

胡芦巴碱超声提取工艺研究

兰 卫¹, 陶 宁², 哈木拉提·吾甫尔^{1*}

1. 新疆医科大学 新疆名医名方与特色方剂学自治区重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 新疆医科大学公共卫生学院, 新疆 乌鲁木齐 830011

摘 要: 目的 研究胡芦巴碱最佳超声提取工艺。方法 采用超声提取法, 以胡芦巴碱的提取率为指标, 采用正交试验考察各因素对其提取率的影响, 优选出胡芦巴碱最佳超声提取工艺。结果 胡芦巴碱最佳超声提取工艺为 70%乙醇提取 30 min、提取功率 500 W, 胡芦巴碱提取率最高, 平均提取率为 0.588%。结论 本实验确定的超声提取工艺可用于胡芦巴碱的提取。
关键词 胡芦巴; 胡芦巴碱; 正交试验; HPLC; 超声提取

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)11-2200-03

Study on extracting of trigonelline by ultrasonic technology

LAN Wei¹, TAO Ning², HALMURAT·Wufuer¹

1. Xinjiang Key Laboratory of Famous Prescription and Science of Formulas, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. Public Health College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Key words: *Trigonella foenum-graecum* L.; trigonelline; orthogonal test; HPLC; ultrasonic extraction

胡芦巴为豆科植物胡芦巴 *Trigonella foenum-graecum* L. 的干燥成熟种子, 为维吾尔族常用药材, 被新疆维吾尔自治区科技厅列为重点研究的药材。传统医学认为胡芦巴归肝、肾经, 主治腹肋胀满、肾虚腰痛等症。胡芦巴化学成分丰富, 有黄酮类、甾体皂苷类、三萜类、生物碱类、香豆素类等。药理研究表明, 胡芦巴具有抗糖尿病、降胆固醇及对急性化学性肝损伤的保护作用^[1]。胡芦巴碱(trigonelline)是胡芦巴主要药效成分, 熔点为 218 °C, 分子式 $C_7H_8NO_2$, 相对分子质量为 137.4, 化学名为 *N*-甲基烟酸内酯或 *N*-甲基烟酸内盐, 溶于水、甲醇、乙醇等极性溶剂中。其具有降血糖、抗肿瘤、调血脂、促进神经组织再生、镇静等药理活性, 一直为国内外学者所关注^[2]。本实验采取正交试验法考察提取因素对其提取效果的影响, HPLC 法测定胡芦巴碱的量, 从中优选出胡芦巴碱最佳提取工艺。

1 仪器与材料

日本岛津高效液相色谱仪(包括 LC-20AB 二元

泵; SPD-M20A SPD 检测器); 电子天平(北京赛多利斯天平仪器厂); DZKW2C 电子恒温水浴锅(北京光明医疗仪器厂), SHZ-D 循环水式泵(河南巩义市英峪予华仪器厂), KQ-500VDE 台式三频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 容量 22.5 L, 超声频率 45 kHz, 超声功率 500 W, 功率可调 40%~100%, 时间可调 1~480 min。

胡芦巴碱对照品(批号 110883-201008, 中国药品生物制品检定所)。乙腈、甲醇为色谱纯(进口), 水为重蒸馏水, 无水乙醇等其他试剂均为分析纯。

胡芦巴购于新疆中新药业有限责任公司(批号 2010-11-20), 经新疆医科大学中药鉴定室李永和主任中药师鉴定为豆科植物胡芦巴 *Trigonella foenum-graecum* L. 的干燥成熟种子。按《中国药典》2010 年版进行定量测定, 符合规定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3-4]

色谱柱为 Agilent Zorba X NH₂ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为水-甲醇-乙腈(20:40:40);

收稿日期: 2012-02-19

基金项目: 新疆名医名方与特色方剂学重点实验室开放课题(20100816)

作者简介: 兰 卫(1969—), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为民族药研究。Tel: 18099186178 E-mail: lanwei516@sina.com

*通讯作者 哈木拉提·吾甫尔 E-mail: halmurat@263.net

网络出版时间: 2012-10-19 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121019.1032.003.html>

体积流量 1 mL/min; 检测波长 265 nm, 进样量 10 μ L; 柱温 40 $^{\circ}$ C, 色谱图见图 1。

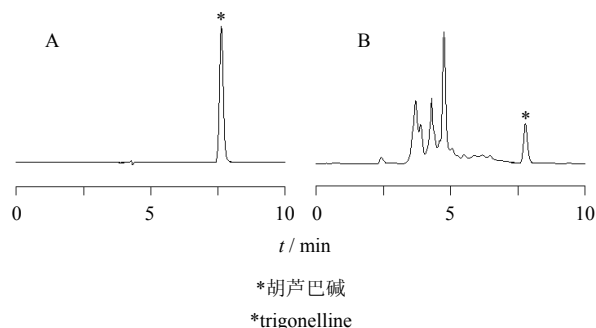


图 1 胡芦巴碱对照品 (A) 和供试品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC chromatograms of trigonelline reference substance (A) and samples (B)

2.2 线性关系考察

胡芦巴碱对照品 5.77 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 50% 甲醇定容。分别精密吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 50% 甲醇稀释并定容, 进样 10 μ L, 以色谱峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 得回归方程 $Y=1\ 175.92 X-3\ 366.6$, $r=0.999\ 7$, 表明胡芦巴碱在 11.54~57.70 μ g/mL 线性关系良好。

2.3 胡芦巴碱的测定^[5]

按《中国药典》2010 年版胡芦巴定量测定项下方法测定胡芦巴药材中胡芦巴碱的量, 测得其质量分数为 0.595%, 符合《中国药典》2010 年版胡芦巴碱超过 0.45% 的规定。

2.4 正交试验

参考文献方法^[3]及预试验结果, 以胡芦巴碱提取率为考察指标, 选择影响胡芦巴碱提取的主要因素超声提取功率 (A)、提取时间 (B)、乙醇体积分数 (C) 为考察因素, 按 $L_9(3^4)$ 正交试验设计安排试验, 见表 1, 方差分析见表 2。

样品粉碎过 40 目筛, 精密称定约 0.5 g, 置索氏提取器中, 加石油醚 (60~90 $^{\circ}$ C) 80 mL, 加热回流 3 h, 药渣挥干; 加不同体积分数的乙醇溶液, 按 $L_9(3^4)$ 正交试验设计处理, 提取 2 次, 回收乙醇, 残渣加甲醇溶解, 转移至 50 mL 量瓶中, 甲醇定容; 量取 1.0 mL 置于 25 mL 量瓶中, 50% 甲醇定容, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 放入样品瓶中, 设定时间, HPLC 自动进样, 连续 3 批, 测定胡芦巴碱的峰面积, 计算胡芦巴碱的量, 取平均值, 计算胡芦巴碱提取率。

提取率 = 提取液中胡芦巴碱质量 / 胡芦巴质量

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果

Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A / W	B / min	C / %	D (误差)	提取率 / %
1	200 (1)	10 (1)	30 (1)	(1)	0.434
2	200 (1)	20 (2)	50 (2)	(2)	0.489
3	200 (1)	30 (3)	70 (3)	(3)	0.547
4	350 (2)	10 (1)	50 (2)	(3)	0.483
5	350 (2)	20 (2)	70 (3)	(1)	0.543
6	350 (2)	30 (3)	30 (1)	(2)	0.503
7	500 (3)	10 (1)	70 (3)	(2)	0.536
8	500 (3)	20 (2)	30 (1)	(3)	0.497
9	500 (3)	30 (3)	50 (2)	(1)	0.559
K_1	1.470	1.453	1.434	1.536	
K_2	1.529	1.529	1.531	1.528	
K_3	1.592	1.609	1.626	1.527	
R	0.122	0.156	0.192	0.009	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

变异来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.248	2	152.973	$P < 0.01$
B	0.406	2	250.082	$P < 0.01$
C	0.614	2	378.753	$P < 0.01$
D (误差)	0.002	2		

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

由方差分析看出, A、B、C 3 因素均有极显著差异 ($P < 0.01$); 由极差分析可知, 各因素影响的大小依次为 $C > B > A$; 各因素最优组合为 $A_3B_3C_3$, 即以 70% 乙醇在超声功率 500 W 条件下提取 30 min。

2.5 验证试验

取 3 份样品各 0.5 g, 按最佳组合进行提取, 结果胡芦巴碱提取率分别为 0.585%、0.589%、0.591%, 平均提取率为 0.588%。

2.6 常规提取试验^[4]

样品粉碎过 40 目筛, 精密称定约 0.5 g, 置索氏提取器中, 加石油醚 (60~90 $^{\circ}$ C) 80 mL, 加热回流 3 h, 药渣挥干, 加无水乙醇 80 mL, 加热回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 回收乙醇, 残渣加甲醇溶解, 转移至 50 mL 量瓶中, 甲醇定容。量取 1.0 mL 置于 25 mL 量瓶中, 50% 甲醇定容。0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 放入样品瓶中, 设定时间, HPLC 自动进样 3 批, 测定胡芦巴碱的峰面积, 计算胡芦巴碱的量, 计算其提取率分别为 0.458%、0.475%、0.469%,

平均提取率为 0.467%。

3 讨论

超声波提取法在中药化学成分提取中的应用已经显示出明显的优势,具有省时、节能、提取率高等优点,这对于提取方法落后、生产周期长的中药大规模生产,在提供更科学的工艺条件方面,推广应用价值非常高。

胡芦巴碱是胡芦巴的主要药效成分,具有多种生物活性^[6]。本实验采用 HPLC 法测定胡芦巴提取液中胡芦巴碱的量,测定结果准确可靠,专属性强。通过正交试验多方面考察影响胡芦巴碱提取工艺的各种因素,进行胡芦巴碱提取工艺的筛选,优选出了最佳提取条件,并得到了验证。

在试验因素的选择上,本实验选择了超声功率、提取时间和乙醇体积分数,尚有料液比、提取温度、药材粒径等因素可供选择,其完整的最优工艺有待进一步研究。

由于各种药材中有效成分的性质差异,在实际操作中,如果超声提取的有关参数选取不当,其提

取效果与其他提取方法相比并不具有优势,甚至还要差。因此,通过正交试验来确定某种药材的最佳超声提取工艺显得尤为重要。按该最佳工艺组合的放大重复试验,也证实了胡芦巴碱提取率为正交设计表中的最大值,说明该组合工艺条件较为可行、可靠,为大规模生产提供参考。

参考文献

- [1] 朱宝立, 班永宏, 段金殿. 胡芦巴对急性化学性肝损伤的保护作用 [J]. 中国工业医学杂志, 2000, 13(1): 19-21.
- [2] 姜 华, 尹 焜, 赵余庆. 胡芦巴碱的生物分布与药理作用 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 附 2-附 4.
- [3] 刘广学, 尚明英, 李 辉, 等. 胡芦巴药材中胡芦巴碱的提取方法及其含量测定 [J]. 中国药品标准, 2005, 6(4): 11-14.
- [4] 赵怀清, 曲 燕, 王学娅, 等. 高效液相色谱法测定胡芦巴中胡芦巴碱的含量 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(3): 194-196.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [6] 荆 宇, 赵余庆. 胡芦巴化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(12): 1146-1149.