

确定污染物的位置。3种孔径的膜污染后表面的SEM图见图3。可以看出,3种膜表面都有不同程度的污染。0.8 μm 孔径的氧化铝膜污染非常严重,膜表面已覆盖满了污染物,看不到膜面结构,膜孔完全被堵塞,污染物成块状堆积,在这种情况下,药液必

然难以通过,通量下降严重,同时固形物和有效成分截留率高,与前面的实验结果一致。0.2 μm 孔径的氧化铝膜表面污染较轻,大颗粒(颗粒粒径在10 μm 左右)的污染物散落于膜面,大部分膜面只有小颗粒的嵌入,膜孔并未被完全堵塞。

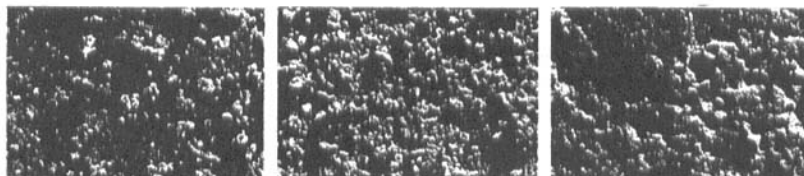


图3 0.2 μm (A)、0.8 μm (B)和50 nm (C)孔径 Al_2O_3 污染膜表面 SEM 图

Fig. 3 Top view of fouling membrane with pore sizes of 0.2 μm (A), 0.8 μm (B), and 50 nm (C)

3 结论

通过对清络通痹水提液分别以不同孔径氧化铝膜滤过过程中污染机制的分析,初步得出以下结论。

3.1 综合膜的渗透性能(包括渗透通量和成分保留率)和污染情况,对于本研究体系,孔径为0.2 μm 氧化铝膜较为适用,有较高的稳定通量和较高的成分保留率,同时污染较轻。0.8 μm 的膜虽然孔径比0.2 μm 的膜大,但是固体颗粒容易阻塞孔口,污染严重,通量反而低。

3.2 从不同孔径的氧化铝膜滤过清络通痹时的阻力分布和污染物位置分析可以看出:对于孔径为50 nm、0.2 μm 、0.8 μm 的氧化铝膜,浓差极化阻力和表面沉积阻力是主要滤过阻力。0.8 μm 孔径膜的浓差极化阻力占主导地位,接近总阻力的90%。随着膜孔径的减小,浓差极化阻力也减小,表面沉积阻力逐渐增大。膜自身阻力所占比例都不大;SEM显示,膜表面都有不同程度的污染。0.8 μm 孔径氧化铝膜表面污染严重,污染物大量堆积在膜表面,几乎覆盖了所有膜孔。0.2 μm 和50 nm 孔径膜污染相对较

轻。本体系的膜阻力在总阻力中所占比例较小,可逆阻力为主要阻力,因此,优化膜过程工艺参数、采用适当清洗方法可以减少膜的污染,使膜的性能有较大恢复。

References:

- [1] Liu T S, Guo L W, Zhou X P. Comparative study on purifying the decoction of Qingluotongbi Compound respectively by 6 kinds of techniques such as ceramic membrane microfiltration and macroporous resin absorption [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 26 (4): 271-274.
- [2] Dong J, Yuan Y, Guo L W. Optimism of refined process of Qingluotongbi Granule with inorganic membrane [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 2004, 20 (2): 99-101.
- [3] Wang S, Jia Y T, Sun Y Y. Studies on quantitative determination of flavonoids in the flavonoids of the composite Chinese material medical preparation [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 1996, 11 (2): 95-96.
- [4] Huang Z T, Zeng Z H, Zhong B K. *Inorganic Membrane Separation Technology and Application* (无机膜技术及其应用) [M]. Beijing: China Petrochemical Press, 1999.
- [5] Shi J, Yuan Q, Gao C J. *Handbook of Membrane Technology* (膜技术手册) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001.

牛膝蜕皮甾酮的加速溶剂提取法研究

汪家权^{1,2}, 赵民军², 林 岚², 柴婴蕾², 曾 苏¹

(1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310031; 2. 浙江养生堂天然药物研究所, 浙江 杭州 310007)

摘要:目的 采用加速溶剂提取法提取牛膝中的蜕皮甾酮,探讨其在中药质量控制中应用的可行性。方法 以蜕皮甾酮为指标成分,采用RP-HPLC为检测方法,单因素考察法对影响加速溶剂提取牛膝中的蜕皮甾酮的因素进行考察。结果 优选出了牛膝中蜕皮甾酮加速溶剂提取的最佳条件:以无水甲醇为溶剂,药材的粒径为0.3~0.45

收稿日期:2005-02-24

作者简介:汪家权(1971—),男,湖北省随州市人,工程师,1994年毕业于武汉大学,获理学学士学位,长期从事中药新药研究工作。

Tel: (0571) 87631197 Fax: (0571) 87631202 E-mail: jqwang@mail.yst.com.cn

mm, 提取温度为 100 ℃, 提取压力 10.34 MPa, 提取时间 6 min, 提取 1 次。结论 加速溶剂提取技术能够快速高效地提取牛膝中的蜕皮甾酮。

关键词: 牛膝; 蜕皮甾酮; 加速溶剂提取; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)12-1797-04

Accelerated solvent extraction of ecdysterone from *Achyranthes bidentata*

WANG Jia-quan^{1,2}, ZHAO Min-jun², LIN Lan², CHAI Ying-lei², ZENG Su¹

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China;

2. Zhejiang Yangshengtang Natural Medicine Institute, Hangzhou 310007, China)

Abstract: Objective To apply accelerated solvent extraction (ASE) technique to extract *Achyranthes bidentata* and to explore the application of this technique in quality control of Chinese materia medica.

Methods Investigation of single factor was used to optimize the conditions that affected the efficiency for ASE from *A. bidentata* by RP-HPLC using ecdysterone as a quantitative marker. **Results** The optimized conditions for ASE of *A. bidentata* were obtained as follows: methanol as solvent, particle size between 0.3 and 0.45 mm, temperature at 100 ℃, pressure under 10.34 MPa, 6 min duration and once extraction.

Conclusion ASE technique can be used to extract *A. bidentata* quickly and effectively.

Key words: *Achyranthes bidentata* Bl.; ecdysterone; accelerated solvent extraction (ASE); HPLC

牛膝为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根, 具有补肝肾、强筋骨、逐瘀通经、引血下行之功效^[1]。其主要成分有三萜皂苷类、多糖类、肽类、甾酮类等^[2], 甾酮类主要有蜕皮甾酮、牛膝甾酮和红苋甾酮等。对牛膝药材的提取多采用回流提取的方法: 无水乙醇 90 ℃ 回流提取 2 h^[3], 无水乙醇回流提取 16 h^[4], 75% 乙醇回流提取^[5]。但样品处理过程时间长。

加速溶剂提取技术 (accelerated solvent extraction, ASE) 是 1995 年提出的一种从固体和半固体基质中提取分析物的提取技术^[6]。它是将待提取样品置于烘箱里的不锈钢池中, 在高温、高压条件下样品被有机溶剂提取, 具有提取时间短、溶剂消耗少、提取效率高、操作自动化程度高等特点, 已经广泛地应用于环境、食品及药品检测等领域。已有报道采用加速溶剂提取方法来提取三七皂苷类成分^[7]。本实验采用蜕皮甾酮为检测指标, 对牛膝的加速溶剂提取方法进行了研究, 同时与索氏提取法进行比较, 以期改进牛膝有效成分检测中的样品处理方法。

1 仪器与试剂

ASE300 加速溶剂提取器 (美国 Dionex 公司), Agilent 1100 LC/DAD 高效液相色谱仪 (含在线真空脱气机、四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二级管阵列检测器、HP Chemstation 色谱工作站), 索氏提取器。

甲醇 (Merck, 色谱纯), 甲酸、乙醇 (分析纯), 蜕皮甾酮对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号为 111638-200301), 牛膝药材购自河北安国, 经胡庆余

堂中药博物馆袁树范高级工程师鉴定。

2 方法与结果

2.1 蜕皮甾酮的 HPLC 测定

2.1.1 色谱条件: 色谱柱: Agilent Zorbax Extend C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 甲酸 (A) 与甲醇 (B); 梯度洗脱条件: 0~5 min (95% A, 5% B), 5~60 min (95%~0% A, 5%~100% B); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 25 ℃。

2.1.2 标准曲线的制备: 取蜕皮甾酮对照品适量, 用 50% 甲醇溶解成质量浓度为 3 mg/mL 的储备液。以此储备液配制成质量浓度不同的系列溶剂, 质量浓度在 0.02~1 mg/mL。分别取 10 μL 进行 HPLC 分析, 记录峰面积值。以蜕皮甾酮质量浓度对其色谱峰峰面积作图, 按最小二乘法计算获得标准曲线为 $Y=10\,073.6 X-2.32$, $r=0.999\,8$ 。

2.1.3 测定: 取加速溶剂提取的样品溶液, 冷却, 滤过。滤液在 60 ℃ 水浴中真空旋转蒸发回收乙醇并浓缩至近干, 冷却。另 50% 甲醇 50 mL 溶解, 用 0.45 μm 滤膜滤过。取滤液 10 μL 进行 HPLC 分析, 以保留时间定性, 将峰面积代入标准曲线, 计算蜕皮甾酮的质量分数。

2.2 提取参数优化: 影响加速溶剂提取的因素有很多, 主要包括药材的材质、药材粉末的颗粒大小、提取溶剂、提取时间、提取温度、提取溶剂的体积、提取次数、提取压力等。在本实验中, 主要采用单因素考察方法对各因素对提取效率的影响进行了分析。药材的材质在本实验中是无法改变的。ASE300 的提

取压力因为固定在 10.34 MPa,不能改变,因此不做考察。

ASE 的基本提取条件设置为压力 10.34 MPa、温度 80 ℃、加热时间 10 min、静态提取时间 10 min、冲洗体积 60%、氮气吹干时间 150 s、提取次数 1 次。当考察某因素时,只改变该因素的条件,其他为考察后的最佳条件。

2.2.1 药材的粒径:药材的粒径直接决定了药材的比表面积,比表面积越大,与溶剂接触就越充分,同时药材的粒径也影响到溶剂向药材颗粒中的扩散程度。实验中选用无水甲醇作溶剂,考察了 5 种不同粒径对提取效率的影响。5 种粒径分别为大于 10 目(>2 mm)、10~20 目(0.9~2 mm)、20~40 目(0.45~0.9 mm)、40~60 目(0.3~0.45 mm)和小于 60 目(<0.3 mm)。结果见表 1。在提取实验中,按药材与硅藻土的质量比为 1:2 的比例将药材粉末与硅藻土混合均匀后提取,这样既可以解决装量问题,又可以防止药材粉末在提取过程中板结而使提取效率降低。表 1 结果显示:药材粉末越细,提取效率越高。但<0.3 mm 样品的收集瓶中有很多药材的粉末,说明过细的药材粉末可穿过提取池的底过滤板,这样极易造成管路的堵塞。因此选择 40~60 目(0.3~0.45 mm)粒径的药材粉末是适宜的。

表 1 粒径对蜕皮甾酮提取效率的影响 (n=3)

Table 1 Effect of particle sizes on extraction efficiency of ecdysterone (n=3)

粒径/mm	蜕皮甾酮/(mg·g ⁻¹)	粒径/mm	蜕皮甾酮/(mg·g ⁻¹)
>2	0.408	0.3~0.45	1.492
0.9~2	0.488	<0.3	1.841
0.45~0.9	1.040		

2.2.2 提取溶剂:溶剂是影响提取效率的重要因素。采用水、甲醇和不同体积分数乙醇提取漏芦中蜕皮甾酮时,甲醇的提取效率最佳^[8];采用 95%乙醇提取华麻花头中蜕皮甾酮的效果最佳^[9]。实验选择水、甲醇和 40%乙醇、60%乙醇、80%乙醇、无水乙醇作为提取溶剂分别进行了考察。选用 40~60 目药材粉末。结果见表 2。可以看出,用水和甲醇作为溶剂从牛膝中提取蜕皮甾酮的提取效率佳,且两种溶剂之间差别不大。但以乙醇作为提取溶剂时提取效率差,并随乙醇体积分数的增加而提取效率也随之降低。以水作为提取溶剂时,提取液浑浊,后续过程难以处理,同时提取后的药材呈糊状,有一定体积的提取液滞留在提取池中,这样会造成结果有较大的误差。因此采用甲醇作为提取溶剂。

2.2.3 提取温度:温度是影响加速溶剂提取的重要

表 2 溶剂对蜕皮甾酮提取效率的影响 (n=3)

Table 2 Effect of solvent on extraction efficiency of ecdysterone (n=3)

溶剂	蜕皮甾酮/(mg·g ⁻¹)	溶剂	蜕皮甾酮/(mg·g ⁻¹)
水	1.427	60%乙醇	0.783
甲醇	1.442	80%乙醇	0.757
40%乙醇	0.821	无水乙醇	0.728

因素。温度越高,溶剂对提取物质的溶解度也在一定范围内增大,同时随着温度的升高溶剂分子的运动速度也加快,溶剂对药材的浸润穿透也随之加快。在一般采用甲醇提取时,因其沸点较低,不可能采用太高的温度。而加速溶剂提取是在高压密闭的容器中进行,溶剂仍然保持在液体状态。选用 40~60 目药材粉末,以甲醇为溶剂,对提取温度进行了考察,结果见表 3。可以看出,提取效率随温度的增加而提高,但当温度高于 100 ℃后提取效率基本一致。因此选择 100 ℃为提取条件。

表 3 温度对蜕皮甾酮提取效率的影响 (n=3)

Table 3 Effect of temperature on extraction efficiency of ecdysterone (n=3)

温度/℃	蜕皮甾酮/(mg·g ⁻¹)	温度/℃	蜕皮甾酮/(mg·g ⁻¹)
60	0.916	120	1.344
80	1.185	140	1.453
100	1.434		

2.2.4 提取时间:提取时间直接与样品中待提取成分向溶剂中扩散程度有关。传统的提取方法(如浸渍、索氏提取法)都需要较长的时间。加速溶剂提取具有高效、快速的特点,平均提取时间为 5~10 min,少于 15 min^[6]。实验选用 40~60 目的粉末,以甲醇为溶剂,提取温度为 100 ℃,对提取时间进行了考察,结果见表 4。可以看出,在考察的时间范围内,时间长短对提取效率的影响并不大。说明在高温高压条件下,在 6 min 内蜕皮甾酮已经在溶剂中达到平衡。因此选择 6 min 为静态提取时间。

表 4 提取时间对蜕皮甾酮提取效率的影响 (n=3)

Table 4 Effect of time on extraction efficiency of ecdysterone (n=3)

时间/min	蜕皮甾酮/(mg·g ⁻¹)	时间/min	蜕皮甾酮/(mg·g ⁻¹)
6	1.453	12	1.504
8	1.500	15	1.494
10	1.488		

2.2.5 提取次数:当提取的物质在溶剂中达到平衡时就需要添加新鲜的溶剂或更换溶剂提取,这样就需要增加提取次数。当提取物质在溶剂中的溶解度小或提取物的质量分数高时就需要增加提取次数以提取完全。选用 40~60 目的粉末,以甲醇为溶剂,提取温度 100 ℃,静态提取时间 6 min,对提取次数进

行考察,结果见表 5。可以看出,第 2 次提取和第 3 次提取的提取液中检测不出蜕皮甾酮。因此选择 1 次提取。

表 5 提取次数对牛膝中蜕皮甾酮提取效率的影响 ($n=3$)

Table 5 Effect of extraction times on extraction efficiency of ecdysterone ($n=3$)

提取次数	蜕皮甾酮/(mg · g ⁻¹)
1	1.452
2	—
3	—

2.3 与索氏提取法的比较:取干燥牛膝药材粉末(40~60 目)约 5 g,精密称定。置索氏提取器中,加入 100 mL 甲醇,加热回流提取 6 h,冷却,滤过。滤液在 60 ℃ 水浴中真空旋转蒸发回收甲醇并浓缩至近干,冷却。50% 甲醇 50 mL 溶解,用 0.45 μm 滤膜滤过。取滤液 10 μL 进行 HPLC 分析,以保留时间定性,用峰面积通过回归曲线来计算蜕皮甾酮的质量分数。同时按上述的优化条件进行加速溶剂提取(提取温度为 100 ℃、压力 10.34 MPa、提取时间 6 min、提取 1 次),与索氏提取器提取进行对比。两种提取方法各重复 5 次,结果见表 6。可以看出,加速溶剂提取和索氏提取相比较,不仅提取时间明显的缩短,而且提取效率有明显的提高,同时实验的重现性也有明显的改善。

表 6 不同提取方式对牛膝中蜕皮甾酮提取效率的影响

Table 6 Comparison of extraction efficiency of ecdysterone between ASE and Soxhlet extraction

提取方式	提取时间	蜕皮甾酮/(mg · g ⁻¹)	RSD/% ($n=5$)
索氏提取	6 h	1.094	7.6
ASE	6 min	1.458	2.5

3 讨论

多种植物中含有蜕皮甾酮。国内有学者用不同的提取方法和溶剂从植物中提取蜕皮甾酮,而在提取牛膝中的蜕皮甾酮时多采用乙醇。实验中对不同体积分数的乙醇提取进行考察时,发现提取效率不佳。这与文献报道采用水、甲醇和不同体积分数的乙醇提取漏芦中蜕皮甾酮时的结果一致。在实验中水和甲醇的提取效率相当,但以水作为提取溶剂时后续样品处理要比以甲醇为提取溶剂时复杂得多。

建议在测定牛膝中蜕皮甾酮时采用甲醇作为提取溶剂。

在加速溶剂提取法中,温度、压力和溶剂是影响提取效率的主要因素。在高压的密闭容器里,由于压力的提高,使得提取温度可以在高于常压下溶剂的沸点的温度下进行,而溶剂仍为液态,这样不仅可选择溶剂种类多,并且液体对溶质的溶解能力也远大于气体。压力和温度的增加,有利于提高提取物的溶解能力,降低样品基质与提取物的作用力,降低溶剂的黏度使溶剂分子更易向物质内部扩散,这使提取效率大大提高,也减少了提取时间和提取次数。

采用单因素法考察了多种因素对牛膝加速溶剂提取法的影响,通过提取因素的优化,使蜕皮甾酮的提取效率有了很大的提高。加速溶剂提取法与传统的索氏提取法相比较,不仅提取效率有较大的提高,而且重现性也有明显的改善。这可能与 ASE 的升温时间、温度、溶剂量等条件可精确控制有关。同时 ASE 在节约能源和溶剂方面都有优势,是值得提倡的。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [3] Wang Y Y, Zhang Z J. Study on the fingerprints of *Achyranthes bidentata* Bl. by HPLC/UV/MS [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2003, 26 (11): 787-789.
- [4] Ma Y. Determination of cyasterone in medicinal *Cyathula* (*Cyathula officinalis*) root by RP-HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (6): 427-428.
- [5] Gao X Y. Determination of ecdysterone in *Achyranthes bidentata* Bl. and its activity promoting proliferation of osteoblast-like cells [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35 (11): 868-870.
- [6] Richter B E, Jones B A, Ezzell J L, et al. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation [J]. *Anal Chem*, 1996, 68 (6): 1033-1039.
- [7] Li P. Studies on the accelerated solvent extraction of *Panax notoginseng* saponins [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2004, 2 (3): 157-161.
- [8] Chen L L. Extraction of ecdysterone from *Stemmacantha uniflora* [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2002, 25 (3): 195-197.
- [9] Ling T J. Ecdysteroids from the roots of *Serratula chinensis* [J]. *J Trop Subtrop Bot* (亚热带热带植物学报), 2003, 11 (2): 143-147.