

网络优先数字出版时间:2015-05-25

网络优先数字出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/45.1075.N.20150525.1658.003.html>

瑶药毛萼清风藤中总三萜酸的提取工艺优化及含量测定*

Optimization of Extraction Technology and Determination of Total Triterpenoidic Acid from *Sabia limoniacea* Wall.

黄艳 张春来 刘布鸣**

HUANG Yan, ZHANG Chun-lai, LIU Bu-ming

(广西中医药研究院, 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022)

(Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences & Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:【目的】优化瑶药毛萼清风藤(*Sabia limoniacea* wall.)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,采用紫外分光光度法测定瑶药毛萼清风藤中总三萜酸的含量。通过单因素试验和正交试验相结合的方法考察提取方法、提取溶剂、乙醇浓度、料液比、提取时间对毛萼清风藤中总三萜酸提取的影响。【结果】试验所用比色条件为5%香草醛溶液0.2 mL,高氯酸0.6 mL,水浴温度70℃,水浴时间15 min,检测波长545 nm;最佳提取工艺为50倍量70%乙醇,于常温下超声提取40 min;在此条件下所提取得到的平均总三萜酸含量为13.76 mg/g。【结论】瑶药毛萼清风藤中总三萜酸含量相对较高,所得的优选工艺稳定可行。

关键词:瑶药毛萼清风藤 总三萜酸 齐墩果酸 含量测定

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2015)02-0121-05

Abstract:【Objective】To optimize extraction technology of total triterpenoidic acid from *Sabia limoniacea* Wall. and establish its content determination method. 【Methods】The content of total triterpenoidic acid was determined by UV with the oleanoic acid as reference. The influence of extracting method, concentration of ethanol, ratio of liquid to material and extracting time on the total triterpenoidic acid of yield were evaluated by single factor experiments and orthogonal experiments. 【Results】The optimum extraction were carried out at room temperature with 50 times of the amount of 70% ethanol, 5% vanillin 0.2 mL and perchloric acid 0.6 mL. After 15 min water bath at 70℃, the extracts were cooled, added 4 mL of acetic acid and

determined at 545 nm. The content of total triterpenoidic acid was 13.76 mg/g. 【Conclusion】The content of total triterpenoidic acid from *Sabia limoniacea* Wall. was relatively high, and this optimized technology was stable and feasible.

Key words: *Sabia limoniacea* Wall., total triterpenoidic acid, oleanic acid, determination

收稿日期:2014-04-10

作者简介:黄艳(1987-),女,助理研究员,主要从事中药化学成分与质量标准研究。

* 南宁市生物制药产业大型科学仪器与设备共享与服务平台建设项目(20121052-3)和广西科学研究与技术开发计划重大专项计划项目(桂科重 1355001-4,桂科重 14124002-11)资助。

** 通讯作者:刘布鸣(1956-),男,研究员,主要从事中药、天然药化学成分与质量标准研究。

0 引言

【研究意义】毛萼清风藤(*Sabia limoniacea* Wall.)是清风藤科清风藤属植物,是传统瑶药“十八钻”中的黑钻^[1,2],民间俗称“腰痛灵、风藤、叶上果、豆甲欧”,其根、茎、叶均可入药,具有祛风除湿、止痛之功,常用于治疗风湿关节痛、跌打损伤疼痛等,鲜叶既可内服治腰痛,又可外用作止血药^[3]。为进一步开发和利用毛萼清风藤资源,本文对该药物的主要活性成分进行了研究。**【前人研究进展】**近年来对该属植物的化学成分的研究表明,其主要成分为三萜酸类化合物^[4~11],而三萜酸是很多中药的主要活性成分,具有重要的生物活性和广泛的药理作用,如抗炎,抗肿瘤,抗菌及抗病毒活性,降低胆固醇,降血糖、免疫活性、杀软体动物活性等^[12]。**【本研究切入点】**到目前为止,对毛萼清风藤根茎中总三萜酸的提取工艺与含量测定尚未见报道。**【拟解决的关键问题】**系统考察提取方法、提取溶剂、乙醇浓度、料液比、提取时间对毛萼清风藤中总三萜酸提取的影响,优选出最佳的提取方案,并采用紫外分光光度法首次测定了毛萼清风藤中总三萜酸的含量。

1 材料与方法

1.1 材料

UV2500 紫外可见分光光度计(日本岛津),KQ5200B 型超声仪(160 W,40 KHz),梅特勒-托利多 XS205 分析天平,水浴锅,移液枪,50 mL 容量瓶,25 mL 具塞试管、锥形瓶。

齐墩果酸标准品(购自中国食品药品检定检验院,批号为 110709-201206),香草醛,高氯酸,冰乙酸,无水乙醇,石油醚,氯仿,95%乙醇,甲醇均为分析纯。毛萼清风藤根茎采自广西十万大山,由广西中医药研究院中药研究所赖茂祥研究员鉴定为毛萼清风藤(*Sabia limoniacea* Wall.)。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的配制

准确称取齐墩果酸标准品 3.0 mg,用无水乙醇溶解定容至 10 mL,即得 0.3 mg/mL 齐墩果酸标准溶液。

1.2.2 供试品溶液的制备

准确称取毛萼清风藤粗粉 1.00 g,加入 70%乙醇 50 mL,室温条件下超声 40 min,过滤,过滤液转移到 50 mL 容量瓶中定容,即得。

1.2.3 波长的选择

准确量取供试品溶液 0.4 mL、齐墩果酸标准品溶液 0.3 mL,分别置于试管中,水浴加热挥去溶剂,冷却,加入新鲜配制的 5%香草醛溶液 0.2 mL 和高氯酸溶液 0.6 mL,摇匀,于 70℃恒温水浴锅中加热 15 min,冷却至室温,加入 4 mL 冰乙酸,摇匀,于 400~800 nm 波长下扫描,测定两者的最大吸收波长。

1.2.4 标准曲线的绘制

分别准确吸取 0.3 mg/mL 齐墩果酸标准品溶液 0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL、0.6 mL 置于试管中,按 1.2.3 方法显色,并于最大吸收波长测定吸光度值 A,以吸光度值 A 为纵坐标,以总三萜酸浓度为横坐标绘制标准曲线。

1.2.5 预备试验

精密度试验:准确吸取 0.2 mL 同一供试品 6 份置于试管中,按 1.2.3 方法显色,测定仪器精密性。

稳定性试验:准确吸取供试品 0.2 mL 置于试管中,按 1.2.3 方法显色、测定,每 10 min 测定一次吸光度值 A,考察 1 h 内吸光度 A 的稳定性。

重复性试验:准确称取毛萼清风藤粗粉 6 份,按 1.2.2 方法提取,准确吸取各样品 0.2 mL 置于试管中,按 1.2.3 方法显色、测定,考察方法的重复性。

加样回收试验:准确称取毛萼清风藤粗粉 0.5 g,平行 6 份,置于 25 mL 具塞试管中,分别加入齐墩果酸标准液 0.1 mL,按 1.2.3 方法显色,测定回收率。

1.2.6 比色条件的选择

分别准确量取对照品溶液 0.2 mL 置于试管中,水浴加热挥去溶剂,分别加入适量的新鲜配置的 5%香草醛溶液,高氯酸溶液,摇匀,于恒温水浴锅中加热,然后冷却至室温,并加入 4 mL 冰乙酸,摇匀,于 545 nm 处测定吸光度。

1.2.6.1 香草醛用量

取香草醛溶液 0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL,高氯酸 0.8 mL,于 70℃恒温水浴锅中加热 15 min,其他步骤同 1.2.6 方法,测定吸光度,确定香草醛用量。

1.2.6.2 高氯酸用量

用最适用量的香草醛溶液,加入高氯酸 0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL、1.4 mL,于 70℃恒温水浴锅中加热 15 min,其他步骤同 1.2.6 方法,测定吸光度,确定高氯酸用量。

1.2.6.3 反应温度

用最适用量的香草醛溶液、高氯酸溶液,于50℃、60℃、70℃、80℃、90℃恒温水浴锅中加热15 min,其他步骤同1.2.6方法,测定吸光度,确定最佳反应温度。

1.2.6.4 反应时间

用最适用量的香草醛溶液、高氯酸溶液,于最佳反应温度条件下分别加热10 min、15 min、20 min、25 min、30 min,其他步骤同1.2.6方法,测定吸光度,确定最适反应时间。

1.2.7 总三萜酸提取工艺优选

1.2.7.1 单因素试验

准确称取1.00 g毛萼清风藤粗粉,加入30 mL溶剂,用不同的提取方法提取,提取后过滤,过滤液定容至50 mL,准确量取0.2 mL供试品溶液置于试管中,按1.2.3方法显色、测定,确定各因素的最适值。

1.2.7.1.1 提取方法

取3份毛萼清风藤粗粉,准确加入30 mL 95%乙醇,1号在室温下超声提取30 min,2号在加热回流条件下提取30 min,3号冷浸放置24 h,其他步骤同1.2.7.1方法,确定最适提取方法。

1.2.7.1.2 提取溶剂

取4份毛萼清风藤粗粉,分别加入石油醚、氯仿、甲醇、95%乙醇各30 mL,于最适提取方法下提取,其他步骤同1.2.7.1方法,确定最适提取溶剂。

1.2.7.1.3 乙醇体积分数

取8份毛萼清风藤粗粉,分别加入30 mL体积分数为30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%的乙醇,于最适提取方法下提取,其他步骤同1.2.7.1方法,确定乙醇的最适体积分数。

1.2.7.1.4 料液比

取6份毛萼清风藤粗粉,按料液比为1:10,1:20,1:30,1:40,1:50,1:60分别加入最适体积分数的乙醇,用最适提取方法提取,其他步骤同1.2.7.1方法,确定合适的料液比。

1.2.7.1.5 提取时间

取6份毛萼清风藤粗粉,分别加入最适体积分数的乙醇,在室温下超声提取10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min,其他步骤同1.2.7.1方法,确定合适的提取时间。

1.2.7.2 正交试验设计

在单因素试验的基础上,选取乙醇体积分数、料液比、提取时间作为考察因素,每个因素选取3个水

平,准确称取9份1.00 g毛萼清风藤粗粉,按 $L_9(3^3)$ 正交表设计试验,各因素水平见表1。

1.2.7.3 验证试验

准确称取毛萼清风藤粗粉1.00 g,平行3份,按优选的工艺进行提取,验证优选的工艺条件可行性。

表1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Levels	因素 Factors		
	A(%)	B	C(min)
1	60	1:30	40
2	70	1:40	50
3	80	1:50	60

注:A,乙醇体积分数;B,料液比;C,提取时间。

Note:A,Ethanol concentration;B,Ratio of material to liquid;C,Extraction time.

2 结果与分析

2.1 波长的选择

供试品与齐墩果酸标准品按照1.2.3方法测定,可知两者在400~800 nm波长下的最大吸收波长为545 nm,因此选定该波长为试验用的测定波长。

2.2 标准曲线的绘制

由1.2.4方法可得,齐墩果酸标准品的回归方程为 $A=58.22948C-0.04739$ ($r=0.9996$)。其溶液浓度在0.006~0.030 mg/mL范围内线性良好。

2.3 预备试验

从1.2.5试验可知,仪器设备的精密度良好(RSD为0.26%);提取所得的供试品溶液在1 h内基本稳定(RSD为2.22%);试验所用方法重复性良好(RSD为1.75%);试验所用方法得到的供试品回收率为99.55%,RSD为1.98%。

2.4 比色条件的选择

香草醛溶液的最适用量为0.2 mL,高氯酸溶液的最适用量为0.6 mL,最佳反应温度为70℃,最佳反应时间为15 min。

2.5 总三萜酸提取工艺优选

2.5.1 单因素试验

提取方法:在3种提取方法中,室温下超声提取30 min所提取得到的总三萜酸含量为10.54 mg/g,加热回流条件下提取30 min所提取得到的总三萜酸含量为9.27 mg/g,冷浸放置24 h所提取得到的总三萜酸质量为9.10 mg/g,说明使用超声提取时总三萜酸的提取率最高,因此选取超声作为提取方法。

提取溶剂的选择:以石油醚、氯仿、甲醇、95%乙醇4种有机化合物为溶剂所提取得到的总三萜酸含

量分别为 3.22 mg/g、6.83 mg/g、12.34 mg/g、12.41 mg/g,由此可知,随着溶剂极性的加大,总三萜酸含量增大,而用甲醇与 95%乙醇提取的总三萜酸质量相差不大,考虑到甲醇具有一定毒性,因此选取乙醇作为提取溶剂。

乙醇体积分数的选择:以 30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%的乙醇为溶剂提取总三萜酸,所得的总三萜酸含量图 1 所示。从图中可知 70%的乙醇为溶剂所提取的总三萜酸含量最高,因此选取 70%乙醇作为提取溶剂。

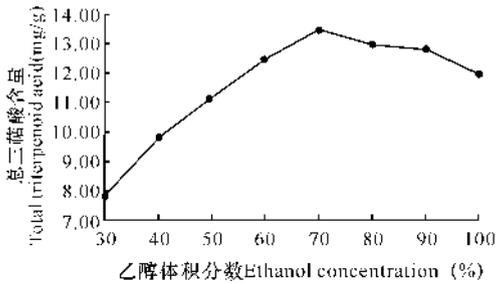


图 1 乙醇体积分数对总三萜酸得率的影响

Fig. 1 Effects of ethanol concentration on total triterpenoid acid yield

料液比的选择:在毛萼清风藤粗粉中按料液比为 1:10,1:20,1:30,1:40,1:50,1:60 分别加入 70%乙醇,提取总三萜酸,所得的结果如图 2 所示,总三萜酸含量随着料液比的增大而增大,当料液比大于 1:50 时,总三萜酸含量不再增大,反而有减小的趋势,因此选取料液比为 1:50。

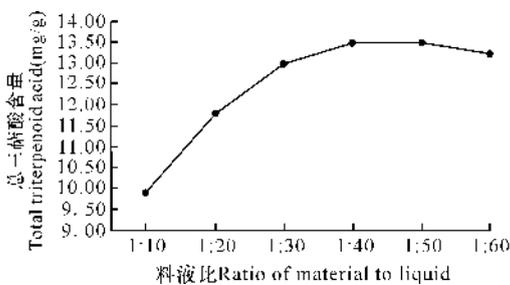


图 2 料液比对总三萜酸得率的影响

Fig. 2 Effects of ratio of material to liquid on total triterpenoid acid yield

提取时间的选择:取毛萼清风藤粗粉 1.00 g,加入 40 mL 70%乙醇,在室温下超声提取 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min,提取总三萜酸,所得的结果如图 3 所示,随着提取时间的增大,总三萜酸含量增大,而当提取时间大于 40 min,总三萜酸含量增长缓慢,因此选取提取时间为 40 min。

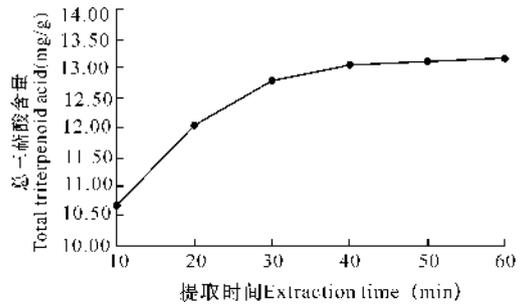


图 3 提取时间对总三萜酸得率的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on total triterpenoid acid yield

2.5.2 正交试验设计

在单因素试验的基础上,选取乙醇体积分数、料液比、提取时间作为考察因素,每个因素选取 3 个水平,按 $L_9(3^3)$ 正交表设计正交试验,试验安排及结果见表 2,方差分析结果见表 3。由表中的极差值可知 3 个因素对总三萜酸提取结果的影响大小依次为乙醇体积分数>料液比>提取时间。以极差值最小的提取时间为误差项进行方差分析,由于是在单因素考察的基础上进行的正交试验,因此在此基础上各因素选取的水平均无显著性差异,最终确定最佳提取条件为 $A_2B_3C_1$,即料液比为 1:50,最适溶剂为 70%乙醇,最佳提取方法为超声提取 40 min。

表 2 正交试验结果与分析

Table 2 Results and analysis of orthogonal test

试验号 Test number	因素 Factors			总三萜酸含量 Total triterpenoid acid yield (mg/g)
	体积分数 Ethanol concentration	料液比 Ratio of material to liquid	提取时间 Extraction time	
1	1	1	1	11.22
2	1	2	2	10.73
3	1	3	3	11.93
4	2	1	2	12.76
5	2	2	3	14.32
6	2	3	1	15.22
7	3	1	3	11.73
8	3	2	1	13.02
9	3	3	2	13.41
K1	11.29	11.90	13.15	
K2	14.10	12.69	12.30	
K3	12.72	13.52	12.66	
R	2.81	1.62	0.853	

2.5.3 验证试验

按优选的工艺:料液比为 1:50,用 70%乙醇超声提取 40 min 进行总三萜酸的提取,结果见表 4,表明优选的工艺条件稳定可行。

表3 正交试验方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal test

方差来源 Sources of variation	偏差平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	F 值 F value	F 临界值 F critical- value	显著性 Significance
体积分数 Ethanol concentration	11.82	2	10.73	19	无显著性差异 No significant differences
料液比 Ratio of material to liquid	3.92	2	3.56	19	无显著性差异 No significant differences
提取时间 Extraction time	1.10	2	1.00	19	无显著性差异 No significant differences
误差 Error	1.10	2			

表4 样品中总三萜酸含量测定结果

Table 4 The results of total triterpenoid acid content in the sample

试验号 Test number	吸光度值 A Absorbance value	总三萜酸含量 Total triterpenoid acid content (mg/g)
1	0.569	13.88
2	0.570	13.90
3	0.553	13.49
平均值 Average value		13.76

3 结论

采用单因素实验和正交试验相结合的方法优选瑶药毛萼清风藤中总三萜酸类化合物的提取方法,结果表明3个因素对实验结果的影响从大到小依次为乙醇体积分数、料液比、提取时间,其最佳提取工艺为料液比为1:50,70%乙醇超声提取40 min。在该方法下提取得到的总三萜酸含量为13.76 mg/g,相对含量较高,且该方法精密性与重复性都较好,回收率也较高,为毛萼清风藤中总三萜酸含量的测定提供一定依据。

参考文献:

- [1] 覃迅云,罗金裕,高志刚. 中国瑶药学[M]. 北京:民族出版社,2002:75.
Qin X Y, Luo J Y, Gao Z G. Yao Ethnic Medicinals in China[M]. Beijing: The Ethnic Publishing House, 2002:75.
- [2] 戴斌,李钊东,丘翠嫦,等. “虎牛钻风”类传统瑶药的调查研究[J]. 中国民族民间医药杂志,1998,31(2):28-34.
Dai B, Li Z D, Qiu C C, et al. “Tiger cattle drill wind” of traditional class Yao medicine research [J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 1998, 31(2):28-34.
- [3] 刘易蓉,梁光义,张永萍. 清风藤属药用植物的研究概况[J]. 贵阳中医学院学报,2006,28(1):50-52.

- [4] Liu Y R, Liang G Y, Zhang Y P. The wind cane of medicinal plant researches[J]. Journal of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, 2006, 28(1):50-52.
林佳,郝小江,梁光义,等. 小花清风藤化学成分的研究[J]. 中草药,1999,30(5):334-335.
Lin J, Hao X J, Liang G Y, et al. Studies on the chemical constituents of *Sabia Pavriflora* Wall. ex Roxb[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1999, 30(5):334-335.
- [5] 邓赞,李翔,吴凤镔. 云南清风藤化学成分的研究[J]. 中草药,2006,37(2):183-185.
Deng Y, Li X, Wu F E. Studies on the chemical constituents of *Sabia yunnanensis* Franch[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2006, 37(2):183-185.
- [6] 袁晓,王国亮,龚复俊. 四川清风藤根皮中三萜成分的研究[J]. 植物学报,1994,36(2):153-158.
Yuan X, Wang G L, Gong F J. Studies on triterpenoid constituents isolated from the roots of *Sabia schumanniana* [J]. Acta Botanica Sinica, 1994, 36(2):153-158.
- [7] 陈谨,邓赞,唐天君,等. 小花清风藤三萜成分的研究[J]. 中草药,2004,35(1):16-17.
Chen J, Deng Y, Tang T J, et al. Studies on triterpenoid constituents from *Sabia Pavriflora* Wall. ex Roxb[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2004, 35(1):16-17.
- [8] 林材. 清风藤等中药化学成分的研究[D]. 贵阳:贵州大学,2006.
Lin C. Studies on the Chemical Constituents of *Sabia Pavriflora* Wall. ex Roxb, *Sabia parviflora* Wall. ex Roxb and *Epimedium dewuense* S. Z [D]. Guiyang: Guizhou University, 2006.
- [9] 田源. 刺梨叶、巫山淫羊藿、册亨清风藤三种民族药化学成分的研究[D]. 贵阳:贵州大学,2007.
Tian Y. Studies on the Chemical Constituents of Three Medical Ethno-herbs, *Folium Rosae roxburghii*, *Epimedium wushanense* T. S. Ying and *Sabia parviflora* Wall. ex Roxb, var. *cehengensis* CY [D]. Guiyang: Guizhou University, 2007.
- [10] 梁光义,周滢,曹佩雪,等. 四川清风藤的化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(12):900-901.
Liang G Y, Zhou Y, Cao P X, et al. Studies on chemical constituents of *Sabia schumanniana* [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2005, 40(12):900-901.
- [11] 黄艳,李齐修,刘元,等. 簇花清风藤的化学成分研究[J]. 中草药,2014,45(6):765-769.
Huang Y, Li Q X, Liu Y, et al. Chemical constituents of *Sabia fasciculata* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(6):765-769.
- [12] 张雁冰,王克让,刘宏民. 马桑叶中总三萜酸的含量测定[J]. 时珍国医国药,2006,17(4):529-530.
Zhang Y B, Wang K R, Liu H M. Determination of the content of the triterpenoidic acid in *Coriaria sinica* Maxim [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2006, 17(4):529-530.

(责任编辑:米慧芝)