

阿里红中总三萜酸的提取工艺优选及含量测定

尤努斯江·吐拉洪^{1*}, 木妮热·依布拉音², 吐尔洪·买买提¹

(1. 新疆大学化学化工学院, 乌鲁木齐 830046;

2. 新疆乌鲁木齐市疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830002)

[摘要] 目的:优化阿里红中总三萜酸的提取工艺,并建立其含量测定方法。方法:以齐墩果酸为对照品,采用分光光度法测定三萜酸含量;采用单因素试验考察提取溶剂种类及浓度、料液比、温度、提取时间及提取次数对总三萜酸得率的影响,在此基础上,采用L₉(3⁴)正交试验优选阿里红中总三萜酸提取工艺。结果:最佳提取工艺为30倍量90%乙醇于60℃超声提取3次,每次30min。在此条件下,阿里红中总三萜酸质量分数35.1%。各因素影响次序为提取温度>液料比>提取时间>乙醇体积分数。结论:阿里红中三萜酸含量很高,该优选工艺稳定可行,可推广于大生产。

[关键词] 阿里红; 总三萜酸; 正交试验; 超声提取

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0024-04

Optimization of Ultrasonic Extraction Technology and Content Determination of Total Triterpenoidic Acid from *Fomes officinalis*

Yunusjan TURAHUN^{1*}, Munire IBRAHIM², Turghun MUHAMMAD¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang University, Urumqi 830046, China;

2. Urumqi Center for Disease Control and Prevention, Urumqi 830002, China)

[收稿日期] 20120416(021)

[基金项目] 新疆大学校院联合项目(XY110115);新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2011211A015)

[通讯作者] *尤努斯江·吐拉洪,讲师,学士,从事天然产物活性成分研究,Tel:13139697591,E-mail:yunus858@sina.com

[参考文献]

[1] 王绍美,何照范,郁建平. 木瓜营养成分分析[J]. 营养学报,2000,22(2):190.

[2] 郭学敏,洪永福. 皱皮木瓜化学成分的研究[J]. 中草药,1997,28(10):584.

[3] 查孝柱,谢晓梅,吕美红,等. 含齐墩果酸和熊果酸的10种果实类中药HPLC分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):60.

[4] 吴虹,魏伟,吴成义. 木瓜化学成分及药理活性的研究[J]. 安徽中医学报,2004,23(2):62.

[5] 殷彪,严红光,何波,等. 正交法优选宣木瓜叶齐墩果酸回流提取工艺[J]. 食品科技,2006,31(10):101.

[6] 李海鹏,徐怀德,孟祥敏,等. 光皮木瓜齐墩果酸超声波辅助提取及纯化工艺[J]. 农业工程学报,2008,24(10):222.

[7] 董海丽,陈怡平. 超高压提取木瓜中齐墩果酸的研究

[J]. 食品与发酵工业,2007,33(11):125.

[8] 丁之恩,殷彪,周根土,等. 利用微波辅助提取宣木瓜叶中活性物质的研究[J]. 经济林研究,2007,24(4):14.

[9] 谷满仓,钱亚芳,李大鹏. 超临界流体分离技术提取中药活性成分的研究进展[J]. 中国药业,2009,18(16):21.

[10] 熊清平,张强华,蒋长兴,等. 花生壳中木犀草素的超临界CO₂萃取工艺研究[J]. 食品科技,2011,36(12):241.

[11] 王岱杰,王晓,耿岩玲,等. 反相高效液相色谱测定不同品种皱皮木瓜中齐墩果酸和熊果酸含量[J]. 食品科学,2008,29(10):97.

[12] 韦建华,李耀华,蔡少芳,等. HPLC测定柿子中齐墩果酸与熊果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):48.

[责任编辑 全燕]

[Abstract] Objective: To optimize extraction technology of total triterpenoidic acid from *Fomes officinalis* and establish its content determination method. **Method:** The content of total triterpenoidic acid was determined by UV-Vis with oleanic acid as reference; Effects of kind and concentration of extraction solvent, solid-liquid ratio, temperature, extraction time and extraction times on yield of total triterpenoidic acid were investigated by single factor test, basis on this, extraction technology was optimized by orthogonal test. **Result:** Optimum conditions of ultrasonics extraction were as follow: extracted 3 times at 60 °C with 30 times the amount of 90% ethanol, 30 min each time. Under these conditions, effect of factors on yield was in order of extraction temperature > solid-liquid ratio > extraction time > the concentration of ethanol, yield of total triterpenoidic acid from *F. officinalis* was 35.1%. **Conclusion:** The content of triterpenoidic acid from *F. officinalis* was very high, this optimized technology was stable and feasible, which could be extended to large-scale production.

[Key words] *Fomes officinalis*; total triterpenoidic acid; orthogonal experiment; ultrasonic extraction

大型真菌阿里红又名苦白蹄^[1],维吾尔药名哈日混,为落叶松病原菌,收载于1999年版《中华人民共和国药品标准·维吾尔药分册》^[2]。阿里红形似开密艾提(蘑菇样)或驴蹄样,多生于松树上,亦长在胡桃树和无花果树上,主要分布于新疆东部和北部,以阿尔泰所产最为有名。阿里红具有温肺化痰、降气平喘、祛风除湿、活血消肿、利尿等作用^[3],且能增强体力、延长抗疲劳和耐缺氧时间、增强机体的应急能力^[4],用于治疗黄疸、脾肿大、气喘等疾病,为维吾尔药复方阿里红片的主要药味之一^[5-6]。

阿里红含有萜烯类、皂苷类、多糖等化学成分,其主要成分为三萜酸、脂肪酸等^[7-9]。三萜酸具有广泛生物活性,具有降低胆固醇、降血糖、抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤等活性^[10],近年来已成为中药化学研究的一个热点领域,目前阿里红中三萜酸提取工艺未见报道。本试验采用紫外-可见分光光度法测定阿里红中总三萜酸的含量,通过正交试验优化三萜酸提取工艺参数,为新疆特色民药资源阿里红的开发利用提供理论依据。

1 材料

723型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),齐墩果酸对照品(购自上海品纯实业有限公司,批号27479),所用试剂均为分析纯。

5%香草醛溶液配制 称取香草醛1.25 g,加入少许冰乙酸溶解,转移至25 mL量瓶中,用冰乙酸定容至刻度。现配现用。阿里红购于新疆维吾尔自治区维吾尔医院,经新疆大学生命科学与技术学院教授买买提明·苏来曼鉴定为*Fomes officinalis* (Vill. Et Fr.) Ames,除杂,碾碎成粉末,保存于干燥阴凉处。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制 精密称取齐墩果酸对照

品20 mg,用无水乙醇定容于100 mL量瓶中,即得 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 齐墩果酸对照品溶液。

2.2 检测波长的确定 分别精密移取供试样品和对照品溶液0.2,0.3 mL置10 mL具塞试管中,加热挥去溶剂,加入新配置5%香草醛-冰乙酸0.2 mL和高氯酸0.8 mL,于70 °C恒温水浴加热15 min,冷却至室温,精密加入冰乙酸4 mL,摇匀,在400~800 nm扫描,结果两者最大吸收波长都在550 nm处。故确定550 nm为阿里红三萜酸含量测定的检测波长。

2.3 标准曲线的绘制^[11-12] 精密吸取齐墩果酸对照品溶液0.0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL,分别置于具塞试管中,按2.2项下方法显色,以空白试样为参比溶液,于550 nm处测定吸光度(A),以A为纵坐标,总三萜酸质量浓度为横坐标,得回归方程 $A = 0.0079C + 0.022$ ($r = 0.9997$)。

2.4 供试品溶液的制备 称取阿里红粉1.00 g,置于具塞锥形瓶中,加相应溶剂20 mL,在60 °C下超声提取30 min(功率200 W),过滤并收集滤液,滤渣继续超声提取2次,将3次滤液合并,浓缩,用95%乙醇定容至25 mL量瓶中,准确移取0.5 mL于25 mL量瓶中,用95%乙醇定容至刻度,摇匀,即得。

2.5 总三萜酸含量测定

2.5.1 精密度试验 移取供试品溶液1份,按2.3项下方法连续测定6次,RSD 1.16%,说明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 移取供试品溶液0.3 mL,按2.3项下方法操作,在0~1 h每隔20 min测定A 1次,RSD 1.78%,说明供试品溶液1 h内稳定。

2.5.3 加样回收率试验 移取已知质量浓度的供试品溶液5份,每份0.1 mL,分别加入0.1 mL已知含量的对照品溶液,按2.3项下方法测定A,计算得

阿里红三萜酸的平均回收率 94.6%, RSD 1.47%, 说明回收率较好。见表 1。

表 1 阿里红三萜酸加样回收率试验

No.	试样中含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%
1	29.8	20.0	46.6	93.6
2	29.8	20.0	47.9	96.1
3	29.8	20.0	46.2	92.8
4	29.8	20.0	47.3	94.9
5	29.8	20.0	47.7	95.7

2.5.4 样品测定 精密移取供试品溶液按 2.3 项下方法测定 A, 计算总三萜酸含量。

2.6 总三萜酸提取工艺优选

2.6.1 单因素试验

2.6.1.1 提取溶剂考察 准确称取阿里红粉末 1.00 g, 置于具塞锥形瓶中, 分别加入石油醚、三氯甲烷、乙醇、正丁醇和丙酮 4 种溶剂 30 mL, 于 50 °C 下超声提取 30 min, 过滤, 浓缩, 用 95% 稀释至一定体积, 按 2.5.4 项下方法测定阿里红中总三萜酸含量。结果总三萜酸得率分别为 15.1%, 31.1%, 30.1%, 13.8%, 19.1%, 说明乙醇和三氯甲烷为溶剂时总三萜酸得率最高, 可能由于总三萜酸极性与乙醇和三氯甲烷的极性比较相近。考虑到三氯甲烷毒性较大, 故本试验选用乙醇作为提取溶剂。

2.6.1.2 乙醇体积分数考察 精密称取阿里红粉末 1.00 g 置于具塞锥形瓶中, 共 7 份, 分别精密加入体积分数 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 的乙醇溶液各 30 mL, 超声提取 30 min, 滤过, 取续滤液, 按 2.5.4 项下方法测定总三萜酸含量。结果总三萜酸得率分别为 6.45%, 10.6%, 14.5%, 22.0%, 27.6%, 29.5%, 30.2%, 随着乙醇体积分数的增加总三萜酸提取率增加, 在乙醇体积分数 > 90% 时三萜酸得率增长缓慢, 故选择 90% 乙醇。

2.6.1.3 料液比对总三萜酸得率的影响 精密称取阿里红粉末 1.00 g 置于具塞锥形瓶中, 按 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 不同料液比加入 90% 乙醇, 在 50 °C 超声提取 30 min, 过滤, 浓缩, 用 95% 稀释一定体积后, 按 2.5.4 项下方法测定总三萜酸含量。结果总三萜酸得率分别为 18.9%, 26.0%, 28.3%, 29.5%, 说明当料液比为 1:30 时, 得率较高, 此后再提高溶剂用量, 得率增加缓慢。

2.6.1.4 提取温度考察 精密称取阿里红粉末 1.00 g 置于具塞锥形瓶中, 加入 90% 乙醇 30 mL, 在

不同温度 (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C) 下超声提取 30 min, 过滤, 浓缩, 用 95% 乙醇稀释一定体积后, 按 2.5.4 项下方法测定总三萜酸含量。结果总三萜酸得率分别为 16.8%, 25.9%, 29.2%, 31.6%, 28.7%, 24.4%, 21.8%, 说明加热温度 < 50 °C 时总三萜酸得率随温度增大而增大, 当提取温度 > 50 °C 时, 提取得率随温度的增大而减小。

2.6.1.5 提取时间考察 精密称取阿里红粉末 1.00 g 置于具塞锥形瓶中, 加入 90% 乙醇 30 mL, 于 50 °C 提取 10, 20, 30, 40, 50 min, 过滤, 滤液浓缩, 用 95% 乙醇稀释一定体积后, 按 2.5.4 项下方法测定总三萜酸含量。结果总三萜酸得率分别为 19.4%, 26.3%, 31.8%, 31.9%, 30.3%, 说明提取时间 < 30 min 时, 提取得率随时间增加而增大, 当提取时间 > 30 min, 提取得率随时间增长而增大缓慢。

2.6.1.6 提取次数考察 称取阿里红粉末 4 份, 每份 1.00 g, 分别置于具塞锥形瓶中, 加入 90% 乙醇 30 mL, 在 50 °C 下超声提取 1, 2, 3, 4 次, 每次 30 min, 过滤, 各提取液合并, 浓缩, 用 95% 乙醇稀释一定体积后, 按 2.5.4 项下方法测定总三萜酸含量。结果总三萜酸得率分别为 20.0%, 28.1%, 31.5%, 32.3%, 说明提取 3 次后, 增加提取次数对得率影响很小。

2.6.2 正交试验设计 在单因素试验基础上, 选取乙醇体积分数、提取时间、液料比、提取次数为考察因素, 每个因素选取 3 个水平, 称取阿里红粉末 9 份, 按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验。因素水平见表 2, 试验安排及结果见表 3, 方差分析见表 4。

由极差分析可知, 影响阿里红三萜酸得率的主次因素顺序为提取温度 > 液料比 > 提取时间 > 乙醇体积分数。以极差值最小的 D 因素为误差项进行方差分析, 结果因素 A 对阿里红三萜酸提取率有显著性影响, 故确定最佳提取工艺为 $A_3B_2C_3D_2$, 即提取温度 60 °C, 超声提取时间 30 min, 料液比 1:30, 乙醇体积分数 90%。

2.6.3 验证试验 称取同一批次阿里红样品 3 份, 按优选工艺进行 3 次平行试验, 按 2.5.4 项下方法测定, 结果总三萜酸平均得率 35.1%, RSD 1.23%。表明优化工艺稳定可靠。

3 讨论

阿里红是大型真菌类民族药, 为新疆地区的道地药材, 有着广泛的民间用药基础。由于真菌代谢产物具有多种结构类型和生理活性, 是寻找新的天然药物的重要来源。有关阿里红化学成分和药理活

表2 阿里红中总三萜酸提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A 提取温度/℃	B 超声时间/min	C 液料比	D 乙醇体积分数/%
1	40	20	1:10	80
2	50	30	1:20	90
3	60	40	1:30	100

表3 阿里红中总三萜酸提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	总三萜酸得率/%
1	1	1	1	1	25.2
2	1	2	2	2	28.7
3	1	3	3	3	27.4
4	2	1	2	3	30.2
5	2	2	3	1	33.1
6	2	3	1	2	29.6
7	3	1	3	2	33.9
8	3	2	1	3	31.3
9	3	3	2	1	32.1
K_1	27.100	29.767	28.700	30.133	
K_2	30.967	31.033	30.333	30.733	
K_3	32.433	29.700	31.467	29.633	
R	5.333	1.333	2.767	1.100	

表4 总三萜酸得率方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	45.547	2	25.026	<0.05
B	3.387	2	1.861	
C	11.607	2	6.377	
D(误差)	1.820	2	1.000	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

性的研究较少,还处在起步阶段。阿里红富含三萜类化合物,是其最主要成分之一,其含量最高可达55%^[7],用于治疗慢性支气管炎、腹痛、感冒、肺结核和癌症。超声提取法是利用超声波的机械作用、空化作用、热效应等以提高细胞内容物的穿透力和传输能力,增大物质分子运动频率和速度,提高中药成分的浸出率。与煎煮法、浸渍法、渗漉法等传统提

取方法相比,具有时间短、提取效率高、对成分的破坏小等优点。本文采用超声波法和正交试验法相结合从阿里红中提取总三萜酸工艺进行了优化并测定了其含量。此工艺简单,可行,结果准确可靠。

阿里红外表棕黄或灰白色,部纯白色,质疏松较轻,老时易碎,选料时要精选和除杂,否则其溶液带色。阿里红采集于林区的野生药材,尚无人工培育,而且新疆产量较多,收集容易,很有开发利用前景。

[参考文献]

[1] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京:科学出版社, 1979:459.

[2] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准维吾尔药分册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:42.

[3] 江苏新医学院. 中药大词典[M]. 上海:上海人民出版社,1977:2404.

[4] 王颖,吕巡贤,于佳林,等. 新疆药用层孔菌补益作用的研究[J]. 新疆农业大学学报,2002,25(1):40.

[5] 吴霞,杨峻山,闫明. 阿里红药材 HPLC 特征图谱研究[J]. 药物分析杂志,2008,28(9):1429.

[6] 吴霞,杨峻山,董悦生. 阿里红化学成分的研究[J]. 中草药,2005,36(6):811.

[7] 吴霞,徐硕,罗容,等. 阿里红中总三萜酸及去氢硫色多孔菌酸的测定[J]. 中草药,2010,41(9):1546.

[8] 张涛,孙建,黄玲,等. 新疆维药阿里红液体发酵工艺条件研究[J]. 新疆农业科学,2010,47(12):2457.

[9] 帕丽达·阿不力孜,丛媛媛,王勇,等. 阿里红多糖的气相色谱和红外光谱[J]. 光谱实验室,2011,28(4):2147.

[10] 鲍长余,刘冰晶,毕和平,等. 紫外分光光度法测定海南木莲叶·枝中总三萜酸的含量[J]. 安徽农业科学,2010,38(23):12460.

[11] 田明月,俞力超,徐秀泉. 正交设计法优化桦褐孔菌总三萜超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):31.

[12] 王光忠,张明,葛如斌,等. 大孔树脂纯化盾叶薯蓣总皂苷的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(5):25.

[责任编辑 全燕]