

表1 不同体积分数乙醇对总蒽醌提取率影响
Table 1 Effect in different alcohol concentration on extracting rate of anthraquinone

提取溶剂	总蒽醌提取率/%	提取溶剂	总蒽醌提取率/%
去离子水	0.51	60%乙醇	1.79
20%乙醇	0.67	70%乙醇	2.95
40%乙醇	1.45	95%乙醇	2.15

质量浓度为0.2%的不同表面活性剂,测定总蒽醌提取率,见表2。结果表明SDS对大黄总蒽醌提取率影响最大。

2.5 不同质量分数SDS对提取率的影响:以40%乙醇为提取溶剂,分别加入不同质量分数的SDS,测定提取率,见表3。提取率的增加幅度是以70%乙醇提取率为相对标准(100%),考察加入不同质量分数的SDS后相对提取率的增加值,结果表明0.8% SDS提取率增加幅度最大。

表2 表面活性剂对提取率的影响

Table 2 Effect of surface active agent on extracting rate

表面活性剂	总蒽醌提取率/%
聚山梨酯 85	1.28
聚山梨酯 80	1.31
十二烷基硫酸钠(SDS)	1.63
十二烷基磺酸钠	1.56
司盘 40	1.31

表3 加入不同质量分数SDS对提取率的影响

Table 3 Effect of SDS concentration on extracting rate

SDS/%	总蒽醌提取率/%	增幅/%
0.0	1.38	—
0.2	1.66	9.5
0.4	1.80	14.20
0.6	1.88	16.95
0.8	1.98	20.33
1.0	1.92	18.31

2.6 SDS对游离与结合蒽醌提取率的影响:以40%乙醇为提取溶剂,精密量取0.5 mL 续滤液,乙醚萃取至无色,合并乙醚萃取液,浓缩液置5 mL 量瓶中,挥去乙醚,0.5%醋酸镁甲醇显色,测定游离蒽

醌提取率。精密量取0.5 mL 于具塞试管中,测定总蒽醌的提取率。以总蒽醌提取率减去游离蒽醌提取率即为结合蒽醌提取率。见表4。

表4 SDS对游离和结合蒽醌提取率的影响

Table 4 Effect of SDS on extracting rate of free and conjugated anthraquinone

SDS/%	存在状态	总蒽醌提取率/%
0.0	总蒽醌	1.31
	游离型	0.72
	结合型	0.59
0.8	总蒽醌	1.96
	游离型	1.09
	结合型	0.87

3 讨论

表面活性剂在溶液中形成临界胶束,对难溶性药物产生增溶作用,因此可以提高大黄中总蒽醌的提取率。不同的表面活性剂对不同分子结构的难溶物质增溶作用不同。大黄中的游离蒽醌极性弱,不溶于水,易溶于氯仿、乙醇、乙醚等有机溶剂,结合蒽醌极性较强,易溶于水。实验结果表明:SDS对游离与结合蒽醌均有增溶作用。

SDS可以增加大黄中总蒽醌提取率,降低提取溶剂乙醇的体积分数,降低提取成本,因此本方法有较高的实用价值。

References:

- [1] Huang Y. Orthogonal test for effect of water and alcohol extracting process to anthraquinone content in *Radix et Rhizoma Rhei* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2003, 25 (4): 273-276.
- [2] Zhang Y H. Researching the condition that can effect the content of extracting anthraquinone in *Radix et Rhizoma Rhei* [J]. *J Lanzhou Med Coll* (兰州医学院学报), 1996, 22 (2): 27-29.
- [3] Han G, Han X C, Zhang W G. Study on applying surface active agent to increase extractive rate of curcumin [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 26 (4): 577-579.
- [4] *British Pharmacopoeia* [S]. Vol 1. 1993.

一步提取山楂中总黄酮和熊果酸的工艺研究

杨万运, 殷殿书, 蒋建兰*, 元英进

(天津大学化工学院 制药工程系, 天津 300072)

山楂为药食两用中药, 广泛用于治疗消化不良、高血脂、冠心病等症。主要含黄酮类和三萜类等有效

收稿日期: 2004-12-30

作者简介: 杨万运(1976—), 男, 陕西富平人, 硕士研究生, 2000年毕业于天津大学生物化工专业, 研究方向为药物制剂、药物分析、中药现代化研究。E-mail: yangwanyun@eyou.com

* 通讯作者 蒋建兰 Tel: (022) 27400388 E-mail: jiang0202@126.com

成分,熊果酸是山楂三萜类物质的主要成分。所含黄酮类有降低高血脂模型大鼠血脂的作用^[1],熊果酸能明显降低高血脂小鼠胆固醇、调节血脂的作用^[2]。目前工业提取过程仅提取总黄酮而不考虑熊果酸,造成资源浪费,文献也只考虑总黄酮或熊果酸的提取,而没有把两种有效成分综合考察^[3,4]。本实验采用不同体积分数的乙醇超声提取,以干粉得率、总黄酮和熊果酸提取率为考察指标,确立一步提取,同时提高山楂提取物中降脂成分总黄酮和熊果酸的量,为山楂单方或复方制剂生产提取提供实验依据。

1 材料、试剂与仪器

山楂,产地:河北安国,经石家庄第四制药厂姚震林高级中药师鉴定为山楂 *Crataegus pinnatifida* Bunge 的果实。标准品:芦丁,批号:0080-9705,中国药品生物制品鉴定所;熊果酸,批号:110742-200212,中国药品生物制品鉴定所。甲醇为色谱纯,其他试剂均为国产分析纯。

SSI 高效液相色谱仪(美国),TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用);BS210S 电子天平(德国赛多利斯);C3860 超声波清洗器;ALPHA1-2 冷冻干燥机(德国 Christ)。

2 方法与结果

2.1 待测样品的制备^[5]:称取粉碎的山楂粉 20 g,11 份,分别加 15 倍体积水、10%乙醇、20%乙醇、30%乙醇、40%乙醇、50%乙醇、60%乙醇、70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、无水乙醇,超声处理 45 min,滤过,滤渣再重复提 2 次,合并提取液,减压浓缩到一定体积,用水定容。分为两部分,一部分为供试品 A,另一部分转移至分液漏斗中,用水饱和的正丁醇萃取 5 次,至正丁醇无色,合并正丁醇溶液,挥干、残渣用乙醇溶解转移至量瓶,用 60%乙醇定容,得供试品 B,备用。

2.2 干粉的测定:取供试品 A,加水适量稀释,转移至烧杯,置冰箱预冻 24 h 后,取出,冷冻干燥,制得提取物干粉。提取物于称量,计算于干粉得率(干粉质量/山楂粉质量×100%),以乙醇体积分数对干粉得率作图,结果见图 1。

2.3 总黄酮测定^[6]

2.3.1 标准曲线的绘制:精密称取干燥至恒重的芦丁对照品 9.3 mg,置 25 mL 量瓶中,加 60%乙醇溶解至刻度,摇匀,即得对照品溶液。精密吸取对照品溶液 0.0、0.3、0.5、0.8、1.0、1.3、1.5、1.8、2.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加 60%乙醇溶液至 5 mL,精密加入 5%亚硝酸钠 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,再

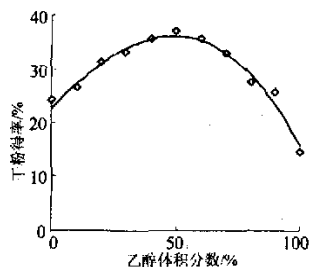


图 1 乙醇体积分数与干粉得率的关系

Fig. 1 Relationship between ethanol concentration and dry powder extracting yields

精密加入 10%三氯化铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 10 min,再加入 4%氢氧化钠溶液 4 mL,最后加 60%乙醇至刻度,摇匀,放置 10 min,置比色杯中。以不加对照品的空白做参比,在 510 nm 处测吸光度(A)值,测 3 次,取平均值。以芦丁质量浓度(C)对 A 计算回归方程和相关系数。回归方程: $C = 0.0883A + 0.0014$, $r = 0.9998$ 。结果表明芦丁在 11.16~74.4 μg/mL 与吸光度线性关系良好。

2.3.2 样品测定:取供试品 B,按标准曲线项下方法测定 A 值,测 3 次,取均值,根据回归方程计算总黄酮的量。

2.4 熊果酸测定

2.4.1 色谱条件:色谱柱:Thermo ODS-2 Hypersil (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-15 mmol/L 磷酸盐(pH 6.8)缓冲液(78:22);体积流量:0.5 mL/min;柱温:25 °C;检测波长:219 nm;灵敏度:0.5 AUFS;进样量:10 μL。理论塔板数以熊果酸计不低于 2 000。

2.4.2 标准曲线的绘制:精密称取熊果酸对照品 10.56 mg 于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,制成含熊果酸 1.056 mg/mL 的对照品溶液。分别精密量取对照品溶液 0.15、0.3、0.6、1.2、2.4、3.6 mL 于 5 mL 量瓶中,用流动相加至刻度。按上述色谱条件,分别吸取 10 μL 进样,测定熊果酸的峰面积,重复 3 次,取均值,以质量浓度(C)对色谱峰面积(A)计算回归方程和相关系数。回归方程: $C = 6 \times 10^{-7}A - 0.0018$, $r = 0.9996$ 。结果表明熊果酸在 0.03168~0.76032 mg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.4.3 样品测定:取供试品 B,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,精密吸取 10 μL,按上述色谱条件进行测定,重复进样 3 次,取均值,根据回归方程计算熊果酸的量。色谱图见图 2。

2.5 乙醇体积分数与总黄酮提取率的关系:根据 A 值计算各样品中总黄酮,得出总黄酮提取率(总黄酮

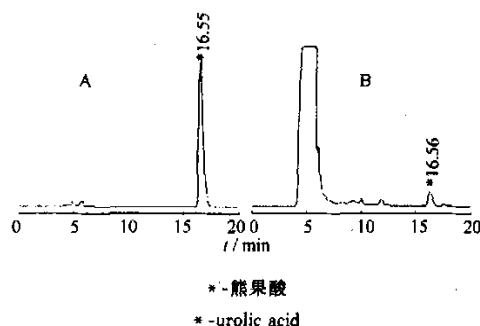


图2 熊果酸对照品(A)和山楂提取物(B)的HPLC图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of urololic acid reference substance (A) and *C. pinnatifida* extract (B)

质量/山楂粉质量 $\times 100\%$,以乙醇体积分对总黄酮提取率作图,结果见图3。

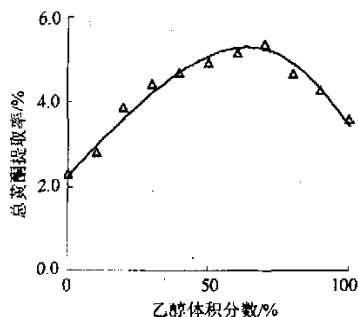


图3 乙醇体积分数与总黄酮提取率的关系

Fig. 3 Relationship between ethanol concentration and flavonoids extracting rate

2.6 乙醇体积分数与熊果酸提取率的关系:根据峰面积计算各样品中熊果酸,得出熊果酸提取率(熊果酸质量/山楂粉质量 $\times 100\%$),以乙醇体积分对熊果酸提取率作图,结果见图4。

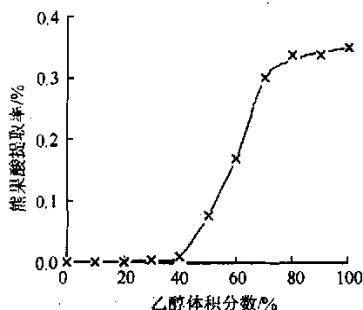
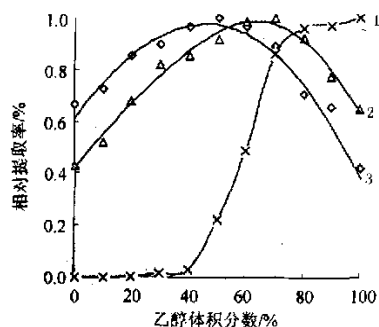


图4 乙醇体积分数与熊果酸提取率的关系

Fig. 4 Relationship between ethanol concentration and urololic acid extracting rate

2.7 乙醇体积分数与干粉得率、总黄酮和熊果酸提取率的关系:以乙醇体积分数为横坐标,相对提取率(各指标在不同乙醇体积分数下的提取率/最大提取率 $\times 100\%$)为纵坐标做图,见图5。



1-熊果酸 2-总黄酮 3-干粉

1-urololic acid 2-total flavonoids 3-dry powder

图5 乙醇体积分数与相对提取率的关系

Fig. 5 Relationship between ethanol concentration and relative extracting rate

3 讨论

50%乙醇时,干粉得率最大,为35%,随着乙醇体积分数的降低或增加,干粉得率逐渐降低,水提取时,提取率为24%,无水乙醇提取时,干粉得率最低,为15%。70%乙醇时,总黄酮提取率最大,达5.376%,而水提取只得2.295%,无水乙醇时提取率为3.475%。随着乙醇体积分数的增加,熊果酸提取率增大。水提取率为0,当乙醇体积分数为0~40%时提取率很低,40%~70%时剧增,80%~100%时基本达到最大提取率,无水乙醇提取时,熊果酸提取率最大,为0.3505%。

从中药多组分、多靶点的作用特点考虑,为能达到山楂中降脂成分总黄酮、熊果酸的提取率相对较高,而干粉得率相对较低的最适乙醇体积分数,将3个指标的相对提取率与乙醇体积分数结合在一起考察作图,可直观地观察和分析各指标随乙醇体积分数变化趋势及各指标之间的相互变化趋势。总黄酮和熊果酸的相对提取率均较高时(93.6%),乙醇体积分数为78.6%,此时干粉相对提取率为85.6%,达到了所得干粉或浸膏量少而降脂有效成分高,最终达到一步提取,简化工艺,取精去杂、减少服用量的中药现代化要求。

References:

- [1] Lin Q S, Chen J D. Molecular mechanism of hawthorn and its flavonoids in prevention on lipid metabolism disorder in rats [J]. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 2000, 22 (2): 131-136.
- [2] Li G H, Sun J Y, Yang Z N, et al. Experimental studies on antihyperlipidemia effects of two compositions from hawthorn in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (1): 50-52.
- [3] Zhang Y, Li H W, Zhang Y C, et al. Study on extraction methods of flavonoids from hawthorn fruit and their determi-

- nation [J]. *J Harbin Med Univ* (哈尔滨医科大学学报), 2001, 35 (3): 183-185.
- [4] Zhang C T, Jiang M L, Zhao B Q, et al. Optimization of alcohol extract technology of hawthorn by orthogonal design [J]. *J Hunan Coll Tradit Chin Med* (湖南中医学院学报), 2002, 22(1): 38-39.
- [5] Liu C Y, Tang L H. Effect of different extraction methods on flavonoids in hawthorn extract [J]. *Acta Acad Med Suzhou* (苏州医学院学报), 1998, 18 (12): 1266-1267.
- [6] Sun L L, Xie H X, Sun J J, et al. Determination of flavonoids in *Fructus Crataegi* by colorimetry [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23 (10): 748-750.

HPLC 法测定固本益肠薄膜衣片中芍药苷

鲁曼华¹, 李洪侠², 孙 玫³, 梁 娟⁴

(1. 沈阳军区总医院, 辽宁 沈阳 110015; 2. 沈阳市医药学校, 辽宁 沈阳 110013; 3. 沈阳绿洲制药有限责任公司, 辽宁 沈阳 110016; 4. 沈阳军区总医院 动物实验科, 辽宁 沈阳 110015)

固本益肠片是由白芍、黄芪、延胡索、党参等 14 味中药制成的中药制剂, 具有健脾温肾、涩肠止泻之功效, 临床用于治疗脾肾阳虚所致的慢性腹泻。芍药苷是其中的主要有效成分, 具有抗炎、镇痛作用^[1]。本实验采用 RP-HPLC 对固本益肠片中的芍药苷测定方法进行了研究, 结果表明, 该法简便、快捷、重现性好, 可用于固本益肠片的质量控制。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, SPD-10AVP 紫外检测器, Anashtar 工作站; KQ2200 超声波清洗器。

固本益肠薄膜衣片(沈阳绿洲制药有限责任公司); 芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所); 甲醇、乙腈为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Discovery C₁₈ 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-0.025 mol/L 磷酸溶液 (含 0.18% 三乙胺) (2: 13: 85); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 230 nm。理论板数按芍药苷峰计算, 不低于 4 500。

2.2 芍药苷对照品溶液: 取芍药苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并稀释使成 80.5 μg/mL, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备: 取本品 20 片, 精密称定、研细、混匀, 取约 1 g, 精密称定, 加水 30 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 置 50 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 色谱行为: 按固本益肠片处方称取除白芍外的各药, 与样品相同工艺制备空白片剂, 制备溶液, 通

过比较, 确证 16.711 min 色谱峰为芍药苷色谱峰, 空白制剂中其他组分不干扰测定, 结果见图 1。

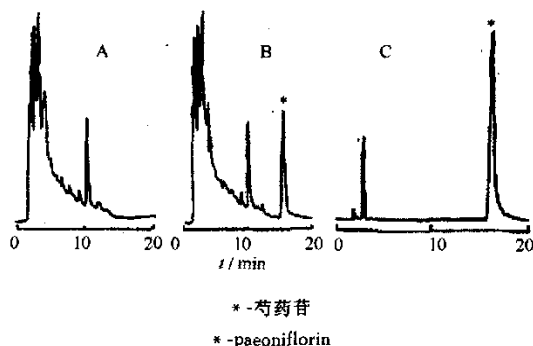


图 1 空白阳性对照(A)、固本益肠薄膜衣片(B)和芍药苷对照品(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of negative sample without *Radix Paeonile Alba* (A), Guben Yichang Tablets (B), and paeoniflorin reference substance (C)

2.5 标准曲线的绘制: 精密吸取芍药苷对照品溶液 2.0、4.0、5.0、8.0、10.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 依次吸取 20 μL, 注入高效液相色谱仪。以峰面积对质量浓度进行线性回归计算, 得标准曲线回归方程为 $Y = 852\,389 X - 9\,677.2$, $r = 0.999\,3$, 说明芍药苷在 16.1~80.5 μg/mL 与色谱峰的峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验: 取样品批号为 20031001 的供试品溶液, 连续进样 5 次, 测定芍药苷峰面积, 计算得其 RSD 为 0.95%。

2.7 重现性试验: 取批号为 20031001 样品, 5 份, 制备供试品溶液, 分别进样分析, 测定芍药苷峰面积积分值, 计算方法精密度 RSD 为 0.71%。