

女贞子中齐墩果酸的提取与鉴定

李开泉^{1,2}, 陶华蕾²

(1. 江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西 宜春 336000; 2. 宜春学院 化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000)

摘要: 研究女贞子所含主要化学成分的类型及结构。用 $\varphi=95\%$ 乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h, 减压回收乙醇后以水洗涤得沉降物。用“YCX-2 号”除杂剂处理后, 加活性炭脱色 30 min, 经凝析分离、纯化精制得产品。采用理化常数测定和薄层色谱、红外光谱、质谱及核磁共振光谱鉴定其化学结构。实验所得产品确证为齐墩果酸, 其纯度达 99.63%。齐墩果酸为女贞子的主要化学成分。本实验方法简单易行, 合理实用, 产品纯度高, 安全性好, 为工业生产提供了技术参考。

关键词: 女贞子; 齐墩果酸; 提取分离; 结构鉴定

中图分类号: TQ464.2; Q949.776.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)01-0179-04

Extraction and Identification of Oleanolic Acid in *Ligustrum lucidum* Ait.

LI Kai-quan^{1,2}, TOU Hua-lei²

(1. Key Laboratory of Province for Research on Active Ingredients in Natural Medicines, Yichun 336000, China; 2. Chemistry & Bioengineering College of Yichun University, Yichun 336000, China)

Abstract: To study the types and structure of main chemical components in *Ligustrum lucidum*. Oleanolic acid was extracted with 95% ethanol two times, each time 1 h, deposit was obtained after vacuum recovery of ethanol and water rinse. Treated with impurity-removing agent “YCX-2”, decoloured with active carbon for 30 min, the product was obtained after condensate separation and purification. The chemical structure of the product was determined with physical and chemical constants, thin-layer chromatography, infrared spectroscopy, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The product was confirmed to be oleanolic acid, its purity was 99.63%. Oleanolic acid is the main chemical component of *Ligustrum lucidum*. This technology is advanced and rational, practical and feasible. It is applicable to gathering and purification of oleanolic acid. The product safeness is good. It has created the technical conditions for industrial production.

Key words: *Ligustrum lucidum*; oleanolic acid; extraction and separation; structure identification

女贞子为木樨科常绿乔木女贞(*Ligustrum lucidum* Ait)的成熟干燥果实,主产于浙江、江苏、湖南、福建、广西以及四川等地,江西资源丰富。女贞子为传统中药材,性甘、苦凉,具有补益肝肾、清热明目功效,用于肝肾阴虚、头昏目眩、耳鸣、腰膝酸软、须发早白等症^[1]。女贞子对心血管系统疾病疗效显著,能降低血脂,预防动脉粥样硬化;清除氧自由基,提高机体对自由基的防御力而发挥抗衰老作用^[2];能抵抗癌细胞的增殖和侵袭,并可诱导癌细胞凋亡^[3]。而其成分齐墩果酸具有抗毒保肝、降低谷丙

收稿日期: 2011-08-10 修回日期: 2011-10-02

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目[2002AA2Z3217]

作者简介: 李开泉(1954—)男,研究员,教授,硕士生导师,主要从事天然药物化学与新药开发研究, E-mail: lkq541024@sina.com。

转氨酶的活性,对多种肝毒物有抵抗作用,并具有显著降糖效果^[4-7]。为了开发我国丰富的药用植物资源,对女贞子中齐墩果酸进行了提取分离实验,并对样品进行了结构鉴定,现报告其结果。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

女贞子购于宜春市第一人民医院,经江西省天然药物活性成分研究重点实验室鉴定为女贞(*Ligustrum lucidum* Ait)之果实。乙醇(体积分数 95%,食用级),广西糖厂产;活性炭(分析纯),上海豪申化学试剂有限公司产;齐墩果酸对照品,由中国药品生物制品检定所提供。

1.2 检测仪器

Waters 高效液相色谱仪(美国),Nicolet IMPACT-400 型傅立叶变换红外光谱仪(美国);INOVA-500 型¹H 及¹³C 核磁共振光谱仪(美国);Autospec-Ultima ETOF EI 及 Magnet BPI 型质谱仪(美国);显微熔点测定仪,北京分析仪器厂;WZZ-1S 数字式自动旋光仪(上海);三用紫外线分析仪,江阴市申港电光仪器厂。

1.3 提取工艺

将干燥的女贞子粉碎成粗粉(20 目),用石油醚浸泡脱脂 24 h,滤去石油醚,药渣挥干溶剂后,加 5 倍量体积分数为 95% 的乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,合并 2 次提取液,减压回收乙醇得浸膏。浸膏以水沉降 2 次,取沉降物,用自制的“YCX-2 号”除杂剂处理,除去脂类、类脂类及色素等杂质,过滤,不溶物用乙醇加热溶解,并加活性炭脱色 30 min,趁热过滤,滤液经凝析分离、纯化精制,烘干得针状结晶齐墩果酸。

工艺流程为:药材粗粉→乙醇提取→减压浓缩→沉降过滤→加除杂剂 乙醇溶解→脱色→凝析分离→纯化精制→齐墩果酸。

2 结果与分析

2.1 性状鉴定

样品为白色针状结晶,不溶于水和石油醚,可溶于甲醇、乙醇、丙酮、氯仿、乙醚等有机溶剂。

2.2 定性反应

2.2.1 Liebermann-Burchard 反应 取齐墩果酸样品约 2 mg,以 1 mL 体积分数为 95% 的乙醇溶解,吸取齐墩果酸乙醇溶液 1 滴,置试管中,加醋酐试剂 1 mL,摇匀,沿试管壁缓缓加入浓硫酸试剂 1 mL,在醋酐与浓硫酸界面上呈紫红色圆环。

2.2.2 硅胶薄层层析 取硅胶 G 加 5 g/L 的 CMC-Na 制成硬板,晾干后于 110 °C 活化 1 h 备用。取齐墩果酸样品约 2 mg,加 1 mL 体积分数为 95% 的乙醇溶解,点样,同时用齐墩果酸对照品作对照,以 V 环己烷:V 丙酮(3:1)为展开剂,展距 10 cm,晾干,喷以体积分数为 10% 的硫酸乙醇溶液,于 110 °C 加热 5~10 min。结果在与对照品相应的位置上显相同颜色的红色斑点,在 365 nm 紫外光下显相同颜色的淡黄色荧光斑点。

2.3 理化常数测定

齐墩果酸样品 $[\alpha]_D^{20}$ (CHCl₃, 0.6) +79.7°, mp 291.5~293. °C,与齐墩果酸对照品混合熔点不下降。

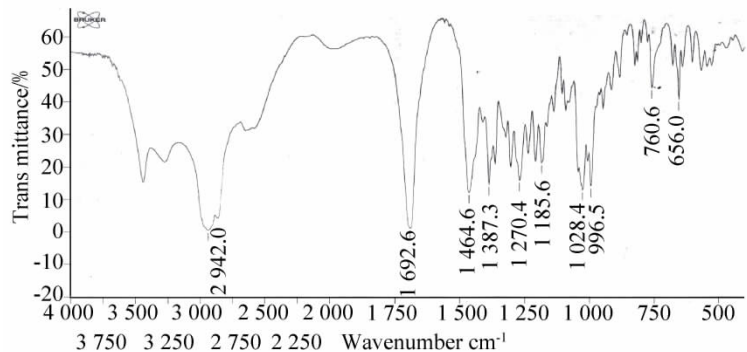


图 1 齐墩果酸的红外图谱

Fig. 1 IR spectra of oleanolic acid

2.4 含量测定

色谱条件 Symmetry Shield RP18 色谱柱 (3. 9 × 150 mm , 5 μm) 流动相为甲醇-水(88: 12) , 流速 1 mL/min , 检测波长 210 nm 柱温 25 °C ,用外标法定量分析。结果测得样品中齐墩果酸的质量分数为 99. 63% ,RSD 为 0. 39% (n = 5) 。

2.5 结构鉴定

UVλ = 203. 4 nm; IR (KBr) ν/cm: 3475 ,2942 ,2875 ,1693 ,1465 ,1387 ,1270 ,1186 ,1028 ,997 ,761 ,656; EI - MS (m/z) : 456. 3575、451、447、441、425、423、248、203 (100) 、189、133、119、69、55、43。

¹H NMR (DMSO - d₆ , 600MHz) : δ = 12. 04 (s , 1H , COOH) ,5. 16(t - like , J = 3. 7 , 3. 3Hz , 1H , H - 12) , 2. 99(dd , J = 10. 6 , 5. 1Hz , 2H , H - 3) , 2. 75(dd , J = 13. 9 , 4. 0Hz , 1H , H - 18) , 1. 91(td , J = 13. 6 , 4. 0Hz , 1H , H - 16 - 1) , 1. 81(dd , J = 8. 8 , 3. 3 Hz , 2H , H - 11) , 1. 58 - 1. 67(m , 3H , H - 2 - 1 , H - 15 - 1 , H - 19 - 1) , 1. 38 - 1. 52(m , 8H , H - 1 - 1 , H - 1 - 2 , H - 2 - 2 , H - 6 - 1 , H - 7 - 1 , H - 9 , H - 16 - 2 , H - 21 - 1) , 1. 07(d , J = 5. 9Hz , 3H , H - 6) , 1. 28 - 1. 34 (m , 2H , H - 19 - 1 , H - 21 - 2) , 1. 23(td , J = 9. 9 , 3. 3 Hz , 1H , H - 5) , 1. 13(m , 1H - 19 - 2) , 1. 03 - 1. 07(m , 1H , H - 21 - 2) , 0. 99(td , J = 11. 0 , 3. 3Hz , 1H , H - 15 - 2) , 1. 09 , 0. 89 , 0. 87 , 0. 87 , 0. 85 , 0. 72 , 0. 67(s each , 3H each , CH₃ × 7) 。

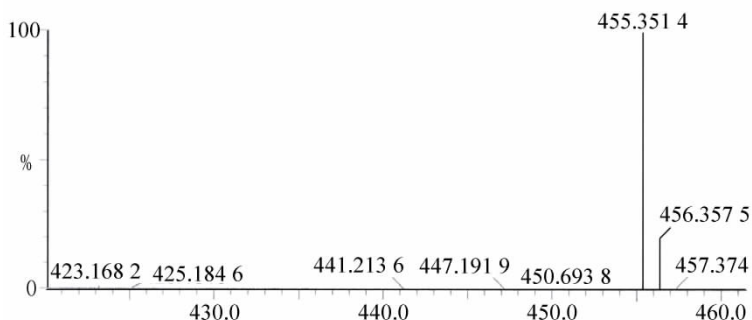


图 2 齐墩果酸的质谱图

Fig. 2 Mass spectrum of oleanolic acid

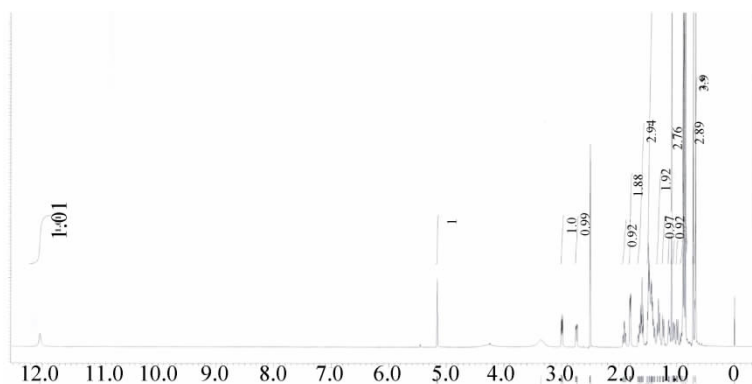


图 3 齐墩果酸的¹H 图

Fig. 3 ¹H NMR of oleanolic acid

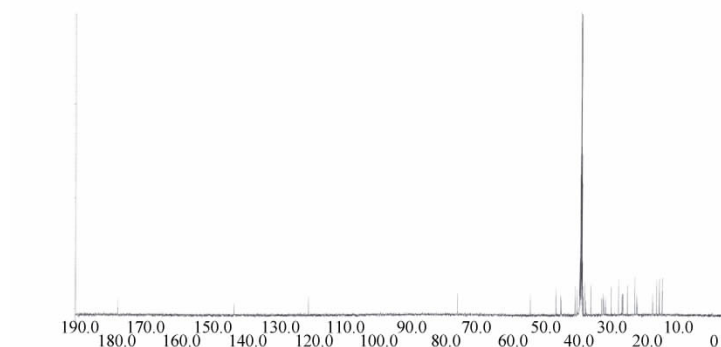


图 4 齐墩果酸的¹³C 图

Fig. 4 ¹³C NMR of oleanolic acid

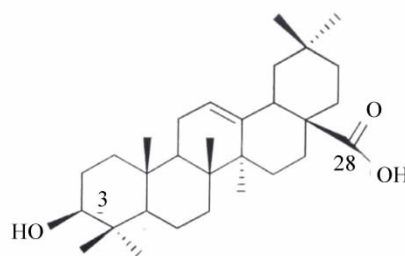


图 5 齐墩果酸的结构

Fig. 5 The structure of oleanolic acid

¹³C NMR (DMSO - d₆ , 600Hz) : δ = 178. 6(C - 28) , 143. 8(C - 13) , 121. 5(C - 12) , 76. 8(C - 3) , 54. 8(C - 5) , 47. 1(C - 9) , 45. 7(C - 19) , 45. 4(C - 17) , 41. 3(C - 18) , 40. 8(C - 14) , 38. 9(C - 8) , 38. 4(C - 1) , 38. 1(C - 4) , 36. 6(C - 10) , 33. 3(C - 21) , 32. 8(C - 29) , 32. 4(C - 7) , 32. 1(C - 22) , 30. 4(C - 20) , 28. 2(C - 23) , 27. 2(C - 15) , 26. 9(C - 27) , 25. 6(C - 2) , 23. 4(C - 30) , 22. 9(C - 11) , 22. 6(C - 16) , 18. 0(C - 6) , 16. 8(C - 26) , 16. 0(C - 24) , 15. 1(C - 25) 。

根据以上理化常数和光谱学数据确证样品为齐墩果酸。

3 讨 论

(1) 本实验仅用体积分数为 95% 的乙醇为溶剂对女贞子粗粉回流提取两次,回收溶剂后再经除杂、脱色,凝析分离得齐墩果酸,不仅产品无有毒有害溶剂残留,提高了安全性,而且简化了操作程序,降低了生产成本,有利于齐墩果酸的富集和纯化,为工业生产创造了技术条件。

(2) 本实验应用高效液相色谱法测定齐墩果酸的含量,采用甲醇-水(88:12)为流动相,配比简单,经济实用,出峰时间在 7.4 min 左右(柱温 25 ℃),且分离度较好,达基线分离,同时流动相 pH 为 5.4 左右,符合色谱柱的要求^[8]。

(3) 将齐墩果酸对照品溶液在 190~300 nm 进行光谱扫描,其最大吸收波长为 203 nm,由于溶剂甲醇在短波长处也有吸收,为了减少干扰,同时保持其灵敏度,故选择 210 nm 作为检测波长。经方法学研究表明,此法简便快速、分离效果好、准确性高。

(4) 齐墩果酸资源广泛,毒副作用小,服用安全,具有多种生物活性,尤其在抗肝炎、抗肿瘤、治疗心血管疾病、降低血脂血糖等方面作用显著^[9-12]。目前对齐墩果酸多种生物功能的作用机制还不明确,工作仍在探索阶段。随着齐墩果酸的药理作用机制及结构类似的三萜化合物研究工作的不断深入,齐墩果酸的开发及应用研究将会取得更大突破。

参考文献:

- [1] 郑汉臣, 蔡少青. 药用植物学与生药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [2] 张蜀艳, 李政. 齐墩果酸研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(4): 20-24.
- [3] 吕娟涛, 汤浩. 女贞子多糖对肝损伤保护作用的实验研究[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(12): 1024-1025.
- [4] 裴占须. 中西医结合治疗 2 型糖尿病 60 例观察[J]. 实用中医药杂志, 2010, 26(11): 780.
- [5] 张建芬, 陈蔚青, 蒋新龙. 降糖 1 号关黄柏部分的提取工艺研究[J]. 中成药, 2010, 32(10): 1826-1828.
- [6] 卢晓沅, 陈志良, 王春霞. 女贞子化学成分及其药理作用研究概况[J]. 中药材, 2006, 29(6): 627-629.
- [7] 全会娟, 胡魁伟, 康琛, 等. 近十五年中女贞子研究进展[J]. 中国实用医药, 2009, 36(4): 1-5.
- [8] 陈德昌. 中药化学对照品工作手册[M]. 北京: 中国医学科技出版社, 2000: 18.
- [9] 王奇, 芦柏. 齐墩果酸的研究进展[J]. 中国药房, 2008, 19(9): 711-712.
- [10] 李磷, 邱蓉丽, 周长慧, 等. 女贞子多糖对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(6): 388-390.
- [11] 车德亚, 陈林. 女贞子化学成分及其药理研究进展[J]. 现代临床医学, 2009, 35(5): 323-325.
- [12] 杨曦, 蒋桂华. 女贞子的研究开发现状与展望[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2987-2990.