

牛膝中齐墩果酸的提取工艺研究

刘学湘, 陈建伟

(南京中医药大学, 南京 210029)

摘要: 目的: 筛选牛膝中齐墩果酸的最佳提取工艺。方法: 采用正交设计 $L_{18}(3^7)$, 用高效液相色谱法对不同提取工艺牛膝中的齐墩果酸的含量进行测定。结果: 牛膝中齐墩果酸的最佳提取工艺为 $A_1B_2C_1D_1$, 即 20 目的药材, 加入 70% 的乙醇水浴回流提取 1h, 只需一次。

关键词: 牛膝; 齐墩果酸; 提取工艺

中图分类号: R283.6 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)02-0005-02

Studies on the Extracting Technique of Oleanolic Acid from *Achyranthes bidentata* Bl

LIU Xue-xiang, CHEN Jian-wei

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029)

Abstract: Objective: To screening the optimized extracting technique of oleanolic acid from *Achyranthes bidentata* Bl. Methods: To determine the content of oleanolic acid with different extracting technique by the orthogonal designed methods ($L_{18}(3^7)$). Results: The optimum extracting technique is $A_1B_2C_1D_1$, that is the crude drug in twenty mesh refluxed by 70% alcohol for one hour.

Key words: *Achyranthes bidentata* Bl.; Oleanolic acid; extracting technique

牛膝为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根, 主产河南, 俗称怀牛膝, 具有补肝肾, 强筋骨, 活血通经, 引血(火)下行, 利尿通淋^[1]的功效。牛膝含牛膝皂甙, 其甙元为齐墩果酸, 属五环三萜类化合物, 是主要活性成分。药理研究表明, 它具有保肝降酶、降血脂、强心的作用, 能明显降低血清中甘油三酯、胆固醇和 β -脂蛋白的含量。文献报道 HPLC 法测定牛膝中齐墩果酸的含量^[2,3], 流动相均采用甲醇-水的不同比例。本实验首次采用乙腈-水为流动相测定齐墩果酸的含量, 克服了短波长下用甲醇-水为流动相带来的紫外吸收背景干扰的缺陷, 为牛膝的质量控制提供了新的方法。

1 材料与仪器

牛膝, 购自河南, 经本校中药鉴定学教研室陈建伟副教授鉴定为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根。

齐墩果酸对照品, 购自中国药品生物制品检定所, 编号 709-8903, 经高效液相归一化法计算含量为 99.99%。乙腈, 色谱纯, Tedia Company, Inc。

水为重蒸水。其它试剂均为分析纯。

美国 Water 515 型高效液相色谱仪, Water 2487 紫外检测器, 高速离心机(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计 以牛膝中齐墩果酸为指标, 选择药材粒度、乙醇浓度、提取次数、提取时间为考察因素, 应用 $L_{18}(3^7)$ 正交设计表进行试验, 因素水平安排见表 1。

表 1 考察的因素和水平

水平	因素			
	A	B	C	D
	药材粒度(目)	乙醇浓度(%)	提取次数(次)	提取时间(h)
1	20	50	1	1
2	40	70	2	3
3	65	90	3	3

2.2 供试品溶液的制备 精密称取牛膝粗粉 2g, 按 $L_{18}(3^7)$ 正交试验表所列进行水浴回流提取, 抽滤, 合并滤液, 离心, 精密吸取上清液 10ml, 加入 20% 盐酸 10ml, 加热回流 3h, 加一倍量水, 蒸去部分乙醇, 用氯仿萃取 4 次, 每次 10ml, 合并氯仿层, 滤过, 取滤液, 浓缩至干, 用甲醇定容于 10ml 容量瓶中, 高速离心,

取上清液作为供试品溶液。

2.3 色谱条件 色谱柱: 汉邦 Lichrosper5-18(200 × 4.6mm); 流动相乙腈-水(72: 8); 流速 0.8ml·min⁻¹; 检测波长 206nm; 灵敏度 2.0Aufs; 柱温 30℃。对照品及样品色谱图略。

2.4 经方法学研究, 齐墩果酸在上述色谱条件下, 进样浓度在 0.12~ 1.2mg/ml 范围内, 线性关系良好, 精密度、稳定性、重现性均较好, 回收率 102.2%, RSD 为 1.19% (n= 5)。

表2 不同提取工艺牛膝中齐墩果酸的含量测定结果

试验号	因素							齐墩果酸的含量 Y (%)
	A		B		C		D	
	1	2	3	4	5	6	7	
1	1	1	1	1	1	1	1	0.219
2	1	2	2	2	2	2	2	0.313
3	1	3	3	3	3	3	3	0.0978
4	2	1	1	2	2	3	3	0.180
5	2	2	2	3	3	1	1	0.210
6	2	3	3	1	1	2	2	0.167
7	3	1	2	1	3	2	3	0.190
8	3	2	3	2	1	3	1	0.326
9	3	3	1	3	2	1	2	0.0913
10	1	1	3	3	2	2	1	0.161
11	1	2	1	1	3	3	2	0.323
12	1	3	2	2	1	1	3	0.101
13	2	1	2	3	1	3	2	0.214
14	2	2	3	1	2	1	3	0.503
15	2	3	1	2	3	2	1	0.135
16	3	1	3	2	3	1	2	0.170
17	3	2	1	3	1	2	3	0.260
18	3	3	2	1	2	3	1	0.150
K ₁	1.2148	1.134	1.2083	1.552	1.287	1.2943	1.201	
K ₂	1.409	1.935	1.178	1.225	1.3983	1.226	1.2783	ΣY= 3.8111
K ₃	1.1873	0.7421	1.4248	1.0341	1.1258	1.2908	1.3318	CT= 0.80692
R	0.2217	1.1929		0.5179		0.0035		
SS	0.0049	0.12	0.006	0.023	0.0063	0.00049	0.0014	

2.5 样品测定 精密吸取上述样品溶液 10μl, 测定结果见表 2。

2.6 方差分析 结果见表 3

表3 不同提取工艺牛膝中齐墩果酸的含量方差分析表

方差分析	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	0.0049	2	0.00245	1.05	
B	0.12	2	0.06	25.75	**
C	0.023	2	0.0115	4.94	
D	0.00049	2	0.000245	0.11	
误差	0.014	6	0.00233		

$F_{1-0.05}(2, 6) = 5.14, ** F_{1-0.01}(2, 6) = 10.92$

3 结果与讨论

3.1 实验曾用 甲醇-水为流动相, 因溶剂甲醇在 206nm 处有较强的吸收峰, 基线不稳。本实验用乙腈-水为流动相, 可明显减少溶剂的背景干扰, 基线平稳, 灵敏度大大提高, 且分离效果良好。

3.2 从 R 值来看, 影响牛膝中齐墩果酸含量的因素主次顺序为 B> C> A> D (B 为乙醇浓度, C 为提取次数, A 为药材粒度, D 为提取时间)。

3.3 从方差分析结果看, B 因素(乙醇浓度) 差异极显著, 结合 K 值, 用 70% 乙醇提取, 牛膝中齐墩果酸的含量最高, 说明牛膝中牛膝皂甙在 70% 乙醇溶液中溶解性明显高于在 50% 90% 的乙醇溶液, 故提取牛膝中的皂甙成分可优先考虑用 70% 乙醇提取。A、C、D 因素均无明显差异, 本着节能、减轻劳动强度的原则, 可选择 A₁C₁D₁。综合分析, 最佳工艺条件为 A₁B₂C₁D₁, 即 20 目的牛膝药材, 加入 70% 乙醇溶液, 水浴回流提取 1h, 只需一次。

参考文献:

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(2) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999. 833.
[2] 陈惠玲, 王建科, 张丽丽, 等. 高效液相色谱法测定怀牛膝不同炮制品齐墩果酸的含量[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(5): 281.
[3] 刘怀德, 孙晓飞, 郝润喜, 等. 高效液相色谱法测定齐墩果酸的含量[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(5): 286.