

正交试验法优选东紫苏中齐墩果酸的提取工艺^{*}

胡浩斌[#], 曹 宏, 郑旭东, 简毓峰, 刘建新(甘肃陇东学院, 庆阳市 745000)

中图分类号 R284.2;R283.3 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2006)09-0716-02

摘要 目的: 优选东紫苏中齐墩果酸的提取工艺。方法: 应用微波辅助流动萃取法, 以齐墩果酸含量为指标, 通过正交试验法优选提取工艺; 以薄层层析—分光光度法测定齐墩果酸的含量。结果: 最佳提取工艺条件即微波功率为 600W、萃取溶剂为甲醇、溶剂流速为 8ml/min、萃取管内径为 10mm。结论: 微波辅助流动萃取法具有简单、安全、快速、准确、萃取率高等优点。优选的提取工艺稳定、可行, 适合工业化生产。

关键词 正交试验; 微波辅助流动萃取; 东紫苏; 齐墩果酸

Optimization of the Extraction Technology of Oleanolic Acid from *Elsholtzia Bodinieri* V. by Orthogonal Test

HU Haobin, CAO Hong, ZHENG Xudong, JIAN Yufeng, LIU Jianxin (Gansu Longdong University, Qingyang 745000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of oleanolic acid from *Elsholtzia bodinieri* V. METHODS: The extraction technology was optimized by orthogonal test using microwave-assisted dynamic extraction method with oleanolic acid as index; And the content of oleanolic acid was determined by TLC-spectrophotometry. RESULTS: The optimum extraction condition was described as follows, the microwave power is 600W with methanol as extracting solvent, the flow rate was 8ml/min and the inner diameter of extraction tube was 10mm. CONCLUSIONS: The microwave-assisted dynamic extraction method is simple, safe, rapid, accurate and with high extraction yield. The optimized extraction technology is stable and feasible, and suitable for industrialized production.

KEY WORDS Orthogonal test; Microwave-assisted dynamic extraction; *Elsholtzia bodinieri* V; Oleanolic acid

齐墩果酸系五环三萜类化合物($C_{30}H_{48}O_3$), 纯品为无色针状结晶, 是一种脂溶性成分, 易溶于甲醇、乙醇、乙醚、酮和氯仿等有机溶剂, 不溶于水, 可与多种显色剂发生显色反应。现代医学研究^[1]表明, 齐墩果酸除具有广谱消炎抑菌作用外, 还有促进肝细胞再生、防止肝硬化、强心、利尿、降血脂、降血糖、增强有机体免疫功能、抑制变态反应和降转氨酶等作用, 是当前治疗肝炎的有效药物之一。

东紫苏(*Elsholtzia bodinieri* Vaniot), 又名“风尾茶”, 为唇形科香薷属植物, 主要分布在甘、黔、蜀、滇等西部地区。其性平、味辛, 全草可入药, 具有发散解表、理气和胃等功效, 主治外感风寒、头身痛、咽喉痛、消化不良和肝炎等症^[2], 是民间常用的中草药, 主要含挥发油、黄酮、三萜及多糖等有效成分^[3]。在笔者对东紫苏植化成分进行系统研究的基础上, 发现东紫苏中齐墩果酸的含量丰富, 并主要以皂苷的形式存在。为正确评价该药材的质量、提高药材的利用率, 笔者采用微波辅助流动萃取、薄层色谱分离(TLC)及分光光度法(UV)测定了东紫苏中

齐墩果酸的含量, 优选了适宜的提取条件, 取得了令人满意的效果。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

WR-C型微波制样系统(北京盈安美诚科学仪器有限公司); FI-2100型流动注射分析系统(北京海光科学仪器有限公司); 756型紫外—可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

齐墩果酸标准品(中国药品生物制品检定所提供, 批号: 0709-9803); 硅胶G(青岛海洋化工厂); 其余试剂均为分析纯。新鲜的东紫苏于2004年6月采自云南思茅地区, 经西北师范大学生命科学学院廉永善教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制

精确称取于105℃下干燥至恒重的齐墩果酸标准品20mg, 用甲醇配成浓度为0.4mg/ml的标准溶液, 备用。精密量取标准溶液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0ml, 分别置于25ml容量瓶中, 用甲醇稀释、定容成一系列标准溶液, 摇匀, 备用。分别吸取上述系列标准溶液100μl在薄层板上点样, 以石油醚—苯—乙酸乙酯—醋酸=10:20:7:0.6作展开剂层析展开, 挥干溶剂, 喷以10%硫酸—乙醇, 105℃下显色10min, 然后刮取与红紫色部分相对应的显色带, 以甲醇为溶剂微波提取、洗脱3次(每次10min), 洗脱液在水浴上蒸干, 加入5%香草醛—冰醋酸溶液0.3ml和高氯酸1ml, 摇匀, 60℃下反应15min, 冷却后加入5ml冰醋酸, 以第1种溶液作空白, 在200nm~500nm波长范

999
三九医药

本栏目由 深圳市三九医药贸易公司 协办

参 附 注 射 液

※ 社保甲类
※ 独家专利

电话: 0755-82419231 82430127 传真: 0755-82265593

^{*}甘肃省十五科技攻关项目(2GS035-A43-070)

[#]副教授, 硕士。研究方向: 天然有机化学。电话: 0934-8631942

E-mail: hhh-88@126.com

围内进行扫描,发现 $\lambda_{\max}$ 为560nm。在此条件下,测定系列标准溶液的吸光度并绘制标准曲线。以浓度(C)对吸光度(A)进行线性回归,得方程 $C=0.0079A-0.0027$, $r=0.9997$ 。结果表明,齐墩果酸检测浓度在0.254~1.269 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内线性关系良好。

2.2 稳定性试验

在1.5h内每隔10min,在 $\lambda_{\max}$ 560nm波长处分别测定供试品和标准溶液的吸光度,结果发现吸光度值均未发生改变,说明显色反应较稳定。

2.3 回收率及精密度试验

按所选最佳试验条件,对样品中齐墩果酸的含量进行测定,并采用标准品(齐墩果酸)加入法进行回收率和精密度的测定,并重复取样平行测定5次,结果详见表1。

表1 回收率及精密度试验结果(n=5)

	部位		
	根	茎	叶
平均含量(mg/g)	1.97	0.74	0.27
RSD(%)	0.96	1.11	1.02
加入量(mg)	10.50	11.25	12.45
平均测得量(mg)	10.38	11.54	12.86
平均回收率(%)	98.86	102.58	103.29
RSD(%)	1.12	1.54	1.79

2.4 齐墩果酸含量的测定

2.4.1 试验方案。以齐墩果酸的收率为指标,采用正交试验法 $L_9(3^4)$ 来考察微波功率A、溶剂流速B、萃取溶剂C及萃取管内径D这4个因素对提取效果的影响。

2.4.2 供试品溶液的制备。将东紫苏去杂质,洗净,晾干,研细,过60目筛,备用。准确称取根、茎、叶干粉样品各2.000g,分别置于萃取管中,将萃取管装入微波炉中,同时将甲醇泵入萃取管中,选择适当的功率和时间进行流动提取。等提取完成后,收集提取液,关闭微波炉,继续泵入4ml~5ml甲醇淋洗样品,并把淋洗液并入到萃取液中,在50℃下减压浓缩至干,加入2mol/L HCl 20ml,氯仿20ml,在恒温水浴(60℃)上回流水解3h,用氯仿萃取有机层和水层,合并萃取液并真空浓缩,以齐墩果酸标准品溶液(0.4mg/ml)作对照,在制备薄层板上按“2.1”项下的方法进行层析分离,将洗脱液在水浴上浓缩后,用甲醇在25ml容量瓶中定容,作为供试品溶液。

2.4.3 薄层色谱。取上述供试品溶液约40 μl ,点样于硅胶G薄层板上,并以齐墩果酸标准溶液为阳性对照,以石油醚-苯-乙酸乙酯-醋酸=10:20:7:0.6作展开剂层析展开,晾干后喷碘磺酸-醋酸试剂(1:3),可见供试品与标准品在相应位置处均显唯一的粉红色斑点,Rf值为0.37,在紫外光(365nm)下呈棕黄色斑点。由此表明提取的齐墩果酸纯度较高。

2.4.4 含量测定。按“2.1”项下的方法,在560nm波长处对各供试品溶液的吸光度进行测定,并按回归方程计算出齐墩果酸的含量,对根部提取液分析结果见表2;方差分析详见表3。

由表2可知,微波功率A和溶剂流速B的极差R很大,是影响萃取率和萃取选择性的主要因素。根据各因素的K值,综合考虑其它因素,选择最佳提取条件为 $A_2B_2C_1D_2$,即微波功率为600W、萃取溶剂为甲醇、溶剂流速为8ml/min、萃取管内径为10mm。

方差分析结果显示,A、B因素的影响具有极显著性意义($P<0.01$),C因素的影响具有显著性意义($P<0.05$),D因素的影响最小,即影响顺序为 $A>B>C>D$,这与极差分析的结

表2 正交试验设计及结果

Tab 2 Orthogonal test design and experimental results

试验 编号	影响因素				齐墩果酸含量 (mg/g)	RSD (%)
	A(W)	B(ml/min)	C	D(mm)		
1	1(500)	1(6)	1(甲醇)	1(8)	0.64	0.21
2	1(500)	2(8)	2(乙醇)	2(10)	0.98	0.34
3	1(500)	3(10)	3(水)	3(18)	0.51	0.72
4	2(600)	1(6)	2(乙醇)	3(18)	1.30	0.18
5	2(600)	2(8)	3(水)	1(8)	1.93	0.47
6	2(600)	3(10)	1(甲醇)	2(10)	1.82	0.57
7	3(800)	1(6)	3(水)	2(10)	0.81	0.25
8	3(800)	2(8)	1(甲醇)	3(18)	1.68	0.12
9	3(800)	3(10)	2(乙醇)	1(8)	1.09	0.36
K ₁	2.13	2.75	4.14	3.66		
K ₂	5.05	4.59	3.37	3.61		
K ₃	3.58	3.42	3.25	3.49		
R	2.92	1.84	0.89	0.17		

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of analysis of variance					
方差来源	离差平方和Q	自由度F	均方S	F	P
A	1.6875	2	0.8438	324.54	<0.01
B	0.5781	2	0.2891	111.19	<0.01
C	0.1555	2	0.0778	29.92	<0.05
D	0.0051	2	0.0026	1	
误差效应	0.0051	2	0.0026		

$F_{\text{临界值}}: F_{0.01}(2,2)=99.0, F_{0.05}(2,2)=19.00$

果相符。

3 讨论

东紫苏中的齐墩果酸类化合物主要集中在根部(1.97mg/g),茎部次之(0.74mg/g),叶部最低(0.27mg/g),所以根和茎部是提取齐墩果酸的最好资源。

通过试验优选出的最佳提取工艺为 $A_2B_2C_1D_2$,即微波功率为600W、溶剂流速为8ml/min、甲醇为萃取溶剂、萃取管内径为10mm。并经验证试验证实。

经笔者建立的TLC法对药材进行初步分离,能去除部分干扰物质。

微波可破坏植物细胞壁,有效地提高萃取量^[4],且随微波功率的增加,萃取率随之提高,但当功率过大时,由于辐射时间长,可能使目标提取物分解,产率有所下降。因此,在试验过程中应选择适当的功率,以保证目标提取物在不分解的情况下获得较高的提取率;溶剂流速越大,微波辐射时间越短,从而导致萃取率降低;因萃取溶剂不仅影响微波的吸收,而且也影响目标物的溶解;管径越细,萃取越先达到完全,所需溶剂越少,但所需时间越长。

本研究结果提示,微波辅助流动萃取法具有速度快、操作安全、萃取率高、萃取后不需要过滤等优点,在中草药生产中具有很好的应用前景。

参考文献

[1] 王立新,韩广轩,刘文庸,等.齐墩果酸的化学及药理研究[J].天然药物,2001,19(2):104.
[2] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,1985:489.
[3] 胡浩斌,简毓峰,刘建新,等.东紫苏根中萜类化合物的分析[J].中国医学生物技术应用杂志,2005,4(2):74.
[4] 张代佳,刘传斌,修志龙,等.微波技术在植物有效成分提取中的应用[J].中草药,2000,31(9):附5.

(收稿日期:2005-11-08 修回日期:2006-01-10)