

测试,进样量各为 10 μ L,分析结果见表 2

表 1 回收率实验结果

样 品	进样浓度		峰面积			回收率		RSD(%)
	(mg/mL)					(%)	(%)	
大豆苷	0.038 6	23 894	23 869	23 919	23 892	99.74		0.085 5
大豆黄素	0.016 5	56 530	57 006	57 489	57 008	100.01		0.686 8
染料木苷	0.017 1	58 682	59 732	59 137	59 184	100.08	100.05	0.726 4
染料木素	0.041 5	98 595	98 465	98 724	98 593	100.36		0.107 2

表 2 导入基因大豆后代的异黄酮的含量 (mg/100 mg)

样品	大豆黄素	染料木素	大豆苷	染料木苷
Y ₁₀ -10-3	0.000 5	0.001 3	0.009 5	0.017 6
Y ₁₀ -12-1	0.001 2	0.001 5	0.011 7	0.010 4
Y ₁₀ -12-2	0.010 2	0.012 5	0.057 3	0.056 8
Y ₁₀ -15-3	0.001 2	0.001 9	0.007 2	0.012 0
Y ₁₀ -15-13	0.001 1	0.002 0	0.018 3	0.028 7
Y ₁₀ -30-1	0.005 7	0.008 4	0.027 9	0.030 1
Y ₁₀ -30-2	0.004 8	0.005 6	0.018 8	0.020 8
Y ₁₀ -30-3	0.002 0	0.003 8	0.019 8	0.032 4
Y ₁₀ -42-1	0.000 8	0.001 2	0.011 1	0.015 2
Y ₁₀ -43-2	0.001 5	0.002 4	0.021 5	0.031 4
Y ₁₀ -53-1	0.001 0	0.002 3	0.011 5	0.021 1
湘春豆 10号	0.001 2	0.001 7	0.015 3	0.018 5

3 小结

3.1 对 12批样品 4种异黄酮类成分含量测定结果

表明,导入西洋参 DNA 基因后的大豆异黄酮类含量发生了广泛的变异,与样本湘春豆 10号比较,就大豆黄素成分而言,高于受体亲本的样品数有 5个;染料木素成分,有 8个样品明显高于亲本,大豆苷成分,有 6个样品;染料木苷成分,有 7个样品。其中 Y₁₀-30-2, Y₁₀-30-3, Y₁₀-12-2, Y₁₀-30-1 样品的 4种成分含量大大的高于亲本湘春豆 10号。此结果也表明,西洋参 DNA 导入大豆后,提高了大豆的有效成分含量,从中可望筛选出有效成分含量较高的株系进一步栽培,培育出大豆新的种资源。

3.2 经反复实验,此 HPLC 法能同时测定大豆中的 4种异黄酮类成分的含量,分离良好,方法比较简便,快速。

参 考 文 献

- 1 麻 浩,等.中草药,2000,(1): 51
- 2 郭建平,等.中草药,1995,26(3): 163,(6): 298
- 3 白井智之,等.第 57回日本癌学会总会,横浜,1998,92
- 4 国家医药管理局中草药情报中心站编.植物药有效成分手册.北京:人民卫生出版社,1986 493
- 5 早川顺子,等.药学杂志,1984 104(1): 50

(1999-02-09收稿)

SFE-HPLC测定银杏叶粗提物中黄酮类化合物的含量

第二军医大学药学院药物分析教研室(上海 200433) 佳红* 柳正良

摘 要 采用超临界流体萃取法提取银杏叶粗提物中总黄酮苷,确定最佳萃取条件为:压力 41 364 Pa;温度 60℃;静态萃取时间 4 min;动态萃取体积 4 mL;改性剂加入量 0.2 mL 乙醇;用 HPLC 测定含量,结果表明:本法简便快速,萃取完全,为银杏叶粗提物的分离、纯化、测定提供了一种有效可靠的方法。
关键词 超临界流体萃取法 银杏叶粗提物 黄酮类化合物 HPLC 法

银杏叶为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的叶子,经现代药理和临床研究表明^[1],银杏叶提取物可软化血管,增加冠状动脉血流量,对心绞痛、脑血管疾病具有显著疗效,并广泛用于临床。而黄酮类化合物为其主要有效成分之一,其制剂质量通过测定黄酮含量来控制^[2,3]。传统的提取方法均采用有机溶剂提取,费时且残留有害溶剂,超临界流体萃取(SFE)因其特有的高选择性、高效性及低毒害的优点,在中草药的提取方面具有广泛应用^[4~6]。我们采用 SFE 技术萃取银杏叶粗提物中的黄酮类成分,用 HPLC 测定含量,提取效率高,杂质少,具有一定的优点。

1 试剂与仪器

1.1 仪器:ISCO 100DX, 100DM 泵, SFX 2-10M 超临界流体萃取仪(美国 ISCO 公司), Waters 高效液相色谱仪(美国 Waters), NEC powermate 433 电子计算机(日本 NEC 公司)。

1.2 试剂:槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所),山柰素对照品(Sigma 公司), CO₂ (99%) (上海酒精总厂), 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: μ -BondapakTM C₁₈ (300 mm $\times$ 3.9 mm, Waters); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸

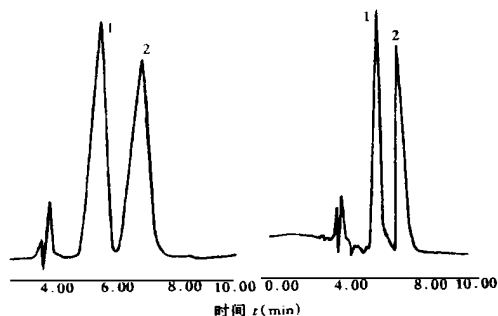
* Address: She Jiahong, Department of Analysis Materia Medica, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai

(60: 40);流速: 1 mL/min;检测波长: 266 nm;柱温: 室温;进样量: 20 μ L

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取干燥至恒重的槲皮素对照品 12.70 mg, 山柰素对照品 10.01 mg, 分别加甲醇溶解, 定容于 10 mL 容量瓶中, 即为对照溶液

2.3 供试品溶液的制备: 精密称取银杏叶粗提物 20 mg, 装入萃取池中, 加入 0.2 mL 乙醇, 在 41 364 Pa 温度 60 $^{\circ}$ C 下, 静态萃取 4 min, 动态萃取 4 mL, 以乙醇为接收液, 萃取完毕定容至 10 mL, 然后将萃取液置于 50 mL 烧瓶中, 加入 1.5 mL 2% 盐酸溶液, 混匀, 水浴回流 30 min, 迅速冷却至室温, 然后转移至 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液

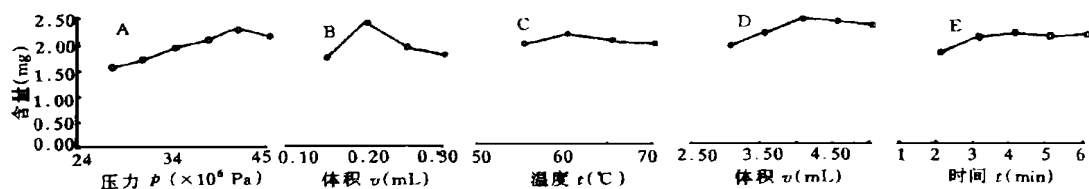
2.4 标准曲线的绘制: 精取槲皮素对照品溶液 (1.270 mg/mL) 2.5, 5, 10, 20, 40 μ L, 置于 1 mL 容量瓶中, 依次加入山柰素对照品溶液 (1.000 mg/mL) 2.5, 5, 10, 20, 40 μ L, 加甲醇至刻度, 混匀后分别进样测定, 以峰面积 (A) 对进样浓度 (C) 进行回归, 回归方程为: $A_{\text{槲皮素}} = 67\,596.7C + 58\,380$, $r = 0.999\,9$ ($n = 5$); $A_{\text{山柰素}} = 68\,601C - 568\,6$, $r = 0.999\,7$ ($n = 5$).



标准品的色谱图 样品的色谱图
1 槲皮素 2 山柰素

图 1 提取物水解液的色谱图

2.5 加样回收率试验: 精密称取银杏叶粗提物 (约 20 mg), 6 份, 各精密加入槲皮素和山柰素对照品 25, 50 μ g, 按样品分析方法操作, 计算回收率, 测定结果见表 1



A-压力 B-加入改性剂 C-温度 D-动态萃取体积 E-静态萃取时间

图 2 各条件对萃取总黄酮苷量的影响

表 1 回收率试验结果

	加入 25 μ g ($n = 3$)		加入 50 μ g ($n = 3$)	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
槲皮素	98.36	3.52	96.23	2.41
山柰素	97.20	2.86	94.81	3.27

2.6 重现性试验: 按样品测定方法, 对银杏叶粗提物进行 5 次平行试验, 结果分别为 $RSD_{\text{槲皮素}} = 4.13\%$ ($n = 5$); $RSD_{\text{山柰素}} = 5.24\%$ ($n = 5$).

2.7 样品测定: 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液适量, 进样, 按上述色谱条件测定, 以外标法计算含量, 结果槲皮素含量为 0.609 mg, 山柰素含量为 0.472 mg; 总黄酮苷含量 = 2.64 山柰素 + 2.51 $\times$ 槲皮素 = 2.78 mg

3 讨论

3.1 超临界流体萃取条件的选择

3.1.1 萃取压力的选择: 超临界 CO_2 流体在一定的温度下, 密度和介电常数可随压力增大而增加, 但不呈线性相关. 到达某一压力后, 溶解能力随压力增加而变化不大. 我们在 27 576~44 811 Pa 之间, 每隔 3 447 Pa 萃取一个样品, 结果见图 2, 从图中发现采用 41 364 Pa 压力较好.

3.1.2 改性剂的选择: 超临界 CO_2 流体的极性较弱, 难以萃取出极性较强的物质, 因此通过加入极性改性剂提高萃取效率, 经试验采用乙醇为改性剂, 无毒且萃取效率高; 同时对其加入量进行考察, 结果见图 2, 从图中可见采用加入 0.2 mL 乙醇为最佳.

3.1.3 萃取温度的选择: 在一定的压力下, 温度升高, 溶质的蒸气压升高, 溶解度增加, 但升高温度, CO_2 流体密度变小, 溶解能力下降, 对 55 $^{\circ}$ C~70 $^{\circ}$ C 间每隔 5 $^{\circ}$ C 萃取一个样品, 结果见图 3, 从图中可见以 60 $^{\circ}$ C 时萃取效果较好.

3.1.4 动态萃取体积的影响: 固定其它因数, 分别选择 3, 3.5, 4, 4.5, 5 mL 流体体积进行考察, 发现 4 mL 流体萃取较适宜, 结果见图 2

3.1.5 静态萃取时间的影响: 整个萃取过程同时存在溶质的传导和扩散, 适宜的静态萃取时间有利于溶质的溶解, 考察 2, 3, 4, 5, 6 min 静态萃取时间对

结果的影响,结果见图 2

综上萃取的最佳条件为: 压力 41 364 Pa; 温度 60℃; 改性剂 0. 2 mL乙醇; 动态萃取体积 4 mL; 静态萃取时间 4 min

3. 2 对样品的水解,经试验: 10 mL的萃取液加入 1. 5 mL 25% 盐酸液水解 30 min,水解完全

3. 3 在我们所测的样品中,未发现异鼠李素的存在

3. 4 采用本法测定银杏叶粗提取物中黄酮苷的含量,方法简便,快速,重现性好

3. 5 文献报道^[7]在测定槲皮素和山柰素时有拖尾现象,本文的色谱条件两者分离度好,峰形对称,杂质无干扰

参考文献

- 1 Beek T A. J Chromatogr, 1991, 543: 375.
- 2 Hasler A, et al. J Chromatogr, 1992, 605(1): 41
- 3 栗晓黎,等. 药物分析杂志, 1998, 18(3): 186
- 4 Chester T L, et al. Anal Chem, 1994, 66: 106
- 5 Jerry W K. J Chromatogr Sci, 1990, 28(1): 9
- 6 Sanagi M M, et al. J Chromatogr Sci, 1993, 31(1): 20
- 7 谢大年,等. 色谱, 1994, 12(5): 384

(1999-02-04收稿)

纤维素酶在黄连提取工艺中的应用

黑龙江省医药工业研究所(哈尔滨 150040) 马桔云* 赵晶岩 姜颖** 于喜水

摘要 用黄连提取小檗碱之前,经纤维素酶进行酶解,可以提高小檗碱的收率,从而考察是否可将纤维素酶用于其它中药材的提取中,达到提高有效成分收率的目的

关键词 纤维素酶 酶解 盐酸小檗碱

近年来,纤维素酶在国外各个领域得到广泛应用,例如: 食品工业,饮料工业,制取各种糖类以及提取天然产物等。然而我国的工业化用酶目前仍不普遍。大部分的中药材的细胞壁是由纤维素构成的,植物的有效成分往往被包裹在细胞壁内;纤维素则是由β-D-葡萄糖以 1, 4β-葡萄糖苷键连接,用纤维素酶酶解可以破坏β-D-葡萄糖键,使植物细胞壁破坏,有利于对有效成分的提取。根据这个原理,我们选用黄连提取小檗碱,对其加酶组和未加酶组进行对有效成分小檗碱提取的影响

1 实验材料和药品

纤维素酶粗品(活力单位 2 000 U /g)海林万力达集团公司提供;盐酸小檗碱对照品中国药品生物制品检定所提供;黄连为黑龙江省药材站购进,经黑龙江省医药工业研究所生药鉴定室王有志副主任药师鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的根茎;日本岛津 CS-930双波长薄层扫描仪

2 实验方法与结果

2. 1 黄连中小檗碱提取工艺^[1]: 黄连粗粉 50 g(酶解) $\xrightarrow[\text{pH5 } 40^{\circ}\text{C 水浴恒温 } 90 \text{ min}]{\text{3倍量的水浸泡, 0. 3\% } \text{H}_2\text{SO}_4}$ 置渗漉筒中

$\xrightarrow[\text{收集渗漉液 } 500 \text{ mL}]{\text{0. 3\% } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 渗漉}}$ 渗漉液 $\xrightarrow[\text{沉淀、抽滤}]{\text{用石灰乳调 pH } 10 \sim 12}$ 滤液
 $\xrightarrow[\text{搅拌充分溶解,静置 } 24 \text{ h,得粗品 } 60^{\circ}\text{C 烘干}]{\text{用浓 HCl 调 pH } \sim 2, \text{加精制食盐使含盐量达到 } 7\%}$ 干燥粗品

2. 2 黄连中小檗碱的酶提取工艺:

此工艺比原工艺多了一步酶解实验,即每克生药 10 U 的量(0. 25 g)加入纤维素酶,充分搅拌,其它工艺同原工艺 2. 1

2. 3 薄层层析: 将加酶粗提取物甲醇溶液(1),未加酶粗提取物甲醇溶液(2),盐酸小檗碱甲醇溶液(3),于硅胶 G 薄层板上展开,取出,晾干,紫外灯下观察比较。

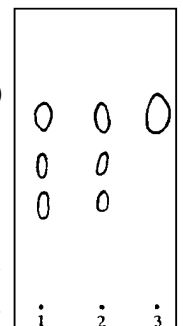


图 1 层析图

展开剂: 正丁醇-冰醋酸-水(7:

1: 2),展距 10 cm 层析结果见图 1

2. 4 收率与提取结果的比较: 对不同工艺提取物进行含量测定^[2],结果见表 1

3 小结与讨论^[2]

从纤维素酶提取黄连有效成分小檗碱实验中,可以初步看出,在纤维素酶的作用下,小檗碱提取量大大提高,由 t 检验可以看出 $P < 0. 01$,两种工艺提

* Address: Ma Juyun, Heilongjiang Institute of Pharmaceutical Industry, Harbin

马桔云 女,1984年毕业于黑龙江中医学院,医学学士,副主任药师,黑龙江医药工业研究所植化研究室主任。主要从事中药的开发与新药的研究。参与多个新药的研究,在《中成药》《中国中药杂志》《黑龙江医药》等学术刊物上发表论文 20余篇。

** 黑龙江完达山制药厂