

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 翀

(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. mtem. 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≥

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 12 h,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 μL(58.05 mg),置于 50 mL 的容量瓶中,用甲醇溶解,定容至刻度,浓度为 1.161 mg/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 1,2,3,4,5 mL 置 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,在 269 nm 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 1.0 mL 置于 10 mL 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,中金贵,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] 中金贵,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 dye terminator 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)