

图3 HPD400树脂的动态解吸曲线

Fig 3 Dynamic desorption curve of HPD400 resin

回收率为88.4%,质量分数为31.4%,故确定洗脱剂用量为6倍树脂柱体积。

2.4.5 树脂使用次数的考察:按照优选出来的最佳工艺,准确称取相当于50g干树脂的已处理HPD400树脂,湿法装柱,上样量为饱和点的80%,质量浓度为0.2g生药材/mL,待吸附完全,依次用水,30%乙醇水溶液4倍柱体积洗脱后,换用6倍柱体积70%乙醇溶液以0.2 mL/min的流速洗脱,收集洗脱液,为1个周期,重复试验。将各次收集的洗脱液按2.2.2项操作测定总黄酮质量浓度后减压浓缩,干燥得固体样品,称定质量,计算每个周期总黄酮回收率。结果重复使用至第5周期时,由于山蜡梅提取物中含有大量叶绿素,树脂颜色变绿,残留在树脂上的杂质较多,使吸附能力减弱,总黄酮收率降到了39.8%,已不符合产品要求,需要进行再生处理。

2.4.6 再生试验研究:树脂柱先用95%乙醇洗脱至无色后,再用1%的氢氧化钠水溶液4倍柱体积洗脱,控制流速1 mL/min,最后用大量蒸馏水洗至pH值为中性,换用1%盐酸水溶液4倍柱体积洗脱,最后用大量蒸馏水洗至pH值为中性即可。再生后,该树脂总黄酮收率仍可达到73%以上。经过2次再生后,树脂不可再用。

3 讨论

不同类型的树脂对山蜡梅总黄酮的吸附性能均为(NKA-9) > 中等极性树脂(HPD-400) > 弱极性树脂(HPD-450、AB-8) > 非极性树脂(HPD-100、HPD-700、HP-20、D101),显示极性树脂和中等极性树脂对山蜡梅总黄酮具有较好的吸附解吸性能;但解吸率和总黄酮质量分数却显示为弱极性树脂中等极性树脂(HPD-400) > 弱极性树脂(HPD-450、AB-8) > 非极性树脂(HPD-100、HPD-700、HP-20、D101) > 极性树脂(NKA-9)。

HPD400型大孔吸附树脂对山蜡梅总黄酮具有良好的吸附性能,其工艺条件为上样液质量浓度为0.2g生药材/mL,上样生药量与干树脂的质量比小于1.68:1;吸附6h后基本饱和,依次用水、30%乙醇溶液4BV洗脱后,换用6BV70%乙醇溶液洗脱,洗脱速率为2 mL/min,总黄酮收率为88.4%,质量分数为31.4%;树脂经2次再生后可连续使用10个周期。

研究结果表明HPD400树脂具有较大的吸附量,易吸附、易解吸,其重复使用次数等性能与其他树脂相比也具有明显优势,实验中确定的总黄酮纯化工艺可为进一步纯化总黄酮(使质量分数达到50%以上)提供借鉴,从而为进一步开发有效部位新药提供参考。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] 刘耀明,冯淑香,肖柄坤. 山蜡梅颗粒的质量标准研究[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(3): 185-188.
- [3] 李少华,胡满根,江 玢,等. VIS法测定山蜡梅冲剂中的总黄酮含量[J]. 江西医学院学报, 1999, 34(4): 87-88.
- [4] 盛 萍,帕丽达·阿不力孜,刘 波,等. 大孔树脂吸附法富集野菊花总黄酮的工艺研究[J]. 中草药, 2006, 37(8): 1170-1173.

罐组逆流提取荷叶生物碱的研究

黄 鑫,周永传*,陈德煦

(华东理工大学中药现代化工程中心,上海 200237)

摘 要:目的 采用罐组逆流提取技术提取荷叶中的荷叶生物碱并优化其工艺条件。方法 采用分光光度法测定荷叶生物碱。按 $L_{16}(4^4)$ 正交设计表设计试验,分别考察提取时间、提取温度、固液比和乙醇体积分数4个因素的影响。结果 通过极差分析得出罐组逆流提取荷叶生物碱的最佳工艺条件为:提取时间25 min,提取温度80℃,固液比1:10,乙醇体积分数70%。

* 收稿日期:2008-10-14

作者简介:黄 鑫(1984—),男,江苏镇江人,华东理工大学药学院硕士研究生,研究方向为中草药有效成分的提取与纯化。

Tel: 015921545525 E-mail: ashura-00@hotmail.com

*通讯作者 周永传 Tel: (021) 64253329 E-mail: xdeng@ecust.edu.cn

固液比 1:50,乙醇体积分数为 70%。结论 可以将罐组逆流提取技术应用于荷叶提取工程。

关键词:荷叶;生物碱;罐组逆流提取;正交试验

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)08-1229-04

Extracting of alkaloids from *Nelumbo nucifera* leaves by multi-stage countercurrent extraction

HUANG Xin, ZHOU Yong-chuan, CHEN De-xu

(Modern Engineering Center for Traditional Chinese Medicine, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract : Objective To optimize the extracting process of alkaloid from *Nelumbo nucifera* leaves by multi-stage countercurrent extraction. **Methods** The spectrophotometry was used to determine the alkaloids. The extracting process of alkaloid was optimized by $L_{16}(4^4)$ to observe the effect of extraction time, extraction temperature, solid to liquid ratio, and ethanol concentration, respectively. **Results** The optimum extraction parameters were extraction time 25 min, extraction temperature 90℃, solid to liquid ratio 1:50, and ethanol concentration 70%. **Conclusion** The multi-stage countercurrent extraction is used to the extracting process of alkaloid from *N. nucifera* leaves.

Key words : the leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn.; alkaloids; multi-stage countercurrent extraction; orthogonal test

荷叶是睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的叶片,除含有普通植物中所共有的碳水化合物、脂质、蛋白质、鞣质等化学成分外,还含有荷叶碱、亚美罂粟碱、N-去甲基荷叶碱等多种生物碱类活性物质。荷叶不仅具有活血化瘀、降脂减肥、降血压和防止动脉粥样硬化等功效,而且还具有抗有丝分裂的作用,有较强的抑菌效果^[1,2]。目前对荷叶生物碱的提取多采取单级提取法,即物料与溶剂的一次平衡的间歇提取,由于到提取后期体系中传质推动力不断降低直至液固两相平衡,因此单级提取法的提取率较低、溶剂量大、提取时间长,同时极大地增加了后续工序的处理量。罐组逆流提取(multi-stage countercurrent extraction)是一种增大传质推动力、提高提取效率的提取技术^[3]。它将多个提取单元科学组合,使单位时间内固液两相保持较高的浓度差,从而提高提取效率。本研究采用自制罐组逆流提取装置,利用其一次可以进行多罐提取的特点提取荷叶中的荷叶生物碱,并通过正交试验设计对其工艺条件进行优化。本研究建立荷叶中生物碱的提取优化工艺,可为荷叶生物碱结构和生理功能因子的研究以及荷叶保健食品、天然防腐剂的开发提供很好的参考。

1 仪器与材料

UV1900PC 型紫外可见分光光度计(亚研电子有限公司),RE-52c 型旋转蒸发器(上海予华仪器有限公司)。自制罐组逆流提取装置,其装置图见图 1。

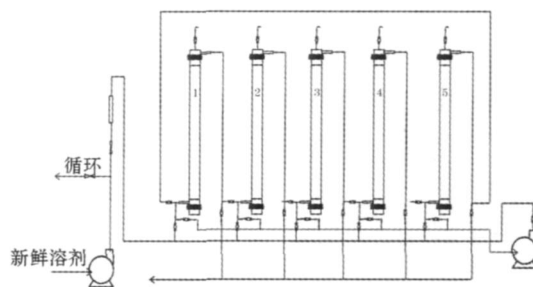


图 1 罐组逆流提取装置示意图

Fig 1 Device sketch of multi-stage countercurrent extraction

荷叶购于雷允上中药店,经本校中药中心鉴定为睡莲科植物莲 *N. nucifera* Gaertn. 的干燥叶片;荷叶碱对照品购于中国药品生物制品检定所;乙醇等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 罐组逆流提取工艺流程:见图 2。当某一阶段提取过程结束时,(1)有效成分被提净的单元:进行排渣和加料作业。(2)其他未提净的单元:被提净单元的上一单元的饱和溶剂通过泵二排至后道浓缩工序,不饱和溶剂按有效成分的量递减的反方向进行单元组数减 1 次的迁移;新鲜溶剂通过泵一加入到物料浓度最低的单元,各罐不饱和溶剂按有效成分的量递增方向进行单元组数减 1 次的迁移。上述各项步骤完成后各单元重复下一个过程。

2.2 荷叶生物碱的分光光度法测定

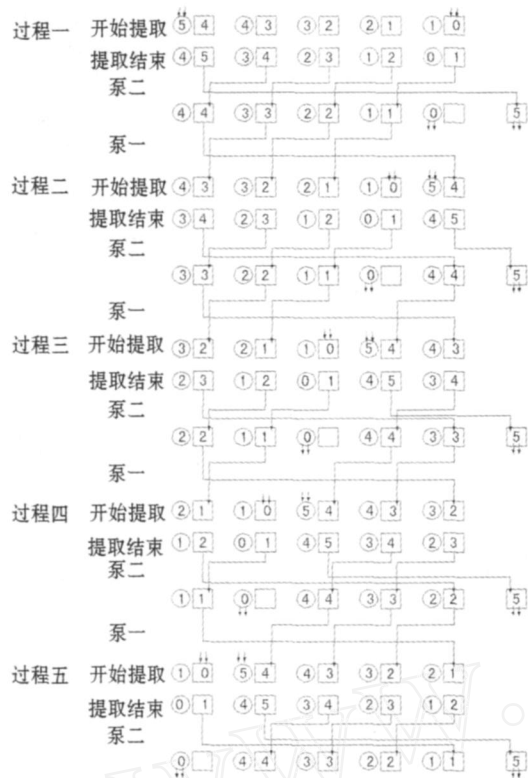


图 2 罐组逆流提取工艺流程图

Fig 2 Flow chart of multi-stage countercurrent extraction

2.2.1 对照品溶液的制备:精密称取荷叶碱 4 mg,置于 10 mL 量瓶中,加三氯甲烷至刻度,摇匀。精密吸取 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加三氯甲烷至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液的配制:取罐组逆流提取液,旋蒸去乙醇,将浓缩液用 0.5% HCl 调节 pH 2~3,用滤纸滤过,用 30 mL 氯仿分 2 次萃取酸水液,弃去氯仿层,酸水中加入 0.5% NaOH 调节 pH 7 左右,静置,用滤纸滤过,除去鞣质。再加 0.5% NaOH 调节 pH 9~11,再用 90 mL 氯仿分 3 次萃取至水中无生物碱为止,合并氯仿液,备用。

2.2.3 溴甲酚绿缓冲液的制备:精密称取溴甲酚绿 125 mg,用 0.2 mol/L NaOH 12.5 mL 溶解,加入邻苯二甲酸氢钾 2.50 g,加少量水溶解,转移至 250 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀。

2.2.4 标准曲线的绘制^[4]:分别用移液管精密吸取 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 荷叶碱对照品溶液于 10 mL 量瓶中,加三氯甲烷至刻度,振摇,移至分液漏斗中。精密加入溴甲酚绿缓冲液 6 mL,摇匀,静置。取澄清的三氯甲烷液在 413.5 nm 处测定吸光度(A)值。以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,通过最小二乘法进行线性回归,得回归方程

$Y = 0.088 X - 0.036 (r = 0.9994)$,线性范围为 4~12 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.5 样品测定:精密称量供试品溶液 2 mL,用氯仿配成一定浓度的溶液。按标准曲线的绘制项下的方法测定样品中的 A 值,计算荷叶生物碱的得率[得率 = 荷叶生物碱的质量/药材质量 $\times 100\%$]。

2.3 罐组逆流提取工艺优化

2.3.1 因素水平的确定:选取提取时间(A)、乙醇体积分数(B)、固液比(C)和提取温度(D)作为考察因素,每因素设计 4 个水平,见表 1。

2.3.2 正交试验结果与分析:按照 $L_{16}(4^4)$ 正交试验安排试验,测定提取液中荷叶生物碱的质量浓度,结果见表 2。

表 1 因素及水平

Table 1 Factors and levels

水平	因 素			
	A/ min	B/ %	C	D/
1	10	60	1 15	50
2	15	70	1 20	60
3	20	80	1 30	70
4	25	90	1 50	80

表 2 $L_{16}(4^4)$ 正交设计结果

Table 2 Results of $L_{16}(4^4)$ orthogonal test

序号	A	B	C	D	得率/ %
1	25	60	1 50	50	1.229
2	25	70	1 30	60	1.068
3	25	80	1 20	70	0.918
4	25	90	1 15	80	1.167
5	20	60	1 30	70	0.918
6	20	70	1 50	80	1.335
7	20	80	1 15	50	0.713
8	20	90	1 20	60	0.674
9	15	60	1 20	80	0.988
10	15	70	1 15	70	0.675
11	15	80	1 50	60	0.821
12	15	90	1 30	50	0.542
13	10	60	1 15	60	0.404
14	10	70	1 20	50	0.444
15	10	80	1 30	80	0.932
16	10	90	1 50	70	0.889
K_1	1.096	0.862	1.069	0.732	
K_2	0.910	0.881	0.865	0.742	
K_3	0.734	0.864	0.733	0.850	
K_4	0.667	0.819	0.740	1.083	
R	0.429	0.062	0.336	0.351	

极差分析结果可以看出,影响荷叶生物碱提取效果各因素的主次顺序分别为:提取时间、提取温度、固液比、乙醇体积分数。同时得出较优化试验组合为 $A_1D_4C_1B_2$,即提取时间 25 min,提取温度 80,固液比 1 50,乙醇体积分数 70%。

2.4 验证试验:应用优化得到的工艺条件提取,并

重复试验3次,得率为1.4358%,试验结果见表3。

表3 验证试验结果

Table 3 Results of verification

序号	得率/ %	序号	得率/ %
1	1.423	3	1.501
2	1.384	均值	1.436

3 讨论

将罐组逆流提取技术应用于荷叶提取工程,可以克服提取时原料与溶剂中有效成分在接近平衡时浓度差小的不足,有效提高提取效率。

通过正交试验结果得出本装置的最佳工艺条件:提取时间25 min,提取温度80℃,固液比1:50,乙醇体积分数为70%。

参考文献:

- [1] 陶波,陈慕英. 荷叶药用研究概况[J]. 中医药信息, 2001, 18(2): 4.
- [2] 纪丽莲. 荷叶中抑菌成分的提取及其抑菌活性的研究[J]. 食品科学, 1998(8): 64-66.
- [3] 谢秀琼. 现代中药制剂新技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [4] 王伟,谭晓梅. 荷叶总生物碱含量测定方法的研究[J]. 中药材, 2004, 27(1): 50-51.

毛细管气相色谱法测定辛夷挥发油软胶囊中的 α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯和1,8-桉叶素

曾蔚欣^{1,2}, 王弘¹, 孙路路², 赵冠勋¹, 陈世忠^{1*}

(1. 北京大学医学部药学院, 北京 100191; 2. 北京世纪坛医院 药剂科, 北京 100038)

摘要:目的 建立测定辛夷挥发油软胶囊中 α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯和1,8-桉叶素的测定方法。方法 采用毛细管气相色谱法测定。BP-5毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.22 μ m); 进样器温度180℃; FID检测器温度200℃; 柱温采用程序升温; 分流比1:30; 苯乙酮为内标。结果 α -蒎烯在0.054~2.505 μ g线性关系良好, 平均加样回收率为98.6%, RSD为0.72% ($n=9$); β -蒎烯在0.070~3.204 μ g线性关系良好, 平均加样回收率为99.0%, RSD为0.65% ($n=9$); 柠檬烯在0.068~3.190 μ g线性关系良好, 平均加样回收率为101.1%, RSD为0.56% ($n=9$); 1,8-桉叶素在0.301~10.205 μ g线性关系良好, 平均加样回收率为99.6%, RSD为1.24% ($n=9$)。结论 该方法简便、准确、重现性好, 可作为辛夷挥发油软胶囊的质量控制方法。

关键词: 辛夷挥发油软胶囊; α -蒎烯; β -蒎烯; 柠檬烯; 1,8-桉叶素; 毛细管气相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)08-1232-04

Determination of α -pinene, β -pinene, limonene, and 1, 8-cineole in Flos Magnoliae volatile oil soft capsula by capillary gas chromatography

ZENG Wei-xin^{1,2}, WANG Hong¹, SUN Lu-lu², ZHAO Guan-xun¹, CHEN Shi-zhong¹

(1. School of Pharmaceutical Science, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China;

2. Department of Pharmacy, Peking Millennium Monument Hospital, Beijing 100038, China)

Abstract: **Objective** To develop a method for determination of α -pinene, β -pinene, limonene, and 1, 8-cineole in Flos Magnoliae volatile oil soft capsula. **Methods** The contents of α -pinene, β -pinene, limonene, and 1, 8-cineole were determined at the same time by capillary gas chromatography with sequential increase of temperature programming. Capillary column BP-5 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.22 μ m) was used, injector temperature 180℃, flame ionization detector (FID) temperature 200℃, split ratio 1:30, acetophenone as internal standard. **Results** A good linear relationship of α -pinene was at a range of 0.054—2.505 μ g, the average recovery was 98.6%, and RSD was 0.72% ($n=9$); A good linear relationship of β -pinene was at a range of 0.070—3.204 μ g, the average recovery was 99.0%, and RSD was 0.65% ($n=9$); A

* 收稿日期: 2008-11-04

基金项目: 国家“973”项目(2006CB504707)

作者简介: 曾蔚欣(1972—), 女, 湖南省益阳市人, 主管药师, 硕士, 北京世纪坛医院药剂科工作, 主要从事药品检验及中药与天然药物研发工作。Tel: (010) 63926353 E-mail: cindy_zwx@sina.com

*通讯作者 陈世忠 Tel: (010) 82802723 E-mail: chenshizhong66@163.com