

桃仁脂肪酸类成分的提取工艺研究^{*}

梁志彬 尹立敏 颜永刚** 王红艳 邓 肿

(陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 筛选出提取桃仁脂肪酸类化学成分的最佳工艺。方法 以正交试验设计为考察方法,以乙醇浓度,提取时间、提取次数、溶剂倍数为因素,脂肪酸类含量为指标,UV法为含量测定方法,确定最佳提取条件。结果 用乙醇浓度80%;提取次数3次;提取时间2小时;溶剂倍数6倍效果最好。结论 桃仁脂肪酸类提取工艺的优化,为桃仁脂肪酸类进一步研究提供参考。

关键词:桃仁;脂肪酸;正交试验;提取工艺

中图分类号: R 284.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-0571(2015)05-0183-03

DOI: 10.13424/j.cnki.mtcm.2015.05.067

桃仁来源于蔷薇科(Rosaceae)植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch. 或山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子^[1]。性味苦、甘、平,具有活血化瘀、润肠通便的功效。用于经闭,痛经,癥瘕痞块,跌扑损伤,肠燥便秘^[2]。通过对桃仁石油醚部位的GC-MS分析研究^[3-4],使我们基本明确了桃仁中石油醚部位的化学成分,又有桃仁药理实验筛选研究,结合本课题组前期研究结果,桃仁石油醚提取物其脂肪酸的含量最高,其中又以油酸、亚油酸最为突出^[5-6]。因此,以分光光度法对桃仁油中脂肪酸类化学成分提取工艺进行考察,对桃仁的石油醚部位进行进一步分离,来寻找桃仁活血化瘀的物质基础,以便为中药桃仁的新药开发和临床应用提供科学的依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 UV-2500型紫外可见分光光度仪(上海天美科学仪器有限公司),GB204型电子天平(德国赛多利斯公司);ZDHW型调温电热套(河北省中兴仪器有限公司);连续回流提取器(上海洪纪仪器设备有限公司);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);HWS28型电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司)。

1.2 试剂 无水乙醇,95%乙醇,甲醇(纯度 \geq

99.5%,天津市天力化学试剂有限公司)均为分析纯。

1.3 药材 桃仁自采陕西省彬县水口镇寺峪村,经陕西中医学院生药教研室胡本祥教授鉴定为蔷薇科(Rosaceae)植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch. 或山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子。将种子净选,置于40℃(药典要求低温干燥温度)红外恒温干燥箱中烘干12h,粉碎,备用。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取亚油酸对照品50 μ L(58.05mg),置于50mL的容量瓶中,用甲醇溶解,定容至刻度,浓度为1.161mg/mL,即得对照品溶液。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液1,2,3,4,5mL置10mL容量瓶中,用甲醇定容,在269nm处测定吸光度,以吸光度A对浓度C做标准曲线,得回归方程为 $Y = 1.6617X - 0.1237$, $r = 0.9996$ 。

2.1.3 精密度实验 精密吸取亚油酸对照品1.0mL置于10mL的量瓶中,按“2.1.2”项下测定方法,连续5次重复测定。结果表明精密度良好,

* 基金项目:国家自然科学基金(30901970);陕西省教育厅(14JK1204);陕西省中医管理局(ZY05)

** 通讯作者:颜永刚(1978),男,博士,副教授,主要从事中药品种、品种与资源开发研究,以及中药物质基础和质量标准研究工作。E-mail:yunfeng828@163.com.

RSD为1.47%。

2.1.4 稳定性实验 精密吸取亚油酸对照品1.0 mL置于10 mL的量瓶中,按“2.1.2”项下测定方法测定,分别于0,15,30,45,60 min 时间点测定吸光度。计算RSD为2.99%。结果表明亚油酸对照品稳定性较好。

2.1.5 回收率实验 取已知含量的样品6份,精密加入一定量亚油酸对照品溶液,照“2.1.6”项下的方法制备供试品溶液,按“2.1.2”项下测定方法测定平行测定5份样本。回收率试验表明,亚油酸回收率为(99.91±4.39)%之间,RSD为1.46%。

2.1.6 供试品溶液制备 精密称取桃仁药材粉末(过60目筛)2.0 g,按照实验设计的方法进行提取。定容于25 mL量瓶中。取0.5 mL溶液,用于分光光度法测定吸光度。

表1 乙醇提取工艺因素水平表

| 水平 | 因素 | | | |
|----|----------|----------|--------|--------|
| | A 乙醇浓度/% | B 提取时间/h | C 提取次数 | D 溶剂倍数 |
| 1 | 70 | 1 | 1 | 6 |
| 2 | 80 | 2 | 2 | 8 |
| 3 | 90 | 3 | 3 | 10 |

表2 乙醇提取工艺正交实验方案和结果 (n=9)

| 试验号 | A | B | C | D | 脂肪酸百分含量(%) |
|----------------|--------|--------|--------|--------|------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 23.10 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 25.65 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 30.95 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 34.25 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 46.70 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 38.90 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 36.70 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 32.40 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 32.90 |
| K ₁ | 0.7970 | 0.9405 | 0.9440 | 1.0270 | |
| K ₂ | 1.1985 | 1.0475 | 0.9280 | 1.0125 | |
| K ₃ | 1.0200 | 1.0275 | 1.1435 | 0.9760 | |
| R | 0.4015 | 0.0870 | 0.2155 | 0.0365 | |

2.2 脂肪酸类提取工艺考察 通过正交实验考察不同提取条件对脂肪酸类含量的影响,最后确定出脂肪酸类的最佳提取工艺。

2.2.1 正交实验设计 选取提取时间,乙醇浓度,溶媒容量,提取次数4个因素,以脂肪酸类含量

作为评价指标,选用L₉(3⁴)正交表进行实验。水平因素见表1,结果及方差分析见表2、表3。

表3 提取工艺方差分析表

| 方差来源 | 方差平方和 | 自由度 | 均方 | F比 | 显著性 |
|------|----------|-----|----------|----------|-----|
| A | 0.026977 | 2 | 0.013489 | 58.59624 | ** |
| B | 0.002158 | 2 | 0.001079 | 4.68638 | |
| C | 0.009611 | 2 | 0.004805 | 20.87523 | * |
| D | 0.01292 | 2 | 0.006458 | 28.05262 | ** |
| 误差 | 0.000460 | 2 | 0.000230 | | |

F_{0.05}(2,2)=19.0 F_{0.01}(2,2)=99.0

2.2.2 结果分析 由极差分析的结果(见表2,表3)可知,各因素对桃仁脂肪酸类的得率影响主次顺序为A>C>B>D,即为乙醇浓度>提取次数>提取时间>溶剂倍数,乙醇浓度和提取次数是主要影响因素,其他因素次之,故应选A₂B₂C₃D₁为桃仁脂肪酸类提取的最佳方案。表3方差分析说明,提取乙醇浓度对试验影响差异达到显著水平。

2.3 验证试验 根据正交实验结果对A₂B₂C₃D₁工艺条件重复三次实验,以验证该工艺的合理性和稳定性,结果无显著性差异,RSD值为0.66%,测得脂肪酸类的平均含量为47.04%。最后确定最佳提取工艺为乙醇浓度80%;提取次数3次;提取时间2小时;溶剂倍数6倍,即A₂B₂C₃D₁。

3 讨论

在预实验中,本实验对甲醇、水、乙醇不同的提取溶媒进行考察,结果甲醇和乙醇提取率相差不大,考虑安全,经济的因素,本实验选择乙醇为提取溶媒。在对提取方法考察中本实验对回流提取和超声提取进行了考察,结果回流提取方法明显优于超声提取法,本实验最终选择回流提取。

本研究从桃仁中提取得到的粗桃仁油,有助于进一步了解桃仁的脂肪酸类纯化工艺及其药理作用机制。桃仁在提取的过程和提取前药材干燥,设定温度不能过高,要求温度适中,否则将破坏其中的一些化学成分,在用非极性溶剂石油醚萃取的过程中要保证萃取完全,不然会丢失桃仁中的部分脂肪酸,直接造成桃仁脂肪酸的产率降低。亚油酸属脂肪酸类化合物,其化学性质比较活泼,在加热、碱或者酸存在的环境下不稳定^[7-12]。本次实验结果表明乙醇浓度是最主要因素具有显著性差异,试验中A₂B₂C₃D₁为最优水

平。80%乙醇提取时,能避免用水作为溶剂时提取杂质多,过滤操作困难等不利因素,也能提取出较多的组份,保证药效物质的充分溶出,是一种比较适合大量提取的方法。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)(2010年版)[M]. 北京:化学工业出版社,2010:260.
- [2] 张廷模. 中药学[M]. 北京:高等教育出版社,2002:265.
- [3] 颜永刚,邓翀,刘静,等. 桃仁与山桃仁石油醚部位气相色谱-质谱联用分析比较[J]. 时珍国医国药,2011,22(8):1812-1814.
- [4] 裴瑾,颜永刚,万德光,等. 桃仁脂肪酸 GC-MS 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(18):2360-2362.
- [5] 裴瑾,颜永刚,万德光. 桃仁油对动物血液流变学及微循环的影响[J]. 中成药,2011,33(4):587-589.

(上接第154页)显的抗菌、抗炎、调节免疫等作用^[1-4],所以提出肺癆康具有回复 katG 基因突变的假说,然而目前初步的实验结果显示,肺癆康在治疗耐异烟肼结核小鼠方面依然具有重要作用,它不仅能改善模型小鼠的生存状况,还能控制肺脏炎症反应的发生(表1),研究发现实验提供的结核杆菌 katG 基因突变类型为错义突变,手工筛选对比数据库发现,模型组第315、463密码子发生改变,核苷酸序列分别由 AGC、CGG 突变为 ACC、CTG,对应的氨基酸改变分别 Ser→Thr 和 Arg→Leu,而异烟肼组、肺癆康组以及联合组 katG 基因突变位点与模型组一致(见表2),可见肺癆康对耐异烟肼结核杆菌的分子机制与 katG 基因回复突变关系不大,对于肺癆康对耐药肺结核的分子机制的还需从其他层次探讨。另外,在 bam 导出的数据库中我们还发现了大量的核苷酸多态性(SNP)位点,需要进一步结合国内外最新研究成果加以对比、筛选研究。

参考文献

- [1] 叶品良,卢润生,黄秀深,等. 肺癆康治疗肺结核69例[J]. 江西中医药,2009,40(2):33.
- [2] 王帅,叶品良,申金贵,等. 肺癆康对结核杆菌体内抑菌实验研究[J]. 浙江中医药大学学报,2010,34(1):37-38.
- [3] 刘婷婷,叶品良,王帅,等. “肺癆康”对耐多药结核分枝杆菌抑菌效力的体外研究[J]. 光明中医,2008,19

- [6] 裴瑾,颜永刚,万德光. 桃仁中脂肪酸的含量分析研究[J]. 中药材,2009,32(6):908-910.
- [7] 颜永刚. 桃仁质量研究[D]. 成都中医药大学,2009.
- [8] 颜永刚,裴瑾,万德光. 桃仁和山桃仁中的氨基酸分析[J]. 云南中医中药杂志,2010,31(6):63-64.
- [9] 颜永刚,裴瑾,邓翀. 桃仁的酸败度及其限制的分析[J]. 河南中医,2010,30(5):510-512.
- [10] 颜永刚,裴瑾,万德光. HPLC 法测定不同产地和品种桃仁中苦杏仁苷[J]. 中草药,2008,39(9):1415-1416.
- [11] 颜永刚,裴瑾,杨新杰,等. 中药桃仁的品种、品质与药效相关性分析研究[J]. 成都医学院学报,2011,6(4):296-298.
- [12] 颜永刚,雷国莲,刘静,等. 中药桃仁的研究概况[J]. 时珍国医国药,2011,22(9):2262-2264.

(收稿日期:2015-04-02 编辑:文颖娟)

(10):1453-1454.

- [4] 申金贵,叶品良,王帅,等. 肺癆康对小鼠结核病模型的免疫指标观察[J]. 浙江中医药大学学报,2010,34(1):48-49.
- [5] HerreraL, ValverdeA, SaizP, et al. Molecular characterization of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical strains isolated in the Philippines[J]. Int J Antimicrob Agents,2004,23(6):572.
- [6] 漆浩珊,卢润生,杨奇,等. 不同毒力菌株与感染途径在树造结核动物模型中的作用[J]. 四川医学,1997,18(3):150-152.
- [7] 肖和平. 耐药结核病化学治疗指南[J]. 中国防痨杂志,2010,27(4):181-198.
- [8] 王旭,王洁,董福生,等. 野生型 p53 对涎腺多形性腺瘤细胞突变基因的修复[J]. 中华口腔医学杂志,2007,42(3):144-147.
- [9] 张俊仙,吴雪琼,刑婉丽,等. 应用基因芯片技术检测耐利福平结核分枝杆菌基因型[J]. 中国现代医学杂志,2007,17(13):1572-1577.
- [10] 吴雪琼. 耐药性结核分枝杆菌的分子生物学研究现状[J]. 中华结核和呼吸杂志,2006,29(12):837-840.
- [11] Wang Y, Zhang WH, Zhao JR, et al. Detection of katG 315 gene mutation associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis by template-directed dyeterminator incorporation with fluorescence polarization detection technology[J]. Zhonghua Jie He Hu xi Za Zhi, 2004,27(3):179-182.

(收稿日期:2015-07-15 编辑:文颖娟)