

超声波辅助提取甘草角鲨烯及粗脂肪成分分析

高贵桃¹, 杨敏丽^{1*}, 梁新华²

(1. 宁夏大学能源化工重点实验室, 银川 750021; 2. 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021)

[摘要] 目的: 确定甘草中角鲨烯的超声波辅助最佳提取条件, 并分析甘草粗脂肪的组成。方法: 分别研究了料液比、浸泡时间、超声温度、超声时间对角鲨烯得率的影响, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 对提取工艺进行优选; 并采用气相色谱-质谱法 (GC-MS) 分析了甘草粗脂肪的组成。结果: 甘草角鲨烯的最佳提取工艺为料液比 1:15, 浸泡时间 10 h, 超声时间 50 min, 超声温度 50 °C; 甘草粗脂肪中共分离鉴定出 26 种成分, 角鲨烯含量 0.8%。结论: 超声法操作简便, 开发和利用甘草粗脂肪中的角鲨烯具有较好的社会效益和经济效益。

[关键词] 甘草; 角鲨烯; 提取; 正交试验; 化学成分

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0005-05

Ultrasonic-assisted Extraction of Squalene from Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma and Analysis of Crude Fat Components

GAO Gui-tao¹, YANG Min-li^{1*}, LIANG Xin-hua²

(1. Key Laboratory of Energy Resources & Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

[Abstract] **Objective:** To determine optimum extraction process of squalene from Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma, and analysis of crude fat components. **Method:** The extraction process was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal

[收稿日期] 20110102(003)

[基金项目] 宁夏回族自治区科技攻关计划项目 (KGX-07-09-06); 宁夏自然科学基金项目 (NZ1013)

[第一作者] 高贵桃, 硕士, 从事天然药物化学研究, Tel: 0951-2062861, E-mail: shengxiaotaotao@163.com

[通讯作者] * 杨敏丽, 教授, 从事分析化学研究, Tel: 0951-2062861, E-mail: yml@nxu.edu.cn

艺具有更强的推广应用价值^[6]。

由于同一化合物在不同类型大孔树脂的吸附动力学特性具有显著差异, 基于动态平衡的中药复方多组分共存时的吸附规律是十分复杂的^[7]。在中医整体观指导下, 探索现代分离技术对中药复杂体系的适宜性, 实现中药复方的等效分离, 对于中药复方的新剂型开发具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 吴彦, 孙建宁, 于绍坤. 黄连解毒汤有效部位对培养大鼠皮层神经元缺糖缺氧损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(8): 936.
- [2] 李华安. 黄连解毒汤的研究及应用[J]. 山东中医学院学报, 1995, 19(5): 312.

- [3] 陈光亮, 张秀荣, 王钦茂. 黄连解毒汤的化学及药理学研究进展[J]. 中草药, 2008, 39(6): 935.
- [4] 朱华旭, 潘林梅, 李欢, 等. 黄连解毒汤全方与“组合-配伍”提取的比较研究[J]. 中成药, 2010, 32(10): 1815.
- [5] 李欢, 朱华旭, 潘林梅, 等. 黄连解毒汤全方和不同极性部位的活性筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 124.
- [6] 屠鹏飞, 贾存勤, 张洪全. 大孔吸附树脂在中药新药研究和生产中的应用[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2004, 6(3): 22.
- [7] J. D. Seader. 分离过程原理[M]. 朱开宏, 吴俊生, 译. 上海: 华东理工大学出版社, 2007: 556, 837.

[责任编辑 全燕]

design with extraction rate of squalene as index. Four factors were chosen, including ratio of material to solvent, soaking time, ultrasonic temperature and ultrasonic time; And the constituents of crude fat from *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma* were analyzed by GC-MS. **Result:** The optimum extraction process was as follows: ratio of material to solvent was 1:15, soaking time was 10 h, ultrasonic time was 50 min, extraction temperature was at 50 °C; The GC-MS results showed that 26 kinds of compounds were identified, the content of squalene was 0.8%. **Conclusion:** The ultrasonic method is simple for extracting squalene, and the development and utilization of squalene from licorice crude fat had a better social and economic benefits.

[**Key words**] *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; squalene; extraction; orthogonal design; chemical constituents

甘草是卫生部公布的药食两用植物,可以作为食品或保健食品开发的重要原料。角鲨烯(squalene, C₃₀H₅₀, 2, 6, 10, 15, 19, 23-六甲基-2, 6, 10, 14, 18, 22-二十四碳六烯)是一种高度不饱和的直链三萜类非极性化合物,是胆固醇生物合成途径的一种中间体,其生理功能显著,有强抗氧化作用,具有增强体质和抗疲劳的功效,可用于肝病治疗并具有一定的抗癌、防癌及保湿养颜作用,在医疗保健品和化妆品等领域已有广泛应用^[1]。

鲨鱼肝油中角鲨烯的相对含量达到 80% 以上,目前约 99% 的角鲨烯是由鲨鱼肝油的不皂化物中提取出来的,资源稀缺。为了保护深海鲨鱼,维护海洋生态平衡,迫切需要开发角鲨烯的植物资源。有研究报道苋属植物种子油中角鲨烯含量可达 2.4% ~ 8.0%, 橄榄油中为 0.2% ~ 0.7%^[2-4]。甘草主要药效成分甘草酸属五环三萜类物质,其生物合成的中间代谢物为角鲨烯,本实验以宁夏道地中药材甘草为材料,首先用石油醚提取,得到甘草粗脂肪部分,从中分离附加值高的角鲨烯。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),QP2010 型气相色谱质谱联用仪(日本岛津公司),AL204 型电子分析天平(梅特勒-托利多公司),KQ250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

甘草采自宁夏盐池,经宁夏大学生命科学学院梁新体副教授鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 干燥根,角鲨烯对照品(Sigma 公司,纯度 ≥ 98%),石油醚、乙酸乙酯、正己烷、甲醇、丙酮、三氯甲烷等均为分析纯(天津市科密欧化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 甘草中粗脂肪测定及成分分析

2.1.1 甘草粗脂肪的测定 甘草经脂溶性溶剂石油醚提取所得脂质中,包括中性脂肪(油和脂肪)、类脂(磷脂、固醇和蜡)以及它们的水解产物(脂肪酸、高级脂肪醇),还含色素及挥发油、蜡、树脂等物,故称粗脂肪。本试验根据中华人民共和国国标 GB/T5009·6-2003,采用索氏提取法测定甘草中粗脂肪质量分数为 1.20%。

2.1.2 甘草粗脂肪成分的 GC-MS 分析 GC 条件: DB-5MS 毛细管柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm),进样量 0.3 μL,分流比 20:1,进口温度 290 °C,载气为高纯度 He 气,平均线速 37.2 cm · s⁻¹,流量 1 mL · min⁻¹,升温程序为初始温度 100 °C,保持 1min,以 10 °C · min⁻¹的速度升温至 290 °C,保持 9 min。

MS 条件:电离能量 70 eV,离子源温度 235 °C,接口温度 290 °C,溶剂延迟 1.5 min。

通过 GC-MS 联用首次分析了甘草粗脂肪的化学成分,共分离出 26 个峰,用面积归一化法测定了各组分的质量分数,确定了甘草粗脂肪的全部化学成分,其中角鲨烯质量分数为 0.8%,见表 1。

2.2 甘草中角鲨烯含量的测定 **2.1.1** 项下所得粗脂肪用三氯甲烷溶解定容,采用 HPLC 测定角鲨烯含量^[5-6],测定条件为 C₁₈ 柱,流动相乙腈-甲醇(40:60),检测波长 210 nm,流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 25 °C。在此条件下,角鲨烯标品的保留时间为 17.6 min。甘草中角鲨烯质量分数为 31 μg · g⁻¹。

2.3 甘草角鲨烯的超声波辅助有机溶剂提取

2.3.1 单因素试验 以石油醚为提取溶剂,采用超声波辅助提取法进行甘草中角鲨烯的提取,高效液相色谱法测定角鲨烯含量,研究了料液比、浸泡时间、超声时间和超声温度对角鲨烯得率的影响。由于石油醚易挥发,实验过程所用三角烧瓶的容量在溶剂用量的 2 倍以上以防爆,并用下口密封的小漏

表1 甘草粗脂肪的化学成分

No.	化合物	分子式	相对分子质量	质量分数/%
1	4-羟基-4-甲基-2-戊酮	C ₆ H ₁₂ O ₂	116	1.52
2	乙苯	C ₈ H ₁₀	106	0.77
3	邻二甲苯	C ₈ H ₁₀	106	3.02
4	邻二甲苯	C ₈ H ₁₀	106	1.49
5	2-甲基萘	C ₁₁ H ₁₀	142	0.29
6	邻苯二甲酸二乙酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222	0.41
7	Z-2-十八碳烯-1-醇	C ₁₈ H ₃₆ O	268	1.92
8	八氢-1,1,8-三甲基-2,6-萘	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	208	0.43
9	邻苯二甲酸二正丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278	1.52
10	正十九烷	C ₁₉ H ₄₀	268	0.40
11	(9β, 13α, 14β, 17α)-羊毛甾-7-酸-3-酮	C ₃₀ H ₅₀ O	426	5.00
12	二十二烷酸	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340	5.07
13	豆甾醇-3,5-二烯-7-酮	C ₂₉ H ₄₆ O	410	34.01
14	2-9,12-十八碳二烯氨基-乙醇	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310	2.32
15	1-二十三碳烯	C ₂₃ H ₄₆	322	5.23
16	1,2-苯二甲酸庚辛酯	C ₂₃ H ₃₆ O ₄	376	1.12
17	孕甾-17,21-二醇-9,11-环氧-3,20-二酮-醋酸	C ₂₃ H ₃₂ O ₆	404	12.35
18	三十四烷	C ₃₄ H ₇₀	478	0.55
19	1-[(2,2-二甲基-1,3-碳酰乙烷酯-4-基)甲氧基]-2-六癸酮	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	370	0.54
20	2,6,10,14,18-五甲基-2,6,10,14,18-二十碳五烯	C ₂₅ H ₄₂	342	1.32
21	角鲨烯	C ₃₀ H ₅₀	410	0.80
22	正二十五烷	C ₂₅ H ₅₂	352	3.10
23	β-谷甾醇	C ₂₉ H ₅₀ O	414	1.38
24	(3α,5β,6γ)-3,6-二氢-[5,6]环丙并胆甾-3-醇	C ₂₈ H ₄₈ O	400	1.47
25	豆甾醇	C ₂₉ H ₄₈ O	412	2.65
26	γ-谷甾醇	C ₂₉ H ₅₀ O	414	15.17

斗置于三角烧瓶口,兼起回流和减少溶剂挥发的作用。

2.3.1.1 料液比 溶剂用量直接关系到浸提时的平衡浓度,从而影响提取的速度和效率。称取 20.0 g 甘草根粉,分别按料液比 1:5,1:10,1:15,1:20,1:25 加入石油醚,浸泡 12 h,控制水温 30 ℃,超声 30 min,超声功率 150 W。提取物测定角鲨烯得率。

结果表明角鲨烯得率在初始时随着料液比的增加而逐渐增大,1:15 时达到最大,继续增大溶剂用量对角鲨烯得率无太大影响,故考虑提取效果、成

本及后续浓缩操作等,确定最佳料液比为 1:15。

2.3.1.2 浸泡时间 称取 20.0 g 甘草根粉 5 份,加入石油醚 300 mL,分别浸泡 0,4,8,12,16 h,在 30 ℃ 下超声 30 min。结果显示角鲨烯得率随浸泡时间的延长而逐渐增大,8 h 达到最大值,再延长浸泡时间反而使角鲨烯的相对含量有所下降。这可能是因为甘草中其他脂溶性或某些非脂溶性成分的含量也进入溶剂。因此,确定最佳浸泡时间为 8 h。

2.3.1.3 超声时间 称取 20.0 g 甘草根粉 4 份,加入石油醚 300 mL 浸泡 8 h,30 ℃ 下分别超声 15,30,45,60 min。试验结果表明随着超声时间的延长角鲨烯得率逐渐提高。显然超声波处理时间越长,空化现象越剧烈,原料颗粒被破碎的机会越多,对角鲨烯的溶出越有利,但在超声波作用一定时间后,继续增加作用时间对提取影响不大。综合考虑确定超声时间为 45 min。

2.3.1.4 提取温度 称取 20.0 g 甘草根粉 5 份,加入石油醚 300 mL 浸泡 8 h,分别在 30,40,50,60,70 ℃ 下超声 45 min。由于超声会发热,试验过程中通过添自来水控制超声仪中的水温误差在 0~2 ℃。

由结果可知,在 50 ℃ 以内角鲨烯得率随温度的升高而增大,之后温度继续升高角鲨烯得率反而下降。这可能是因为当接近石油醚沸点时,溶剂挥发加快,且高温下角鲨烯更易分解或被氧化。因此,确定最佳提取温度为 50 ℃。

表2 超声波辅助提取甘草角鲨烯工艺因素水平

水平	A 料液比	B 浸泡时间	C 超声时间	D 提取温度
		/h	/min	/℃
1	1:12	5	30	40
2	1:15	10	40	50
3	1:18	15	50	60

2.3.2 正交试验 根据单因素试验结果,采用 L₉(3⁴) 正交设计进行超声提取,以角鲨烯得率为考察指标,因素水平见表 1,正交试验结果见表 2。

由正交试验结果及方差分析可知,在所选因素水平范围内,影响甘草角鲨烯得率的因素大小顺序为 C>D>B>A,超声时间和超声温度影响较大,是影响试验结果的主要因素,料液比和浸泡时间的影响相当且都较小。结合 K 值综合考虑确定最佳提取工艺为 A₂B₂C₃D₂,浸泡时间的影响不显著,考虑生产成本及节能降耗,确定最佳工艺为料液比 1:15,浸泡时间 10 h,超声温度 50 ℃,超声时间 50 min。按此最佳工艺提取,角鲨烯得率为 0.002 7%。

表 3 超声波辅助提取甘草角鲨烯工艺正交试验

No.	A	B	C	D	角鲨烯得率 /%
1	1	1	1	1	0.001 78
2	1	2	2	2	0.002 80
3	1	3	3	3	0.002 59
4	2	1	2	3	0.002 29
5	2	2	3	1	0.002 63
6	2	3	1	2	0.002 54
7	3	1	3	2	0.002 72
8	3	2	1	3	0.002 03
9	3	3	2	1	0.002 07
K_1	0.007 17	0.006 79	0.006 35	0.006 48	
K_2	0.007 46	0.007 46	0.007 16	0.008 06	
K_3	0.006 82	0.007 20	0.007 94	0.006 91	
R	0.000 64	0.000 67	0.001 59	0.001 58	

表 4 方差分析

方差变异来源	SS	MS	F	P
B	7.61×10^{-8}	3.80×10^{-8}	1.11	>0.05
C	4.21×10^{-7}	2.11×10^{-7}	6.15	>0.05
D	4.45×10^{-7}	2.22×10^{-7}	6.50	>0.05
A(误差)	6.85×10^{-8}	3.42×10^{-8}		

注: $f=2, F_{0.1}(2,2)=9.00, F_{0.05}(2,2)=19.00$ 。

3 讨论

本研究经单因素和正交试验得到了超声波辅助提取甘草角鲨烯的最优工艺,超声法提取效率高,操

作简便,所得甘草粗脂肪中含大量营养价值高生理活性强的类固醇,其中角鲨烯含量达 0.8%,既开发了角鲨烯的资源,也为石油醚提后的残渣继续提取甘草的主要药效成分甘草酸、甘草多糖等除去了脂质杂质,利于其精制纯化。这增加了甘草附加值,是对甘草的综合利用,具有一定的经济效益和开发价值。对于甘草中角鲨烯、甘草酸、甘草黄酮及甘草多糖等的联合提取在进一步研究中。

[参考文献]

- [1] HUANG Zhi-rou, LIN Yin-ku, FANG Jia-you. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds; potential uses in cosmetic dermatology [J]. J Molecules, 2009, 14: 540.
- [2] Becker R. Amaranth oil: composition, processing, and nutritional qualities // Paredes-Lopez O Ed; Amaranth Biology, Chemistry, and Technology; CRC Press: Boca Raton FL, 1994: 133.
- [3] De Leonardis A, Macciola V, De Felice M. Rapid determination of squalene in virgin olive oils using gas-liquid chromatography [J]. Ital J Food Sci, 1998, 10: 75.
- [4] 赵振东, 孙震. 生物活性物质角鲨烯的资源及其应用研究进展 [J]. 林产化学与工业, 2004 (3): 107.
- [5] 梁新华, 郑彩霞, 张风侠, 等. 甘草角鲨烯的提取及高效液相色谱分析 [J]. 北京林业大学学报, 2010, 32 (2): 123.
- [6] 戴宇航. 橄榄油中角鲨烯的分离纯化工艺研究 [D]. 天津: 天津大学, 2009.

[责任编辑 全燕]

弱酸性离子交换树脂纯化黄连总生物碱

陈奇, 邓雁如*, 于静, 夏娜
(天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的: 探寻大孔树脂纯化黄连总生物碱的工艺条件, 为规模化生产提供可行性方案。方法: 以盐酸小檗碱含量为指标对 D101, AB-8, D151 等大孔树脂纯化总黄连生物碱的效果进行考察。结果: D151 型弱酸性离子交换树脂对总生物碱的吸附能力明显强于其他树脂, 适宜的工艺条件为生药质量浓度 $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上样, 上样量 9 BV, 水洗体积 2 BV, 酸洗浓度为 $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液, 用量 5 BV。此条件下, 所得浸膏量减少 60% 以上, 总生物碱质量分数达 80% 以上, 样品回收率在 70% 以上。结论: D151 型弱酸性离子交换树脂对黄连总生物碱的纯化效果较好, 其载药量较大, 适合规模化生产。

[关键词] 总生物碱; 盐酸小檗碱; 纯化; 大孔树脂; D151

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)18-0009-04

Purification of Total Alkaloid from Rhizoma Coptidis by Weakly Acidic Ion Exchange Resin

CHEN Qi, DENG Yan-ru*, YU Jing, XIA Na
(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the purification technology of total alkaloids from Rhizoma Coptidis by macroporous resin, and to provide feasible program for large-scale manufacture. **Method:** Evaluated the effect of purification of total alkaloids from Rhizoma Coptidis by D101, AB-8 and D151 resins respectively with the indicator of the content of berberine. **Result:** It has been found that D151 resin's adsorption capacity of total alkaloids was the best in those three resins. The optimum process was as follows: the concentration of the sample solution was $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ with 9 times the amount of resin volume, washed 2 times the amount of resin volume by distilled water and 5 times the amount of resin volume by $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of HCl solution. Under those conditions, more than 60% extract was reduced with the proportion of total alkaloid in excess of 80%, and 70% of sample recover. **Conclusion:** D151 resin is suitable for industrial production for excellent drug loading and purification.

[Key words] total alkaloid; berberine; purification; macroporous resin; D151

黄连为毛茛科植物黄连、三角叶黄连或云连的干燥根茎, 为清热类药物, 味苦、性寒, 具有清热燥湿、泻火解毒等功效。黄连是治疗糖尿病的中药复方中常用的一味药, 经药效学研究证明, 其总生物碱

为有效部位, 所含的多种生物碱中主要成分是小檗碱、黄连碱、甲基黄连碱、巴马汀、药根碱、表小檗碱和木兰花碱等^[1], 其中最主要的是小檗碱。市售黄连类药品中主要生物碱成分多以盐酸盐形式存在, 为强酸弱碱盐。本研究利用生物碱的弱碱性及产品的盐酸盐形式的特点, 运用弱酸性阳离子交换树脂中含有的酸性反应基团, 如羧基, 能在水中离解出 H^+ 而呈酸性, 树脂离解后的带负电基团, 如 $\text{R}-\text{COO}^-$, 能与溶液中的其他阳离子(如季铵型氮离子)吸附结合, 从而产生阳离子交换作用的原理, 选择弱酸性阳离子交换树脂作为载体纯化生物碱类成

[收稿日期] 20110105(014)

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(2009CB523003); 国家自然科学基金项目(81073033)

[第一作者] 陈奇, 硕士, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 13821280193, E-mail: chenqi-qq@163.com

[通讯作者] * 邓雁如, 教授, 博士, 从事中药学研究, E-mail: dyanru@sina.com