

除了两性霉素 B 是通过与麦角甾醇特异性结合,破坏真菌细胞膜结构,从而起到抗真菌作用外,其余都是麦角甾醇的生物合成抑制剂。这类药物虽然作用于麦角甾醇生物合成过程中的不同环节,但最终都能使真菌中的麦角甾醇的质量分数下降。

用于检测细胞膜中麦角甾醇的方法有薄层色谱法、高效液相色谱法等^[9]。反相高效液相色谱分析法具有分析速度快、分离效能高、自动化程度好的特点而被广泛使用。本实验以酮康唑为阳性对照,采用反相液相色谱法测定了肉桂醛、柠檬醛作用烟曲霉后细胞膜中麦角甾醇的变化。实验中发现,一定浓度的药物作用后烟曲霉细胞膜中麦角甾醇较阴性对照组减少,随着药物浓度的增加,麦角甾醇也随之减少。表明药物影响了细胞膜中麦角甾醇的生物合成,从而抑制了烟曲霉的生长繁殖。至于药物抑制了麦角甾醇生物合成的哪一个环节或多个环节,还有待进一步研究。通过测定真菌中麦角甾醇,有助于探讨抗真菌药物的作用机制,为中药活性成分的体外抗真菌作用研究提供了新方法。

References:

- [1] Xie X M, Xu Y, Fu Y Y. *In vitro* anti-*Aspergilli* activity study of active ingredients of Chinese herbs by broth micro-

dilution testing [J]. *Microbiology* (微生物学通报), 2003, (6): 112-115.

- [2] Xie X M, Xu Y, Fang J R. Effects of cinnamaldehyde and citral on DNA and RNA in *Aspergillus flavus* and *A. fumigatus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36 (4): 558-560.
- [3] Xie X M, Zhang W P, Fu Y Y, et al. Study on antifungal mechanism of cinnamaldehyde and citral in *Aspergilli* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (4): 430-432.
- [4] Chen S P. *Fungal Infection* (真菌感染学) [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 2000.
- [5] Liu H T, Gao P H, Cao Y B, et al. Inhibitory effect of fluconazole on sterol biosynthesis in *Candida albicans* studied by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2002, 16 (5): 368-371.
- [6] Zhang W J. Study on effect of cinnamaldehyde against opportunistic fungi [J]. *J Clin Dermatol* (临床皮肤科杂志), 1995 (4): 219-220.
- [7] Zhou Y, Tao J D, Zhang J J. Study on antifungal role by *Litsea Cubeba* and its primary component—the citral [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1984, 4 (9): 558-559.
- [8] Ji H, Zhang W, Zhou Y, et al. A three dimensional model of lanosterol 14 α demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals [J]. *J Med Chem*, 2000, 43 (13): 2493-2505.
- [9] Cao Y B, Jiang Y Y, Yin M, et al. Effect of fluconazole on ergosterol biosynthesis in fungi by TLC [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 1999, 20 (5): 312-315.

正交试验法优选酸枣仁中白桦脂酸的提取工艺

赖 玲, 杨 昕, 杨 光, 吴孔弦

(华中科技大学同济医学院药学院 分析测试中心, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 优化酸枣仁中白桦脂酸的提取工艺。方法 以白桦脂酸和干浸膏得率为检测指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 考察乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间和提取次数 4 个影响因素, 采用高效液相色谱法进行白桦脂酸测定。结果 乙醇体积分数对提取物中白桦脂酸有显著影响, 其他因素影响不显著, 最佳提取工艺条件为 3 倍量 95% 乙醇热回流 3 次, 每次 2 h。结论 优选得到的工艺稳定、方法可行。

关键词: 酸枣仁; 白桦脂酸; 正交试验; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)04-0532-03

Orthogonal test for optimizing extraction technique of betulinic acid in *Semen Ziziphi Spinosae*

LAI Ling, YANG Xin, YANG Guang, WU Kong-xian

(Tongji Pharmaceutical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Key words: *Semen Ziziphi Spinosae*; betulinic acid; orthogonal test; HPLC

收稿日期: 2005-06-29

基金项目: 华中科技大学同济医学院科学研究基金资助(01514709)

作者简介: 赖 玲(1980—), 女, 广西桂林, 在读硕士, 主研方向为中药新剂型。

Tel: (027) 8365817 E-mail: victoryD773@yahoo.com.cn

酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子,具有养心安神的功效,是较为常用的镇静催眠中药^[1]。其中白桦脂酸(betulinic acid)的质量分数较高^[2]。白桦脂酸及其衍生物具有明显抗炎活性,白桦脂酸对白血病细胞 P388 具有较强的抑制作用^[3],因此具有良好的开发前景。

本实验采用正交试验设计结合高效液相色谱法(HPLC),以白桦脂酸的质量分数和干浸膏得率为检测指标对诸影响酸枣仁中白桦脂酸的提取工艺因素进行了考察。

1 仪器与试剂

惠普(安捷伦)Agilent 1100 高效液相色谱仪; Agilent Serial 泵及 VWD 检测器; Sepu3000 工作站; TG16—11 台式离心机(长沙平凡仪器有限公司)。

无水乙醇、95%乙醇均为分析纯,HPLC 用试剂均为色谱纯。酸枣仁购于武汉天成大药房,经本院生药教研室张长弓教授鉴定,取酸枣仁适量,按 1:3 加水煮沸 30 min,共煮 3 次,于 80℃烘干,粉碎,备用。白桦脂酸对照品购于德国 Aldrich 公司,质量分数大于 90%。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计:选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验设计,因素水平安排见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 乙醇体积 分数/%	B 乙醇用量/ (g·mL ⁻¹)	C 提取 时间/h	D 提取 次数/次
1	35	1:3	1	1
2	65	1:6	2	2
3	95	1:9	3	3

2.2 供试品溶液的制备:将酸枣仁粗粉于 80℃干燥至恒重,精密称取 9 份,按 1~9 进行编号,按照正交试验要求进行操作。合并滤液,定容至 100 mL。精密量取 5 mL,挥干溶剂,用适量甲醇溶解,定容至 25 mL,取续滤液 1.5 mL,离心(3 500 r/min) 10 min,取上清液,即得。

2.3 干浸膏得率的计算:精密量取供试品溶液 25 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿上,水浴挥干溶剂,105℃干燥至恒重,称质量,计算干浸膏得率。

2.4 白桦脂酸测定

2.4.1 色谱条件:色谱柱 Hypersil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水-冰醋酸(70:30:0.08);检测波长:207 nm;柱温:40℃;体积流

量:1 mL/min。

2.4.2 线性关系考察:精密称取干燥至恒重的白桦脂酸对照品 4.40 mg,甲醇溶解,转移并定容于 25 mL 量瓶中,摇匀。精密吸取适量对照品溶液配成系列质量浓度,按上述色谱条件测定,重复进样($n=3$),20 μL/次。以平均峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标绘制标准曲线,并进行回归分析。结果得回归方程: $Y=10\,905\,X-26\,783$, $r=0.999\,1$,表明白桦脂酸在 7.04~176 μg/mL 内线性关系良好。

2.4.3 精密度试验:精密吸取同一质量浓度白桦脂酸对照品溶液,进样测定,20 μL/次。白桦脂酸峰面积的 RSD 为 0.16% ($n=5$)。

2.4.4 稳定性试验:取新制备的酸枣仁供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 分别进样 20 μL。结果测得酸枣仁中白桦脂酸的平均质量分数为 0.248%,RSD 为 1.29%,表明供试品溶液中白桦脂酸在 24 h 内稳定。

2.4.5 重现性考察:精密称取干燥至恒重的原料粗粉 5 份,制备供试品溶液,进样测定,20 μL/次,结果白桦脂酸面积的 RSD 为 0.83%。

2.4.6 加样回收率试验:精密称取干燥至恒重的、含白桦脂酸 0.247% 10 份 3 g 的原料粗粉,其中 9 份中每 3 份按 80%、100%、120% 水平加 5.93、7.41、8.89 mg 的白桦脂酸对照品,另 1 份作为空白对照,制备供试品溶液,重复进样($n=3$),20 μL/次,测定。结果平均回收率为 99.96%,RSD 为 0.62%。

2.4.7 测定:取供试品溶液,重复进样($n=3$),20 μL/次,测定按外标两点法计算。

2.5 结果:色谱图见图 1。正交设计见表 2,方差分析见表 3、4。

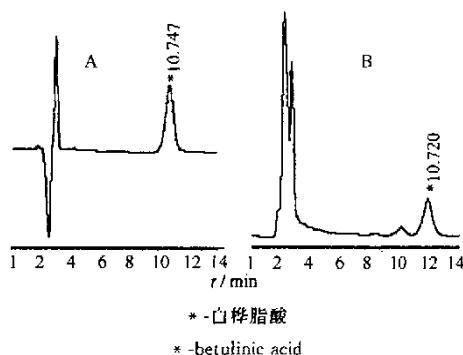


图 1 白桦脂酸对照品(A)和酸枣仁提取物的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of betulinic acid reference substance (A) and Semen Ziziphi Spinosa extract (B)

表 2 正交试验结果与分析

Table 2 Results of orthogonal test and analysis

试验号	A	B	C	D	干浸膏得率/%	白桦脂酸/%
1	1	1	1	1	2.797	0.023 8
2	2	2	1	2	1.434	0.169 4
3	3	3	1	3	2.346	0.464 9
4	2	3	2	1	1.578	0.230 1
5	3	1	2	2	1.640	0.368 4
6	1	2	2	3	3.278	0.073 7
7	3	2	3	1	1.457	0.378 0
8	1	3	3	2	2.919	0.043 9
9	2	1	3	3	2.397	0.351 3
K_1	I	2.998	2.278	2.192	1.944	
	II	0.047	0.248	0.219	0.211	
K_2	I	1.803	2.056	2.165	1.988	
	II	0.250	0.207	0.224	0.194	
K_3	I	1.814	2.281	2.258	2.674	
	II	0.404	0.246	0.258	0.297	
极差	I	1.195	0.225	0.093	0.730	
R	II	0.357	0.041	0.039	0.103	

表 3 以干浸膏得率为指标的方差分析

Table 3 Variance analysis based on dry extract rate as index

误差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	2.829	2	1.414 5	202.071	$P < 0.01$
B	0.100	2	0.050	7.143	
D	0.992	2	0.496	70.857	$P < 0.05$
误差(C)	0.014	2	0.007		

$$F_{0.05}(2,2)=19.00 \quad F_{0.01}(2,2)=99.00$$

表 4 以白桦脂酸为指标的方差分析

Table 4 Variance analysis based on betulinic acid as index

误差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	0.192	2	0.096	64	$P < 0.05$
B	0.003	2	0.001 5	1	
D	0.018	2	0.009	6	
误差(C)	0.003	2	0.001 5		

$$F_{0.05}(2,2)=19.00 \quad F_{0.01}(2,2)=99.00$$

极差分析表明,4 个因素对酸枣仁中白桦脂酸提取率影响的顺序为:以干浸膏得率为检测指标: $A > D > B > C$;以白桦脂酸为检测指标: $A > D > B >$

C;方差分析表明,因素 A 对提取工艺有显著影响,而且随着乙醇体积分数升高,出膏率有所降低。考虑到工业生产上操作简便、省时、经济,最终选定 $A_3B_1C_2D_3$,即 95%乙醇,3 倍量×3 次,每次 2 h 为最佳提取工艺。

3 讨论

试验及文献报道^[4,5],酸枣仁中提取分离白桦脂酸关键在于除去其中的酸枣仁皂苷 A 和 B 及脂肪油等杂质的干扰。笔者采用水煮酸枣仁饮片 3 次,去除了大部分皂苷类、糖类、鞣质类等易溶于水、极性大的物质,而白桦脂酸没有损失。

曾设计乙醇体积分数为 65%、80%、95%,但各影响因素之间没有显著性差异,重新调整乙醇体积分数为 35%、65%、95%,结果各影响因素间存在显著性差异,而且乙醇体积分数影响显著。

确定最佳工艺后,笔者实验室进行了 3 批平行实验并到我院生药实验室放大生产了 3 批,以白桦脂酸的量和干浸膏得率为考察指标,结果稳定、可靠、重现性好,证明该工艺稳定、可行。

References:

- [1] Li H J, Li P. Determination of jujuboside A and jujuboside B in spine date seed by HPLC-ELSD [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2000, 20 (2): 82.
- [2] Li S Y, Zhang R Y. TLC Determination of betulinic acid in spine date seed [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1987, 18 (6): 15.
- [3] Otsuka H, Fujioka S, Komiya T, et al. Studies on anti-inflammatory agents. V. A new anti-inflammatory constituents of *pyracantha crenulata* (D. Don) Roem [J]. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29 (11): 3099.
- [4] Zhang Y J, Tang Y H, Liu H L, et al. Extraction technique study of jujubosides in spine date seed [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 2001, 16 (1): 18.
- [5] Gong J Y, Zhao Q D, Shi L. Extraction technique and component study of fatty oils in spine date seed [J]. *J Changchun Coll Tradit Chin Med* (长春中医学院学报), 2003, 19 (3): 87.

《中草药》投稿特别注意事项

1. 实验性论文需要单位介绍信(注明:论文内容真实,作者排名无争议,无一稿两投,无泄密)。
2. 创新性论文优先发表,新化合物免收版面费。
3. 图题、表题、图注、表注需中英文双语表示。
4. 文后参考文献译成英文。
5. 本刊不收审稿费,但刊用稿件要收取版面费。
6. 投稿时请留下联系方式(电话和 E-mail)。