

子素的溶出率随载体比例的增大而增大。这可能与 PVP-S630 良好的水溶性、较好的塑性和较强的表面活性有关。

在提高药物溶出度方面,热熔挤出法效果较好。溶剂法以溶媒使物料粒径从宏观层混合,热熔挤出法集固体输送、熔融、剪切混合、排气匀化、熔体输送于一体,使细化的粒子彼此交换位置,均匀分散,实现分子水平的混合。在挤出后的降温阶段,由于 PVP-S630 的玻璃态转化温度较高,抑制了原料的二次析晶,而溶剂法在挥干溶剂过程中,药物可能会出现二次结晶现象,导致溶出率较挤出法低。

参 考 文 献

[1] 陈凤珍,李庆国,何贵峰,等. 熔融挤出法制备穿心莲内

酯固体分散体的研究[J]. 中药材, 2011, 34(12): 1953-1955.

[2] 张晓晖,徐敏. 蛇床子香豆素的药理研究进展[J]. 广西中医药, 2005, 28(1): 5-8.

[3] 黎为能,谢金鲜. 蛇床子素药理作用的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(16): 530-531.

[4] 俞迪佳,刘扬,朱缨,等. 蛇床子素固体分散体的制备与分析[J]. 中国民族民间医药杂志, 2011, 20(14): 40-41

[5] 李宝红,张立坚,庄海旗,等. 蛇床子素固体分散体的制备与分析[J]. 华东理工大学学报, 2004, 30(5): 598-600.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 二部. 北京:中国医药科技出版社, 2010:附录 86.

枸杞子中 β -胡萝卜素的快速溶剂萃取 提取条件优化及 HPLC 测定

曹静亚,谭亮,迟晓峰,董琦,胡风祖*

(中国科学院西北高原生物研究所/中国科学院藏药研究重点实验室,青海 西宁 810008)

摘要 目的:研究枸杞子中 β -胡萝卜素的快速提取工艺。方法:以 β -胡萝卜素的含量为指标,通过高效液相色谱法测定其含量,考察了超声、溶剂浸提、快速溶剂萃取(ASE)三种提取方法对 β -胡萝卜素提取效果的影响,通过单因素试验和正交试验优化 ASE 的提取条件。结果:ASE 在提取效果上明显优于其他两种方法,影响枸杞子中 β -胡萝卜素提取效果的因素主次顺序为:D(提取次数) > A(提取溶剂) > C(提取时间) > B(称样量)。ASE 的最佳提取工艺为:称样 0.8 g,以石油醚:丙酮(1:2)作为提取溶剂,提取 20 min,循环 2 次,在该条件下,得出枸杞子中 β -胡萝卜素的总含量为 208.17 $\mu\text{g/g}$ 。结论:该方法简单、快捷、高效,适用于枸杞子中 β -胡萝卜素的提取。

关键词 快速溶剂萃取;枸杞子; β -胡萝卜素;正交试验;高效液相色谱

中图分类号:R286.1 文献标识码:A 文章编号:1001-4454(2013)07-1168-04

枸杞子是茄科枸杞属植物枸杞 *Lycium chinense* Mill. 的成熟果实。性味甘,平。具有滋肾、润肺、补肝、明目的功效。用于治疗肝肾阴亏、腰膝酸软、头晕、目眩、目昏多泪、虚劳咳嗽、消渴、遗精等^[1]。枸杞子中含有丰富的类胡萝卜素,其中包括 β -胡萝卜素。 β -胡萝卜素(β -carotene)不溶于水,溶于脂肪和脂肪溶剂,亦称脂色素。近年来发现天然 β -胡萝卜素在抗癌、预防心血管疾病、白内障及抗氧化方面有显著的功效,可防止因老化引起的多种退化性疾病^[2]。因此研究 β -胡萝卜素的提取工艺在医药工

业上具有很高的应用价值。

快速溶剂萃取(ASE)是指在密闭容器内于高温(50~200 $^{\circ}\text{C}$)和高压(500~3000 psi)条件下,在短时间内,用有机溶剂提取固体或半固体样品的一种新型样品前处理方法^[3]。与超声、微波、回流、超临界萃取等成熟方法相比,ASE 有萃取溶剂用量少、提取时间短、萃取效率高、操作简单方便、安全和自动化程度高等优点^[4]。本文研究用快速溶剂萃取法提取枸杞子中 β -胡萝卜素的可行性,并用正交试验 $L_9(3^4)$ 对其最佳提取工艺进行优化。现将结果报道如下。

收稿日期:2012-12-17

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-J-26)

作者简介:曹静亚(1990-),女,硕士研究生,主要从事天然产物与药物分析工作;Tel:13519708120, E-mail:caojingya1101@126.com.

* 通讯作者:胡风祖, Tel:0971-6132750, E-mail:hufz@nwipb.cas.cn.

1 仪器与材料

ASE350 快速溶剂萃取仪(美国, DIONEX 公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪, UV 检测器, 四元梯度泵, 自动进样器(美国, Agilent 公司); AG135 电子天平(德国 Mettler Toledo 公司); KQ-100E 型超声波清洗器(昆山超声仪器科技公司); MOLELEMENT 元素型超纯水机(上海摩勒生物科技有限公司)。旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

枸杞子采自柴达木栽培基地, 经中国科学院西北高原生物研究所分析测试中心胡风祖研究员鉴定为茄科枸杞属植物枸杞 *Lycium chinense* Mill. 的成熟果实; β -胡萝卜素(批号: CA11045800, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany), 乙腈、四氢呋喃、正己烷为色谱纯, 石油醚、丙酮、NaCl、无水 Na_2SO_4 为分析纯, 超纯水(实验室自制); $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜(美国, Agilent 公司)。

2 方法

2.1 对照品溶液的配制 取 β -胡萝卜素对照品适量, 精密称定, 置于 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 $112.984\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 β -胡萝卜素对照品溶液。

2.2 色谱条件 色谱条件: SpursilTM C_{18} -EP 色谱柱 ($4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$), 流动相: 乙腈-四氢呋喃 (90:10), 流速: $1.2\ \text{mL}/\text{min}$, 检测波长: $448\ \text{nm}$, 柱温: 25°C 。

2.3 标准曲线的绘制 分别精密吸取 β -胡萝卜素对照品溶液 1.00 、 2.00 、 6.00 、 10.00 、 15.00 、 20.00 、 $25.00\ \mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪, 按照“2.2”项下色谱条件测定峰面积。分别以 β -胡萝卜素进样质量 (x) 为横坐标, 色谱峰面积 (y) 为纵坐标绘制标准曲线。得回归方程为: $y = 118.3x - 4.070$, $r = 0.9995$ 。 β -胡萝卜素进样质量在 $0.1130 \sim 2.825\ \mu\text{g}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

2.4 不同提取方法的考察

2.4.1 溶剂浸提法: 枸杞子鲜样粉碎, 匀浆, 准确称取 $1.0\ \text{g}$, 加入 $50\ \text{mL}$ 石油醚: 丙酮 (1:1), 置于暗室中, 每隔 $20\ \text{min}$ 用手震摇 1 次, 提取 $30\ \text{min}$ 。将提取液过滤到分液漏斗中, 并加入 10% NaCl 促进分层后, 用蒸馏水洗脱, 再经无水 Na_2SO_4 过滤至圆底烧瓶中, 暗室中减压旋转蒸干, 加正己烷 $2\ \text{mL}$, 经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 进液相进行分析。

2.4.2 超声提取法: 准确称取样品 $1.0\ \text{g}$, 加入 $50\ \text{mL}$ 石油醚: 丙酮 (1:1), 在 20°C 条件下, 以 $50\ \text{W}$ 功率超声 $30\ \text{min}$ 。提取液按上述方法处理后, 进液相进行分析。

2.4.3 ASE 法: 准确称取样品 $0.5\ \text{g}$, 置于 $34\ \text{mL}$ 不锈钢萃取池中, 以石油醚: 丙酮 (1:1) 为提取溶剂, 提取 1 次, 提取时间 $10\ \text{min}$ 。将提取液按上述方法处理后, 进液相进行分析。

2.5 ASE 法提取枸杞子中 β -胡萝卜素条件的优化

本实验分别考察了提取溶剂、提取时间、提取次数和称样量这 4 个因素对枸杞子中 β -胡萝卜素提取含量的影响, 以 β -胡萝卜素提取含量为考察指标, 并通过单因素试验的结果, 确定每个因素的 3 个水平, 以 $L_9(3^4)$ 正交试验设计对 ASE 法提取枸杞子中 β -胡萝卜素的条件进行优化。正交试验因素水平表见表 1。

表 1 枸杞子中 β -胡萝卜素正交试验因素水平表

水平	A 提取溶剂	B 称样量/g	C 提取时间/min	D 提取次数
1	石油醚: 丙酮 (1:1)	0.2	10	1
2	石油醚: 丙酮 (1:2)	0.5	15	2
3	石油醚: 丙酮 (2:1)	0.8	20	3

3 结果与分析

3.1 枸杞子中 β -胡萝卜素不同提取方法的比较

由实验得出, 3 种不同的提取方法提取枸杞子中 β -胡萝卜素含量 ($n=5$) 分别为: 超声提取法 (14.8988 ± 0.2580) $\mu\text{g}/\text{g}$, 溶剂浸提法 (19.8480 ± 0.3126) $\mu\text{g}/\text{g}$, ASE 法 (126.9668 ± 1.1130) $\mu\text{g}/\text{g}$ 。对 β -胡萝卜素含量的影响由高到低顺序为: ASE > 溶剂浸提 > 超声提取法。其中, ASE 作为一种新的提取方法提取效果最好, 提取时间少, 只用了 $10\ \text{min}$, 且所用的实验材料只用了 $0.5\ \text{g}$, 而其他两种方法提取都用了 $1\ \text{h}$, 且实验材料用了 $1\ \text{g}$ 。所以本实验采用 ASE 对枸杞子中 β -胡萝卜素的提取条件进行优化。

3.2 单因素试验

3.2.1 提取溶剂的选择: 准确称取枸杞子样品 $0.5\ \text{g}$, 分别用石油醚: 丙酮 (1:0)、(1:1)、(1:2)、(2:1) 作为提取溶剂, 常温下静态萃取 $10\ \text{min}$, 提取 1 次, 考察不同提取溶剂对 β -胡萝卜素提取效果的影响。结果见图 1。

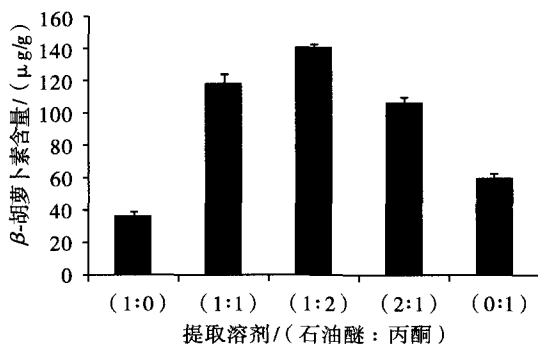


图 1 提取溶剂对 β -胡萝卜素提取效果的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

由图1可知,只用石油醚或丙酮做提取溶剂时,提取效果不好,当用石油醚:丙酮(1:2)做提取溶剂时,效果最好。故选择石油醚:丙酮(1:2)做提取溶剂。

3.2.2 称样量的选择:分别称取枸杞子鲜样0.2、0.5、0.8、1.5和2.0 g,用石油醚:丙酮(1:1)作为提取溶剂,常温下快速萃取10 min,提取1次,考察不同料液比对 β -胡萝卜素提取效果的影响。结果见图2。

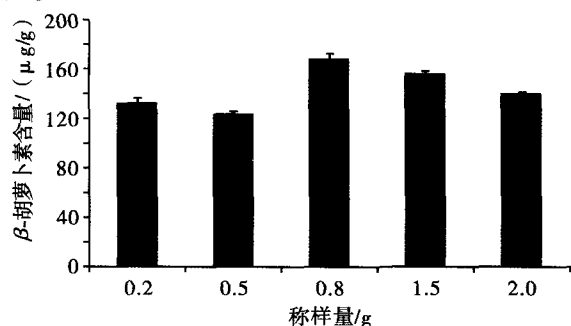


图2 称样量对 β -胡萝卜素提取效果的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)

由图2可知,当称样量为0.8 g时,提取效果最好。其原因可能是当称样量过小时,部分样品被硅藻土吸附后造成一定损失;称样量过大时,萃取不完全。故选择0.8 g的称样量。

3.2.3 提取时间的选择:准确称取枸杞子鲜样0.5 g,用石油醚:丙酮(1:1)作为提取溶剂,常温下分别萃取5、10、15、20、25、30 min,提取1次,考察不同提取时间对 β -胡萝卜素提取效果的影响。结果见图3。

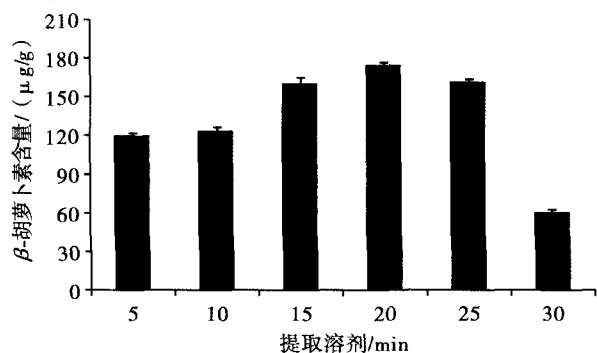


图3 提取时间对 β -胡萝卜素提取效果的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)

由图3可知, β -胡萝卜素的提取含量随着提取时间的延长而增加,在20 min时提取效果最好,超过20 min后,提取效果下降,其原因可能是 β -胡萝卜素本身不稳定,随着时间的延长, β -胡萝卜素的氧化程度也随之增加。故选择提取时间为20 min。

3.2.4 提取次数的选择:准确称取枸杞子鲜样0.5 g,用石油醚:丙酮(1:1)作为提取溶剂,常温下快速萃取10 min,分别提取1、2、3、4次,考察不同提取时间对 β -胡萝卜素提取效果的影响。结果见图4。

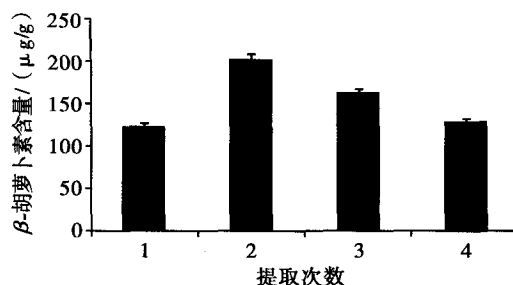


图4 提取次数对 β -胡萝卜素提取效果的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)

由图4可知,当提取次数为2次时,提取效果最好,提取次数大于2次时,含量反而下降,其原因可能是随着提取次数的增多,其他成分也不断溶出,故提取次数选择为2次。

3.3 正交试验 根据以上单因素试验的结果,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计对枸杞子中 β -胡萝卜素提取条件进行优化。正交试验结果见表2,方差分析结果见表3。由表2可知,影响枸杞子中 β -胡萝卜素提取效果各因素主次顺序为:D(提取次数) $>$ A(提取溶剂) $>$ C(提取时间) $>$ B(称样量),由表3可知,各因素对 β -胡萝卜素提取率的影响均未达到显著水平,结合单因素试验结果,得到最佳提取工艺组合为: $A_2B_3C_3D_2$,即称样0.8 g,石油醚:丙酮(1:2)作为提取溶剂,提取20 min,循环2次。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验表及结果

试验号	A	B	C	D	β -胡萝卜素含量/($\mu\text{g/g}$)
1	3	2	1	3	109.34
2	3	3	2	1	110.79
3	2	1	2	3	173.22
4	2	3	1	2	165.22
5	2	2	3	1	125.18
6	1	3	3	3	176.79
7	1	1	1	1	101.40
8	3	1	3	2	155.54
9	1	2	2	2	156.41
K_1	434.6	430.2	375.9	337.4	
K_2	463.6	390.9	440.4	477.2	
K_3	375.7	452.8	457.5	459.4	
R	87.95	61.87	81.55	139.80	

表3 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	1338.901	2	669.450	2.050	0.328
B	653.273	2	326.637	1	-
C	1233.062	2	616.531	1.888	0.346
D	3860.079	2	1930.040	5.909	0.145

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$

3.4 工艺验证 按照上述优化的最佳工艺条件,制备6份供试品进行测量,其均值为208.17 $\mu\text{g/g}$,RSD

值为 2.29%。结果表明最佳工艺条件稳定、可靠。

4 小结和讨论

加速溶剂萃取技术是近年来发展起来的一种全新的萃取方法,已被美国国家环保局批准为 EPA3545 号标准方法。ASE 在环境、食品分析等领域已有广泛应用,虽然该仪器存在着成本高,对操作者要求较高等一些缺点,但是由于其快捷、高效、自动化程度高等突出优点,必然会展现出更强的生命力。本研究将 ASE 与传统的提取方法相比较,结果 ASE 的提取效果最佳,也进一步证实了该方法的优势。

在优选工艺时,极差分析结果中,提取溶剂(A)、料液比(B)、提取时间(C)与提取次数(D)四个因素对 β -胡萝卜素的提取率的影响不显著。分析原因,可能是由于因素选择梯度过小,造成其实

验点过于集中,差异性不明显。实验结果得出最佳提取工艺为:称样 0.8 g,石油醚:丙酮(1:2)作为提取溶剂,提取 20 min,循环 2 次,得到 β -胡萝卜素含量为 208.17 $\mu\text{g/g}$ 。验证试验结果表明,此工艺条件可用于 β -胡萝卜素的提取,方法稳定可靠。

参 考 文 献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 下册. 上海:上海科学技术出版社,1996:1518-1520.
- [2] 张博,刘武,郭强,等. β -胡萝卜素提取工艺的研究进展[J]. 化工科技市场,2009,32(4):34-37.
- [3] Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, et al. Accelerated Solvent Extraction: a Technique for Sample Preparation[J]. Anal Chem, 1996, 68:1033-1039.
- [4] 牟世芬,刘勇建. 加速溶剂萃取的原理及应用[J]. 现代科学仪器,2001,(3):18-20.

UPLC 法同时测定益髓生血颗粒中 9 种成分的含量

孙玉雯,张 莹,刘起华,文 谨,吴志奎*

(中国中医科学院广安门医院,北京 100053)

摘要 目的:建立 UPLC 法同时测定益髓生血颗粒中没食子酸、马钱苷、二苯乙烯苷、槲皮素、补骨脂素、异补骨脂素、芒柄花素、大黄素、大黄素甲醚 9 种成分的含量。方法:采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm),乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱,流速 0.25 mL/min,柱温 30℃,检测波长 254 nm。结果:没食子酸、马钱苷、二苯乙烯苷、槲皮素、补骨脂素、异补骨脂素、芒柄花素、大黄素、大黄素甲醚线性范围分别为 0.00565 ~ 0.0339 μg ($r_1 = 0.9998$)、0.03616 ~ 0.10848 μg ($r_2 = 0.9995$)、0.0101 ~ 0.0505 μg ($r_3 = 0.9998$)、0.00182 ~ 0.009 μg ($r_4 = 0.9999$)、0.0065 ~ 0.0325 μg ($r_5 = 1.0000$)、0.0088 ~ 0.044 μg ($r_6 = 1.0000$)、0.00083 ~ 0.00415 μg ($r_7 = 0.9998$)、0.00159 ~ 0.00795 μg ($r_8 = 0.9999$)、0.00392 ~ 0.02352 μg ($r_9 = 0.9993$)。平均加样回收率分别为 98.97% (RSD = 1.12%)、99.12% (RSD = 1.08%)、101.01% (RSD = 2.31%)、101.98% (RSD = 0.99%)、102.13% (RSD = 1.28%)、100.92% (RSD = 2.46%)、99.72% (RSD = 1.92%)、99.08% (RSD = 0.87%)、100.35% (RSD = 2.19%)。结论:该方法方便、稳定、可靠,可用于益髓生血颗粒的质量控制。

关键词 益髓生血颗粒;UPLC;质量控制

中图分类号:R286.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-4454(2013)07-1171-03

地中海贫血是世界范围内发病率最高、危害最大的单基因遗传病。目前西方医学尚无确切有效的治疗方法及药物。益髓生血颗粒(YSSXG)是吴志奎教授根据中医“肾生髓、髓生血”理论创制的、具有我国自主知识产权的、唯一用于治疗地中海贫血的中药制剂,具有滋阴补肾、益髓生血、补气健脾之功效。本课题组依托多项国家课题和基金的资

助,在我国广西南宁地贫高发区开展临床研究近 30 年,取得肯定的可重复的临床疗效^[1-4]。该药由山茱萸、何首乌、熟地黄、炙黄芪、党参、当归、补骨脂、鸡血藤、阿胶、鳖甲、砂仁等 11 味中药组成,成分复杂,该制剂目前的质量控制方法为薄层色谱法,前期研究报道的益髓生血颗粒质量控制指标也仅限于一两个成分的含量测定^[5],对于组方如此复杂

收稿日期:2013-02-01

基金项目:中药新药大平台研发品种(2009ZX0931-005-2-7);国家“973”计划(2010CB530406);国家自然科学基金(81173167)

作者简介:孙玉雯(1979-),女,博士,主管中药师,主要从事中药新制剂及药效物质基础研究;Tel:13146186904,E-mail:980925204@qq.com。

* 通讯作者:吴志奎,Tel:010-88001149,E-mail:gamwuzhikui@sina.com。