

在线净化-快速溶剂萃取法 (In-Cell cleanup - ASE) 分析检测黄连上清丸中的小檗碱

车金水 张艳海 叶明立
赛默飞(中国)有限公司

关键词: 快速溶剂萃取; 在线净化; 中药; 黄连上清丸; 小檗碱

Key words: Accelerated Solvent Extraction; In-Cell cleanup; Traditional Chinese Medicine; Huanglian Shangqing Wan; Berberine

引言

在分析基质复杂的样品时, 萃取过程中干扰物质容易同目标化合物一起萃取出来, 这些共萃取物干扰分析或影响仪器性能。通常需采用额外的净化步骤来对萃取液进行处理, 以达到分析检测的目的, 如柱层析法、固相萃取法(SPE)、凝胶色谱法(GPC)等。复方中药黄连上清丸基体组成复杂, 主要组成药物17种, 2010版药典对黄连上清丸中的小檗碱提取采用水浴, 超声提取, 浓缩提取液后过层析柱去除杂质, 该方法操作复杂, 耗时耗力^[1]。快速溶剂萃取技术(Accelerated Solvent Extraction, ASE)是由美国戴安公司研发的一种新型的样品前处理方法, 其原理是通过选择合适的溶剂在高温高压下快速提取固体、半固体样品。ASE具有萃取效率高, 速度快、溶剂用量少等优点。同时ASE还具备选择性提取的功能—in-cell cleanup技术, 即在萃取池底部填入合适吸附剂(见图1), 选择性吸附样品中的杂质, 达到萃取净化同步完成的目的, 极大的节省了操作时间和步骤。本方法采用in-cell cleanup ASE提取技术对复方中药黄连上清丸进行提取净化, 取得了满意的效果。

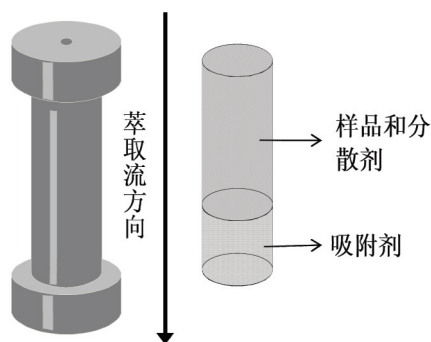


图1. In-cell cleanup

ASE条件

仪器: ASE350

前处理方法: 取黄连上清丸水丸1g, 精密称定, 加入硅藻土(DE)适量, 研磨, 混合均匀。在萃取池(22mL)中垫入纤维素膜, 加入5g碱性氧化铝, 填平; 将混合均与的样品加入萃取池中, 快速溶剂萃取, 萃取液定容, 滤过, 待HPLC分析。

表1. ASE萃取条件

ASE条件	参数
溶剂	甲醇
温度	140°C
加热时间	7 min
静态萃取时间	5 min
循环次数	2
吹扫体积	60%
吹扫时间	90s
总体积	40mL
总时间	20 min

HPLC条件

仪器: Dionex Ultimate 3000 HPLC

分析柱: Acclaim 120Å C18, 5µm, 250×4.6mm

流动相: 乙腈-33mmol/L磷酸二氢钾溶液(35:65)

柱温: 30°C

检测波长: 270nm

进样量: 10µL

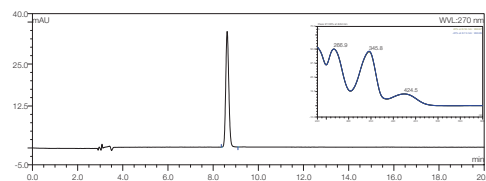


图2. 标准样品色谱图

结果与讨论

ASE萃取条件

参考2010版药典, 以甲醇为萃取溶剂, 其他ASE的萃取条件为: 萃取温度140°C, 静态萃取时间5 min, 循环两次。经实验证明(见表2), 该萃取条件能够完全萃取黄连上清丸中小檗碱。

In-cell cleanup净化过程

参考2010版药典，采用碱性氧化铝作为在线净化吸附剂。取1g黄连上清丸样品，分别于萃取池底部添加不同量的碱性氧化铝，考察碱性氧化铝的量对净化效果的影响。实验结果表明：当不添加碱性氧化铝萃取时，HPLC分析小檗碱时，小檗碱色谱峰被杂质峰覆盖，干扰严重（见图5）。当碱性氧化铝添加量达到5g时，样品中小檗碱色谱峰未见干扰（见图6），采用DAD检测器进行紫外光谱图扫描， $\pm 50\%$ 和 100% 处三张光谱图重叠良好，光谱匹配因子大于999.0，小檗碱色谱峰没有杂质干扰。比较未净化样品和净化样品色谱图，净化样品杂质峰明显减少（见图7，红线圈出部分）。

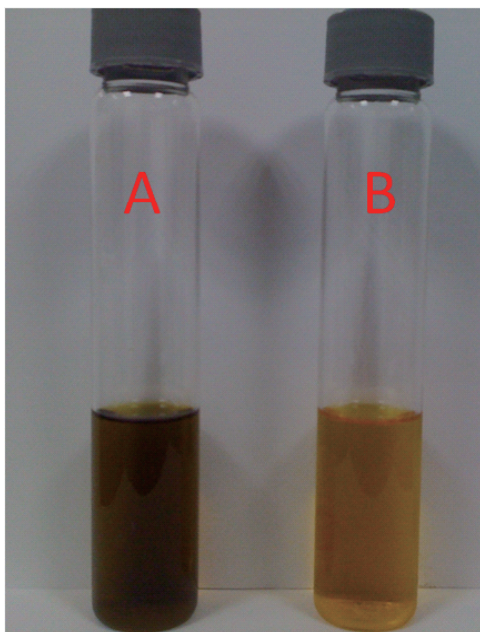


图3. 萃取液颜色比较
(A: 未添加碱性氧化铝; B: 添加5g碱性氧化铝)

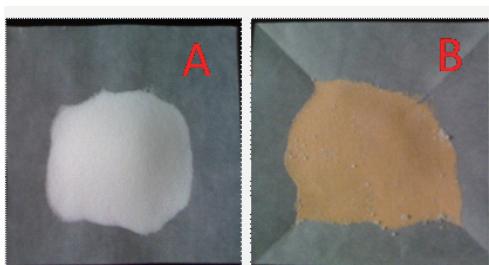


图4. 碱性氧化铝颜色变化 (A: 萃取前; B: 萃取后)

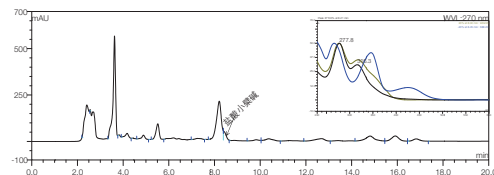


图5. 未添加碱性氧化铝净化样品色谱图

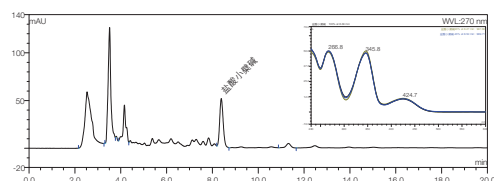


图6. 添加5g碱性氧化铝净化样品色谱图

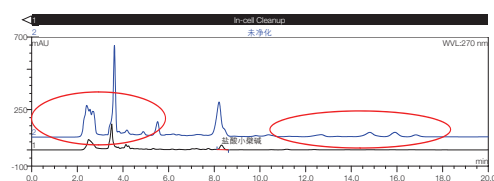


图7. 未净化样品和净化样品色谱图比较

ASE和药典方法比较

分别采用ASE在线净化技术和2010版药典方法对同一样品进行萃取，经HPLC分析得出结果（表2）。采用ASE在线净化萃取技术提取的样品中小檗碱含量为0.497 mg/g，标准偏差为2.6% (n=3)；采用2010版药典方法提取的样品中小檗碱含量为0.474 mg/g，标准偏差为3.5% (n=3)。采用在线净化-ASE萃取法和2010版药典方法对小檗碱的萃取率接近，但在线净化-ASE萃取法省去了药典方法中过层析柱，浓缩等步骤，大大简化了实验过程，实现了萃取净化一步到位的目的。

表2. ASE和索氏提取比较 (n=3)

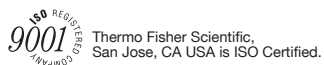
萃取方法	样品量	溶剂量	耗时	样品含量(mg/g)	RSD/%
ASE	1g	40mL	20min	0.497	2.6
USE	1g	100mL	4h	0.474	3.5

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2010版第一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1066-1067.

结果讨论

采用in-cell cleanup ASE提取中药复方黄连上清丸中的小檗碱, 和2010版药典推荐方法对小檗碱的萃取率接近, 能够去除干扰小檗碱测定的杂质, 能够达到萃取净化一步到位, 同时具有操作简单、快速、高效等特点。



thermoscientific.com

© 2012 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Specifications, terms and pricing are subject to change. Not all products are available in all countries. Please consult your local sales representative for details.

上海
上海浦东新金桥路27号6号楼
邮编: 201206
电话: 021-68654588
传真: 021-64457830

北京
北京东城区安定门东大街28号
雍和大厦西楼F座7层702-715室
邮编: 100007
电话: 010-84193588
传真: 010-88370548

免费服务热线:
800 810 5118
400 650 5118

ThermoFisher
SCIENTIFIC