

# 降糖片中荔枝核提取工艺优选和定量测定

郭宇洁, 孟 硕, 徐 辉, 刘建勋\*

(中国中医科学院西苑医院实验中心, 北京 100091)

**[摘要]** 目的: 研究荔枝核的提取工艺, 建立 HPLC 法测定荔枝核中原儿茶酸含量。方法:  $L_9(3^4)$  正交设计, 探讨加水倍数、煎煮时间和煎煮次数对荔枝核提取的影响; 采用色谱柱 Symmetry  $C_{18}$ ; 流动相为甲醇-水-冰乙酸(10: 118: 1); 检测波长为 260 nm。结果: 荔枝核提取时以 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 0.5 h; 醇沉纯化浓度为 60%; 原儿茶酸在  $5.04 \sim 50.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  呈良好线性关系( $r = 0.9997$ ), 平均加样回收率为 97.70%,  $\text{RSD} = 1.69\%$ 。结论: 加水倍数和煎煮次数对荔枝核中原儿茶酸的提取有显著性影响, HPLC 测定方法简单快速, 适用性好。

**[关键词]** 荔枝核; 原儿茶酸; 工艺优选; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)08-0050-03

荔枝核为无患子科植物荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. 的干燥成熟种子, 具有行气散结、祛寒止痛的功能。荔枝核含有水溶性成分原儿茶酸(protocatechuic acid), 2005 年药典中没有收载荔枝核含量测定, 本研究探索以原儿茶酸为指标成分<sup>[1~2]</sup>, 采用正交设计法对荔枝核提取工艺进行研究, 并进一步建立 HPLC 法测定原儿茶酸的含量。

## 1 仪器、试剂及原料

Waters 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Waters515 泵及 996 二极管阵列检测器, Waters717 自动进样器, Millennium<sup>32</sup> Login 工作站; BRANSON 超声清洗器(上海必能信超声有限公司); METTLER AE240 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

原儿茶酸对照品(中国药品生物制品检定所, 标号: 809-9201); 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

荔枝核药材购于安国市神农中药饮片有限公司。降糖片(中国中医科学院西苑医院提供, 批号: 080321)

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定方法

**2.1.1 色谱条件与系统适应性** 色谱柱: Symmetry  $C_{18}$ (5  $\mu\text{m}$ , 3.9 mm  $\times$  150 mm); 流动相: 甲醇-水-冰乙

酸(10: 118: 1); 检测波长: 260 nm; 流速  $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温: 室温。在此条件下原儿茶酸与其他成分达到基线分离。

**2.1.2 对照品溶液制备** 精密称取原儿茶酸适量, 加无水乙醇制成每 1 mL 含 0.03 mg 的溶液, 即得。见图 1。

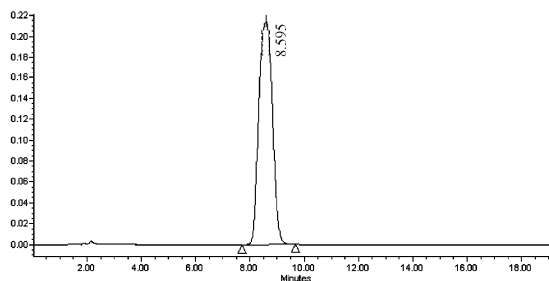


图 1 原儿茶酸 HPLC 色谱图

**2.1.3 标准曲线绘制** 精密称取原儿茶酸 10.08 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加无水乙醇定容至刻度。精密吸取此溶液 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。以标准品浓度对峰面积作图。结果表明原儿茶酸在  $5.04 \sim 50.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  呈良好的线性关系。回归方程为:  $Y = 5172.993X + 134.8062$ ,  $r = 0.9997$ 。

**2.1.4 精密度试验** 取上述对照品溶液在同 1 d 内重复进样 5 次,  $\text{RSD} = 0.86$ , 说明本方法用于测定原儿茶酸较稳定。

**2.1.5 稳定性试验** 称取样品一份, 按样品测定项下方法制成供试品溶液, 分别于配制后 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 依法测定, 结果表明, 原儿茶酸对照品在 24 h 内基本稳定。

[收稿日期] 2008-12-01

[通讯作者] \* 刘建勋, Tel: (010) 62835601; E-mail: liujx0324@sina.com

**2.1.6 加样回收率试验** 精密称取已知含量的降糖片粉末共 6 份(每份 0.3 g),加入一定量的原儿茶酸对照品溶液,制备成不同浓度的 6 份样品,按样品测定项下进行操作,进样测定。测得原儿茶酸平均加样回收率为 97.7%, RSD= 1.69% (n= 6)。结果见表 1。

表 1 原儿茶酸加样回收率试验

序号	样品称样量(mg)	样品中量(mg)	加入量(mg)	测得总量(mg)	检出量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD%
1	0.298 4	0.361	0.110 4	0.469 6	0.108 6	98.37	97.70	1.69
2	0.301 5	0.364 7	0.110 4	0.475 3	0.110 6	100.2		
3	0.297 3	0.359 6	0.110 4	0.466 0	0.106 4	96.38		
4	0.300 2	0.363 1	0.276 0	0.632 1	0.269 0	97.46		
5	0.293 3	0.354 8	0.276 0	0.618 3	0.263 5	95.47		
6	0.290 4	0.351 3	0.276 0	0.622 1	0.270 8	98.12		

**2.1.7 样品测定** 称取降糖片粉末 0.3 g,精密称定,研细,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇:1% 盐酸(9: 1) 20 mL,称定重量,超声处理 20 min,取出,放冷,再称定重量,用溶剂补足减失的重量,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,续滤液作为供试品溶液。见图 2。

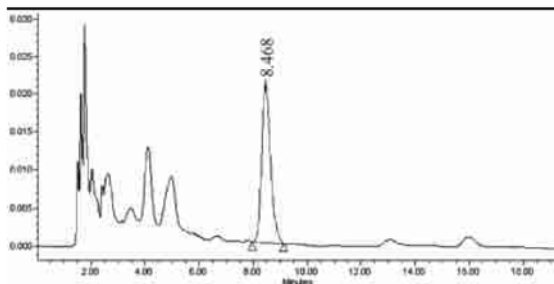


图 2 降糖片中原儿茶酸 HPLC 色谱图

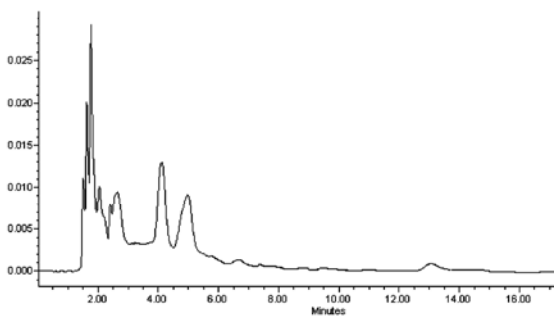


图 3 降糖片中原儿茶酸阴性样品色谱图

**2.2 荔枝核提取工艺筛选**

**2.2.1 因素水平的确定** 荔枝核的主要活性成分为原儿茶酸,有抗菌作用。原儿茶酸在热水中有较好的溶解度,选择水提。选择加水倍数、煎煮时间和煎煮次数 3 因素,每因素各取 3 个水平,因素水平见表 2。

表 2 因素水平表

水平	A(加水倍数)	B(煎煮时间)	C(煎煮次数)
1	6	0.5 h	1
2	8	1.0 h	2
3	10	1.5 h	3

**2.2.2 试验方法** 根据以上因素水平,选择  $L_9(3^4)$  正交表,称取粉碎后的荔枝核 9 份,每份 24 g,以荔枝核中原儿茶酸的含量作为考察指标,进行试验,结果见表 3。

表 3 正交试验设计及结果

序号	A	B	C	D	正交样品中原儿茶酸含量(mg)
1	1	1	1	1	1.303 0
2	1	2	2	2	3.989 8
3	1	3	3	3	4.792 7
4	2	1	2	3	6.091 1
5	2	2	3	1	5.239 7
6	2	3	1	2	1.968 8
7	3	1	3	2	7.224 9
8	3	2	1	3	2.839 4
9	3	3	2	1	5.928 1
K1	10.085 5	14.619 0	6.111 2	12.470 8	$\Sigma = 39.377 5$
K2	13.299 6	12.068 9	16.009	13.183 5	
K3	15.992 4	12.689 6	17.257 3	13.723 2	CT= 172.287 500 7
S	5.830 342 1	1.178 984 8	24.862 249 2	0.263 080 3	

**2.2.3 试验结果** 以荔枝核中原儿茶酸的含量作为考察指标,对试验结果进行方差分析,结果见表 4。

表 4 原儿茶酸方差分析表

来源	平方和	自由度	均方和	F 比	显著性
A	5.830 342 1	2	2.915 171 05	22.161 834 16	* $P < 0.05$
B	1.178 984 8	2	0.589 492 4	4.481 463 644	
C	24.862 249 2	2	12.431 124 6	94.504 412 53	* $P < 0.05$
误差= D	0.263 080 30	2	0.131 540 15		

$F_{1-0.05(2,2)} = 19; F_{1-0.01(2,2)} = 99$

**2.2.4 结果分析** 由上述方差分析可知,对荔枝核提取效果的影响顺序为 C> A> B, A 因素和 C 因素有显著性差异, B 因素无显著性差异,最佳工艺为  $A_3B_1C_3$ ,即取粉碎后的荔枝核,以 10 倍量水提取 3 次,每次 0.5 h。

**2.3 荔枝核纯化工艺优选**

**2.3.1 醇沉浓度的选择** 称取荔枝核 66 g, 以 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 0.5 h, 合并水煎液, 平均分成 3 份, 分别浓缩至浓缩液与药材量比值为 1: 2 时, 放凉, 加入乙醇使醇沉浓度为 50%, 60% 和 70%, 冷藏过夜, 滤过, 回收乙醇, 真空干燥。残渣以甲醇: 1% 盐酸(9: 1) 溶解, 定容至 25 mL 量瓶中, 称定重量, 超声处理 20 min, 放冷, 再称定重量, 用溶剂补足减失的重量, 摇匀, 微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ ) 滤过, 即得, 结果见表 5。

表 5 醇沉浓度选择

醇沉浓度	原儿茶酸含量( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	干膏量(g)
50%	0.276	3.79
60%	0.308 2	3.56
70%	0.278 9	3.38

由表 5 可知, 醇沉浓度对样品中原儿茶酸含量有一定的影响, 醇沉浓度为 60% 时, 原儿茶酸的含量较高, 故选择醇沉浓度为 60%。

**2.3.2 浓缩液体积选择** 称取荔枝核 66 g, 以 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 0.5 h, 合并水煎液, 平均分成 3 份, 分别浓缩至浓缩液与药材量比值为 1: 1, 1: 2 和 1: 3 时, 放凉, 加入乙醇使醇沉浓度为 60%, 冷藏过夜, 滤过, 回收乙醇, 真空干燥。残渣以甲醇: 1% 盐酸(9: 1) 溶解, 定容至 25 mL 量瓶中, 称定重量, 超声处理 20 min, 放冷, 再称定重量, 用溶剂补足减失的重量, 摇匀, 微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ ) 滤过, 即得, 结果见表 6。

表 6 浓缩液体积选择

浓缩液与药材量比值	原儿茶酸含量( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	干膏量(g)
1/1	0.276 4	3.80
1/2	0.301 3	3.54
1/3	0.276 8	3.25

由表 6 可知, 浓缩液: 药材量的比值对样品中原儿茶酸含量也有一定的影响, 浓缩液与药材量比值为 1: 2 时, 原儿茶酸的含量较高, 故选择浓缩液: 药材量为 1: 2。

综上所述, 荔枝核的最佳提取和纯化条件为: 取粉碎后的荔枝核, 以 10 倍量水提取 3 次, 每次 0.5 h。合并水煎液, 浓缩, 浓缩液与药材量比值为 1: 2 时, 放凉, 加入乙醇使醇沉浓度为 60%, 冷藏过夜, 回收乙醇, 真空干燥, 即得。

### 3 讨论

在确定 HPLC 测定原儿茶酸含量时, 采用了乙腈-水(70: 30)、乙腈-水(15: 85)、乙腈-水(5: 95)、甲醇-水-冰乙酸(22: 106: 1)、甲醇-水-冰乙酸(18: 110: 1) 和甲醇-水-冰乙酸(10: 118: 1) 等不同的流动相, 发现乙腈-水系列对原儿茶酸的分离效果不好, 而甲醇-水-冰乙酸系列对原儿茶酸的分离较好, 且具有合适的保留时间(10 分钟左右), 故流动相选择甲醇-水-冰乙酸(10: 118: 1), 得到的原儿茶酸色谱峰与其他干扰组分色谱峰能较好分离, 峰形好, 测定更方便准确。

样品中加入适量盐酸酸化, 有利于原儿茶酸的提取, 样品经过超声, 既可提取完全, 又节省测定时间。

### [参考文献]

- [1] 林春华, 朱品业, 胡家焱, 等. 高效液相色谱法测定壮腰健肾丸原儿茶酸含量[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(5): 288-289.
- [2] 谢培德, 桑彤, 龚秀珍. 反相高效液相色谱法测定滇桂艾纳香中原儿茶酸的含量[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(4): 227-229.