

根据试验结果, 确定苯乙酮为本实验的内标物。

参考文献:

- [1] 熊天琴, 秦旭华, 庞 龙, 等. 辛夷挥发油对实验性过敏性鼻炎的作用[J]. 中医药学刊, 2006, 24(6): 1031-1032
- [2] 李寅超, 赵宜红, 薛敬礼. 辛夷挥发油对哮喘豚鼠嗜酸性粒细胞影响的实验研究[J]. 现代预防医学, 2006, 33(8): 1338-1341
- [3] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [4] 刘晋华, 尤光甫, 李玉萍. 鼻炎口服液检测方法的研究[J]. 中国药事, 2007, 21(9): 749-751.
- [5] 王兴宁, 张明时, 夏品华, 等. 毛细管气相色谱法测定辛夷药材中桉油精含量[J]. 时珍国医国药, 2008 年, 19(1): 48-49
- [6] 王 琪, 李洪玲. 中药辛夷质量标准研究—比色法测定辛夷中总黄酮的含量[J]. 中草药, 2003, 34(5): 424-425

红车轴草提取物中多环芳烃脱除工艺的研究

许 龙^{1,2}, 陈应庄¹, 曾建国^{1,2*}, 罗 琪¹

(1 湖南省中药提取工程研究中心, 湖南 长沙 410331; 2 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007)

摘要: 目的 优选红车轴草提取物中多环芳烃(PAHs)脱除工艺。方法 以 PAHs 脱除率为指标, 考察提取物粒度、脱除溶剂、脱除方法对 PAHs 脱除工艺的影响。结果 最佳工艺为: 红车轴草提取物超微粉碎至 300 目以上, 用六号溶剂超声提取, 对 PAHs 的脱除率达到 98.0% 以上, PAHs 的残留量为 10.0 ng/g 以下。结论 超微粉碎-六号溶剂-超声提取法脱除红车轴草提取物中 PAHs 脱除率高, 工艺稳定、可行。

关键词: 红车轴草; 多环芳烃; 超微粉碎; 超声提取

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)08-1235-04

Technique of removing polycyclic aromatic hydrocarbons from *Trifolium pratense* extract

XU Long^{1,2}, CHEN Ying-zhuang¹, ZENG Jian-guo^{1,2}, LUO Qi¹

(1. Hunan Engineering Research Center of Chinese Materia Medica Extract, Changsha 410331, China;

2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Abstract: **Objective** To optimize the removal technique for extracting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from *Trifolium pratense*. **Methods** The influence of various factors, including the size, solvent, extraction methods, and their effects on the removal efficiency, were investigated. **Results** The best process for extraction: the ground extract of PAHs was over 300 meshes by ultra-fine grinding firstly and then the removal rate of PAHs was above 98.0% and the total removal of PAHs was below 10.0 ng/g by ultrasonic extraction with solvent No. 6. **Conclusion** The removal rate of PAHs in *T. pratense* extract by ultra-fine grinding-ultrasonic extraction with solvent No. 6 is much higher. The title process is stable and available.

Key words: *Trifolium pratense* L.; polycyclic aromatic hydrocarbons; ultramicro-pulverization; ultrasonic extraction

红车轴草 *Trifolium pratense* L. 为豆科多年生草本植物, 主要含有鹰嘴豆芽素 A、刺芒柄花素等多种异黄酮类成分, 刘晗等^[1] 研究发现红车轴草在鲜活状态下的异黄酮的量最高, 并确定最佳采收期为花蕾期至初花期。红车轴草中异黄酮成分具有抗肿瘤、治疗骨质疏松和更年期综合症等作用^[2,3], 因此被广泛用于保健食品中。近年来发现红车轴草提

取物中有微量多环芳烃(PAHs)存在, 其来源可能与红车轴草植物生长过程中的富集作用或在生产过程中受到污染有关^[4]。PAHs 具有强致癌性^[5,6], 严重影响红车轴草提取物的质量, 因此开展 PAHs 脱除工艺研究非常重要。本实验考察了提取物粒度、提取溶剂和提取方法对 PAHs 脱除的影响, 并对其最优的超声提取法进行了研究, 为 PAHs 脱除工

* 收稿日期: 2009-03-09

基金项目: 湖南省科技厅重大专项(2007FJ1005); 湖南省科技计划重点项目(2008SK2009)

作者简介: 许 龙(1982—), 男, 湖南耒阳人, 在读硕士, 主要从事天然产物开发利用研究。

Tel: 13808475843 E-mail: longxu23@yahoo.com.cn

* 通讯作者 曾建国 Tel: (0731)84686478 E-mail: ginkgo@worldway.net

业化运用寻求最佳的工艺路线。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters Empower 工作站, Waters 2475 荧光检测器。

AB135—S 分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); JAC—300 型超声波提取装置(济宁市奥波超声电气有限公司); 恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); JB/T 5520—91 电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂); RE—52A 旋转蒸发仪(北京瑞邦兴业科技有限公司); 循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂); GS12—2 电子恒速搅拌器(上海医械专机厂); BFM—6A 试验型贝利微粉机(济南倍力粉技术工程有限公司)。

PAHs 标样为 Supelco 公司生产 EPA610 PAHs 混合标样, 其中萘、二氢苊各为 1 000 mg/L, 苊 2 000 mg/L, 苊、荧蒹、苯并(b)荧蒹、二苯并(a, h)苊、苯并(g, h, i)花各为 200 mg/L, 菲、苊、苊、苯并(a)苊、苊、苯并(k)荧蒹、苯并(a)苊、茚并(1, 2, 3-cd)苊各为 100 mg/L。二氯甲烷、丙酮、环己烷、正庚烷、乙腈均为色谱纯; 氢氧化钠、六号溶剂(沸程为 62~85 °C 的石油馏分六碳烷烃混合物)为分析纯, 其余试剂为分析纯。红车轴草提取物由湖南省中药提取工程研究中心提供, 含总异黄酮 20%、40%、60%。

2 方法与结果

2.1 PAHs 的分析方法建立

2.1.1 样品前处理: 精确称取红车轴草提取物 10.0 g, 置具塞锥形瓶中, 加入 15 倍 0.5% NaOH 溶液充分溶解, 再加入等体积的环己烷萃取, 静置分层, 下层溶液再加入等量环己烷萃取, 重复操作 5 次, 合并环己烷于旋转蒸发仪上回收溶剂至近干, 用乙腈洗脱并定容至 1 mL 量瓶中, 摇匀, 过膜, 得滤液, 即为供试品溶液。

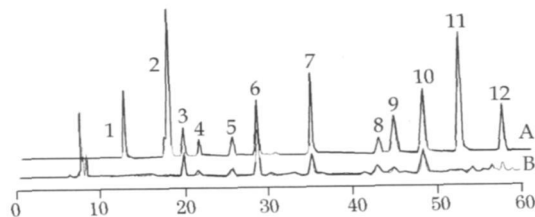
2.1.2 色谱条件: 色谱柱为 Hypersil ODS2(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(大连依利特分析仪器有限公司); 柱温 30 °C; 进样体积 5 μL; 体积流量: 0.50 mL/min; 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱, 0~30 min, 70% 乙腈, 30~50 min, 80% 乙腈, 50~65 min, 90% 乙腈, 95 min 以后, 95% 乙腈; FLD 检测器, 激发波长和发射波长随时间程序的变化见表 1。

2.1.3 标准曲线的绘制: 分别精密量取各多环芳烃对照品溶液, 用甲醇稀释至质量浓度为 1000、100、10、1 ng/mL, 摇匀。经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液进样 5 μL。在上述色谱条件下进行分析, 记

录色谱图。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 拟合回归方程, 见表 2。结果表明多环芳烃在 1~1 000 ng/mL 线性良好。

表 1 FLD 检测波长的时间程序

时间/min	激发波长/nm	发射波长/nm
0 00	225	315
19 0	250	360
21 0	260	420
24 0	435	358
27 0	270	380
32 0	286	400



1-萘 2-苊+苊 3-菲 4-苊 5-荧蒹 6-苊 7-苯并(a)苊+苊 8-苯并(b)苊 9-苯并(k)苊 10-苯并(a)苊 11-二苯并(a, h)苊 12-苯并(g, h, i)花+茚并(1, 2, 3-cd)苊

图 1 多环芳烃对照品(A)和红车轴草提取物(B)的色谱图

Fig 1 Chromatograms of PAHs reference substances (A) and *T. pratense* extract (B)

表 2 多环芳烃的标准曲线方程

化合物	回归方程	相关系数 <i>r</i>
萘	$Y = 48\,269 X + 2 \times 10^6$	0.999 9
苊+苊	$Y = 938\,728 X + 204\,166$	0.999 5
菲	$Y = 350\,840 X - 2 \times 10^6$	0.999 8
苊	$Y = 222\,169 X - 1 \times 10^6$	0.999 8
荧蒹	$Y = 132\,714 X - 1 \times 10^6$	0.999 7
苊	$Y = 877\,135 X - 4 \times 10^6$	0.999 8
苯并(a)苊+苊	$Y = 566\,125 X - 6 \times 10^6$	0.999 7
苯并(b)苊	$Y = 112\,633 X - 1 \times 10^6$	0.999 8
苯并(k)苊	$Y = 685\,436 X - 4 \times 10^6$	0.999 8
苯并(a)苊	$Y = 1 \times 10^6 X - 7 \times 10^6$	0.999 7
二苯并(a, h)苊	$Y = 2 \times 10^6 X - 1 \times 10^7$	0.999 7
苯并(g, h, i)花+茚并(1, 2, 3-cd)苊	$Y = 246\,578 X - 4 \times 10^6$	0.999 7

2.1.4 空白试验: 该研究由于是痕量分析, 为避免试剂对实验造成影响, 所有试剂做空白试验。取 100 mL 各种溶剂, 分别旋蒸浓缩到 1 mL, 进行检测分析。

2.1.5 样品测定: 取提取物样品, 按 2.1.1 项下操作, 在上述色谱条件下进行 HPLC 分析, 按外标一点法计算 12 种 PAHs 的量, 并计算 12 种 PAHs 脱除率[脱除率=(原样品中 PAHs 的质量分数-脱除后产品中 PAHs 的质量分数)/原样品中 PAHs 的质量分数×100%]。

2.2 红车轴草提取物中总异黄酮的测定: 依照《中华人民共和国外贸行业标准(红车轴草提取物) WM/T6-2004》检测方法, 总异黄酮以刺芒柄花苷、印度黄檀苷、刺芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A 的量之和计算。

2.3 不同粒径对脱除效果的影响: 称取同一批次红车轴草提取物 5 份, 每份 100 g, 分别粉碎制成 80、120、200 目和超微粉碎制成 300、400 目不同粒径的样品。分别取不同粒径样品各 30 g 置于圆底烧瓶内, 加入 8 倍量六号溶剂, 搅拌回流提取 1.0 h, 放冷滤过, 沉淀进入下次提取, 重复操作 3 次, 沉淀真空干燥后得供试样。不同粒度对提取物 PAHs 脱除率影响的实验结果见表 3。

表 3 提取物粒度对脱除率的影响

Table 3 Effect of extract diameter on removal rate

目数	粒度/ μm	PAHs/($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)		脱除率/%
		脱除前	脱除后	
80	178	465.0	51.8	88.8
120	124	465.0	40.3	91.3
200	74	465.0	27.0	94.1
300	48	465.0	16.2	96.5
400	38	465.0	15.3	96.7

由于红车轴草提取物中指标成分异黄酮类的质量分数越高, 越难溶于水、乙醇、醋酸乙酯等溶剂, 而 PAHs 吸附于提取物颗粒的表面及浅表面, 因此选择将供试样充分粉碎, 以扩大其表面积, 有利于溶剂从表层、浅表层脱去 PAHs。表 3 结果显示, 将提取物粉碎得越细, PAHs 的脱除效果越好, 但提取物粒度并不与 PAHs 脱除率成正比关系, 这与吸附于浅表面的 PAHs 不能被完全脱除有关^[7]。从工业化生产角度出发, 以选用 300 目左右为宜。

2.4 不同溶剂对 PAHs 脱除效果的影响: 脱除溶剂的选择必须具备对 PAHs 的溶解性好, 而对红车轴草提取物中指标成分溶解性差的条件下, 同时确保脱除过程不产生有害溶剂残留, 因此选择环己烷、六号溶剂、正己烷和正庚烷作为脱除溶剂。称取未经刻意粉碎但均通过 80 目筛的红车轴草提取物 30 g 置于圆底烧瓶内, 加入 8 倍量溶剂, 搅拌回流提取 1.0 h, 放冷滤过, 沉淀进入下次提取, 重复操作 3 次, 沉淀真空干燥后得供试样。考察环己烷、六号溶剂、正己烷、正庚烷对脱除率的影响, 结果见表 4。可以看出, 4 种溶剂对 PAHs 均有较好的脱除能力。

2.5 不同脱除 PAHs 工艺方法的比较: 将回流提取、超声波提取、萃取、活性炭吸附脱除工艺的脱除效果进行比较, 确定不同脱除方法对 PAHs 脱除的

优劣, 结果见表 5。可以看出, 回流提取脱除率最低, 而超声提取、溶剂萃取和活性炭吸附脱除率高, 脱除供试样中 PAHs 的量均低于 10.0 ng/g。

2.6 脱除工艺对红车轴草提取物中总异黄酮的影响: 取经超微粉碎的 300 目红车轴草提取物, 分别采用回流、超声、萃取、活性炭吸附 4 种工艺中最佳条件脱除 PAHs, 将原样品及经工艺处理得到的供试样进行指标成分的测定, 结果见表 6。

表 4 不同溶剂对脱除率的影响

Table 4 Effect of different solvents on removal rate

提取剂	PAHs/($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)		脱除率/%
	脱除前	脱除后	
环己烷	465.0	58.4	87.4
六号溶剂	465.0	51.8	88.8
正己烷	465.0	62.5	86.5
正庚烷	465.0	55.2	88.1

表 5 4 种脱除 PAHs 方法的比较

Table 5 Comparison of four methods to remove PAHs

脱除方法	PAHs/($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)		脱除率/%
	脱除前	脱除后	
回流提取	465.0	13.4	97.1
超声提取	465.0	9.1	98.0
萃取	465.0	4.9	99.0
活性炭吸附	465.0	7.5	98.3

表 6 脱除 PAHs 前后总异黄酮的比较

Table 6 Comparison of total flavonols contents before and after removing PAHs

脱除方法	总异黄酮/%		收率/%
	脱除前	脱除后	
回流提取	41.3	40.8	97.8
超声提取	41.3	40.1	97.2
萃取	41.3	34.5	96.6
活性炭吸附	41.3	32.7	95.4

可以看出, 经萃取法和活性炭吸附法脱除 PAHs 得到的样品, 其指标成分的量下降很大, 原因可能为指标成分长时间处在碱性条件下不稳定造成; 经回流提取法和超声提取法除 PAHs 得到的样品, 其总异黄酮的量和收率均很高, 表明脱除过程对指标成分影响很小, 但由于回流提取对 PAHs 脱除率较超声低, 因此选择超声提取法来脱除 PAHs。

2.7 超声提取工艺对 PAHs 脱除效果的研究: 考察不同频率、溶剂用量、提取次数和提取时间的影响, 确定最佳超声提取工艺。

2.7.1 不同超声频率的考察: 称取红车轴草提取物 30 g 置于锥形瓶内, 加入 8 倍量六号溶剂, 在一定频率下超声波提取 1.0 h, 放冷滤过, 沉淀进入下次提取, 重复操作 3 次, 考察不同频率对脱除率的影响, 见

图 2。结果表明,当超声频率为 60 kHz 时脱除率达 98% 以上,继续增加超声频率其脱除率变化不明显。

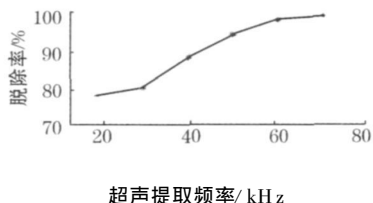


图 2 超声频率对脱除率的影响

Fig 2 Effect of ultrasonic frequency on removal rate

2.7.2 不同提取溶剂用量的考察: 称取红车轴草提取物 30 g 置于锥形瓶内, 加入一定量六号溶剂, 在频率为 60 kHz 条件下, 超声提取 1.0 h, 放冷滤过, 沉淀进入下次提取, 重复操作 3 次, 考察溶剂不同的用量对脱除率的影响, 结果见表 7。结果表明, 当每次用 8 倍量六号溶剂提取时, 脱除率高而溶剂用量适度。

表 7 不同溶剂用量对脱除率的影响

Table 7 Effect of different solvent amounts on removal rate

提取剂用量 (倍量×次数)	PAHs/(ng·g ⁻¹)		脱除率/%
	脱除前	脱除后	
5×3	465.0	17.1	96.3
6×3	465.0	12.2	97.3
8×3	465.0	9.1	98.0
10×3	465.0	7.2	98.4
15×3	465.0	6.3	98.6

2.7.3 不同超声提取次数的考察: 称取红车轴草提取物 30 g 置于锥形瓶内, 加入 8 倍量六号溶剂, 在频率为 60 kHz 下, 超声提取 1.0 h, 放冷滤过, 沉淀进入下次提取, 重复操作不同次数, 考察不同次数对脱除率的影响, 结果见表 8。结果表明, 随着提取次数增加到 3 次, 样品中 PAHs 的量基本稳定, 此后提取次数的增加变化不显著。

表 8 不同提取次数对脱除率的影响

Table 8 Effect of different times of extracting on removal rate

提取次数	PAHs/(ng·g ⁻¹)		脱除率/%
	脱除前	脱除后	
1	465.0	35.0	92.4
2	465.0	14.6	96.8
3	465.0	9.1	98.0
4	465.0	7.0	98.5

2.7.4 最佳工艺参数: 超声提取工艺的最佳条件为用 8 倍量六号溶剂, 在超声频率为 60 kHz 条件下, 重复操作 3 次。

2.8 重叠图谱比较: 通过对红车轴草提取物在脱除 PAHs 前后样品的 HPLC 图谱比较, 判断脱除工艺是否对样品的成分产生影响。取经超微粉碎的 300

目红车轴草提取物, 采用提取工艺中最佳条件脱除 PAHs, 将原料和超声工艺制得产品的供试品进行 HPLC 图谱比较, 脱除 PAHs 前后样品图谱见图 3。结果表明有效成分重叠图谱中图谱峰能很好的吻合, 说明 PAHs 脱除过程对提取物化学成分未造成明显的破坏或损失, 脱除工艺稳定、可控。

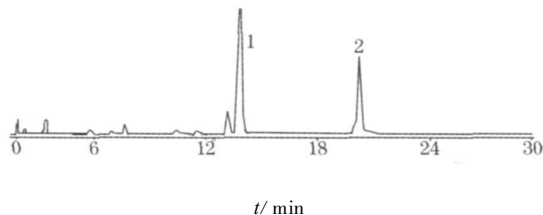


图 3 超声工艺脱除前后样品色谱图

Fig 3 Chromatograms of samples before and after removing PAHs by ultrasonic technique

3 结论

超微粉碎-六号溶剂-超声波提取法适合红车轴草提取物中 PAHs 的脱除, 工艺稳定、可控, 适用于工业生产。因痕量分析实验对分析仪器要求高等原因, 脱除工艺未做正交试验确定最佳的提取条件, 本研究确定的最佳工艺条件为: 将提取物超微粉碎至 300 目以上, 用 8 倍量六号溶剂, 在超声波频率 60 kHz 条件下, 超声提取 3 次。该工艺对红车轴草提取物中 PAHs 可以达到很好的脱除效果(对 PAHs 的脱除率达 98.0% 以上), 其残留量(小于 10.0 ng/g)符合产品要求。

致谢: 感谢大连化学物理研究所梁鑫淼研究员课题组为本实验提供的仪器设备和给予大量的指导帮助。

参考文献:

- [1] 刘 晗, 罗 琪, 欧阳勇, 等. 红车轴草的最佳采收期和前处理加工方法研究[J]. 中草药, 2007, 38(12): 1821-1823
- [2] 马 强. 红车轴草和川续断的化学成分及质量研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2005
- [3] Adlercreutz H, Mazur W. Phytoestrogens and western medicine[J]. Arch Invest, 1997, 29: 96
- [4] 严付华, 曾建国. 高效液相色谱法荧光检测红车轴草提取物中的苯并(a)芘[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(10): 935-936
- [5] Moret S, Conte L S. Of line LC-LC determination of PAHs in edible oils and lipidic extracts[J]. J High Resolut Chromatogr, 1998, 21: 253-257
- [6] Bogusz M J, El-hajj S A, Ehaideb Z, et al. Rapid determination of Benzo(a)pyrene in olive oil samples with solid-phase extraction and low pressure. Wide bore gas chromatography-mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection[J]. J Chromatogr A, 2004, 1026: 1-7
- [7] 吴澜尔, 陈宇红. 碳化硅超细粉碎粉体粒度与比表面积的变化规律[J]. 矿业研究与开发, 2002, 22(3): 49-52