

2.2.7 精密度试验:精密吸取同一供试品溶液 10 μL 进样,重复 8 次,测定荭草苷的峰面积,结果 RSD 为 1.11%。

2.2.8 重现性试验:平行取样品 6 份,依供试品溶液的制备方法操作,依法测定,结果荭草苷 RSD 为 0.76%。

2.2.9 加样回收率试验:精密量取已知荭草苷的量的金莲花露适量,加入荭草苷对照品约 2.0、2.7、5.8 mg,按供试品溶液制法制备,依法测定,计算加样回收率。结果平均回收率为 98.33%,RSD 为 1.14% ($n=6$)。

2.2.10 样品中荭草苷的测定:精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL 分别进样测定,以外标面积法计算金莲花露中荭草苷的质量浓度,结果见表 2,色谱图见图 1。

表 2 金莲花露中荭草苷的测定结果

Table 2 Determination of orientin in Trollius Beverage

批 号	荭草苷/(mg·mL ⁻¹)	批 号	荭草苷/(mg·mL ⁻¹)
031208-1	0.092 01	031209-3	0.094 76
031208-2	0.094 80	031210-1	0.101 00
031208-3	0.097 23	031210-2	0.945 60
031209-1	0.090 73	031210-3	0.903 10
031209-2	0.093 03	031210-4	0.928 80

3 讨论

采用紫外分光光度法对金莲花露中总黄酮进行测定,方法稳定、简便快速、准确可靠,可以用于控制产品中的总黄酮。对金莲花露采用 RP-HPLC 法测定其主要成分荭草苷,经方法学考察和回收率试验证明,该方法具有样品处理简便快速、灵敏、专属性强等优点。采用检测总黄酮和主要活性成分的双重

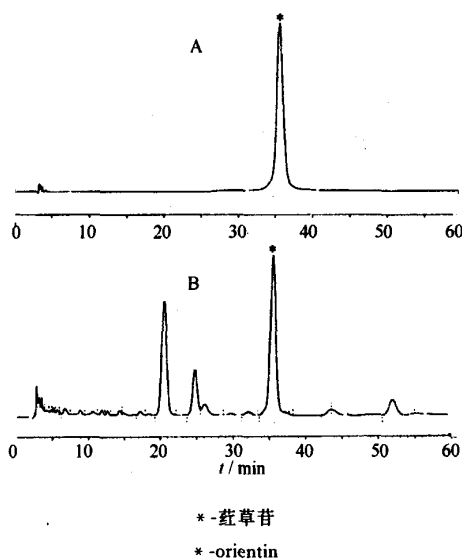


图 1 荭草苷对照品(A)和金莲花露(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of orientin reference substance (A) and Trollius Beverage (B)

质控方法,可用于控制产品的质量。

References:

- [1] Li S Z. Determination of the content of total flavonoids in Jinlianhua Tablets [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1988 (4): 15-16.
- [2] Zou X M, Li J C, Zhang L H. Study on the quality standard of Jinlianhua Tablets in Mongolian drugs [J]. *J Med Pharm Chin Minorities* (中国民族医药杂志), 1999, 5 (3): 42-44.
- [3] Ling X Y, Zao Z J. Determination of the content of total flavonoids in Jinlianhua granules [J]. *J Mod Appl Pharm* (现代应用药学), 1995, 12 (4): 45-46.
- [4] Huang W Z, Liang X. Determination of the content of two flavonoids in *Trollius ledebourli* Reichb by HPLC [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2000, 35 (10): 658-659.
- [5] Su L J, Li C, Liu L J. Determination of the content of orientin and vitexin in *Trollius macropetalus* Fr. Schmidt [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28 (3): 151-152.

正交试验优选那如-3 凝胶剂的提取工艺研究

温爱平¹, 郭林祥², 刘云乐³

(1. 内蒙古医学院 药理学系, 内蒙古 呼和浩特 010059; 2. 内蒙古自治区医院, 内蒙古 呼和浩特 010020;

3. 复旦蒙药研发中心, 上海 200433)

那如-3 凝胶剂是由草乌、诃子、葶苈组成的新型蒙药制剂, 具有祛寒、痛痹、除湿、通络的协同作用, 用于治疗风湿病。那如-3 传统剂型丸剂口服困难且毒性较大, 具有一定的局限性, 故拟将其剂型改为凝胶剂, 本实验采用 3 种不同的方法提取有效成

分, 以草乌中生物碱和葶苈中胡椒碱作为指标优选出最佳提取方法并对其提取工艺条件进行了考察。

1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括四元泵、在线脱气机、自动进样器; DAD 紫外检测器; HP

化学工作站;JL型超声波清洗器(上海杰理科技有限公司)。

新乌头碱、乌头碱、次乌头碱和胡椒碱对照品均由中国药品生物制品检定所提供,批号分别为0799-9403,0720-9807,0798-9403,0775-9702;草乌、芫花、诃子药材均购自上海市药材公司,经复旦大学天然药物研究所陈家宽教授鉴定,符合《中国药典》2000年版(一部)标准;甲醇为色谱纯,蒸馏水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Zorbax Extend-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm);流动相为甲醇-0.1%三乙胺(70:30);检测波长:胡椒碱为 343 nm,乌头生物碱为 230 nm;体积流量为 1 mL/min;柱温为 30℃。

2.2 胡椒碱的测定:精密称取胡椒碱对照品适量,用甲醇溶解并稀释成 0.108 mg/mL 的对照品溶液。精密吸取胡椒碱对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 μL 分别注入液相色谱仪,记录峰面积。以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程为 $Y = 3349.18X - 2.127$, $r = 1.0000$ 。结果表明:胡椒碱在 0.108~0.756 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

将各提取液减压浓缩至 50 mL,吸取浓缩液 2 mL 置分液漏斗中,加 0.1 mol/L 硫酸 5 mL,摇匀,用乙醚提取 4 次(20、20、15、15 mL)(酸水层留用),合并乙醚液,蒸干,残渣加甲醇溶解并稀释至 25 mL 量瓶中,滤过,取续滤液 1 μL 进样,测定峰面积值,根据回归方程计算胡椒碱的质量分数。色谱图见图 1。

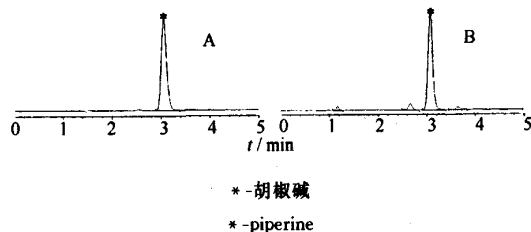
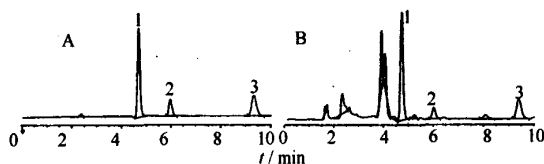


图1 胡椒碱对照品(A)和提取液(B)的 HPLC 图
Fig.1 HPLC chromatograms of piperine reference substances (A) and extract (B)

2.3 乌头总碱的测定:精密称取新乌头碱、乌头碱和次乌头碱对照品适量,加甲醇制成含新乌头碱 0.44 mg/mL、乌头碱 0.14 mg/mL、次乌头碱 0.19 mg/mL 的混合对照品溶液。精密吸取此混合对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 μL 注入液相色谱仪。以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,求得回归方程。新乌头碱: $Y = 1086.34X + 4.783$, $r =$

0.99998,线性范围:0.44~2.64 μg;乌头碱: $Y = 1147.14X + 9.092$, $r = 0.99983$,线性范围:0.14~0.84 μg;次乌头碱: $Y = 179.14X + 5.245$, $r = 0.99966$,线性范围:0.19~1.14 μg。

胡椒碱测定项下的酸水层,加氨试液调节至 pH 9~10,用乙醚-氯仿(3:1)混合液提取 4 次(20、15、15、10 mL),合并提取液,减压蒸干,残渣加甲醇溶解并稀释至 10 mL,滤过,取续滤液 5 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积值,根据回归方程分别计算新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的质量分数。色谱图见图 2。



1-新乌头碱 2-乌头碱 3-次乌头碱
1-mesaconitine 2-aconitine 3-hypaconitine
图2 混合对照品(A)和提取液(B)的 HPLC 图
Fig.2 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and extract (B)

2.4 提取方法的比较

2.4.1 渗漉法:按处方比例,称取草乌 30 g、芫花 18 g、诃子 60 g 粗粉混合均匀用 8 倍 85%乙醇浸润 12 h 后,以 1 mL/min 的体积流量进行渗漉,收集渗漉液,直至流出液接近无色。

2.4.2 乙醇回流法:取草乌 30 g、芫花 18 g、诃子 60 g 混合均匀,加 85%乙醇回流 2 次,第 1 次 8 倍量回流 1.5 h,第 2 次 6 倍量,回流 1 h,滤过,合并滤液。

2.4.3 超声提取法:按处方比例称取那如-3 混合粗粉适量,置锥形瓶中,加 85%乙醇 8 倍量浸泡 0.5 h 后,超声提取 30 min,滤过,滤渣用溶剂冲洗至无色,合并滤液。

2.4.4 测定:将各提取液进行测定,测定结果见表 1。可见对于胡椒碱,超声法结果较高,但将 3 种方法测定结果进行 t 检验,结果差异无显著性。对于总乌头碱,3 种方法差异较大,其中渗漉法结果最高。故综合考虑各项指标,选择渗漉法作为提取方法,并采取正交试验法选择最佳条件。

2.5 渗漉法的正交试验设计及结果:按处方比例,称取草乌 30 g、芫花 18 g、诃子 60 g 粗粉混合均匀,加入一定倍量的一定体积分数的乙醇,pH 调至一定要求,浸润 12 h,以一定体积流量进行渗漉,收集渗漉液,直至流出液接近无色,测定。正交试验结果及方差分析结果见表 2~4。

表1 不同提取方法测定结果 ($n=3$)Table 1 Comparison of various extracting methods ($n=3$)

提取方法	胡椒碱/%	新乌头碱/%	乌头碱/%	次乌头碱/%	总乌头碱/%
回流法	0.368	0.039 8	0.005 95	0.019 7	0.065 0
渗漉法	0.333	0.053 9	0.007 52	0.020 3	0.081 7
超声法	0.383	0.030 0	0.005 92	0.017 9	0.054 1

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果Table 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A pH值	B 乙醇体积分数/%	C 体积流量/(mL·min ⁻¹)	D 加醇量/倍	胡椒碱/(mg·g ⁻¹)	总乌头碱/(mg·g ⁻¹)
1	1(2)	1(70)	1(1)	1(6)	4.27	0.886
2	1	2(80)	2(2)	2(8)	4.14	0.741
3	1	3(90)	3(3)	3(10)	4.12	0.655
4	2(4)	1	2	3	4.11	0.878
5	2	2	3	1	4.11	0.692
6	2	3	1	2	4.14	0.614
7	3(6)	1	3	2	3.80	0.816
8	3	2	1	3	4.21	0.855
9	3	3	2	1	4.11	0.586
胡椒碱	K_1	12.53	12.18	12.62	12.49	
	K_2	12.36	12.46	12.36	12.08	
	K_3	12.12	12.37	12.03	12.44	
	R	0.137	0.093 3	0.197	0.137	
乌头碱	K_1	2.282	2.58	2.355	2.164	
	K_2	2.184	2.288	2.205	2.171	
	K_3	2.257	1.855	2.163	2.388	
	R	0.032 7	0.242	0.064	0.074 7	

表3 胡椒碱的方差分析

Table 3 Variance analysis of piperine

误差来源	离均差平方和(SS)	自由度	均方	F	显著性
A	2.83×10^{-3}	2	1.42×10^{-3}	2.07	
B(误差)	1.37×10^{-3}	2	6.85×10^{-3}		
C	5.83×10^{-3}	2	2.92×10^{-3}	4.26	
D	3.34×10^{-3}	2	1.67×10^{-3}	2.44	

 $F_{0.05}(2,2)=19.00$

可见,影响胡椒碱提取效果的因素顺序为体积

表4 乌头生物碱的方差分析

Table 4 Variance analysis of Aconitum alkaloids

误差来源	离均差平方和(SS)	自由度	均方	F	显著性
A(误差)	1.73×10^{-4}	2	8.65×10^{-5}		
B	8.87×10^{-3}	2	4.44×10^{-3}	51.33	$P < 0.05$
C	6.793×10^{-3}	2	3.40×10^{-4}	3.93	
D	1.081×10^{-3}	2	5.40×10^{-4}	6.24	

 $F_{0.05}(2,2)=19.00$

流量>乙醇用量>pH>乙醇体积分数,最佳工艺为 $A_1B_2C_1D_1$ 。对乌头生物碱,方差分析表明,乙醇体积分数对生物碱影响具有显著性,而体积流量、乙醇用量则影响无显著性,影响乌头碱的顺序为乙醇体积分数>乙醇用量>体积流量>pH。由直观分析表明,提取乌头生物碱的最佳工艺为 $A_1B_1C_1D_3$ 。

鉴于各因素对胡椒碱无显著性影响,因此选择以乌头生物碱的最佳工艺 $A_1B_1C_1D_3$ 为提取条件,即采用 70%乙醇 10 倍量、pH 2、体积流量为 1 mL/min 渗漉法进行提取,按此条件,验证 3 次,结果胡椒碱平均质量分数为 4.10 mg/g,总乌头碱的质量分数为 0.902 mg/g。

3 讨论

曾对色谱条件进行选择,最后确定以甲醇-水(70:30)为流动相,胡椒碱和乌头生物碱分别在 343 nm 和 230 nm 检测,可同时进行测定,且分离效果较好,阴性样品无干扰。

实验中对测定胡椒碱和乌头生物碱的供试品溶液制备方法进行了选择,并分别考察了提取次数(3、4、5),结果提取 3 次即可使胡椒碱和乌头生物碱提取基本完全,为保证结果准确可靠,本实验选择提取 4 次。

本实验选择渗漉法作为提取方法,具有简便、实用、经济科学的特点,溶剂乙醇比较廉价,适用于大生产。

HPLC 法测定藏茴香油中葛缕酮

张存彦,王成港,陈继英,郭嘉林,王春龙*

(天津药物研究院 制剂中心,天津 300193)

藏茴香为伞形科植物葛缕子 *Carum carvi* Linn. 的干燥果实,其植物为多年生草本。藏茴香为常用藏药,该药性温、味微辛,有芳香健胃、驱风理气

之功,用于治疗胃脘疼痛、腹胀、消化不良及小肠疝气等症。藏茴香油为有效部位,其主要有效成分为葛缕酮和柠檬烯,其中葛缕酮占藏茴香油 60%左右。

收稿日期:2004-11-27

作者简介:张存彦(1976—),男,硕士研究生。

* 通讯作者 王春龙 Tel: (022) 23006880