

基质固相分散法提取牛蒡子中牛蒡子苷和牛蒡子苷元

高赛男, 杜雯雯, 李春香, 蒋蕾, 甄细娥, 李森*
(哈尔滨医科大学大庆校区药学院, 黑龙江 大庆 163319)

[摘要] 目的: 探析基质固相分散法提取牛蒡子中牛蒡子苷和牛蒡子苷元的可行性。方法: 以牛蒡子苷和牛蒡子苷元总提取量为评价指标, 采用 HPLC 测定指标成分含量, 通过单因素试验考察分散剂、洗脱剂、压实程度及洗脱流速对牛蒡子有效成分提取率的影响, 并与甲醇超声提取法进行比较。结果: 选取 4 倍量硅胶为分散剂, 100 倍量甲醇为洗脱剂, 洗脱流速约 40 滴/min, 压实程度为中度挤压; 牛蒡子苷和牛蒡子苷元的总提取率达 7.94%, 略高于甲醇超声提取法的 7.89%。结论: 基质固相分散法操作简单、快速, 可作为牛蒡子主要成分的提取方法, 并为中药材有效成分的提取提供参考。

[关键词] 基质固相分散法; 牛蒡子; 牛蒡子苷; 牛蒡子苷元; 高效液相色谱; 单因素试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0047-04

[doi] 10.11653/syfy2013230047

Extraction of Arctiin and Arctigenin from Arctii Fructus by Matrix Solid-Phase Dispersion

GAO Sai-nan, DU Wen-wen, LI Chun-xiang, JIANG Lei, ZHEN Xi-e, LI Sen*
(College of Pharmacy, Daqing Campus of Harbin Medical University, Daqing 163319, China)

[Abstract] **Objective:** To analysis feasibility of matrix solid-phase dispersion technology for extraction of arctiin and arctigenin from Arctii Fructus. **Method:** With total extraction amount of arctiin and arctigenin as index, which were determined by HPLC, effects of dispersants, eluents, compaction degree and elution flow rate on extraction rate of active ingredients from Arctii Fructus were investigated by single factor tests, and compared with methanol ultrasonic extraction technology. **Result:** Optimum matrix solid-phase dispersion technology was as following: with four times the amount of silica gel as dispersants, one hundred times the amount of methanol as eluents, compaction degree moderate extrusion, elution flow rate 40 drops/min. Total extraction ratio of arctiin and arctigenin was up to 7.94%, while it was 7.89% by methanol ultrasonic extraction technology. **Conclusion:** Matrix solid-phase dispersion method was simple and rapid, it could be used as a new method for extracting main ingredients from Arctii Fructus and provide a reference for extraction of active ingredients from Chinese herbal medicines.

[Key words] matrix solid-phase dispersion method; Arctii Fructus; arctiin; arctigenin; HPLC; single factor test

牛蒡子主要用于治疗风热感冒、麻疹等症, 具有

抗菌、抗肿瘤和降血糖等功效, 主要化学成分为牛蒡子苷和牛蒡子苷元。牛蒡子苷元为其主要活性成分, 口服后牛蒡子苷在肠道菌的作用下会转为牛蒡子苷元^[1]。目前提取牛蒡子苷和牛蒡子苷元的主要方法为超声提取法和加热回流法, 存在操作步骤繁琐、溶剂用量大等缺点。基质固相分散法(MSPD)是由 Barker 教授^[2]首次提出并给予理论解释的一种崭新的样品前处理技术, 该方法是将吸附填料与样品一起放入研钵中研磨, 利用“剪切力”将

[收稿日期] 20130527(003)

[基金项目] 黑龙江省卫生厅基金项目(2011-234)

[第一作者] 高赛男, 讲师, 硕士, 从事天然药物活性成分高效分离及药效物质基础研究, Tel: 0459-8153631, E-mail: gsn_2003@163.com

[通讯作者] *李森, 教授, 博士, 从事天然药物活性成分高效分离及药效物质基础研究, Tel: 0459-81538776, E-mail: lisen_116@163.com

样品均匀分散到分散剂中,形成一种新的固定相,将研磨好的待测样品装入柱中压实,用洗脱剂将待测物洗脱下来。MSPD 的优点是集样品的提取和净化于一体,具有操作简单快捷、提取效率高、溶剂消耗量少、不需特殊设备等特点,目前已广泛用于蔬菜水果^[2-4]、水产品^[5-6]、饮料^[7]、肉类^[8]等物品中农药残留物的提取,但在中药有效成分提取方面应用很少^[9]。本实验尝试应用 MSPD 提取牛蒡子中牛蒡子苷和牛蒡子苷元,采用前期研究确定的 HPLC 条件对提取效果进行考察。

1 材料

9312 A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂),MP 23 C-BF 型美的微波炉(佛山市美的微波电器制造有限公司),ESJ-205-4 型电子天平(沈阳龙腾电子有限公司),LC-20 AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),DFT-100 型手提式高速中药粉碎机(巩义市予华电器有限责任公司),Milli-Q Academic 型超纯水器(法国密理博有限公司)。

牛蒡子(购自哈尔滨市中药批发市场,产地黑龙江省哈尔滨,经哈尔滨医科大学大庆校区药学院魏东华教授鉴定为菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥成熟果实),牛蒡子苷元对照品(天津马克生物技术有限公司,批号 PCM-NBZ-002-20121205),牛蒡子苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110819-201007),C₁₈(成都艾尔胜生物科技有限公司),硅藻土(天津市大茂化学试剂厂),柱色谱硅胶(80~120 目,青岛海洋化工厂分厂),中性氧化铝(100~200 目,国药集团化学试剂有限公司),即墨黄酒(山东即墨黄酒厂出品,酒精度 8.5%),水为自制超纯水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的炮制^[1] 称取于 40℃ 干燥 4 h 的牛蒡子 250 g,除去杂质,加入 10% 黄酒闷制 90 min,在 80% 的微波强度中炮制 4 min,取出,密封冷却,粉碎,过 60 目筛。

2.2 对照品溶液的制备^[1] 分别精密称取干燥至恒重的牛蒡子苷、牛蒡子苷元对照品 12.8,10.8 mg,分别置于 10,100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,即得。

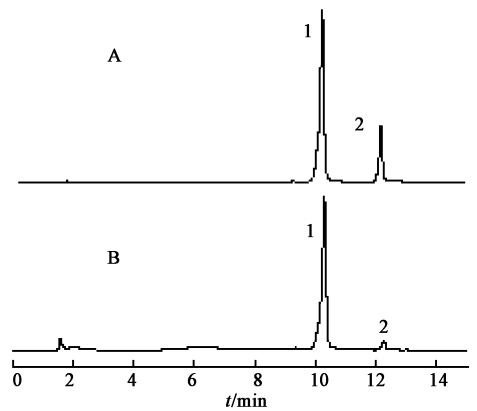
2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 MSPD 提取法 精密称取样品粉末 0.2 g 和硅胶 0.8 g 于研钵内,用研磨棒研磨 3 min,使样品充分分散至硅胶中,倒入底部放有一层脱脂棉的 5 mL 玻璃注射器中,用自制的软棒状物轻轻敲打柱

身,使样品填充均匀,加少许脱脂棉,轻轻压实,用甲醇 20 mL 分 3 次洗涤研钵,洗液转移到注射器中,控制洗脱液流速约 40 滴·min⁻¹,收集洗脱液,用甲醇定容至 20 mL 量瓶中,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,待用。

2.3.2 超声提取法 精密称取样品粉末 0.2 g 于 20 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,超声提取 30 min,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,备用。

2.4 色谱条件^[1] Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,5 μm,日本岛津公司),流动相水(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0~8 min,25%~65% B;8~15 min,65%~65% B),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 280 nm。理论塔板数按牛蒡子苷和牛蒡子苷元计算均不低于 3 000,见图 1。



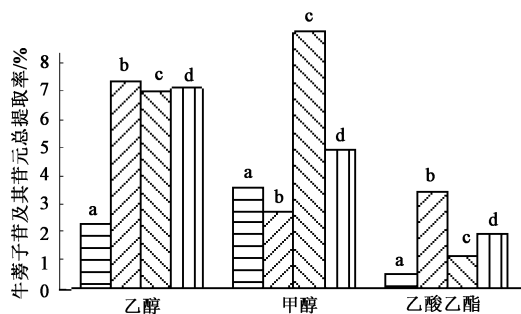
A. 对照品;B. 供试品;1. 牛蒡子苷;2. 牛蒡子苷元

图 1 牛蒡子 HPLC

2.5 MSPD 优化

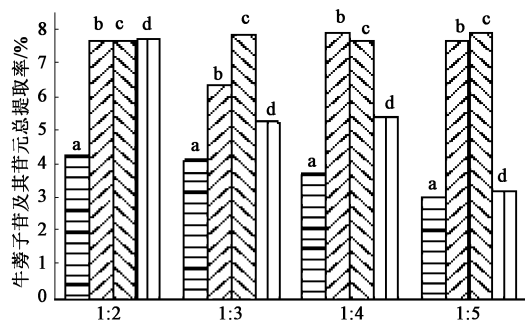
2.5.1 基质固相分散剂和洗脱剂的选择 固体吸附剂和洗脱剂的极性强弱决定组分的出柱顺序,故选择合适的固相萃取材料和洗脱剂有利于提高方法的有效性。称取样品 0.2 g 和分散剂(分别以中性氧化铝、C₁₈、硅胶和硅藻土为固相分散剂)0.8 g,各加入洗脱剂(分别以甲醇、乙醇和乙酸乙酯为洗脱剂,如无特别说明,试剂均为无水试剂)20 mL,洗脱完后用洗脱剂定容至 20 mL,比较牛蒡子苷和牛蒡子苷元的提取效果,见图 2,结果表明以硅胶为固相分散剂、甲醇为洗脱剂时,牛蒡子苷和牛蒡子苷元总含量最高。

2.5.2 固相分散剂和洗脱剂用量选择 依次考察牛蒡子-硅胶质量比 1:2,1:3,1:4,1:5 和甲醇用量 15,20,25,30 mL 的洗脱效果,见图 3,结果表明牛蒡子苷和牛蒡子苷元总提取率在牛蒡子-硅胶(1:4)、甲醇用量 20 mL 与牛蒡子-硅胶(1:5)、洗脱剂用量 25 mL 时的洗脱效果相近,结合生产成本考虑,故选



a. 中性氧化铝; b. C₁₈; c. 硅胶; d. 硅藻土

图2 不同固相分散剂和洗脱剂对牛蒡子苷和牛蒡子苷元总提取率的影响



a. 甲醇 15 mL; b. 甲醇 20 mL; c. 甲醇 25 mL; d. 甲醇 30 mL

图3 固相分散剂和洗脱剂不同用量对牛蒡子苷和牛蒡子苷元总提取率的影响

用牛蒡子-硅胶(1:4)和洗脱剂用量 20 mL。

2.5.3 洗脱速率和压实程度考察 分别从不挤压、轻微挤压、中度挤压和重度挤压(挤压前均用自制软棒敲打均匀)4种情况考察洗脱流速对提取效果的影响。结果显示不挤压样品时,由于洗脱液在固定相中停留时间很短,故提取效果最差;轻微挤压效果其次;中度挤压时样品在洗脱剂和固定相中实现了很好的“吸附-解吸附”过程,所以洗脱效果最好,流速约 $40 \text{滴} \cdot \text{min}^{-1}$;重度挤压时由于样品挤压得过于实,洗脱剂很难透过固定相,样品难以洗脱下来。

2.6 方法学评估

2.6.1 HPLC 测试方法评估 分别精密吸取牛蒡子苷和牛蒡子苷元对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 于 1 mL 量瓶中,用甲醇定容,配成不同质量浓度的混合对照品溶液,进样量 $10 \mu\text{L}$,按 2.4 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得牛蒡子苷和牛蒡子苷元的回归方程分别为 $Y = 5459X + 198736 (r = 0.9993)$, $Y = 8085X + 36630 (r = 0.9996)$,线性范围分别为 128 ~ 1280, 10.8 ~ 108 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取同一混合对照品溶液,1 d 内连续进样 6 次,计算日内精密度 RSD 分别为

1.31%, 1.45%; 1 d 内平均进样 3 次,连续测定 4 d,计算日间精密度 RSD 分别为 1.37%, 1.40%,说明仪器精密度良好。

2.6.2 加样回收率试验 精密移取牛蒡子苷和牛蒡子苷元对照品溶液各 0.1 mL,加入已知质量浓度的牛蒡子粉末 0.2 g 和硅胶 0.8 g 中,在研钵中用研磨棒研磨均匀,按 2.3.1 项下方法平行制备供试品溶液 5 份,各精密吸取供试品溶液 $10 \mu\text{L}$,按 2.4 项下色谱条件测定,计算牛蒡子苷和牛蒡子苷元的加样回收率分别为 97.1%, 99.6%, RSD 分别为 2.04%, 1.15%,说明该方法稳定可行。

2.6.3 重复性试验 取同一批样品,按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液 5 份,分别精密吸取 $10 \mu\text{L}$ 按 2.4 项下色谱条件测定,计算牛蒡子苷和牛蒡子苷元含量的 RSD 依次为 1.93%, 2.23%,表明该方法重复性良好。

2.6.4 提取效果对比 取同一批样品适量,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液适量,各精密吸取 $10 \mu\text{L}$ 按 2.4 项下色谱条件测定,结果表明采用 MSPD 时,牛蒡子苷和牛蒡子苷元的总提取率 7.94%,略高于甲醇超声提取法的 7.89%。

2.6.5 验证试验 分别称取同一批次的样品 2 g 和硅胶 8 g,各 5 份,研磨均匀后放入 15 mL 的玻璃注射器中,中度压实,用甲醇 200 mL 洗脱,控制流速约 $40 \text{滴} \cdot \text{min}^{-1}$,按 2.4 项下色谱条件测定牛蒡子苷和牛蒡子苷元含量,结果与称取样品 0.2 g、硅胶 0.8 g 的测定数据相近,证实了 MSPD 具有样品和洗脱液用量少的优势。

3 讨论

牛蒡子生品外皮质地坚硬,不易粉碎,但经微波炮制后,由于外皮变碎而易于粉碎;炮制中加入黄酒可以充分浸润和溶解样品,使有效成分溶出效率提高,故本实验未采用牛蒡子生品,而选择了酒制牛蒡子^[1]。采用 MSPD 提取样品中有效成分时,固相分散剂和洗脱剂的种类及用量是影响样品洗脱效果的重要因素。但在考察洗脱流速时,需反复操作至熟练,以保证样品在每次洗脱时保持流速的一致性。MSPD 在提取药物有效成分时,具有节约材料、集样品提取和净化于一体、操作简单等优点,可为中药材有效成分的提取提供借鉴。

[参考文献]

[1] 高赛男,李森,魏东华,等.微波炮制酒制牛蒡子的工艺研究[J].中国医药导报,2013,10(17):119.

乳剂对人参有效成分透皮吸收的影响

马东¹, 刘梦², 李超英^{2*}, 高雅言², 于慧超², 何蕊²

(1. 长春市人民医院, 长春 130051; 2. 长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] 目的: 考察人参提取液和人参乳膏中有效成分的体外透皮吸收能力。方法: 采用智能透皮吸收仪, 以人参总皂苷和总多糖为考察指标, 采用 UV 测定指标成分含量, 通过体外释药试验考察人参提取液制备成乳膏前后指标成分的透皮吸收能力变化。结果: 人参乳膏中总皂苷透皮吸收过程符合一级方程, 而人参乳膏中总多糖、人参提取液中总皂苷和总多糖的透皮吸收过程均符合 Higuchi 方程, 2 种成分的累积释药率分别为 82.30%、67.53%。结论: 人参乳膏具有良好的透皮能力, 可增加有效成分的透皮吸收, 为其他透皮给药剂型的研制提供科学依据。

[关键词] 人参; 乳膏; 提取液; 促透作用; 体外释药规律

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0050-04

[doi] 10.11653/syjf2013230050

Effects of Emulsion on *in vitro* Transdermal Absorption of Active Ingredients from *ginseng Radix et Rhizoma*

MA Dong¹, LIU Meng², LI Chao-ying^{2*}, GAO Ya-yan², YU Hui-chao², HE Rui²

(1. Changchun Municipal People's Hospital, Changchun 130051, China;

2. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate *in vitro* transdermal absorption ability of active ingredients from ginseng extract and ginseng creams. **Method:** Taking intelligent transdermal absorption instrument, with total saponins and total polysaccharides from ginseng Radix et Rhizoma as indexes, which were determined by UV; Before and after ginseng extract were prepared into ginseng creams, percutaneous absorption capacity changes of

[收稿日期] 20130511(006)

[基金项目] 吉林省科学技术厅项目(Y Y Z X201118)

[第一作者] 马东, 学士, 副主任药剂师, 从事药物调剂和制剂研究, Tel: 15948339360, E-mail:

[通讯作者] * 李超英, 博士, 教授, 从事药物新剂型与新制剂研究, Tel: 13504417829, E-mail: chaoying_li@126.com

- [2] Barker S A. Matrix solid phase dispersion (MSPD) [J]. J Biochem Bioph Methods, 2007, 70(2): 151.
- [3] Lagunas-Allué L, Sanz-Asensio J, Martinez-Soria M T. Response surface optimization for determination of pesticide residues in grapes using MSPD and GC-MS: assessment of global uncertainty [J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 398(3): 1509.
- [4] 王丽霞, 寇立娟, 潘峰云, 等. 基质固相分散-液相色谱-质谱法测定蔬菜中的邻苯二甲酸酯 [J]. 分析化学, 2007, 35(11): 1559.
- [5] 张静, 宋宁慧, 李辉信, 等. 微型基质固相分散 GC-ECD 法测定鲫鱼中 18 种有机氯农药残留 [J]. 生态与农村环境学报, 2012, 28(6): 722.
- [6] 尹怡, 朱新平, 郑光明, 等. 基质固相分散法与固相萃取法在检测水产品中己烯雌酚残留中的应用 [J]. 分析测试技术与仪器, 2011, 17(4): 211.
- [7] 王荣艳, 王培龙, 余永新, 等. 分子印迹基质固相分散-液相色谱法测定牛奶中的氯霉素残留 [J]. 分析试验室, 2009, 28(8): 26.
- [8] 汪雪雁, 祁克宗, 陈珂珂, 等. 鸡组织中 3 种青霉素类药物残留检测的前处理方法比较研究 [J]. 分析测试学报, 2011, 30(8): 892.
- [9] 金永日, 时晓磊, 李绪文, 等. 基质固相分散提取桃儿七根中鬼臼毒苷和异鬼臼苦酮 [J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(5): 1054.

[责任编辑 全燕]