

杜仲醇提取工艺研究^{*}

彭金年^{1,2}, 孙启时¹, 苏印泉², 董娟娥²

(1 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用单因素和正交试验设计, 应用高效液相色谱仪测定不同提取条件下杜仲醇的提取量, 研究了提取溶剂、提取温度、提取时间和提取次数对杜仲醇提取量的影响。结果表明, 各因素对杜仲醇含量影响程度由大到小依次为: 提取次数> 提取时间> 提取溶剂> 提取温度; 极差分析结果表明, 杜仲醇的最佳提取条件为: 原材料粉碎, 加10倍体积的蒸馏水在80℃下水浴回流提取2次, 每次2h, 在此提取条件下, 杜仲醇的提取量最高, 达8.95 g/kg。

[关键词] 杜仲叶; 杜仲醇; 提取工艺

[中图分类号] S794.908

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)01-0035-04

杜仲(*Eucammia ulmoides* Oliv.)是中国特有的名贵经济树种, 其树皮有强筋骨、补肝肾、久服轻身耐老等功效, 为中药之上品^[1-2]。国内外学者对杜仲的化学成分进行了大量研究, 确定杜仲的主要有效成分为木脂素类化合物和环烯醚萜类化合物^[3-4]。药理研究表明, 杜仲中的许多环烯醚萜类化合物具有显著的生理活性^[4]。杜仲醇(eucommiol)是环烯醚萜开环后的产物, 为一无色油状物, 只存在于植物杜仲(*Eucammia ulmoides* Olive)中, 其他来源未见报道, 是杜仲的特异性成分, 专属性强^[5-8]。Li Yanmei等^[9]研究证明, 杜仲醇是对肉芽形成及胶原蛋白合成起促进作用的主要有效成分之一。本试验采用单因素和正交试验研究了提取次数、提取时间、提取温度和提取溶剂等对杜仲醇提取效果的影响, 以期确定杜仲醇的最佳提取条件提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试杜仲叶采自西北农林科技大学林学院苗圃, 鲜叶自然阴干, 于80℃烘至恒重, 粉碎备用; 杜仲醇标准品由北京大学药学院车庆明教授提供; 甲醇, 纯度为色谱纯, 其余试剂均为国产分析纯; LC-VP型高效液相色谱仪由日本岛津制造厂生产。

1.2 杜仲醇标准液

称取室温下干燥至恒重的杜仲醇标准品0.982

mg, 用蒸馏水配成浓度分别为0.164, 0.327, 0.655, 0.982, 1.309, 1.637 mg/mL的标准溶液。

1.3 试验方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱为ODS柱, 流动相为V_{甲醇}:V_水=1:9的甲醇稀释液, 流速1.0 mL/min, 检测波长210 nm, 柱温25℃, 进样体积3 μL。

1.3.2 标准曲线绘制 精确吸取标准溶液各3 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积。以浓度为横坐标(X), 峰面积值为纵坐标(Y), 进行线性回归, 得回归方程 $Y = 1.187 \times 10^{-6}X - 0.0111$, 相关系数 $r = 0.999$, 线性范围为0.164~1.637 mg/mL。

1.3.3 单因素试验 (1)提取次数对杜仲醇提取量的影响。a 准确称取杜仲叶粉2.000 g, 置于150 mL平底烧瓶中, 分别加入10倍体积的蒸馏水、体积分数60%的乙醇和体积分数50%的甲醇。b 80℃水浴回流提取, 每次1 h, 提取次数依次为1, 2...8次。c 过滤, 滤液合并浓缩, 转入50 mL容量瓶, 用提取溶剂定容至刻度(待检液), 用高效液相色谱仪测定待检液中杜仲醇的含量, 确定最佳提取次数。(2)提取时间对杜仲醇提取量的影响。a 杜仲叶粉预处理方法同(1)a。b 80℃水浴回流提取2次, 每次提取时间依次为0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5和3.0 h。c 操作方法同(1)c, 以确定最佳提取时间。(3)提取温度对杜仲醇提取量的影响。a 杜仲叶粉预处理方法同(1)a。b 80℃水浴回流提取2次, 每次2 h, 提取温度依

* [收稿日期] 2005-05-24

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2001BA502B0403)

[作者简介] 彭金年(1976-), 女, 湖北洪湖人, 在读博士, 主要从事药用植物与中药化学研究。

[通讯作者] 苏印泉(1954-), 男, 陕西白水人, 教授, 主要从事植物资源开发与利用研究。

次为 40, 50, 60, 70, 80 和 90 。c 操作方法同(1) c, 以确定最佳提取温度。(4) 提取溶剂对杜仲醇提取量的影响。a 准确称取杜仲叶粉 2 000 g, 置于 150 mL 平底烧瓶中, 分别加入 10 倍体积的蒸馏水、体积分数 10%, 20%, 30%, ..., 90% 的乙醇、体积分数 10%, 20%, 30%, ..., 90% 的甲醇。b 80 ℃ 水浴回流提取 2 次, 每次 2 h。c 操作同(1) c, 以确定最佳提取溶剂。

1.3.4 正交试验 根据单因素试验结果选定各因素水平, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 试验设计见表 1。

表 1 杜仲醇最佳提取条件试验因素及其水平

Table 1 Factors and levels of the best extraction conditions of eucommiol experiment

水平 Level	溶剂 Solvent	温度/ Temp- erature	时间/h Time	提取次数 Fre- quency
1	蒸馏水 Distilled water	70	1.5	1
2	50% 甲醇 50% methanol	80	2.0	2
3	60% 乙醇 60% ethanol	90	2.5	3

1.3.5 杜仲醇含量的计算 测定不同提取条件下

杜仲提取液中杜仲醇含量。根据标准液的保留时间定性, 将峰面积代入回归方程计算各待检液中杜仲醇含量。杜仲叶中杜仲醇的含量由下式求得: 杜仲醇含量/(g · kg⁻¹) = 测试值 × 定容体积/叶粉质量。

2 结果与分析

2.1 单因素对杜仲醇提取量的影响

2.1.1 提取次数对杜仲醇提取量的影响 由图 1 可知, 提取次数越多, 杜仲醇提取量越高, 但提取 3 次之后, 杜仲叶中的杜仲醇已基本提取完全, 再增加提取次数, 杜仲醇提取量无显著增加。

2.1.2 提取时间对杜仲醇提取量的影响 由图 2 可知, 提取时间为 2 h 时杜仲醇提取量较高; 超过 2 h 后, 再延长提取时间, 杜仲醇提取量无显著增加。

2.1.3 提取温度对杜仲醇提取量的影响 由图 3 可知, 提取温度在 80 ℃ 以下时, 随着温度的升高, 杜仲醇提取量呈增加趋势; 当温度超过 80 ℃ 后, 杜仲醇提取量反而减少。

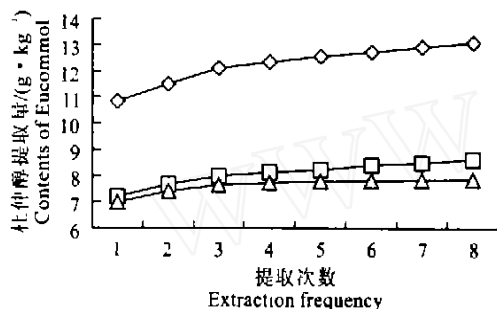


图 1 提取次数对杜仲醇提取量的影响

—◇—, 蒸馏水; —□—, 乙醇; —△—, 甲醇

Fig. 1 Effect of extraction frequency on contents of eucommiol

—◇—, Distilled water; —□—, Ethanol; —△—, Methanol

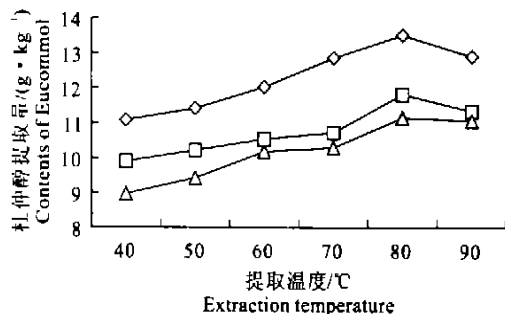


图 3 提取温度对杜仲醇提取量的影响

Fig. 3 Effect of extraction temperature on contents of eucommiol

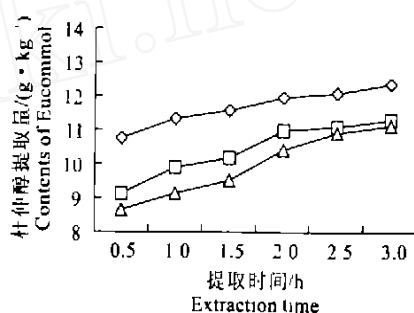


图 2 提取时间对杜仲醇提取量的影响

—◇—, 蒸馏水; —□—, 乙醇; —△—, 甲醇 (下图同)

Fig. 2 Effect of extraction time on contents of eucommiol

—◇—, Distilled water; —□—, Ethanol; —△—, Methanol (The same as below)

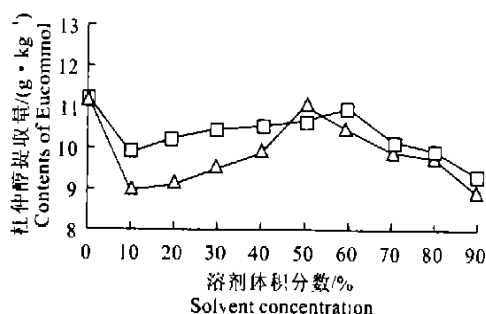


图 4 溶剂及其浓度梯度对杜仲醇提取量的影响

Fig. 4 Effect of solvent concentration on contents of eucommiol

2.1.4 提取溶剂对杜仲醇提取量的影响 杜仲醇易溶于水、甲醇、乙醇等极性溶剂, 不溶或难溶于乙酸乙酯、氯仿等非极性溶剂。本试验采用不同体积分数的甲醇、乙醇和蒸馏水为提取溶剂。由图 4 可知, 提取溶剂为蒸馏水时, 杜仲醇提取量高于各种体积分数的乙醇或甲醇溶液。提取溶剂为乙醇或甲醇时, 杜仲醇提取量在溶剂体积分数较低时随溶剂体积分数的增大而提高, 在溶剂体积分数较高时随溶剂体积分数的增大而降低, 其中乙醇体积分数为 60%、

甲醇体积分数为 50% 时, 杜仲醇的提取量最高。
2.2 杜仲醇提取条件的优化
由表 2 可知, 提取次数和提取时间对杜仲醇的提取量均有明显影响。各因素对杜仲醇提取量影响程度依次为: 提取次数> 提取时间> 提取溶剂> 提取温度。综合分析各因素 K 值后发现, 杜仲醇提取的最佳工艺条件为: 加 10 倍体积的蒸馏水, 在 80 下水浴回流提取 2 次, 每次 2 h。在此提取条件下, 杜仲醇的提取量为 8.95 g/kg。

表 2 杜仲醇最佳提取条件正交试验结果

Table 2 Results of the best extraction conditions of eucommiol experiment

试验 Order	提取因素 Factor				杜仲醇含量/ (g · kg ⁻¹) Contents of eucommiol
	溶剂 Solvent	温度/ Temperature	时间/h Time	次数 Frequency	
1	蒸馏水 Distilled water	70	1.5	1	7.30
2	蒸馏水 Distilled water	80	2.0	2	8.95
3	蒸馏水 Distilled water	90	2.5	3	7.51
4	50% 甲醇 50% methanol	70	2.0	3	7.53
5	50% 甲醇 50% methanol	80	2.5	1	7.19
6	50% 甲醇 50% methanol	90	1.5	2	8.16
7	60% 乙醇 50% ethanol	70	2.5	2	7.70
8	60% 乙醇 50% ethanol	80	1.5	3	7.50
9	60% 乙醇 50% ethanol	90	2.0	1	7.38
K_1	24.31	22.53	22.96	21.87	
K_2	22.91	23.84	24.37	24.82	
K_3	22.59	23.05	22.40	22.54	
R	1.75	1.31	1.97	2.95	

3 讨 论

国内学者对杜仲化学成分的提取进行了大量研究^[10-11], 多以一定体积分数的乙醇或其他有机溶剂为提取溶剂, 本试验选用极性最大的水作为提取溶剂。试验结果表明, 用水作溶剂, 在 80 ℃ 时对杜仲醇

连续提取 2 次, 每次 2 h, 此条件下提取效果较好。水作溶剂不仅能有效地溶出杜仲醇, 而且廉价易得, 无毒无污染, 是一种环保经济型溶剂, 不会与其有效成分发生化学反应, 也无任何不良成分的残留, 能保证有效成分的原始药效, 尤其在杜仲醇产业化提取生产中值得推广。

[参考文献]

[1] 牛春山. 陕西树木志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1940: 728.
[2] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986: 1032; 2090.
[3] 胡佳玲. 杜仲研究进展[J]. 中草药, 1999, 30(5): 394-396.
[4] 尉 芹, 马希汉, 张康健. 杜仲化学成分研究[J]. 西北林学院学报, 1995, 10(4): 88-93.
[5] 张康健, 王 蓝, 马希汉. 杜仲综合开发的发展与前景[J]. 西北林学院学报, 1996, 11(2): 75-79.
[6] 赵玉英, 耿 权, 程铁民. 杜仲化学成分研究概况[J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(3): 46-52.
[7] Bianco A, Iavarone C, Trogolo C. Structure of eucommiol: a new cyclopentenoid-tetrol from *E. ulmoides*[J]. Tetrahedron, 1974, 30: 4117-4121.
[8] Bianco A, Bonini C, Iavarone C, et al. Structure elucidation of eucommioside (2¹⁴O-βD-glucopyranosyl eucommiol) from *E. ulmoides*[J]. Phytochem, 1982, 21(1): 201-203.
[9] Li Yanmei, Sakurako K, Koichi M, et al. The promoting effect of eucommiol from *Eucommia cortex* on collagen synthesis[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2000, 23(1): 54-59.
[10] 刘辉琳, 唐明林, 安莲英, 等. 杜仲药用有效成分提取方法研究[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(6): 47-50.
[11] 叶文峰, 陈 新, 刘秀娟, 等. 杜仲叶中黄酮类化合物的提取工艺[J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2001, 25(1): 69-71.

(下转第 44 页)

Refilling of embolism in the xylem of eight tree species and its relationship with Pressure- Volume parameters

AN Feng^{1a}, CAI Jing^{1a}, JIANG Zai-min^{1b},
ZHANG Yuan-yang^{1b}, LAN Guo-yu^{1a, 2}, ZHANG Shuo-xin^{1a}

(1 a College of Forestry, b College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: Studied in this research were eight tree species, *Robinia pseudoacacia* L., *Acer truncatum* Bge., *Hippophae rhamnoides* L., *Ulmus pumila* L., *Pinus tabulaeformis* Carr., *Pinus bungeana* Zucc. ex Endl., *Ligustrum lucidum* Ait., *Salix matsudana* Koidz. f. *pendula* Schneid., growing well on Xi-lin campus of Northwest A & F University. Xylem cavitations were induced by pressure collar under 2.5 MPa to observe the refilling of cavitated xylem conduits *in situ*; pressure-volume curves of the eight tree species were also established to probe into relationships between embolism characteristics and water parameters. The results showed that: there was a good correlation between embolism refilling speed and its xylem vulnerability. This would suggest that both the occurrence and refilling of xylem embolism were related to xylem architectures. Like tree drought tolerant ability, xylem embolism was controlled by many factors, although there were some relationships between embolism and water parameters, all pressure-volume water parameters were not in accord with the occurrence and refilling sort of xylem embolism. Xylem water potential and water potential gradient in plant organs were main factors influencing the occurrence and refilling of embolism, but transpiration, stomatal closure and osmotic regulation may also play some roles.

Key words: xylem embolism; refilling; P-V parameters

(上接第 37 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)01-0035-EA

Studies on the technology of the extraction of eucommiol

PENG Jin-nian^{1, 2}, SUN Qi-shi¹, SU Yin-quan², DONG Juan-e²

(1 School of Chinese Medicinal Materials, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning 110016, China;

2 College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Single factor and orthogonal test were designed to study the effect of bath temperature, extraction time, solvent concentration and extraction frequency on the contents of eucommiol from *Eucommia ulmoides* leaves. And the contents of eucommiol were detected by HPLC. The result shows that the order of factors affecting the eucommiol contents was extraction frequency > extraction time > solvent concentration > bath temperature. The optimum extraction conditions were distilled water, reflux for 2 hours at 80 °C water bath for twice extractions. Under these extraction conditions the content of eucommiol was the highest, 8.95 g/kg.

Key words: *Eucommia ulmoides* leaf; eucommiol; extraction technology