

- [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.
- [10] Wang G Y, Lin S Y, Ye C Y, et al. The effect and safety of polysaccharide-iron complex on hemodialysis patients for chronic renal failure with erythropoietin therapy [J]. *Chin J Intern Med* (中华内科杂志), 2000, 39 (6): 380-383.
- [11] Chu Y L, Zheng Y Z, Xu Z M, et al. Comparison of the effects of three type oral iron preparations with oral ferrous sulphate for treatment of iron-deficiency anemia [J]. *J Clin Hematol* (临床血液杂志), 1997, 10 (1): 6-9.
- [12] Oates P S, Morgan E H. Defective iron uptake by duodenum of Belgrade rats fed diets of different iron contents [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270: G826-G832.
- [13] Floyd R A, Lewis C A. Hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide by ferrous iron-nucleotide complexes [J]. *Biochemistry*, 1983, 22: 3645-3649.
- [14] Dutra-de-oliveira J E, Marina L S, Jacob F. Iron from complex salts and its bioavailability to rats [J]. *Int J Vit Nutr Res*, 1995, 65: 272-276.

超临界 CO₂ 提取蜂胶中总黄酮的工艺研究

谷玉洪¹, 罗 濛², 徐 飞³, 赵余庆^{4*}

(1. 沈阳东宇药物技术研究院, 辽宁 沈阳 110015; 2. 沈阳市药学会, 辽宁 沈阳 110013; 3. 吉林省药品检验所, 吉林 长春 1300624; 4. 辽宁省中药现代化工程技术中心, 辽宁 沈阳 110032)

蜂胶是蜜蜂采集不同植物树脂、花粉等部位, 混合其上颚分泌物及蜂蜡加工而成的胶状物。目前已从蜂胶中分离鉴定的成分有黄酮类、萜烯类、醌类、有机酸、氨基酸、酶类、维生素及大量的微量元素等, 具有生理学和药理学活性的成分达 300 多种^[1]。其中黄酮类化合物具有较强的抗氧化、清除自由基作用, 能够软化血管、减少血栓形成及改善人体的微循环。被誉为珍贵的天然“血管清道夫”。对于蜂胶中黄酮类成分的提取工艺研究报道较多, 乙醇冷浸提取法较简单, 并且温度不高, 某些易挥发和失活的有效黄酮类不易失去, 但是提取率受时间限制, 一般在两周内随时间的延长而升高, 而且乙醇体积分数以 70% 为最好^[2]。回流浸提法所需时间较短, 且提取率随温度的升高而升高, 但温度升高时很容易使某些黄酮类失去活性^[3]。70% 丙酮提取总黄酮, 效果很好, 但由于价格较贵, 且会造成溶剂残留, 所以不适合于生产上应用^[4]。超临界萃取法作为“绿色”提取技术, 可以克服上述不足。本实验采用超临界 CO₂ 萃取技术研究了蜂胶中黄酮类成分的提取工艺。

1 仪器与材料

DY168—50—05 超临界萃取装置(沈阳东宇药物技术研究院超临界设备制造分公司)、7230G 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司制造)、二氧化碳(食用, 液态纯度为 99%, 钢瓶装)、芦丁对照品购于中国药品生物制品检定所, 批号: 00809705, 蜂胶由吉林省药品检验所鉴定和提供, 所用溶剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 蜂胶中总黄酮的超临界萃取^[5,6]: 蜂胶样品低温粉碎, 称取 100 g 投入萃取釜中, 经热交换器分别加热萃取釜、解析釜 I、II, 使达到设定温度。通过制冷设备冷却贮罐, 开启 CO₂ 钢瓶, 打开加压泵升高萃取釜、解析釜 I 和 II 的压力, 使分别达到设定压力时, 关闭 CO₂ 钢瓶阀门。打开循环, 加入一定量的夹带剂(95%乙醇)至夹带剂储罐中, 打开夹带剂高压泵阀门, 按试验设定条件使夹带剂泵入萃取釜。并控制压力, 调节 CO₂ 流量, 保持恒压、恒温, 萃取 3 h。收集从解析釜 I、II 出口放出的萃取物, 合并, 回收乙醇及水分, 称定提取物, 计算萃取率(萃取率 = 提取物质量/样品质量 × 100%)。

2.2 总黄酮的测定^[7]

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取 120 °C 减压干燥至恒重的芦丁对照品 200 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇 70 mL, 置水浴上微热使溶解, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀。精密吸取 10 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 即得(含芦丁 0.2 mg/mL)。

2.2.2 标准曲线的制备: 精密量取对照品溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 各加水至 6 mL, 加 5% 亚硝酸钠 1.0 mL, 使混匀, 静置 6 min, 再加入 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL, 摇匀, 静置 6 min, 再加入氢氧化钠试液 10 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 照分光光度法在 500 nm 波长处测定吸光度。以吸光度值为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $A = 12.42 C -$

0.008 7, $r=0.999 8$, 线性范围: $0\sim 0.048 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2.3 测定法: 取上述提取物约 1 g, 于 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 6 h, 精密称定, 置索氏提取器中, 加石油醚 120 mL, 加热回流至提取液无色, 放冷, 弃去石油醚液。再加甲醇 90 mL, 加热回流至提取液无色, 移至 100 mL 量瓶中, 用甲醇少量洗涤容器, 洗液并入量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。精密量取 10 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀。精密量取 3 mL, 置 25 mL 量瓶中, 照标准曲线制备项下的方法, 自“加水至 6 mL”起依法测定吸光度, 计算总黄酮。

2.3 不同因素对蜂胶中总黄酮萃取率的影响

2.3.1 粉碎粒度的影响: 分别取蜂胶低温粉碎至 10 目、20 目、30 目样品, 超临界 CO_2 萃取(萃取压力 35 MPa、萃取温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、夹带剂用量 500 mL), 结果见图 1。通过对不同粉碎粒度蜂胶的提取, 粉碎粒度对提取率和总黄酮影响不大。由于蜂胶中含有大量树脂、蜂蜡, 不易粉碎, 过细易粘筛网, 粒度过大, 分散不好。因此, 选取蜂胶粉碎后过 20 目筛作为试验材料。

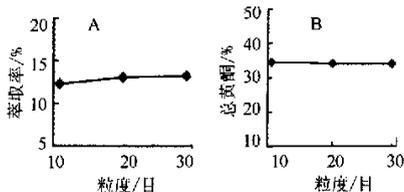


图 1 粉碎度与萃取率(A)、黄酮(B)的关系

Fig. 1 Relationship between mashing granularity and extracting rate (A) and flavone (B)

2.3.2 萃取压力的影响: 分别取蜂胶低温粉碎至 20 目样品 7 份, 超临界萃取, 萃取压力分别设定为 20、25、30、35、40、45、50 MPa, 每次萃取温度为均 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、夹带剂用量均为 500 mL, 结果见图 2。萃取压力的设定与萃取率密切相关, 确定最佳萃取压力, 对设备的正常运行及提高提取效率具有重要意义。从图的数据中可以看出, 压力升高对浸膏萃取率影响不大, 而对总黄酮的影响较大, 随着压力升高总黄酮逐渐增高, 但增加幅度逐渐降低。压力增加能源消耗加大, 设备耗损大。综合各方面因素考虑, 最佳萃取压力选择在 35 MPa 较为适宜。

2.3.3 萃取温度的影响: 分别取蜂胶低温粉碎至 20 目样品 5 份, 超临界萃取, 萃取温度分别设定为 30、35、40、45、 $50\text{ }^\circ\text{C}$, 每次萃取压力均为 35 MPa, 夹带剂用量均为 500 mL, 结果见图 3。可见, 温度升高有利于总黄酮的萃取, 但因温度升高蜂胶样品在萃取罐中易黏结成坨而不利于提取, 因此温度不能选

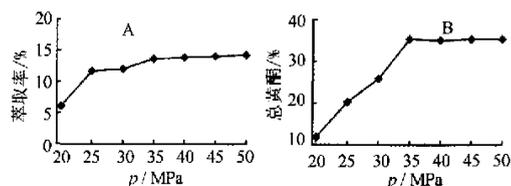


图 2 萃取压力与萃取率(A)、黄酮(B)的关系

Fig. 2 Relationship between extracting pressure and extracting rate (A) and flavone (B)

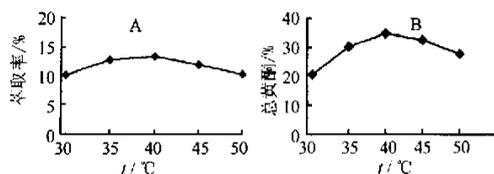


图 3 萃取温度与萃取率(A)、黄酮(B)的关系

Fig. 3 Relationship between extracting temperature and extracting rate (A) and flavone (B)

择太高, 最佳温度选择 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 较为适宜。

2.3.4 蜂胶与夹带剂用量比例的影响: 分别取蜂胶低温粉碎至 20 目样品 4 份, 超临界萃取, 夹带剂用量分别设定 0、500、1 000、1 500 mL, 每次萃取温度均为 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、萃取压力均为 35 MPa, 结果见图 4。可见, 萃取蜂胶中黄酮类成分, 若不加入夹带剂, 提取物收率较低, 加入夹带剂后, 提取物中总黄酮明显增加, 收率也明显升高。但随着夹带剂用量继续增加, 提取物的收率有所提高, 但总黄酮却有所降低。

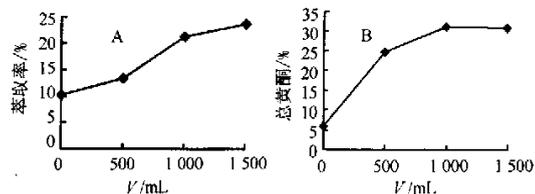


图 4 夹带剂与萃取率(A)、黄酮(B)的关系

Fig. 4 Relationship between modifier and extracting rate (A) and flavone (B)

2.4 验证试验: 取蜂胶样品低温粉碎至 20 目, 萃取温度为 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、萃取压力为 35 MPa, 蜂胶与夹带剂用量比例为 1:2 的条件下, 超临界萃取, 得到了蜂胶总黄酮收率为 34.9%。

3 讨论

采用 SFE-CO_2 并用乙醇作夹带剂萃取蜂胶中的黄酮类有效成分, 萃取物中仅含有少量树脂、蜂蜡等亲脂性成分。萃取物处理方法简单方便, 萃取物中黄酮类成分的量高。SFE- CO_2 萃取的最佳条件为: 粉碎粒度为 20 目, 萃取压力 35 MPa, 萃取温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$, 蜂胶与夹带剂用量比例为 1:2, 方法可行, 适合

工业化生产。

References:

- [1] Guo J, Zhou L D. Research and development of chemical constituents of Propolis [J]. *Alpiculture China* (中国养蜂), 2000, 51 (3): 21-22.
- [2] Hu F L. Propolis's extracting method [J]. *Technol Alpical* (养蜂科技), 2000, (5): 28-29.
- [3] Hu S H, Shuai Q, Shao X P, et al. The study of extraction and analysis for activity content of in bee chrysalis which is the extraction and determination for flavones [J]. *Alpiculture China* (中国养蜂), 2000, 51 (6): 7-9.

- [4] Hu M, Gan L, Jiang F T, et al. The study on the optimum extracting process of flavonoids in *Ginkgo biloba* L. (1) [J]. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 1997, (5): 49-51.
- [5] Liu Y. The volatile constituents of Propolis is analyzed by GC-MS and exacted by SFE [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 23 (9): 547-549.
- [6] Gao Y Y, You H, Chen C, et al. The study on the supercritical fluid extraction technology of Propolis flavonoids [J]. *Food Sci* (食品科学), 2002, 23 (8): 154-157.
- [7] Wei L X. *Analysis of Chinese Medicine Preparation* (中药制剂分析) [J]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishing, 2000.

HPLC 法测定射干利咽口服液中次野鸢尾黄素

刘德茂, 林 艳, 李振学

(大连公安医院, 辽宁 大连 11000)

射干利咽口服液由射干、升麻、桔梗、芒硝、川木通、百合、百草(灸)等药组成, 具有降火解毒、利咽止痛的功效, 用于小儿急性喉痹(急性咽炎)肺胃热盛证。原标准[WS₃-372(Z-057)-2002(Z)]采用薄层扫描法测定君药射干的成分次野鸢尾黄素, 方法的专属性不强, 受干扰的因素较多, 对质量的控制产生了一定的困难。本实验采用高效液相色谱法测定次野鸢尾黄素, 提高了方法的专属性, 操作简单迅速, 精密度高, 重现性好, 能更好的控制射干利咽口服液的质量, 保证了临床应用的有效性及其稳定性。

1 材料与仪器

射干利咽口服液(吉林通化东宝永健制药有限公司, 10 mL/支)次野鸢尾黄素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 111557-200101); 所用试剂均为分析纯。高效液相色谱仪为岛津 LC-10A, Anastar 色谱工作站。

2 方法与结果

2.1 色谱分析条件: 色谱柱: Irregular C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 10 μm), 流动相: 甲醇-水(70:30), 体积流量: 0.5 mL/min, 检测波长: 270 nm, 柱温: 35 °C, 进样量: 20 μL。

2.2 标准曲线的制备: 精密称取次野鸢尾黄素对照品 10.56 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 并稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置 100 mL 量瓶中, 加 1 mL 25% HCl, 再加甲醇至刻度, 摇匀。按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积积分为纵坐标, 次野鸢尾黄素质量浓度为

横坐标绘制标准曲线, 其回归方程为 $A=97\ 452.6C+15\ 369.7$, $r=0.999\ 8$, 即质量浓度在 0.528~5.28 μg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.3 溶液的制备

2.3.1 供试品溶液的制备: 精密量取射干利咽口服液 10 mL, 加 10 mL 水稀释, 用稀盐酸调 pH 3~4, 将酸化液置分液漏斗中, 用醋酸乙酯萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并醋酸乙酯液, 置分液漏斗中, 用 0.1% NaOH 液萃取 3 次, 每次 20 mL, 弃去 NaOH 液, 醋酸乙酯层用蒸馏水萃取 3 次, 每次 20 mL, 充去水层, 回收醋酸乙酯至干, 残渣加甲醇溶解, 转至 25 mL 量瓶中, 加 2.5 mL 25% HCl, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 续滤液备用。

2.3.2 对照品溶液的制备: 精密量取 0.105 6 mg/mL 次野鸢尾黄素对照品溶液 3.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 1 mL 25% HCl, 再加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 阴性干扰试验: 按制备工艺方法制备缺射干的阴性样品, 按供试品溶液方法处理, 测定, 结果在次野鸢尾黄素保留时间处无峰出现, 表明阴性样品无干扰(图 1)。

2.5 精密度试验: 取对照品溶液, 依法进样 6 次, 计算得次野鸢尾黄素面积积分值 RSD 为 0.43%。

2.6 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 于 0、2、4、6、8 h 测定, 计算得次野鸢尾黄素峰面积积分值 RSD 为 0.52%, 表明供试品溶液在 8 h 内测定是稳定的。

2.7 重现性试验: 精密称取同一批样品 6 份, 制备供