

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.02.004

## 枸骨叶中芦丁的提取及含量测定

李艳芝 付英杰 王建安 季荣涛

(济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

**摘要 目的** 研究枸骨叶中芦丁的最佳提取工艺,并建立其含量测定方法。**方法** 以芦丁含量为指标,采用  $L_9(3^4)$  正交设计,考察了提取时间、乙醇浓度、料液比、提取次数对提取率的影响,优选出合理的提取工艺。用高效液相法测定芦丁的含量。**结果** 最佳提取工艺条件为:用 10 倍量的 90% 乙醇,超声提取 2 次,每次 50 min,芦丁在 10.70~64.20  $\mu\text{g/ml}$  范围内具有良好的线性关系( $r=0.9999$ ),平均加样回收率为 98.70%,RSD 为 2.43%。**结论** 该提取工艺简便、快捷,合理可行,测定方法准确,重现性好,专属性强,为枸骨叶质量标准的建立提供了科学依据。

**关键词** 枸骨叶;芦丁;超声提取;正交试验;高效液相色谱法

**中图分类号:** R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2014)04-088-03

### The extraction and determination of rutin in the leaves of *Ilex cornuta*

LI Yan-zhi, FU Ying-jie, WANG Jian-an, et al

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

**Abstract: Objective** To study the extraction process and determination of rutin in the leaves of *Ilex cornuta*. **Methods** With rutin as index, extraction time, concentration of alcohol, amount of alcohol and extraction times were evaluated by  $L_9(3^4)$  orthogonal design method. HPLC was used to analyze the content of rutin. **Results** The best extraction process was to extract 2 times with ten times of 90% ethanol for 50 minutes each time. Rutin showed a good linear relationship at the range of 10.70~64.20  $\mu\text{g/ml}$  ( $r=0.9999$ ). The recovery rate was 98.70% and RSD was 2.43%. **Conclusion** The extraction method is simple, rapid and applicable. The HPLC determination was shown to be rapid, reliable and simple, and may be used for the quality control of the leaves from *Ilex cornuta*.

**Key words:** The leaves of *Ilex cornuta*; Rutin; Ultrasonic extraction; Orthogonal design; HPLC

枸骨叶来源于冬青科冬青属植物枸骨(*Ilex cornuta* Lindl. et Paxt.)的干燥叶,具有清热养阴、益肾平肝等功效<sup>[1]</sup>。枸骨叶可以做苦丁茶用,是减肥及预防动脉粥样硬化的良好饮品<sup>[2]</sup>。研究表明,枸骨叶中主要含有三萜类<sup>[2-5]</sup>、黄酮类化合物<sup>[6]</sup>等,枸骨叶中芦丁的提取及含量测定未见文献报道。本文采用正交试验对枸骨叶中芦丁超声提取工艺进行研究,并采用高效液相色谱法建立其含量测定方法,旨在为进一步开发利用枸骨叶资源提供依据。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

高效液相色谱仪 SPD-10AVP, LC-10ATVP (岛津国际贸易上海有限公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); BS224S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

#### 1.2 试药

枸骨叶采于济宁医学院日照校区本草园,烘干,粉碎过 40 目筛备用;芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号 F20020428);甲醇为色谱纯(天津市科密欧化学试剂有限公司);其他试剂为分析纯,水为超纯水。

### 2 方法与结果

#### 2.1 枸骨叶中芦丁的提取

准确称取枸骨叶粉末 100 g,按要求加入一定

\* [基金项目] 日照市应用技术与开发计划项目(2013JHSZ017); 济宁医学院青年基金重点项目(JYQ2011KZ003)

量的提取溶剂,超声波提取一定时间,抽滤,提取液用石油醚脱色 3 次,弃石油醚层,萃取液旋转蒸发回收溶剂,用甲醇定容于 250 ml 容量瓶中,作为待测液。

2.2 枸骨叶中芦丁含量的测定

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取 105℃干燥至恒重的芦丁对照品 0.0107 g,置于 100 ml 容量瓶中,加甲醇适量溶解,定容,得 0.107 mg/ml 的芦丁溶液,待用。

2.2.2 样品溶液的制备 精密量取“2.1”项中待测液 1 ml 于 250 ml 容量瓶中,甲醇定容,摇匀,用微孔滤膜(0.45μm)滤过,即得样品溶液。

2.2.3 测定波长的确定 分别取对照品溶液和样品溶液,于 200~600 nm 波长之间扫描,结果表明,两者均在 356 nm 波长处有最大吸收,故选择 356 nm 为测定波长。

2.2.4 色谱条件 Kromasil C18 柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为甲醇-0.1%冰醋酸水溶液(45:55);柱温:室温(23℃);流速:0.8 ml/min;检测波长:356 nm;理论塔板数按芦丁计算>4000;保留时间为 6.215 min。

2.2.5 标准曲线的制备 精密吸取对照品溶液 0.0、1.0、2.0、4.0、5.0、6.0 ml 置于 10 ml 容量瓶中,用甲醇定容。分别取 20μl 进样 3 次,记录峰面积,以峰面积值(Y)对芦丁的浓度(X)进行线性回归,得回归方程为  $Y = 15587X + 20055$ ,  $r = 0.9999$ ,表明芦丁对照品在 10.70 ~ 64.20 μg/ml 范围内线性关系良好。

2.2.6 样品含量测定 取“2.2.2”项中样品溶液,按上述色谱条件进样 20μl,记录峰面积,根据回归方程计算,得各样品芦丁含量。

2.2.7 精密度试验 取同一供试品溶液各 20μl,按前述色谱条件,连续重复进样 5 次,测定结果 RSD 为 0.78%。

2.2.8 稳定性试验 同一份样品溶液分别隔 2 h 进样 1 次,在 10 h 内测定结果 RSD 为 0.81% (n=5),表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.2.9 重现性试验 称取同一批次药材样品,按样品制备方法制备 5 份,测定结果 RSD 为 1.87%。

2.2.10 加样回收率试验 精密吸取已知芦丁含量的样品溶液,分别精密加入芦丁对照品溶液,配成低、中、高浓度各 3 份,在前述色谱条件下测定,计算加样回收率,结果见表 1。

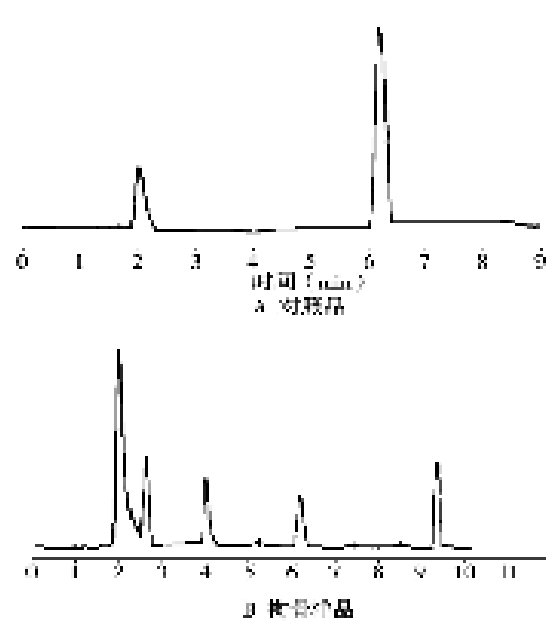


图 1 芦丁对照品及枸骨样品高效液相色谱图

表 1 加样回收率试验结果

| 样品量<br>(mg) | 加入量<br>(mg) | 测得量<br>(mg) | 回收率<br>(%) | 平均回收<br>率(%) | RSD<br>(%) |
|-------------|-------------|-------------|------------|--------------|------------|
| 1.452       | 0.214       | 1.654       | 94.39      |              |            |
| 1.452       | 0.214       | 1.665       | 99.53      |              |            |
| 1.452       | 0.214       | 1.672       | 102.8      |              |            |
| 1.452       | 0.428       | 1.881       | 100.2      |              |            |
| 1.452       | 0.428       | 1.875       | 98.83      | 98.70        | 2.43       |
| 1.452       | 0.428       | 1.879       | 99.77      |              |            |
| 1.452       | 0.856       | 2.290       | 97.90      |              |            |
| 1.452       | 0.856       | 2.276       | 96.26      |              |            |
| 1.452       | 0.856       | 2.296       | 98.60      |              |            |

2.3 单因素试验

2.3.1 提取时间对枸骨叶中芦丁提取量的影响 准确称量枸骨叶粉末 100 g,分别加入 8 倍量 90%乙醇超声提取,提取时间分别为 20、30、40、50、60min,3 次,分别测定芦丁含量,50 min 时提取含量最大。

2.3.2 乙醇浓度对枸骨叶中芦丁提取量的影响 准确称量枸骨叶粉末 100 g,分别加入 8 倍量的 60%、70%、80%、90%的乙醇,超声提取 50min,3 次,分别测定芦丁含量,70%乙醇提取的芦丁含量最大。

2.3.3 料液比对枸骨叶中芦丁提取量的影响 准确称量枸骨叶粉末 100 g,分别加入 8、10、12、16 倍量 70%乙醇超声提取 50min,3 次,分别测定芦丁含量,12 倍量的乙醇所得芦丁含量最大。

**2.3.4 提取次数对枸骨叶中芦丁提取量的影响**  
准确称量枸骨叶粉末 100 g, 分别加入 12 倍量 70% 乙醇超声提取 1 次, 2 次, 3 次, 4 次, 每次 50 min, 分别测定芦丁含量, 提取 2 次所得芦丁含量最大。

#### 2.4 正交试验设计

为系统考察超声提取枸骨叶中芦丁工艺参数, 根据单因素试验的结果, 选用提取时间、乙醇浓度、料液比、提取次数作为考察因素, 进行正交设计, 选用  $L_9(3^4)$  正交表, 因素水平见表 2。

表 2 正交试验因素水平表

| 水平 | 因素             |              |          |           |
|----|----------------|--------------|----------|-----------|
|    | A<br>提取时间(min) | B<br>乙醇浓度(%) | C<br>料液比 | D<br>提取次数 |
| 1  | 40             | 70           | 1:10     | 1         |
| 2  | 50             | 80           | 1:12     | 2         |
| 3  | 60             | 90           | 1:16     | 3         |

按表 3 所列各工艺制备样品, 加乙醇后均浸泡 1 h 后超声提取, 计算芦丁提取量。正交试验结果和直观分析见表 3, 方差分析见表 4。由分析结果

表 3 正交试验结果和直观分析

| 序号    | 提取时间<br>(A) | 乙醇浓度<br>(B) | 料液比<br>(C) | 提取次数<br>(D) | 芦丁含量<br>(mg/g) |
|-------|-------------|-------------|------------|-------------|----------------|
| 1     | 1           | 1           | 1          | 1           | 0.35           |
| 2     | 1           | 2           | 2          | 2           | 0.68           |
| 3     | 1           | 3           | 3          | 3           | 1.03           |
| 4     | 2           | 1           | 2          | 3           | 0.86           |
| 5     | 2           | 2           | 3          | 1           | 0.56           |
| 6     | 2           | 3           | 1          | 2           | 1.21           |
| 7     | 3           | 1           | 3          | 2           | 0.41           |
| 8     | 3           | 2           | 1          | 3           | 0.42           |
| 9     | 3           | 3           | 2          | 1           | 0.64           |
| $K_1$ | 0.682       | 0.540       | 0.660      | 0.517       |                |
| $K_2$ | 0.877       | 0.553       | 0.727      | 0.767       |                |
| $K_3$ | 0.490       | 0.960       | 0.667      | 0.770       |                |
| R     | 0.387       | 0.420       | 0.067      | 0.253       |                |

可知影响枸骨叶中芦丁提取率的主次因素依次为: 乙醇浓度 > 提取时间 > 提取次数 > 料液比, 其中提取时间和乙醇浓度有显著影响, 最佳提取工艺为

$A_2B_3C_2D_3$ 。由于料液比对提取率影响很小, 提取 2 次和 3 次结果差异很小。从节约成本角度出发, 确定最佳提取工艺为  $A_2B_3CD_2$ , 即用 10 倍量的 90% 乙醇, 超声提取 2 次, 每次 50 min。

表 4 方差分析数据表

| 因素   | 偏差平方和 | 自由度 | F 值    | F 临界值  | P     |
|------|-------|-----|--------|--------|-------|
| 提取时间 | 0.224 | 2   | 28.000 | 19.000 | <0.05 |
| 乙醇浓度 | 0.342 | 2   | 42.750 | 19.000 | <0.05 |
| 料液比  | 0.008 | 2   | 1.000  | 19.000 | 误差    |
| 提取次数 | 0.127 | 2   | 15.875 | 19.000 | 0.05  |

#### 2.5 验证实验

取 3 批枸骨叶药材, 按照所得最佳提取条件进行提取, 所得芦丁含量分别为 1.83、1.97、1.68 mg/g, 平均含量为 1.83 mg/g, 高于正交试验中任何一组, 表明所得提取工艺稳定可行。

#### 3 结论

本文通过正交试验法得出了枸骨叶中芦丁的最佳超声提取工艺, 并采用高效液相色谱法建立了其含量测定方法。所得提取工艺简便、稳定可行, 为枸骨叶药效物质基础的进一步研究提供了快捷、经济、高效的提取手段; 所建立的含量测定方法线性关系良好, 重现性好, 专属性强, 为枸骨叶的质量控制和评价提供了科学依据。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 233.
- [2] 李维林, 吴菊兰, 任冰如, 等. 枸骨的化学成分[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(2): 1-5.
- [3] 范志英. RP-HPLC 测定无刺枸骨不同部位中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 浙江中医杂志, 2010, 45(2): 144-145.
- [4] 姚志容, 李军, 周思祥, 等. 枸骨叶中的三萜类成分[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(8): 999-1001.
- [5] 范琳琳, 陈重, 冯育林, 等. 枸骨根的化学成分研究[J]. 中草药, 2011, 42(2): 234-236.
- [6] Zhou SX, Yao ZR, Li J, et al. Flavonoids from the leaves of *Ilex cornuta*[J]. Chin J Nat Med, 2012, 10(2): 84-87.

(收稿日期 2014-02-15)