

金边瑞香药材中瑞香素的超临界萃取及条件的优化 *

熊学敏¹ 曹珏² 方裕华³ 孙磊¹ 胡顺宇¹ 孙忠文⁴

(1 江西省中医药研究院 南昌 330077; 2 南昌大学 南昌 330029; 3 江西省大余县科技局 大余 334500; 4 江西中医学院 南昌 330006)

摘要:目的:研究超临界 CO₂ 流体萃取法萃取金边瑞香药材中有效成分瑞香素的最佳条件。方法:采用均匀设计方法。以萃取压力、萃取温度、解析压力、解析温度四个因素考察,每个因素 7 个水平进行实验。结果:在 SFE 中最佳萃取条件为:萃取压力 20MPa,萃取温度 39℃,解析压力 8MPa,解析温度 36℃。结论:本法是一种简便、高选择性、高效率萃取金边瑞香有效成分的方法。

关键词:瑞香素;超临界流体提取;金边瑞香

中图分类号:R 284.2

文献标识码:B

文献编号:1671-4040(2007)05-0079-02

超临界流体萃取 (Supercritical Fluid Extraction, SFE) 是一种新型的提取、分离技术,较适合相对分子质量较小的亲脂性物质^[1]。金边瑞香,别名蓬莱花、雪冻花、雪花皮瑞香,为瑞香科瑞香属植物瑞香 *Daphne odora* Thunb, 是我省独特的植物资源,我国名贵花卉之一,金边瑞香具有极高的观赏、药用和商用价值。其花蕾富含白瑞香苷瑞香素 -7- 葡萄糖苷及瑞香素 -8- 葡萄糖苷,并含约 0.024% 的挥发油,其主要有效成分为 β- 水芹烯、白瑞香素甲醚、瑞香醇酮、瑞香素、γ- 乙烯醇、壬醇、顺式及反式环氧芳樟醇、香芳醇、橙花醇和伞型花内酯等。本研究运用均匀设计方法,考察了 SFE 法提取金边瑞香药材有效成分之一瑞香素的最佳条件。现报道如下:

1 实验仪器与试剂

1L 超临界萃取器:南通市华安超临界萃取有限公司;岛津 LD-2010 型高效液相色谱仪。色谱柱:依力特 C₁₈ 柱 (4.6mm× 250mm, 大连);流动相:0.01mol/L 磷酸 - 乙腈 (85:15);SPD-UV 检测器,检测波长:328nm,柱温 35℃,流速 2.5mm/min;塔板数按瑞香计算不低于 1 200。瑞香素对照品:卫生部药品生物制品鉴定所提供 (供含量测定用)。香豆素 (CP):西安化学试剂厂提供。CO₂ 气体:食品级,南通气体厂生产,纯度 99%。金边瑞香药材:江西省大余县金边瑞香药材种植基地提供,低温保存。其它试剂均为分析纯。

2 SFE 条件的摸索

2.1 影响因素 SFE 的最主要影响因素是萃取压力、萃取温度、解析压力和解析温度。本试验选择均匀设计方法对这 4 个因素进行筛选,按实验条件将 4 个因素等分为 7 个水平,即:萃取压力 15~30MPa,萃取温度 34~40℃,解析压力 6~9MPa,解析温度 36~42℃,均匀设计 4 因素 7 水平表。

2.2 工艺流程 将金边瑞香药材洗净、晾干后,按 4 因素 7 水平表所安排的顺序每罐装入 200g 药材进行相应的实验,计算其浸膏提取率,并依法测定^[2]其有效成分含量。用计算机处理实验结果,得出金边瑞香药材的最佳提取条件,具体结果见表 1。实验结果以实验号 3 的提取率为最高。

3 瑞香素含量测定

3.1 溶液的配制 瑞香素标准溶液:称取瑞香素对照品,制成 1mg/mL 的乙醇溶液备用。香豆素内标液:称取香豆素化学对照品,制成 1mg/mL 的乙醇溶液备用。

表 1 金边瑞香药材均匀设计 4 因素 7 水平提取实验表

实验号	萃取压力 /MPa	萃取温度 /℃	解析压力 /MPa	解析温度 /℃	提取率 /%
1	15.0	35	7.0	41	0.203
2	17.5	37	8.5	40	0.216
3	20.0	39	6.5	39	0.235
4	22.5	34	8.0	38	0.165
5	25.0	36	6.0	37	0.193
6	27.5	38	7.5	36	0.225
7	30.0	40	9.0	42	0.173

3.2 分离度测定 分别取瑞香素标准溶液和供试品溶液 5 mL,各加入香豆素内标液 5mL,混匀,两种溶液各进样 5μL,结果分离度良好。

3.3 工作曲线 分别取标准品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL 至 10mL 容量瓶中,加入内标液 2.0mL,再加乙醇至刻度,混匀,进样测定。以浓度为横坐标,以峰面积积分值比为纵坐标绘图,瑞香素进样量在 0.1~0.5μg 范围内线性关系良好,相关系数 0.9990。

3.4 精密度实验 取瑞香素标准品溶液连续测定 5 次,测得 RSD=0.84%。

3.5 样品提取方法考察 (1) 取供试品 2mL,加乙醇至 10mL,进样测定。(2)取供试品 2mL,加 0.01mol·L⁻¹ 磷酸液 8mL,乙醚萃取 3 次(10、10、5mL),分别蒸干乙醚提取液后,各加乙醇溶解定容至 5mL,进样测定。(3)取供试品 2mL,加 1%氢氧化钠使成碱性,加乙醚分离杂质,水层进样测定。结果 (2) 法最好,用乙醚提取 2 次,即可全部提取出,提取率 99.17%。

3.6 加样回收实验 分别精密取供试品一定量,定量加入瑞香素标准品依法测定,测定平均回收率为 99.56%,RSD 为 0.54%。

3.7 瑞香素的含量测定 取供试品 2mL,置分液漏斗,加 0.01mol·L⁻¹ 磷酸 8mL,摇匀,用乙醚萃取 2 次,合并乙醚提取液,蒸干乙醚残渣,少许乙醇溶解,加内标液 2mL,再加乙醇至 10mL,依法测定。

3.8 金边瑞香 SFE 总提取物的含量测定 供试品溶液的制备:取本品约 0.5g,精密称定,置 25mL 量瓶中,用甲醇超声溶解稀释至刻度,摇匀。按照液相色谱法测定,取对照品溶液及供试品溶液 10μL 分别注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算,即得。结果见表 2。

4 讨论

均匀设计是有别于正交设计的实验设计^[3],它的特点是

*2005 年度江西省医药科研计划、2005 年度江西省中医药计划项目 (编号 2005A10)

微波辅助提取水牛角的工艺研究

邓愍民 李进进 武卉

(江西国药有限责任公司药物研究所 南昌 330052)

摘要:目的:优选水牛角的最佳提取工艺。方法:以水牛角中 16 种氨基酸的提取率为考察指标,采用正交试验考察了 4 种因素(溶剂用量、辐射时间、微波功率、浸泡时间)对提取结果的影响。结果:正交试验考察优化的结果为采用去离子水作润湿剂,润湿 8h,水提时水与水牛角比为 20:1,辐射时间 15min,微波功率:560W。结论:与传统方法相比,微波辅助萃取能大大节省提取时间并提高提取率。

关键词:微波技术;水牛角;氨基酸;提取工艺

中图分类号:R 282.740.2

文献标识码:B

文献编号:1671-4040(2007)05-0080-02

水牛角为牛科动物水牛(Bubalus bualis L)的角,其有效成分主要为胆甾醇、丙氨酸、精氨酸、天冬门氨酸、胱氨酸、亮氨酸、脯氨酸、酪氨酸、组氨酸、缬氨酸、丝氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、多肽、胍及蛋白质^{〔1〕}。水牛角具有清热解毒、凉血、定惊之功效,用于治疗温病高热、神昏谵语、发斑发疹、吐血衄血、惊风、癫狂等症^{〔2〕}。因其成分与犀角大同小异,可作为犀角的代用品用于抗内毒素中毒、抗内毒素引起的弥漫性血管内凝血(DIC)等症^{〔3〕}。

微波是一种频率在 300MHz~300GHz 之间的电磁波。物料吸收微波能后通过偶极电子旋转和离子传导两种方式由内向外同时加热,使萃取物质的细胞内部温度迅速上升,导致细胞壁破裂,从而使胞内成分在较低温度下被萃取介质捕获并溶解^{〔4〕}。微波辅助提取技术(microwave-assisted extraction)是微波与传统的溶剂萃取法相结合后形成的一种新的萃取方法。Ganzler^{〔5〕}首先在分析化学制样技术中应用微波萃取方法。微波辅助提取以其快速、高效、安全、节能、环保等特点,在中药行业中日益引起人们的关注^{〔6-9〕}。

1 仪器与试剂

微波萃取试验台(NJC03-1 型,南京杰全微波设备有限公司),具有冷凝回流及鼓泡搅拌装置;高速粉碎机(SF-170-3 型,上海中药机械厂);Agilent1100 型高效液相色谱仪(Agilent 公司);Sartorius(BS224S 型)电子称(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。水为去离子水(江西国药有限责任公司

表 2 金边瑞香提取物中瑞香素的含量测定 %			
实验号	瑞香萃取率	瑞香素含量	瑞香素总萃取量
1	2.03	11.76	1.537
2	2.15	11.24	1.320
3	2.52	11.64	1.591
4	1.85	11.92	1.426
5	1.92	11.35	1.085
6	2.18	11.23	1.079
7	1.35	11.19	1.026

将有关实验的水平数均匀分散在实验范围内,使实验次数与水平数相等,减少了多次实验,且实验结果可用计算机处理,通过回归方程得出最佳实验条件,是一种值得推广的实验设计方法^{〔4〕}。对于本实验,可考虑将 4 个因素的相关实验范围各等分为 7 个水平,做 7 次有关的实验即可筛出最佳条件;而正交设计的特点是考虑将实验因素整齐可比,其实验次数是实验水平的平方,比均匀设计要多^{〔5〕}。

本实验在预实验时将萃取压力提高到 30MPa,结果压力大于 20MPa 以上萃取率降低,本实验表 1 结果也和预实验

制剂车间提供),无水乙醇(AR),邻苯二甲醛(AR),β- 巯基乙醇(AR),甲醇(色谱纯),磷酸氢二钾(AR),磷酸二氢钾(AR),乙酸钠(AR),磷酸(优级纯),四氢呋喃(THF)(AR),氨基酸标准品:苯丙氨酸(Phe)、组氨酸(His)、甘氨酸(Gly)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丝氨酸(Ser)、精氨酸(Arg)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、胱氨酸(Cys)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Try)、丙氨酸(Ala)(均购自江西省食品药品检验所),水牛角(购自江西南华医药公司,经南昌市食品药品检验所鉴定为牛科动物水牛的角)。

2 方法与结果

2.1 提取工艺 将水牛角镑片用粉碎机打碎,过 100 目筛,天平称量每 50g 一组,加入适量去离子水润湿一定时间后,装入三口烧瓶中,加入适量去离子水,放入微波炉中微波辐射一定时间后取出,趁热过滤,滤液蒸馏,至蒸馏液剩余约 40mL,加无水乙醇至 200mL,静置 24h,过滤,定容,取少量用 RP-HPLC 法分析产品中氨基酸含量。剩余溶液减压蒸馏至干,得到含多种氨基酸的浸膏。

2.2 柱前衍生反相高效液相色谱法(RP-HPLC)分析氨基酸

2.2.1 色谱条件 HP Hypersil ODS 柱(125mm× 4.6mm× 5 μm),以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂。流动相 A:8.0mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH7.2),含 φ =0.3%四氢呋喃;流动相 B:8.0mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.2)+ 甲醇 + 乙腈(50+35+15)。线性梯度洗脱,柱温 35℃,流速为 1.0mL/min;的结果一致,这可能和金边瑞香药材中的成分和性质有关。超临界 CO₂ 流体萃取是用无毒、不残留的 CO₂ 代替水或有机溶剂萃取介质并在接近室温的条件下萃取,只要简单地改变温度或压力就可使溶质在 CO₂ 中的溶解度发生很大的改变,在萃取后可对各组分进行分离而获得高质量的提取物,从而为高选择性萃取提供了可能。

参考文献

[1]张忠义,邹恒琴,黄昌全,等.超临界流体提取技术在中药化学成分研究中的应用[J].中成药,1997,19(1):45~47

[2]苏子仁,雷正杰,曾健青,等.超临界 CO₂ 在厚朴提取工艺中的应用[J].中国中药杂志,2001,26(1):31~33

[3]林亚平.中药制剂试验设计中要注意的若干问题[J].中国中药杂志,2001,26(9):579~581

[4]林亚平.中药制剂均匀试验设计微机软件的研制与应用[J].中国中药杂志,1995,20(8):473~475

[5]魏毅,罗杰英.用多指标试验全概率评分法研究茶多酚颗粒制备工艺[J].中国中药杂志,1999,24(5):279~281

(收稿日期:2007-04-24)