	B	C	D
总峰面积	K1	22428.263	25326.196	25047.036	26388.407
	K2	26526.788	25594.917	26765.049	24950.971
	K3	27645.544	25679.482	24788.510	25261.217
	66R	5217.281	353.286	1976.539	1437.436
浸出物含量	K1	0.264	0.275	0.269	0.290
	K2	0.297	0.297	0.276	0.276
	K3	0.278	0.266	0.294	0.273
	66R	0.033	0.030	0.025	0.017

表 5 总峰面积与浸出物含量方差分析表

考察项	影响因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P
总峰面积	A	45269532.762	2	221.721	19	<0.05
	B	204173.213	2	1.000	19	-
	C	6925106.826	2	33.918	19	<0.05
	D	3433029.876	2	16.814	19	-
	误差 6	204173.210	2			
浸出物含量	A	0.002	2	2	19	-
	B	0.002	2	2	19	-
	C	0.001	2	1	19	-
	D	0.000	2	0	19	-
	误差 6	0.00	2			

表 6 大叶冬青叶提取工艺验证

样品	峰面积								浸出物含量(g/g)
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	芦丁	异槲皮苷	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	
1	3576.5	13829.2	3926.4	1122.4	439.9	705.1	2923.4	3300.0	0.272
2	3569.7	13869.3	3956.4	1113.6	429.6	704.2	2919.3	3356.6	0.273
3	3598.4	13826.5	3946.6	1115.6	435.6	699.6	2924.4	3359.3	0.271

### 3 讨论

3.1 提取方法与溶剂的选择 比较了超声提取法和加热回流提取法的提取效率,结果显示超声提取法简单方便、易于控制,提取效率也相对较高。

分别以 50% 甲醇、70% 甲醇、50% 乙醇、70% 乙醇、水为提取溶剂,其他提取条件相同的情况下,50% 甲醇和 70% 甲醇提取液中各峰面积和分别高于 50% 乙醇和 70% 乙醇以及水,因此采用甲醇作为提取溶剂。

3.2 评价指标的选择 抗氧化作用是大叶冬青的主要功效之一,本文选用的新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 8 个指标性成分具有抗氧化、抗炎、抗菌等作用。浸出物含量是评价中药药效的另一重要指标,其含量的变化会影响有效成分的含量,并最终影响药物的药理作用。选用大叶冬青叶中 8 个指标成分的总峰面积和浸出物含量联合评价大叶冬青叶提取工艺更为全面。

本试验以大叶冬青叶中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 8 个主要活性成分的总峰面积和浸出物含量为指标,选择最佳提取工艺,考虑了各指标的协同效应,较单一指标确定最佳工艺更具有可靠性,同时也更加科学、有效、合理。本实验正交工艺方案简单

方便,易于结果统计,通过工艺验证,优化后的提取工艺结果稳定可靠,可为大叶冬青的进一步研究开发提供理论参考。

### 【参考文献】

- [1] 王存琴,张艳华.大叶冬青的化学成分及药理活性研究进展[J].中国药房,2014(11):1052-1054.
- [2] 伍彬,郑曦孜.大叶冬青化学成分研究[J].中国药业,2009,18(10):17-18.
- [3] OUYANG MA,LIU YQ,WANG HQ,et al.Triterpenoid saponins from *Ilex latifolia* [J].Phytochemistry,1998,49(8):2483-2486.
- [4] FAN J,WU Z,ZHAO T,et al.Characterization,antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Ilex latifolia* Thunb [J].Carbohydrate Polymers,2014,101(1):990-997.
- [5] 潘慧娟,廖志银,应奇才,等.苦丁茶大叶冬青的降脂作用研究[J].茶叶科学,2004,24(1):49-52.
- [6] 李晓储,蒋继宏,方德兰,等.大叶冬青叶若干生化指标测定及抗菌活性研究[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2006,27(1):91-94.
- [7] ZHAO Z,WANG Q,WANG K,et al.Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its anti-fungal components[J].Bioresour Technol,2010,101(1):292-297.
- [8] 旷春桃,李湘洲,汪玉霞,等.大叶冬青叶中总黄酮测定方法和提取工艺研究[J].食品科学,2009,30(6):49-51.
- [9] ZHENG W,MICHAELN C,PAUL S.Analysis of chlorogenic acids in beverages prepared from Chinese health foods and investigation, in vitro,of effects on glucose absorption in cultured Caco-2 cells [J].Food Chemistry,2008,108(1):369-373.