

# 不同提取液对牛至粉中香芹酚和麝香草酚提取效果分析

马建民 段素云 刘莹 郭彤\*

北京农业职业学院, 北京 102400

**摘要** 本试验使用 1%  $\beta$ -环糊精溶液、1%羟丙基- $\beta$ -环糊精溶液、10%丙二醇溶液, 在 40 °C 对牛至粉进行超声提取 40 min, 同时用纯化水提取作为阴性对照, 乙腈提取作为阳性对照, 获得牛至提取液, 用高效液相色谱法测定不同提取液中牛至精油成分香芹酚和麝香草酚含量, 以期了解环糊精和丙二醇对纯化水提取牛至中挥发油成分香芹酚和麝香草酚辅助提取作用。试验结果显示: 5 种提取液中香芹酚和麝香草酚的浓度差异极显著, 由高到低依次为乙腈、1%  $\beta$ -环糊精溶液、1%羟丙基- $\beta$ -溶液、10%丙二醇溶液、纯化水, 其中 1%  $\beta$ -环糊精提取液对香芹酚和麝香草酚提取效率达到乙腈的 87.64% 和 69.45%。环糊精或丙二醇均可提高纯化水对牛至中香芹酚和麝香草酚的提取量, 其中 1%  $\beta$ -环糊精溶液最优, 为牛至产品开发提供了新的思路。

**关键词** 牛至;  $\beta$ -环糊精; 羟丙基- $\beta$ -环糊精; 丙二醇; 香芹酚; 麝香草酚

牛至 (*Origanum vulgare* L.) 为唇形科牛至属多年生草本植物, 我国主要分布西北、东北、江西、安徽、湖北、河南等地, 本品性凉、味辛、无毒, 具有清热解表、利水消肿的功效, 主治中暑、感冒、头痛身痛、急性胃肠炎、腹痛吐泻、水肿等症<sup>[1]</sup>。药理研究表明, 牛至精油具有抗菌、抗氧化<sup>[2]</sup>、增强免疫力作用, 是牛至产生药效的主要活性部位, 其主要成分为香芹酚和麝香草酚。牛至精油的提取方法主要有有机溶剂提取、水蒸气提取和超临界流体萃取<sup>[3]</sup>等方法。牛至精油不溶于水、易挥发, 可应用环糊精、羧甲基纤维素、海藻酸钠等辅料进行包膜制成牛至精油预混剂进行使用<sup>[4-6]</sup>, 通过包膜技术减少精油的挥发并增加其溶解性。刘元元等<sup>[7]</sup>使用 5% 牛至香酚预混剂, 添加量为 15 mg/kg, 饲料中牛至香酚含量为 0.75 mg/kg, 促进肉鸡生产性能。彭青云等<sup>[8]</sup>使用至多兴牛至油添加剂, 其香芹酚和麝香草酚含量分别为 2.2% 和

1.1%, 添加量为 300 mg/kg, 饲料中总酚含量为 9.9 mg/kg, 能改善肉鸡的生产性能和屠宰性能并提高免疫器官指数。郝丹丹等<sup>[9]</sup>使用购自美国 Sigma-Aldrich 公司牛至油, 其中香芹酚 7.3%、麝香草酚 0.18%, 最佳添加量为 50 mg/kg, 饲料中总酚含量为 3.74 mg/kg, 提高蛋鸡的生产性能和免疫功能。市售牛至精油产品均以香芹酚和麝香草酚作为质量控制指标, 当家禽饲料中总酚浓度为 0.75~9.90 mg/kg 时, 可提高家禽的生产性能。牛至其他部位的药效也有报道, 早克然·司马义等<sup>[10]</sup>发现牛至水提取物具有抗炎、止咳及抗自由基作用。李定刚等<sup>[11]</sup>对不同工艺来源的牛至提取物对小鼠大肠杆菌的防治作用的研究表明, 牛至精油与牛至水提物混合使用防治效果最佳。

由于精油的化学性质, 牛至的水提液中精油成分含量极低, 而牛至精油的单独提取相对复杂, 提

收稿日期: 2020-11-11

基金项目: 北京农业职业学院院级项目 (XY-YF-19-11); 北京市特色高水平院校建设项目-打造高水平专业群项目-动物医学专业群项目-技术平台与社会服务建设项目 (PXM2020\_157102\_000060); 北京市特色高水平骨干专业群项目-动物医学专业群项目-教师教学创新团队建设项目 (PXM2020-157102-000057)

\* 通讯作者

马建民, 男, 1977 年生, 硕士, 副教授。

取后需进行包膜使用,且损失了牛至水提液中部分抗炎、抗氧化成分。本试验在纯化水中添加食品级助溶剂丙二醇或环糊精对牛至进行提取,以乙腈提取作为阳性对比,纯化水提取作为阴性对比,通过高效液相色谱测定提取液中精油成分香芹酚和麝香草酚含量,评价丙二醇、环糊精对牛至精油成分辅助提取作用,为牛至产品开发提供新的提取方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

牛至购自玉林市玉州区菩提药源食品经营部;丙二醇、 $\beta$ -环糊精、羟丙基- $\beta$ -环糊精(食品级)购自九州食品配料商城;香芹酚、麝香草酚(>99.0%)购自 macklin 公司;乙腈(为色谱纯)购自 Fisher Scientific 公司。

1%  $\beta$ -环糊精溶液:精密称取  $\beta$ -环糊精 10.00 g,加蒸馏水 1 000 mL 溶解;1%羟丙基- $\beta$ -环糊精溶液:精密称取羟丙基- $\beta$ -环糊精 10.00 g,加蒸馏水 1 000 mL 溶解;10%丙二醇溶液:精密称取丙二醇 100 g,加蒸馏水溶解定容至 1 000 mL;标准储备液:分别精密称取香芹酚和麝香草酚对照品 0.0250 g,用乙腈定容至 25 mL,制得终浓度为 1 mg/mL 的 2 种标准储备液。混合标准工作液:取以上 2 种标准储备液,用乙腈-水(40:60)稀释制备 1、5、10、20、50 mg/L 5 个系列质量浓度的混合标准工作液,存放于 4 °C 冰箱。

### 1.2 仪器

电子分析天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司 SQP)、昆山 KQ-500DV 超声清洗机、GT10-1 型高速离心机(北京时代北利离心机有限公司)、震荡器(IKA)、高效液相色谱仪(岛津 LC-16AT)。

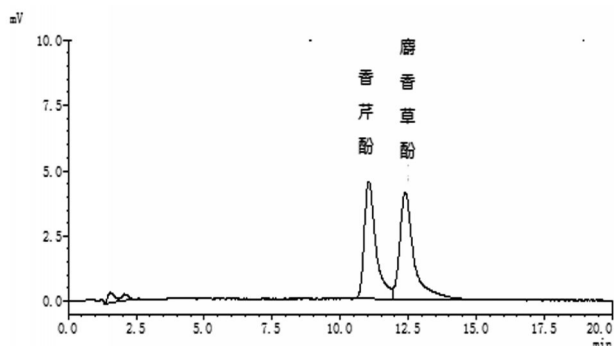


图 1 混合标准工作液色谱图

### 1.3 提取方法

牛至粉碎后,过 0.15 mm 筛,精确称取 3 份牛至粉末 0.200 0 g,置 10 mL 离心管中,分别加入 5 mL 提取液,密封,40 °C 超声 40 min,6 000 r/min 离心 10 min,上清液即为牛至提取液。

### 1.4 色谱方法

色谱柱 InertSustain C18(150 mm×2.1 mm, 3  $\mu$ m);紫外检测波长 276 nm;流动相为乙腈-水(40:60);柱温:50 °C;流速 0.4 mL/min;混合标准工作液依次进样 10  $\mu$ L。将测得香芹酚和麝香草酚的色谱峰面积(A)和相对应的浓度(C)做直线回归,求得标准曲线回归方程的线性范围和相关系数。

### 1.5 提取液中香芹酚和麝香草酚检测

取 1.3 上清液过微孔滤膜,量取滤液 0.6 mL,加入乙腈 0.4 mL,涡动 5 min,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液过微孔滤膜,滤液上机检测,进样 10  $\mu$ L。按峰面积标准曲线法计算提取液中香芹酚和麝香草酚含量。

### 1.6 数据处理

试验数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行方差分析,极显著水平为  $P < 0.01$ 。试验结果以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线和液相色谱图

混合标准工作液和牛至样品色谱图见图 1 和图 2,香芹酚和麝香草酚基本完全分离,色谱峰形对称。香芹酚和麝香草酚的标准曲线方程和相关系数见表 1。

### 2.2 提取液中香芹酚和麝香草酚含量

由表 2 可知,不同提取液中香芹酚和麝香草酚含量均差异极显著( $P < 0.01$ )。

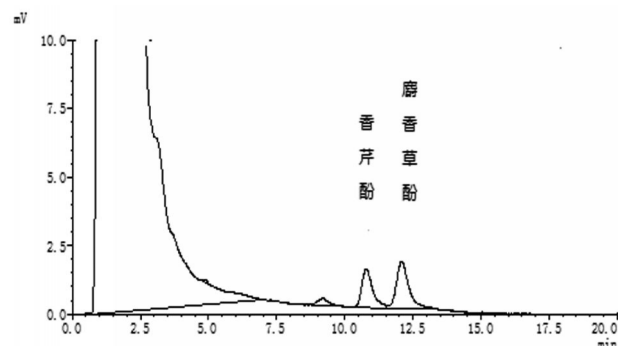


图 2 牛至样品色谱图

表 1 标准曲线和相关系数

种类	标注曲线	相关系数 $R^2$
香芹酚	$y=13\ 982.8x+7\ 340.88$	0.999 7
麝香草酚	$y=17\ 003.8x-5\ 031.26$	0.999 7

表 2 不同提取液中香芹酚和麝香草酚含量

种类	水	1%β-环糊精	10%丙二醇	1%羟丙基-β-环糊精	乙腈
香芹酚	0.29E±0.062	13.62B±0.691	1.40D±0.086	6.67C±0.052	15.54A±0.467
麝香草酚	2.36E±0.004	17.10B±0.071	3.54D±0.046	9.35C±0.323	24.61A±0.230

注:同行标注的不同大写字母表示差异极显著 ( $P<0.01$ ),相同字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ )。

### 3 讨 论

#### 3.1 液相色谱检测

香芹酚与麝香草酚为同分异构体,分离较为困难,其化学名称分别为 2-甲基-5-异丙基苯酚和 5-甲基-2-异丙基酚,窦茂鑫等<sup>[12]</sup>使用甲醇-水-冰醋酸(60:40:2)为流动相对饲料添加剂中的香芹酚与麝香草酚进行检测分析。孙丽娟等<sup>[13]</sup>使用乙腈-水(50:50)为流动相对牛至药材中的香芹酚与麝香草酚进行分析。在文献基础上,本试验采用乙腈-水(40:60)的流动相对提取液进行分析检测,色谱峰分离完全,出峰时间适宜,相关系数符合要求。可以通过标准曲线法计算提取液中香芹酚和麝香草酚含量,进行比较分析。

#### 3.2 不同提取液比较

牛至中挥发油类成分香芹酚和麝香草酚是其抗菌、抗氧化的主要成分,因此用提取液中香芹酚和麝香草酚含量高低评价提取液的提取效果。香芹酚和麝香草酚结构决定其不易溶于水,易溶于有机溶剂,因此乙腈提取液含量最高分别为 15.54 mg/L 和 24.61 mg/L,蒸馏水提取液含量最低分别是 0.29 mg/L 和 2.36 mg/L,牛至中香芹酚和麝香草酚含量测定一般使用乙腈进行提取<sup>[13]</sup>。纯化水中添加环糊精和丙二醇提高香芹酚和麝香草酚的含量,其中 1% β-环糊精提取液含量最高分别为 13.62 mg/L 和 17.10 mg/L,达到乙腈的 87.64%和 69.45%。环糊精具有“内亲油、外亲水”的空腔结构,提高了牛至精油成分溶解度和溶出速率,进而提高提取率<sup>[14]</sup>。

牛至粉在蒸馏水中香芹酚和麝香草酚溶出率极低,饲料中直接添加牛至粉的报道较少。1% β-环糊精牛至提取液与饲料进行 1:(3~10) 比例拌料使用,饲料中总酚含量可达到 3.07~10.24 mg/kg,与市售牛至油预混剂的浓度相当<sup>[7-9]</sup>。牛至 1% β-环糊精提取液制备与提取牛至挥发油再制成牛至油预混剂的工艺相比,具有操作简单、成本低的优点。

### 4 结 论

牛至 β-环糊精提取液显著提高了牛至中香芹酚和麝香草酚溶出度,可直接进行拌料使用,应用于畜牧养殖业。

#### 参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:维吾尔药分册[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999.
- [2] 李娜,武晓英,赵文婧,等.牛至精油成分分析及其抗氧化性和抑菌活性研究[J].中国调味品,2020,45(9):29-33,54.
- [3] 刘军海,李志洲,王俊宏.响应面优化超临界 CO<sub>2</sub> 萃取牛至油工艺研究[J].中国饲料,2016(5):17-20.
- [4] 卢燕霞,田永强,刘惠琴,等.牛至精油 β 环糊精微胶囊的制备及其抑菌效果研究[J].包装工程,2016,37(5):84-88.
- [5] 王楠,王建清,王玉峰,等.海藻酸钠/多孔淀粉牛至精油微胶囊的制备[J].食品工业科技,2016,37(9):224-227,234.
- [6] 谭瑞心,张万刚,周光宏.牛至精油-羧甲基纤维素活性包装膜制备及其抗氧化和抗菌性能研究[J].食品工业科技,2019,40(12):90-96.
- [7] 刘元元,王英俊,张浩,等.天然牛至香酚预混剂对肉鸡生产性能的影响[J].畜牧与兽医,2016,48(2):57-60.
- [8] 彭青云,李菊娣,罗正,等.牛至油对肉仔鸡生长性能、屠宰性能

# 鸭坦布苏病毒冻干高免卵黄抗体的研制

王红琳 卢 琴 罗青平 张蓉蓉 温国元 商 雨 邵华斌\*

湖北省农业科学院畜牧兽医研究所/农业农村部畜禽细菌病防治制剂创制重点实验室,武汉 430064

**摘要** 本研究用鸭坦布苏病毒病灭活苗三次免疫 SPF 蛋鸡,收取高免鸡蛋,制备成冻干高免卵黄抗体;用鸡胚中和试验和间接 ELISA 方法进行效价检测。试验结果显示,第 3 次免疫后 2 周,卵黄抗体中和效价为 1:103.5,4、5 周达到最高值 1:104.5;间接 ELISA 方法检测冻干前后的抗体效价结果均为阳性;对鸭坦布苏病毒强毒的攻毒保护率达 100%,可为鸭坦布苏病毒的防控提供一种有效的冻干高免卵黄抗体制剂。

**关键词** 鸭;坦布苏病毒;卵黄抗体;冻干制剂;抗体效价

鸭坦布苏病毒病是由黄病毒科、黄病毒属的坦布苏病毒(Tembusu virus, TMUV)引起的以产蛋鸭产蛋量骤降和雏鸭或育成鸭出现神经症状为主要特征的一种新型急性传染病,又称为鸭出血性卵巢炎、鸭黄病毒病。以种鸭、蛋鸭产蛋量急剧下降,产蛋率从产蛋高峰 90%左右下降至 10%不等;雏鸭发生神经系统症状甚至死亡为主要特征<sup>[1-2]</sup>。自 2010 年暴发以来,该病在我国大陆地区广泛传播,给国内的家禽养殖业造成了严重的经济损失。该病传播迅速,蔓延范围广,给养鸭业造成了严重的经济损失<sup>[3-4]</sup>。卵黄抗体(IgY)是预防和紧急治疗该病的有效防制剂<sup>[5]</sup>,由于常规卵黄抗体一般为液体,质量不稳定、副作用大、体积大运输不便。因此,本试验通过用鸭坦布

苏病毒灭活疫苗免疫 SPF 蛋鸡后,收集卵黄进行 IgY 的提纯和冻干研究,旨在克服常规卵黄抗体的缺陷,达到有效预防和治疗该病的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1)毒种:鸭坦布苏病毒(DTMUV)JL2011 株,由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所兽医研究室分离、保存。

2)鸭坦布苏病毒病灭活苗:由本实验室制备,将 DTMUV JL2011 株接种 SPF 鸡胚,按常规方法<sup>[6]</sup>制备成油乳剂灭活苗,每毫升疫苗至少含灭活前的鸭坦布苏病毒 106.0 EID<sub>50</sub>,质量检验合格,备用。

收稿日期:2020-11-16

基金项目:国家重点研发计划(2017YFD0500800,2017YFD0500803);国家水禽产业技术体系(CRAS-42-47);湖北省农业科技创新中心项目(2016-620-000-001-025)

\* 通讯作者

王红琳,女,1966 年生,副研究员。



及免疫器官指数的影响 [J]. 中国畜牧杂志,2016,52 (13):73-76,100.

[9] 郝丹丹,张旭,陈嘉,等.牛至油对成年蛋鸡生长性能和免疫功能的影响[J].中国兽医学报,2017,37(6):1121-1127.

[10] 早克然·司马义,于洋,麦合苏木·艾克木,等.牛至草水提物的抗炎、止咳、祛痰及体外抗氧化作用研究[J].新疆医科大学学报,2017,40(12):1580-1584.

[11] 李定刚,韩愈杰,刘亚川,等.不同工艺来源的牛至提取物对小鼠大肠杆菌性腹泻防治作用的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医,2020

(16):130-133,166.

[12] 窦茂鑫,赵迪,侯水清,等.饲料添加剂牛至油中香芹酚和百里香酚含量的测定[J].饲料工业,2013,34(20):12-14.

[13] 孙丽娟,刘红兵,许汉林,等.湖北产牛至药材中香荆芥酚和麝香草酚的含量测定[J].中药材,2005(7):562-563.

[14] 王怡童,王沙沙,方芳,等.环糊精辅助提取原理及其在天然产物分离中的应用[J].机电信息,2017(8):36-41.

【责任编辑:胡 敏】