

高疗效,减少服用剂量和便于质量控制,同时也便于制剂成型的目的。本实验采用多组分 HPLC 法测定,既控制了吴茱萸生物碱类成分,又控制了柠檬苦素类成分,为后期纯化工艺提供了保障。吴茱萸碱和吴茱萸次碱不溶于水、酸水和碱水等水溶性溶剂^[7],柠檬苦素类化合物属于三萜类似物,易溶于有机溶剂,在甲醇、乙醇中溶解度较大,难溶于水^[8],故可以采用水沉工艺进行纯化。但从实验中发现,柠檬苦素随着 pH 值增大溶解度也增大,在碱性水溶液中柠檬苦素的溶解度增大,而在酸性水溶液中溶解度较低,这可能与其结构中含有内酯键、醛基和醚键有关,能够表现酸性。

应用氧化铝柱对物质进行分离纯化,是溶剂对化合物的溶解力和氧化铝柱的吸附能力的一个综合结果。本实验开始采用湿法上样,但适度洗脱液不能完全溶解沉淀,在洗脱过程中容易堵塞色谱柱,采用干法上样能较好解决此问题。在洗脱液的考察时,发现吴茱萸碱和吴茱萸次碱在极性较低(环己烷、二氯甲烷)的洗脱液就能被洗脱下来,而柠檬苦素要在极性较强的洗脱剂(醋酸乙酯)才能被洗脱下来,根据相似相溶原理,吴茱萸碱和吴茱萸次碱属于

吲哚类生物碱,极性较弱,而柠檬苦素含有多个氧原子,极性相对较强些。

本实验先进行醇提水沉工艺,然后中性氧化铝柱色谱纯化吴茱萸中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素,并达到了有效部位的要求,便于制剂成型。该工艺可用于吴茱萸的活性成分的纯化,且经济简便,易于操作,转移率较高。

参考文献:

- [1] 李 飞. 方剂学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002
- [2] 徐继华,刘文英,屠旦来. 吴茱萸多糖的分离和组成研究[J]. 中草药,2009,40(4): 573-576
- [3] 于静华,刘春禹,吕小丹,等. 吴茱萸药理研究进展[J]. 吉林中医药,2005,25(2): 53
- [4] Atsuda H, Yoshikawa M, linuma M, *et al.* Antinociceptive and antiinflammatory activities of limonin isolated from the fruits of *Evodia rutaecarpa* var *bodinieri* [J]. *Planta Med*, 1998, 64: 339-342
- [5] 李 丽,贾 英,陈晓辉,等. HPLC 法同时测定吴茱萸中吴茱萸苦素和柠檬苦素的含量[J]. 中国天然产物,2003,1(3): 158-160
- [6] 鲍天冬,董 宇,杨 庆,等. 高效液相色谱法同时测定吴茱萸及其提取物中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和吴茱萸内酯含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(6): 1-3
- [7] 柯铭清. 中草药有效成分理化与药理特性[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1982
- [8] 杨 云,张 晶,陈玉婷. 天然药物化学成分提取分离手册[M]. 北京:中国中医出版社,2003.

板蓝根多糖的降解和单糖组成的毛细管区带电泳测定研究

郭怀忠^{1,2}, 张 斌¹, 徐相涛¹, 张硕敏¹

(1 河北大学药学院,河北 保定 071002; 2 河北省药物质量分析控制重点实验室,河北 保定 071002)

摘 要:目的 优化板蓝根多糖的提取、降解工艺,并对其单糖组成进行测定。方法 通过正交试验对板蓝根多糖的提取和降解条件进行优化。以 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)为单糖的柱前衍生化试剂,用毛细管区带电泳法(CZE)测定板蓝根多糖的单糖组成。结果 板蓝根多糖最佳降解条件为:1 mol/L 硫酸溶液,95 ℃恒温降解 5 h。板蓝根多糖由木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、半乳糖等组成。结论 采用优化工艺提取和降解板蓝根多糖,结果稳定,重现性好,毛细管区带电泳法用于板蓝根多糖的单糖组成测定及其质量控制,准确,可靠,结果满意。

关键词:板蓝根;多糖;正交试验;衍生;PMP;单糖

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)05-0744-04

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根,始载于《神农本草经》,性寒、味苦,归心、胃经,有清热解毒、凉血消肿的功效^[1]。研究表明板蓝根含有靛玉红、靛蓝、多种氨基酸和多糖等

成分^[2]。有些糖类在抗肿瘤、抗肝炎、抗心血管疾病、抗衰老等方面具有独特的生物活性^[3]。目前有报道板蓝根多糖为均多糖,单糖组成为木糖^[4]。本实验采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)进行单

①收稿日期:2009-08-28

基金项目:河北大学自然科学基金资助项目(2007-111)

作者简介:郭怀忠(1968—),男,内蒙古商都县人,副教授,博士,2005年7月获沈阳药科大学药物分析专业理学博士学位,2005年10月于天津大学药学院从事教学和科研工作,2007年7月至今工作于河北大学药学院,承担国家863计划以及国家自然科学基金等项目的科研

糖衍生, 高效毛细管电泳法测定板蓝根多糖中的单糖组成, 为板蓝根多糖的质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

CL1020 高效毛细管电泳仪(北京彩陆科学仪器有限公司); H W2000 色谱工作站; PHS-3C 型酸度计(上海理达仪器厂); L500 低速自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); T6 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); 毛细管柱(50 cm × 50 μm, 有效长度 40 cm, 河北永年锐沓色谱器件有限公司)。

1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP, 日照力德士化工有限公司, 批号 20090324); D-木糖(保定市化工二厂提供, 批号 20070908), D-阿拉伯糖(北京索莱宝科技有限公司分装, SigmaA3131, 批号 D8120, 质量分数 ≥99.0%), D-葡萄糖(天津市福晨化学试剂厂, 批号 20070927, 分析纯), L-鼠李糖(合肥博美生物科技有限责任公司, 批号 20081020, 质量分数 ≥98.0%), D-甘露糖(北京索莱宝科技有限公司, 批号 20090108, 质量分数 ≥99.5%), D-半乳糖(北京索莱宝科技有限公司分装, Amresco 0637, 批号 D8310, 质量分数 ≥99.0%); 其他试剂均为分析纯; 乙醇(医用规格); 蒸馏水。

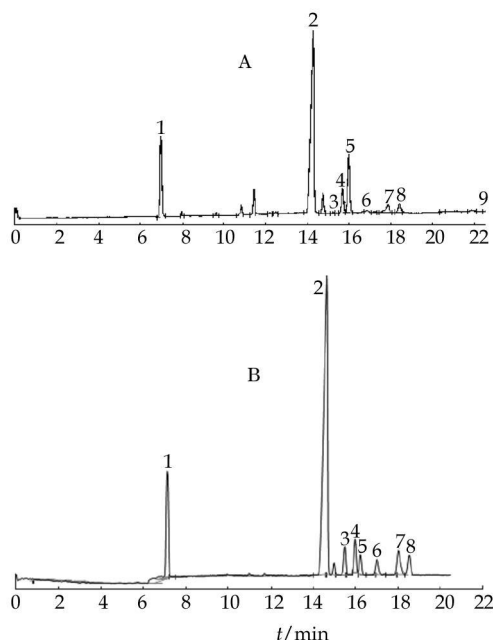
板蓝根药材为市售, 经保定市药品检验所田桂敏副主任药师鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 板蓝根多糖的提取与纯化^[5]: 取 20 g 板蓝根药材, 置于 250 mL 蒸馏烧瓶中, 分 3 次回流提取, 蒸馏水加入量分为 200、100、100 mL; 回流时间分别为 120、60、30 min。提取液合并后, 离心, 减压浓缩, 加入乙醇使含醇量为 85%, 静置过夜。离心后收集下层固体, 并溶于水。活性炭脱色后, 采用 Sevag 法除蛋白, 再加水至 40 mL, 加乙醇使含醇量为 85%, 静置过夜, 离心收集下层固体, 并于 60 °C 下真空干燥, 即得板蓝根多糖。精密称取板蓝根多糖 10 mg, 加水溶解, 移至 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 在 200~300 nm 进行紫外扫描, 结果未发现蛋白质和核酸的特征吸收峰。

2.2 多糖的毛细管电泳测定

2.2.1 电泳条件: 未涂层弹性石英毛细管柱(50 cm × 50 μm, 有效长度 40 cm), 缓冲液为 180 mmol/L 硼酸溶液(0.3 mol/L NaOH 溶液调 pH 值为 10.0); 检测波长为 245 nm; 电压 10 kV; 柱温为室温; 虹吸进样, 进



1-内标(硫脲) 2-PMP 3-木糖 4-阿拉伯糖
5-葡萄糖 6-鼠李糖 7-甘露糖 8-半乳糖
1-internal standard (thiourea) 2-PMP 3-xylose 4-arabinose
5-glucose 6-rhamnose 7-mannose 8-galactose

图 1 板蓝根多糖降解样品(A)和单糖(B)PMP 衍生物的 CZE 图谱

Fig 1 CZE Chromatogram of PMP derivatives of degraded *Radic Isatidis* polysaccharide (A) and monosaccharides (B)

2.2.2 衍生试剂溶液的配制: 称取 PMP 0.8778 g, 溶于甲醇中, 并定容至 10 mL, 制备成浓度为 0.5 mol/L 的溶液。

2.2.3 单糖对照品溶液的配制: 分别精密称取木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、半乳糖对照品 49.6、55.8、51.6、51.8、48.6、52.0 mg, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加入蒸馏水, 稀释至刻度, 振荡摇匀, 作为对照品溶液。

2.2.4 内标溶液的配制: 精密称取硫脲 251.2 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加入蒸馏水, 并稀释至刻度, 振荡摇匀, 作为内标溶液。

2.2.5 线性关系考察: 精密量取 2 mg/mL 木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖和半乳糖的对照品溶液 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 mL 及内标溶液 1.0 mL, 分置 5 mL 量瓶中, 定容, 得到质量浓度分别为 20、40、80、120、160 μg/mL 的溶液, 衍生。以对照品溶液的质量浓度为横坐标, 相应的峰面积比值为纵坐标, 进行线性回归, 线性范围为 19.8~208.9 μg/mL。回归方程为木糖: $Y = 0.0037X - 0.0302$, $r = 0.9995$;

糖: $Y = 0.0017X + 0.0082$, $r = 0.9996$; 鼠李糖: $Y = 0.0024X + 0.0102$, $r = 0.9998$; 甘露糖: $Y = 0.0040X + 0.0123$, $r = 0.9988$; 半乳糖: $Y = 0.0030X - 0.0051$, $r = 0.9994$ 。

2.2.6 精密度试验: 精密量取各单糖对照品溶液 0.20 mL, 分置 5 mL 量瓶中, 加入硫脲溶液 1.0 mL, 水稀释至刻度, 配成 80 μg/mL 混合溶液, 衍生后各连续进样 5 次。计算得木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、半乳糖峰面积与内标硫脲峰面积比值的 RSD 分别为 0.75%、0.41%、1.0%、0.35%、0.96%、1.1%。

2.2.7 重现性试验: 取同一批次板蓝根多糖 5 份, 经降解、衍生, 制备 5 份供试品溶液, 按上述条件测定, 结果木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、半乳糖峰面积与内标峰面积比值的 RSD 分别为 1.8%、0.94%、0.65%、1.6%、1.0%、0.83%。

2.2.8 稳定性试验: 取同一批次板蓝根多糖, 经降解、衍生, 制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定, 结果木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、半乳糖峰面积与内标峰面积比值的 RSD 分别为 2.4%、1.1%、0.86%、2.2%、1.5%、1.3%, 表明供试品溶液至少在 24 h 内稳定。

2.2.9 加样回收试验: 以板蓝根多糖中较多的葡萄

糖和阿拉伯糖为代表, 取 3 份板蓝根多糖样品, 每份约 20 mg, 精密称定, 降解后分别加入不同量的葡萄糖和阿拉伯糖, 制备低、中、高 3 个不同质量浓度水平的供试品溶液, 每一水平 3 份, 衍生后进行测定。记录峰面积, 计算葡萄糖的平均回收率在 93.0%~96.5%, RSD 小于 1.3%; 阿拉伯糖的平均回收率在 93.0%~94.3%, RSD 小于 2.2%。

2.3 板蓝根多糖的降解: 参考有关文献报道^[6], 通过预实验得到以硫酸法降解板蓝根多糖效果较好时各因素的大致范围, 选取降解温度(A)、硫酸浓度(B)、降解时间(C)为考察因素, 进行 $L_9(3^4)$ 试验, 以毛细管电泳内标法测定单糖为指标对各因素和水平进行评价和选择。

由正交试验结果(表 1)可知, 3 个因素对板蓝根多糖降解效果的影响顺序为: 降解温度> 酸浓度> 降解时间, 最优组合为 $A_2B_2C_3$, 即 1 mol/L 硫酸溶液, 95 ℃恒温降解 5 h。方差分析结果(表 2)表明提取温度、酸浓度和提取时间对鼠李糖等单糖提取效率的影响有统计学意义。最终选取的降解条件为: 精密称取板蓝根多糖 20 mg, 溶于 1 mol/L H_2SO_4 溶液 2.0 mL 中, 密封, 95 ℃恒温 5 h, 冷却后, 以 4 mol/L NaOH 溶液中和, 冷却, 移至 10 mL 量瓶中, 精密加入 2.0 mL 上述硫脲溶液, 加水定容, 摇匀, 待衍生。

表 1 多糖降解的正交试验结果

Table 1 Results of orthogonal test of polysaccharide degrading

试验号	A	B	C	D(误差)	单糖/%						
					木糖	阿拉伯糖	葡萄糖	鼠李糖	甘露糖	半乳糖	总量
1	1	1	1	1	0.32	2.01	0.56	0.26	0.20	0.64	4.02
2	1	2	2	2	0.25	3.11	6.22	0.41	1.32	1.07	12.41
3	1	3	3	3	0.62	2.16	14.94	0.70	1.74	2.07	22.26
4	2	1	2	3	0.22	2.76	16.39	—	0.71	2.52	22.62
5	2	2	3	1	0.42	3.01	23.36	0.40	1.86	2.60	31.67
6	2	3	1	2	0.27	2.54	18.87	0.27	1.53	2.28	25.77
7	3	1	3	2	0.77	1.95	18.56	—	1.40	2.13	24.82
8	3	2	1	3	—	3.05	24.36	—	2.43	2.49	32.25
9	3	3	2	1	—	1.72	16.12	—	0.53	1.90	20.26
K_1	12.90	17.15	20.71	18.65							
K_2	26.69	25.47	18.44	21.00							
K_3	25.81	22.77	26.25	25.74							
R	13.79	8.32	7.81	7.09							

—代表未检测到该单糖

— indicated undetected

表 2 方差分析

Table 2 Variance of analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	0.323	2	0.162	1580.466	$P < 0.01$
B	0.094	2	0.047	456.961	$P < 0.01$
C	0.091	2	0.046	446.550	$P < 0.01$
D(误差)	0.000103	2	0.00005		

$F_{(2,2)} = 19.0$ $F_{(2,2)} = 99.0$

2.4 板蓝根多糖降解产物的衍生: 精密量取供试品溶液 80 μL, 加入 50 μL 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液和 50 μL 0.3 mol/L NaOH 溶液, 70 ℃条件下水浴 0.5 h, 冷却至室温后加入 50 μL 0.3 mol/L HCl 溶液中和, 再加入 2 mL 三氯甲烷萃取去除过量的 PMP, 0.45 μm 微孔滤膜滤过后即得

2.5 样品测定:取 3 种不同来源的板蓝根多糖,按照上述方法进行样品制备和测定,计算得到木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、组成半乳糖物质量的比分别为($n=3$):1 号 1.69:9.04:53.1:1.00:1.67:6.51;2 号 0.65:5.79:29.5:1.00:3.28:4.07;3 号 1.12:3.63:19.8:1.00:1.88:2.64。

3 讨论

虽然实验结果表明 3 个不同来源板蓝根多糖的单糖组成类似,但其组成比例差异显著。中药内在质量的稳定性是实现中药质量控制的前提,中药标准化研究急需突破。

曾选择硫脲、苯巴比妥、水杨酸等作为内标物,鉴于样品成分复杂,最终选用硫脲作为内标物,保留时间适宜,且其他成分对选取的内标电泳峰无干扰。

马莉等^[4]报道通过薄层色谱分析,得到板蓝根多糖的 4 种组分均由单一木糖组成。而本实验结果表明板蓝根多糖含有木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠

李糖、甘露糖和半乳糖等多种单糖。结果的差异可能是因为文献采用了不同来源的板蓝根药材所含多糖种类不同,也可能是文献采用的薄层色谱法分辨率不理想造成了结果的差异。毛细管电泳法柱效高、分离能力强,用于分析多糖的单糖组成,专属性高,可靠性强。

参考文献:

- [1] 肖珊珊,金郁,孙毓庆.板蓝根化学成分、药理及质量控制研究进展[J].沈阳药科大学学报,2003,20(6):455-459
- [2] 雷黎明,潘清平.板蓝根化学、药理、质量及提取方法的研究进展[J].时珍国医国药,2007,18(10):2578-2580
- [3] 吴寿金,赵泰,秦永奇.现代中草药成分化学[M].北京:中国医药科技出版社,2002
- [4] 马莉,唐健元,李祖伦,等.板蓝根多糖分离纯化及其性质的研究[J].中草药,2007,38(8):1143-1146
- [5] 王志远,戴玲,朱业云,等.半枝莲酸性多糖 SBPs 的纯化、性质及抗氧化活性研究[J].中草药,2009,40(5):728-731
- [6] 陈蕾,吴昊.多糖降解方法的研究进展[J].中华中医药学刊,2008,26(1):133-135

正交试验法优选麻黄的提取工艺研究

吴晓云

(杭州市第三人民医院 药剂科,浙江 杭州 310009)

摘要:目的 筛选 50% 乙醇回流法提取麻黄中盐酸麻黄碱的最佳工艺。方法 采用正交试验法,以提取次数、提取时间、溶媒用量为因素,HPLC 法测定盐酸麻黄碱并作为评价指标。采用 Dikma Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.2% 磷酸水溶液-乙腈(96:4);检测波长:205 nm;体积流量:1 mL/min。结果 盐酸麻黄碱在 0.488~3.416 μg 线性关系良好,平均回收率为 100.26%,RSD 为 2.17%。提取次数对盐酸麻黄碱的提取率有显著性影响。结论 麻黄中盐酸麻黄碱的最佳提取工艺为 50% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,7 倍量溶媒。

关键词:麻黄;盐酸麻黄碱;提取工艺;正交试验

中图分类号:R284.2

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2010)05-0747-03

麻黄为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf、中麻黄 *E. intermedia* Schrenk et C. A. Mey. 或木贼麻黄 *E. equisetina* Bag. 的干燥草质茎。味辛、微苦,性温,具发汗散寒、宣肺平喘、利水消肿之功效^[1]。主要成分为盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱。本实验以盐酸麻黄碱为指标,采用 HPLC 法测定,利用正交试验设计,以 50% 乙醇为溶媒加热回流提取,考察影响盐酸麻黄碱提取率的因素,筛选麻黄的最佳提取工艺条件。

1 仪器与试药

Perkin Elmer Series 200 高效液相色谱仪(PerkinElmer 公司);Perkin Elmer Lambda 20 紫外/可见分光光度计(Perkin Elmer 公司);Dikma Diamonsil C₁₈ 柱(迪马公司);AB204-S 电子分析天平(Mettler Toled 公司)。

乙腈(色谱纯,TEDIA 公司);盐酸麻黄碱对照品(购自中国药品生物制品检定所,批号 722-200006);麻黄药材购自萧山市医药有限责任公司中药分公司,经浙江省中药研究所药材资源室鉴定为草麻黄。