

五味子挥发油与其他功能成分结合提取新方法

崔景宜, 赵树欣, 宋金隆, 郭淑文

(教育部工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 建立了五味子挥发油与其他功能成分相结合的提取方法。五味子先经水蒸气蒸馏法提取挥发油, 收集挥发油, 将水提液与提油后的原料进行分离。对提油后的原料进行其它功能成分的再次提取: 采用超声波醇提法, 95%乙醇为溶剂, 每次 30 min, 共 2 次, 抽滤, 合并醇提液。将水提液与醇提液分别浓缩, 用高效液相色谱法测定。建立了同时测定五味子中五味子醇甲、五味子甲素的反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 方法。色谱条件: 色谱柱为 Agilent TC-C18 柱 (5 μ m, 250mm $\times$ 4.6mm), 流动相为甲醇-水 (75:25, v/v), 紫外检测波长 226nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 0.7mL/min。检测结果表明与未提油, 直接醇提功能成分的五味子浓缩液比较, 提取挥发油后五味子醇甲、甲素等功能成分的含量均未有损失。本法提高了原料的利用率, 具有环保、节约资源等优点。

关键词: 水蒸气蒸馏法; 超声波提取法挥发油; 反相高效液相色谱法; 五味子醇甲; 五味子甲素

中图分类号: TQ91 文献标识码: A 文章编号: 1006-2513(2010)04-0105-05

New method for extracting schisandra essential oil combined with other functional components

CUI Jing-yi ZHAO Shu-xin, SONG Jin-long GUO Shu-wen

(The key Laboratory of Industrial Microbiology of Ministry of Education,
Tianjin University of Science and Technology, College of Bioengineering Tianjin 300457)

Abstract A method for extracting Schisandra essential oil combined with other functional components was established. First, the fruit of Schisandra chinensis was extracted for the essential oil by steam distillation. Second, the water extract was separated from the raw materials. Second time extraction was performed to obtain other functional components by ultrasonic method. 95% ethanol was used as solvent. 30min/times, extracting twice, leaching and then combining all alcohol extracts. The water extract and alcohol extract were concentrated separately and then tested by HPLC method. A RP-HPLC method for the simultaneous determination of schizandrol A and schisandrin A was established. The detection was by Agilent TC-C18 column (5 μ m, 250mm $\times$ 4.6mm) with methanol- H_2O (75:25, v/v) as the mobile phase, at 226nm wavelength, column temperature 30 $^{\circ}$ C with the flow rate of mobile phase at 0.7mL/min. The results showed that there was no difference on the main components of schizandrol A and schisandrin when compared with the method of keeping the essential oil and directly extracted by ultrasonic ethanol method. The usage value of raw materials was improved and the new method is environmental friendly and nature resource saving.

Key words steam distillation; ultrasonic ethanol references; essential oil; RP-HPLC; schizandrol A; schisandrin A

收稿日期: 2009-09-10

作者简介: 崔宜 (1984-), 女, 硕士, 研究方向: 药食同源在酿酒中的应用。

五味子 [schisandra chinensis (tuncz) ball] 又称北五味子, 具有益气、滋肾、敛肺、涩精、生津、止渴、益智、安神等功效, 是生产健脑安神、调节神经药品及保健品的首选常用中药材, 在国内外一直被用作滋补强壮药和收敛镇咳药。北五味子除药用外, 还可加工果酒和果汁饮料。

现代研究证明, 五味子生物活性成分主要是木脂素和挥发油等。木脂素是北五味子的主要生理活性物质, 经检测含有五味子素、五味子甲素、五味子丙素、二氢愈疮木脂素、五味子酯甲、五味子醇甲、五味子酯戊、五味子酚等。木脂素除了具有保肝降酶作用外, 还具有抗癌、抗艾滋病 (HIV)、拮抗血小板活化因子 (PAF) 和抑制醛糖还原酶等多种活性, 其药用、保健品用、化妆品用价值很高。

五味子醇甲、甲素等功能成分提取研究主要采用水提、乙醇回流提取和渗漉提取法等。这些方法提取时间长、活性成分提取率低; 超声波提取法具有操作简便、快速、提取效率高; RP-HPLC分析方法准确, 灵敏度高, 重现性好, 可用于五味子有效成分的分析。故本实验采用上述方法提取、分析五味子功能成分。

此外, 五味子挥发油中含大量倍半萜烯成分, 其中乙酸龙脑酯有显著的抑制番泻叶所致小鼠腹泻、冰醋酸所致小鼠疼痛和离体家兔小肠平滑肌运动的作用; 柠檬烯对多种肿瘤具有预防和治疗作用, 是一种被发现具有抗癌特性的天然化合物; 蒎烯具有抗氧化、抗衰老的作用。可见挥发油成分是五味子的重要部分, 有着重要的具有潜在的研究意义。

目前, 五味子功效成分提取的相关文献报道中主要有五味子挥发油的提取及五味子木质素等功效成分的提取。而五味子挥发油与木质素等功效成分相结合的提取方法未见报道。本文采用了先水蒸气蒸馏法提取挥发油, 再对提油后的材料进行超声波醇提, 对五味子木质素等功能成分进行进一步的提取的方法。运用 HPLC 检测, 以五味子醇甲和甲素的含量为检测指标, 对上述方法中提取的功能成分与五味子未提油直接超声波醇提所得的功能成分进行比较, 考察五味子挥发油与其他功能成分结合提取方法的可行性。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

五味子, 五味子醇甲、五味子甲素标品 (购于天津科瑞杰生物技术开发有限公司), 甲醇, 乙醇, 纯净水, 无水硫酸钠。

1.1.2 仪器

SS-230A 型粉碎机, KQ3200DE 超声波清洗机, 德国海德尔夫 LABOROTA 4000 旋转蒸发仪, 岛津 2401 型紫外分光光度计, 安捷伦 1100-A 液相色谱仪, 安捷伦 TC-C₁₈ 色谱柱 (5 μ m, 250mm $\times$ 4.6mm), 挥发油提取器。

1.2 方法

1.2.1 五味子醇甲和甲素紫外最大吸收波长的测定

1.2.1.1 制作母液 精密称取五味子醇甲标准品, 五味子甲素标准品各 5mg 于烧杯, 分别加入 5mL 甲醇溶解, 配制成浓度为 1mg/mL 的醇甲和甲素母液, 放入冰箱 4℃ 保存备用。

1.2.1.2 配制样品 分别以乙醇和甲醇为溶剂, 配制醇甲、甲素以及二者混合样品溶液, 浓度均为 0.01mg/mL。

1.2.1.3 用 2401 型紫外分光光度计分别测定以上醇甲、甲素标品以及二者混合标品的紫外最大吸收波长^[1]。

1.2.2 色谱条件

反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 方法: 色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱 (5 μ m, 250mm $\times$ 4.6mm), 流动相为甲醇-水 (75:25 v/v), 进样溶剂为甲醇 (色谱纯), 紫外检测波长 226nm (2.1 结果所得), 柱温 30℃, 流速 0.7mL/min。

1.2.3 五味子醇甲和甲素标准曲线测定

把五味子醇甲和甲素浓度为 1mg/mL 的母液用甲醇分别配制成浓度为 0.008、0.016、0.04、0.08、0.12、0.2mg/mL 梯度浓度的标准溶液。依 2.2 法测定, 以峰面积值为纵坐标, 以浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程: 五味子醇甲 $y = 316249x + 1017.2$, 在 0.008 ~ 0.2 mg/mL 范围内 ($r^2 = 0.9966$) 线性关系良好; 五味子甲素 $y = 263577x - 869.27$, 在 0.008 ~

0.2mg/mL范围内 ($r^2=0.9967$) 线性关系良好。

1.2.4 超声波醇提法提取功能成分

将一定量五味子用水洗净,放入电热干燥箱60℃烘干至恒重。用粉碎机将五味子粉碎。取一定量五味子粉末于烧杯中,按料液比1:15加入95%乙醇,40KHZ,120w,初始温度20℃,超声波振荡提取2次,每次30min,合并滤液,旋转蒸发至少量后放入电热干燥箱烘至浸膏状,加入适量70%乙醇配制成浓缩液1。

1.2.5 水蒸气蒸馏法^[2]提取挥发油

称取一定量样品五味子粉末于烧杯中,按料液比1:15加入蒸馏水,浸泡24h后按照水蒸气蒸馏法(药典附录XD挥发油测定法)蒸馏5h,静置1h,读取挥发油量。所得挥发油加入无水硫酸钠干燥。5000r/min离心,倒出上清液,倒入少量乙醚洗涤离心管^[3],洗涤液与上清液合并,放入通风橱使乙醚挥发。

1.2.6 挥发油提取与五味子功能成分提取结合实验

(1) 按1.2.5中水蒸气蒸馏法提取挥发油。提取后把全部水溶液离心,倒出上清液,上清液旋转蒸发至少量后放入电热干燥箱烘成浸膏状,待浸膏冷却后加入适量70%乙醇制成浓缩液2。

(2) 提油后的原料中以料液比1:15加入95%乙醇超声波提取两次,合并滤液,旋转蒸发至少量,放入电热干燥箱烘干至浸膏状,待浸膏冷却后加入适量70%乙醇制成浓缩液3。

(3) 分别将浓缩液1、2、3用甲醇稀释20倍,RP-HPLC测定醇甲和甲素的峰面积值。再将峰面积值分别代入醇甲和甲素的标准曲线方程计算醇甲和甲素的含量。

2 结果与分析

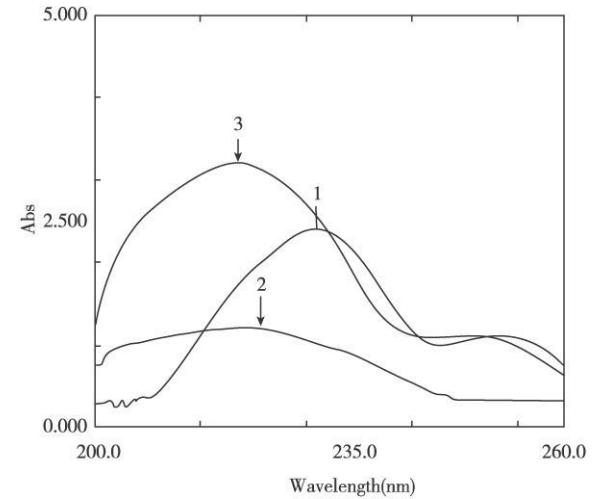
2.1 紫外最大吸收波长及进样溶剂的确定

相关文献报道中运用醇提法对五味子功能成分进行提取,其溶剂多采用甲醇^[4]。作者考虑到实际生产中,五味子药效成分提取后的加工方便,食用安全,故采用乙醇为溶剂提取^[5]。经实验验证95%乙醇提取效果为最佳。一般说来HPLC检测进样溶剂应与提取溶剂相同。但考虑到多数文献均采用甲醇作为进样溶剂,实验考查了醇甲、甲素在乙醇及甲醇中的最大吸收波长,从而选取最佳进样溶剂及最大吸收波长。

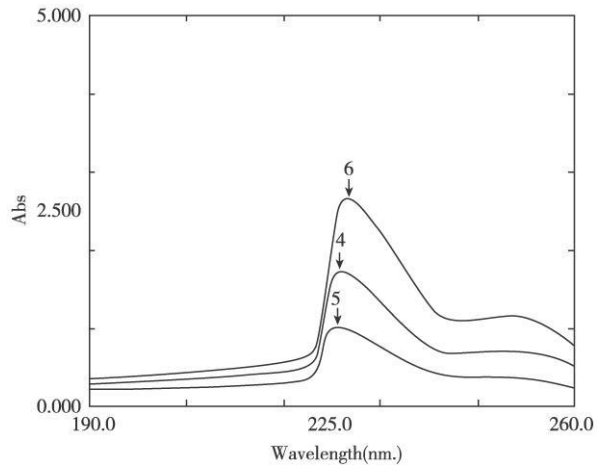
由表1中数据可知,以乙醇为溶剂时醇甲和甲素在混合标品中的紫外最大吸收峰发生较大飘移,如图1所示。而以甲醇为溶剂时二者在混合标品中的紫外最大吸收峰相近,如图2所示。醇甲标品的紫外最大吸收波长为226.10nm,甲素紫外最大吸收波长为225.70nm,故取226nm为紫外检测波长,甲醇为RP-HPLC检测的进样溶剂。

表1 醇甲和甲素紫外最大吸收波长

		甲醇	乙醇
醇甲	醇甲	226.10nm	225.90nm
	甲素	225.70nm	216.75nm
混合标	醇甲	227.30nm	248.00nm
	甲素	227.30nm	216.75nm



1. 醇甲 2. 甲素 3. 混合标品
图1 乙醇中最大吸收波长



4. 醇甲 5. 甲素 6. 混合标品
图2 甲醇中最大吸收波长

2.2 结合提取与单一提取的结果比较

按照 1.2.2 中的色谱条件分别对 1.2.4 中超声波提取功能成分的醇提浓缩液 1; 1.2.6 中水蒸气蒸馏法提取挥发油所得水提液浓缩液 2 提油后的原料再次超声波法提取所得醇提浓缩液 3 进行 RP-HPLC 检测, 如图 3、4、5 所示。图 6 为五味子醇甲、甲素的混标色谱图。测定的醇甲及甲素含量, 结果见表 2。

从表中数据可以看出提油与未提油所得功能性成分含量相差不大, 由此可知水蒸气蒸馏法提取挥发油不会对五味子醇甲和甲素等功能成份造成损失。故可以采取挥发油提取和五味子功能成

份提取相结合的方法来提高原料的利用率, 即先提取五味子挥发油再提取其他功能成分。

表 2 醇甲和甲素峰面积及含量

	醇甲		甲素	
	峰面积值	含量 (mg/g 粉末)	峰面积值	含量 (mg/g 粉末)
浓缩液 2	17595.6	1.0484	4335.1	0.3949
浓缩液 3	8757.4	0.5245	4571.9	0.4424
总和	26353	1.5729	8907	0.8373
浓缩液 1	25248.1	1.5324	11114.7	0.9093

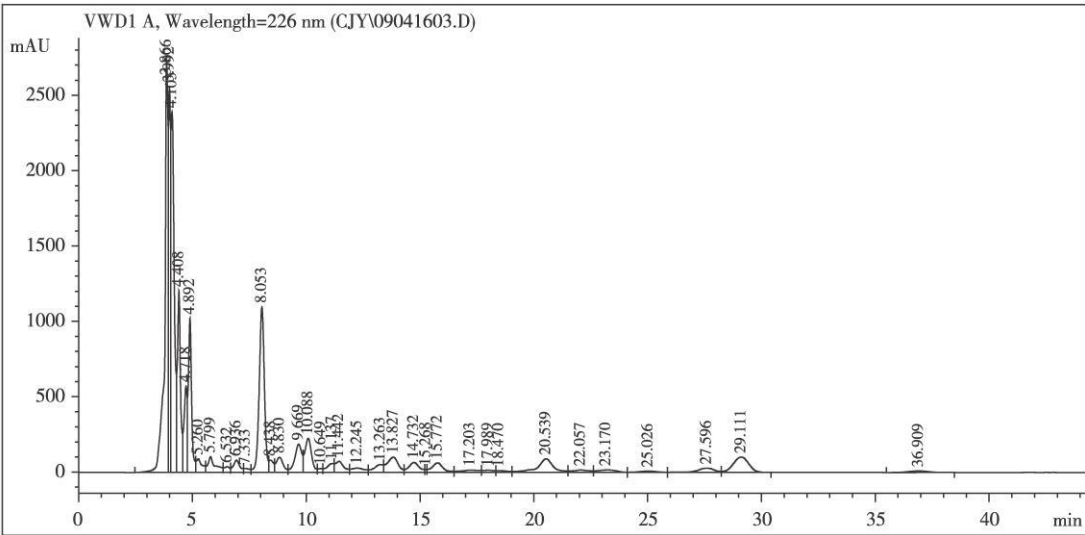


图 3 五味子浓缩液 1HPLC 色谱图

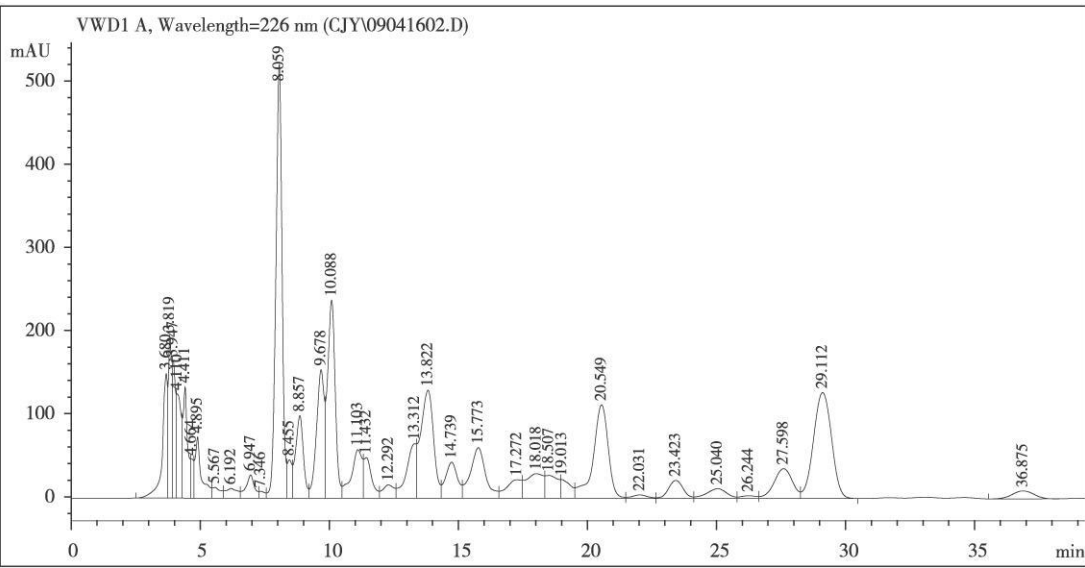


图 4 五味子浓缩液 2HPLC 色谱图

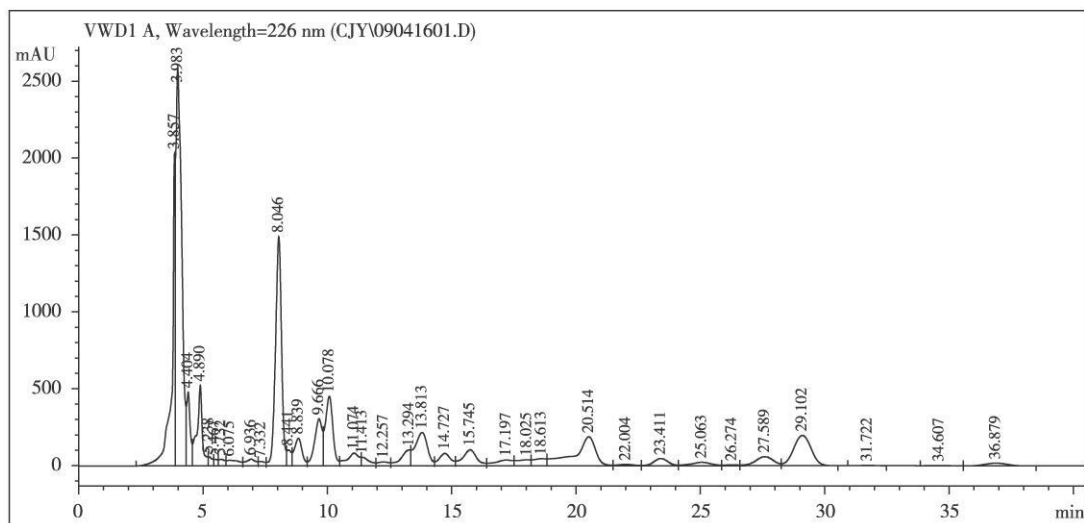


图 5 五味子浓缩液 HPLC 色谱图

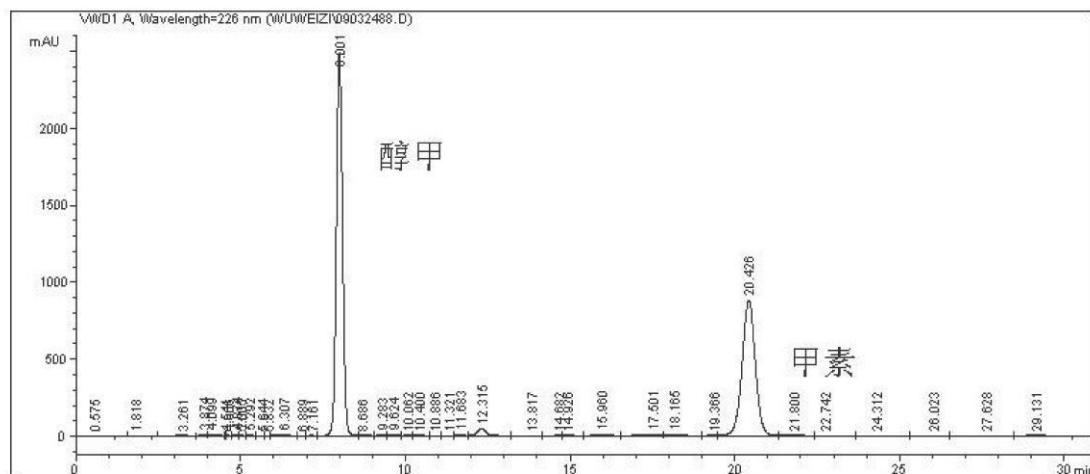


图 6 五味子醇甲、甲素混标 HPLC 色谱图

3 小结与讨论

(1) 实验中考察了乙醇浸泡法、乙醇回流法、索氏提取法和超声波提取法四种提取方法^[6]。其中乙醇浸泡法提取效果不佳, 时间长, 有效成分提取量少。乙醇回流法、索氏提取法和超声波提取法的提取效果相差不大, 但乙醇回流法和索氏提取法消耗时间较长, 溶剂用量也较大, 而超声波提取法耗时短, 溶剂用量适中, 仪器设备简便易操作, 提取效率较高, 所以选择超声波醇提法为醇甲和甲素的提取方法;

(2) 实验中考察了水蒸气蒸馏法、水超声波-乙醚萃取法、乙醚超声波法、乙醚微波萃取法^[7]四种提油方法, 其中水蒸汽蒸馏法所得挥发油虽总量较少但澄清纯净, 呈透明的黄色。由其他三种方法所得挥发油分层有沉淀, 为混合物^[8]。故选择水蒸汽蒸馏法为挥发油的最佳提取方法;

(3) 五味子挥发油与木质素等功能成分相结合的提取方法是一种综合优化, 节约资源, 降低成本, 为后期产品制作提升利润空间和开发价值的新型方法。

(下转第 70 页)

参考文献:

[1] 田召芳, 牛钟相, 常维山, 孙海港, 邹德志. 乳酸菌细菌素的研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2003 23 (6): 47- 49.
[2] 赖毅东, 宁正祥. 生物防腐剂 - 细菌素 [J]. 广州食品工业科技, 2002 18 (4): 54- 56
[3] 周志江, 韩烨, 韩雪, 郑峰. 从酸白菜中分离出一株产细菌素的乳酸片球菌 [J]. 食品科学, 2006 27 (4): 89- 91.
[4] 张艾青. 产广谱细菌素植物乳杆菌的初步研究及其在泡菜中的应用 [D]. 四川农业大学, 2007
[5] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
[6] 韩雪, 周志江. 乳酸片球菌细菌素的活性及特性的研究

[J]. 食品研究与开发, 2006 27 (4): 19- 21.
[7] 李凇, 罗俊成, 胡欣洁, 王忠彦, 胡承. 类细菌素产生菌的筛选及发酵条件的研究 [J]. 酿酒科技, 2005, (4): 34- 37
[8] 李平兰, 张箴, 江汉湖. 产细菌素植物乳杆菌菌株的筛选及其细菌素生物学特征研究 [J]. 食品与发酵工业, 1998, 25 (1): 1- 3
[9] 江汉湖. 食品微生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002
[10] 韩雪. 乳酸片球菌细菌素的分离纯化及特性研究 [D]. 吉林大学, 2006.

(上接第 109 页)

参考文献:

[1] 王彦涵, 高建平, 陈道峰. 高效液相色谱法测定五味子属药用植物木脂素含量 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28 (12): 1155- 1159.
[2] 中华人民共和国药典 (一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005 48.
[3] 秦波. 五味子果实中挥发油成分含量 [J]. 中药通报, 1988 (6): 338
[4] Clemens Schwarzwinger, Hermann Kranawetter. Analysis of the Compounds in Different Part by Means of Pyrolysis2GC/MS

[M]. Monatshefte Für Chemie Chemisch 2004
[5] Jian M Y, Yao Z C, Su M H, et al. Ganschisandrine, Lignan from Schisandra Sphenanthera [J]. Phytochemistry, 1989, 28 (6): 1774
[6] 高春花, 钟海雁, 孙昌波. 五味子木脂素提取分离纯化和含量测定的研究进展 [J]. 专论与综述, 2007, 23 (1): 151- 155.
[7] 五味子木脂素提取分离纯化和含量测定的研究进展 [J]. 专论与综述, 2007, 23 (1): 151- 155.
[8] 黄惠华, 梁汉华. 利用微波辅助萃取技术提取五味子果实中五味子醇甲的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, (18): 112- 115.

(上接第 113 页)

与包含前挥发油的气相色谱图进行比较, 其主要成分、出峰时间及主要成分的百分含量均无明显差异, 说明在包含过程中, 挥发油主要成分几乎没有发生变化, 依然保持了包含前的品质。

3 结论

- (1) β -环糊精包含薰衣草挥发油的最优工艺条件为: β -环糊精与挥发油的比例为 6: 1, 包含时间为 2h, 包含温度为 40℃;
(2) β -环糊精与挥发油的比例、包含时间的水平变化对实验结果有显著影响, 包含温度的水平变化对实验结果没有显著影响;
(3) 通过气相色谱检测, 包含前后挥发油化学组成基本不变。

参考文献:

[1] 张秋霞, 江英, 张志强. 薰衣草精油的研究进展 [J]. 香料香精化妆品, 2006, (6): 21- 24
[2] 吕佳, 徐晶, 李海滨, 等. β -丁香挥发油环糊精包含物制备工艺研究 [J]. 中成药, 2004 26 (5): 424- 426
[3] 李维凤, 牛晓峰, 侯芹, 等. β -环糊精包含白术挥发油的工艺研究 [J]. 中国中药杂志, 2005 30 (12): 940- 941
[4] 谢玲, 左亚杰. β -CD 包结挥发油工艺在中药制剂中的应用概况 [J]. 湖南中医杂志, 2006 22 (1): 83- 84.
[5] 袁勇, 严琳, 潘立华, 等. β -环糊精包含姜黄挥发油的工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2005 16 (2): 122- 123
[6] 王晓颖, 叶梦屏. 陈皮挥发油 β -环糊精包含工艺研究 [J]. 福建中医学院学报, 2005 15 (2): 28- 29.
[7] 何媛, 王四旺, 吴红. 桉油 β -环糊精包含物的制备与鉴定 [J]. 中国药房, 2006 17 (4): 255- 258.