

球磨粉碎技术对刺五加中有效成分提取的影响

霍金海, 贺小雪, 张 瑞, 王伟明*

黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036

摘 要: **目的** 考察球磨粉碎技术对刺五加中有效成分提取的影响。**方法** 采用超声、冷浸法处理, 以紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶质量分数为指标, 采用高效液相色谱法比较了不同处理时间的刺五加球磨粉、粗粉、中粉和细粉。**结果** 随着粉碎粒度的变细, 刺五加中有效成分提取率明显提高, 球磨粉 - 超声 > 球磨粉 - 冷浸 > 细粉 - 超声 > 中粉 - 超声 > 粗粉超声 > 中粉 - 冷浸 > 细粉 - 冷浸 > 粗粉 - 冷浸。其中球磨粉超声 60 min 与常规粉碎的粗粉、中粉及细粉超声 60 min 对比, 紫丁香苷提高 11.05%~56.56%、刺五加苷 E 提高 26.04%~114.74%、异嗪皮啶提高 24.10%~84.64%。**结论** 球磨粉碎技术能够有效地提高刺五加中有效成分的提取率和提取速率, 缩短样品前处理时间, 值得推广应用。

关键词: 刺五加; 球磨粉碎; 紫丁香苷; 刺五加苷 E; 异嗪皮啶; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2014)02-0154-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.02.011

Effect of ball pulverizing technology on extraction of effective constituents in *Acanthopanax Senticosi Radix et Caulis*

HUO Jin-hai, HE Xiao-xue, ZHANG Rui, WANG Wei-ming

Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China

Abstract: **Objective** To study the effect of ball pulverizing technology on extraction of the effective constituents in *Acanthopanax Senticosi Radix et Caulis*. **Methods** Ultrasonic and cold leaching extract methods were used by using syringoside, eleutheroside E, and isofraxidin contents as indexes, and the ball pulverizing powder, coarse powder, middle powder, and fine powder treated in different times were compared by HPLC method. **Results** As the particle size was becoming finer, the leaching of the effective component in *Acanthopanax Senticosi Radix et Caulis* was increased remarkably, namely ball pulverizing - ultrasonic > ball pulverizing-cold leaching > fine powder - ultrasonic > powder - ultrasonic > coarse powder - ultrasonic > powder-cold leaching > fine powder-cold leaching > coarse powder-cold leaching. Among them syringin increased 11.05% - 56.56%, eleutheroside E 26.04% - 114.74%, and isofraxidin 24.10% - 84.64%. **Conclusion** Ball pulverizing technology could effectively promote the extraction of the effective constituents in *Acanthopanax Senticosi Radix et Caulis*, shorten the sample preparation time, which could be worthy of popularization and application.

Key words: *Acanthopanax Senticosi Radix et Caulis*; ball pulverizing; syringoside; eleutheroside E; isofraxidin; HPLC

球磨粉碎技术作为微粉化技术重要组成之一, 是近几十年发展起来的一门高新技术, 已广泛应用于冶金、陶瓷、纺织、食品、医药、化妆品和航空等领域^[1], 一般在 1~40 μm 。还可以应用于材料的亚微米级研磨, 用于机械合金的制备^[2]。根据中药物料的特点, 目前比较公认的中药微粉粒径为 0.1~

75 μm , 粒度分布中心 D_{50} 为 10~15 μm ^[3]。球磨粉碎技术是一种高效超微粉碎技术, 可实现亚微米甚至纳米级别的粉碎, 联合冷冻研磨技术, 特别适合一些对热敏感及黏性较大的药材, 也可以进行生物细胞破碎和 DNA、RNA 提取。不仅可以用于理化分析样品的前处理, 也可用于制药工程领域, 提高

收稿日期: 2013-09-03

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项 (2010ZX09102-138); 黑龙江省科技攻关项目 (WB10B112)

作者简介: 霍金海 (1981—), 男, 哈尔滨人, 助理研究员, 硕士, 研究方向为中药药效物质基础及质量控制。

Tel: (0451)55665478 E-mail: jinhaihuo@126.com

*通信作者 王伟明 (1966—), 女, 哈尔滨人, 研究员, 博士, 研究方向为中药新药研发。Tel: (0451)55665478 E-mail: zyyjy@163.com

质地坚硬药材有效成分提取率。因此,目前国内从事中药研究的大学、科研院所,尤其是药品检验机构基本配备了混合振荡球磨机,但关于其应用的研究报道较少^[4-6]。

刺五加是典型质地坚硬药材,粉碎过程费时费力,粉碎不均匀可影响分析结果,且有效成分提取困难,《中国药典》2010 年版一部“刺五加膏”项下规定刺五加水浸膏需煎煮 2 次,每次 3 h,乙醇浸膏需回流提取 12 h。因此,本实验以刺五加为研究对象,考察球磨粉碎与常规粉碎对有效成分提取率、提取速率的影响,探讨其应用特点,为球磨粉碎技术在中药研究领域的合理应用提供实验依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

MM400 型混合球磨机,包括不锈钢研磨罐(容积 50 mL)、不锈钢研磨球(直径 25 mm)(德国莱驰公司);AF—04A 密封型摇摆式中药粉碎机(奥力中药机械有限公司);2010CH 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);KQ—300DB 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司);BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 试药

紫丁香苷(批号 111574-200201)、刺五加苷 E(批号 111713-200502)、异嗪皮啶(批号 110837-200304)对照品均由中国食品药品检定研究院提供;刺五加药材购于哈尔滨市三棵树药材市场,经黑龙江省中医药科学院王伟明研究员鉴定为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根及根茎。磷酸、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材粉碎处理

取刺五加药材 50 g,置混合球磨机中粉碎,研磨速度为 1 500 r/min,研磨时间为 3 min。出料的粒径<10 μm。

同一批刺五加药材 50 g,共 3 份,置摇摆式中药粉碎机中,分别粉碎成粗粉、中粉、细粉。出料的粒径均符合《中国药典》2010 年版一部凡例要求。

2.2 色谱条件

Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液梯度洗脱,洗脱程序见表 1;体积流量:1.0 mL/min;检测波长:

220 nm;柱温:30 ℃。理论塔板数按紫丁香苷峰计应不低于 10 000,异嗪皮啶峰与相邻杂质峰的分离度应不小于 1.5。

表 1 流动相的梯度洗脱

Table 1 Gradient elution of mobile phase

<i>t</i> / min	乙腈/%	0.1%磷酸溶液/%
0~20	10→20	90→80
20~30	20→25	80→75
30~40	40	60
40~50	10	90

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取紫丁香苷对照品 4.16 mg、刺五加苷 E 对照品 4.48 mg、异嗪皮啶对照品 1.64 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取刺五加各处理方法的球磨粉、粗粉、中粉、细粉约 1.25 g,各 5 份,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,分别超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz)或冷浸 5、10、20、30、60 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.4 样品测定

精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液各 10 μL 注入色谱仪,记录色谱图,结果见图 1。

2.5 不同处理方法的提取结果比较

制备供试品溶液,按以上色谱条件对各样品进行测定,结果见图 2。

可以看出刺五加中 3 种有效成分整体的提取率均为球磨粉-超声>球磨粉-冷浸>细粉-超声>中粉-超声>粗粉-超声>中粉-冷浸>细粉-冷浸>粗粉-冷浸。球磨粉超声或冷浸均能提高有效成分提取率,其中球磨粉超声 60 min 与常规粉碎的粗粉、中粉及细粉超声 60 min 对比,紫丁香苷提高 11.05%~43.44%、刺五加苷 E 提高 26.04%~82.97%、异嗪皮啶提高 24.10%~39.75%;球磨粉冷浸 60 min 与常规粉碎的粗粉、中粉及细粉冷浸 60 min 对比,紫丁香苷提高 44.65%~56.56%、刺五加苷 E 提高 68.30%~114.74%、异嗪皮啶提高 65.20%~84.64%;球磨粉冷浸 5 min 时的提取率(0.468 9 mg/g)即可达到粗粉超声 30 min 处理效果

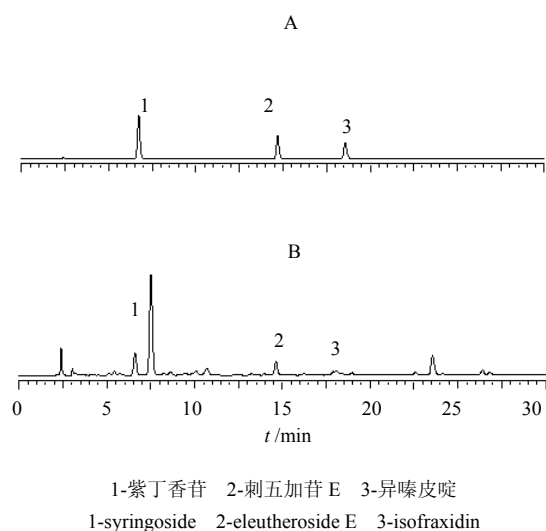


图 1 混合对照品(A)和刺五加粗粉超声 30 min 供试品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *Acanthopanax Senticosi Radix et Caulis* sample coarse powder-ultrasonic for 30 min (B)

(0.350 4 mg/g)。而球磨粉超声处理 30 min 时紫丁香苷的提取率达到 0.609 9 mg/g,《中国药典》2010 年版规定紫丁香苷不得少于 0.500 0 mg/g^[9]。因此球磨粉碎的刺五加样品测定结果合格,而按药典规定的粗粉样品测定结果不合格(0.350 4 mg/g)。说明球磨粉碎技术能够有效促进刺五加中有效成分的提取率和提取速率,缩短样品前处理时间,值得推广应用。

3 讨论

粉碎粒度是影响中药材含量测定的重要因素之一。目前国内许多研究及检验机构均采用球磨粉碎技术制备中药样品,达到省时方便的目的,但很少关注其对含量测定结果的影响。为防止多中心检验同一样品的结果不一致,甚至结论不一致,笔者建议应严格遵守《中国药典》2010 年版凡例要求处理样品。通过上述实验证实球磨粉碎技术能够促进中药有效成分提取,缩短样品制备时间。相信随着在中药研究领域的应用和推广,更多的基于球磨粉碎技术的样本处理方法能够得到认可。

本研究证实细粉在超声波辅助下,也难以达到球磨粉碎冷浸的效果,可能超声波也无法使质地坚硬药材细胞完全破壁,且细粉的粉碎过程非常困难。因此球磨粉碎技术在样品前处理中具有常规粉碎及超声提取不可替代的优势。实验过程中发现,冷浸

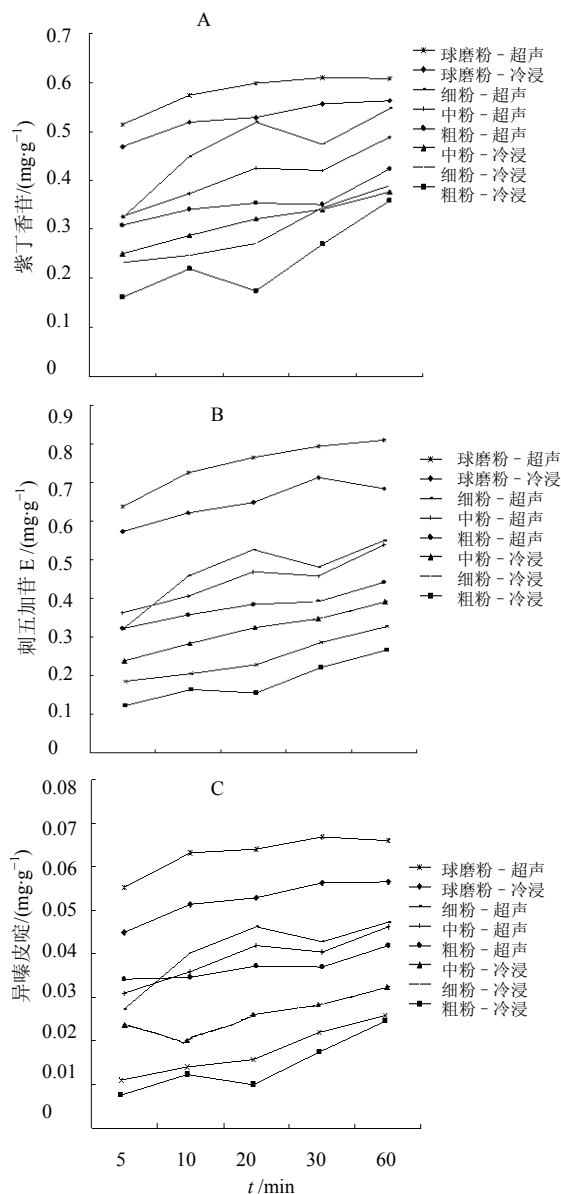


图 2 紫丁香苷 (A)、刺五加苷 E (B) 和异嗪皮啶 (C) 的变化

Fig. 2 Changes of syringoside (A), eleutheroside E (B), and isofraxidin (C)

法细粉含量低于中粉含量,这可能是细粉虽然很细,但未达到细胞破壁,有效成分溶出较慢,细粉对其有一定吸附作用,致使样品内外形成浓度差,20 min 以内难以扩散平衡,含量反而低于中粉,而球磨粉 5 min 即可达到较高含量,从另一侧面反映了球磨粉碎技术的优势。

对于球磨粉碎是否存在增加相关物质甚至毒性物质溶出的问题,本研究观察了不同粒度及处理时间刺五加样品 HPLC 色谱图,未发现球磨粉有新的

色谱峰产生,这可能与检测的灵敏度有关,仍需采用 UPLC-MS 等检测手段深入研究。另外,仍需对球磨粉碎与常规粉碎在药理药效学、指标成分稳定性、生物利用度等指标上进行比较,进一步阐明药材经球磨粉碎微粉化后对产品质量和临床疗效的影响,推动球磨粉碎技术在中药研究领域的应用,发展粉体技术与中药学相交叉的新领域。

参考文献

- [1] 徐月红,王宁生. 中药微粉化的现状与分析 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 487-500.
- [2] 尹艳红,朱应禄. 机械力化学及其发展趋势 [J]. 冶金丛刊, 2008(6): 37-39.
- [3] 陈 力,吴懿平. 微米中药及其制备技术 [J]. 中草药, 2002, 33(10): 865-868.
- [4] 王学鑫,王潮霞. 行星球磨机制备甘草超细粉及其抗菌性能 [J]. 中国粉体技术, 2010, 16(6): 36-38.
- [5] 徐秀丽,张明春,张 旭,等. 微粉化对淫羊藿叶中淫羊藿苷提取效果的研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 3029-3030.
- [6] 刘开永,张 敏,李道敏,等. 微粉化穿心莲中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的溶出特性 [J]. 中成药, 2010, 32(4): 673-675.
- [7] 孟祥才,颜丙鹏,孙 晖,等. 刺五加不同药用部位及不同组织有效成分含量比较研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 1899-1900.
- [8] 张崇禧,张 倩,蔡恩博,等. HPLC 比较刺五加茎与短梗五加茎中紫丁香苷及异嗪皮啶的含量 [J]. 中成药, 2010, 32(2): 254-256.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 192.