

复方积雪草颗粒提取工艺研究

李阳春^{1,2}, 孙静芸^{2*}, 姚新生^{1*}

(1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016 2 浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310007)

摘要: 目的 研究复方积雪草颗粒最佳提取工艺。方法 采用正交试验法进行优选, HPLC法测定积雪草苷、黄芪甲苷的含量。结果 乙醇浓度、溶媒量、提取时间、提取次数对积雪草苷、黄芪甲苷提取率均有显著影响。结论 最佳提取工艺为药材 10倍量 50%乙醇, 提取 2次, 每次 3h

关键词: 复方积雪草颗粒; 正交试验; 积雪草苷; 黄芪甲苷; 高效液相色谱

中图分类号: R284. 2; R286. 02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2003)10-0903-03

Investigation on extracting process for Compound Jixuecao Granula*

LI Yang-chun^{1,2}, SUN Jing-yun², YAO Xin-sheng¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Zhejiang Academy of TCM, Hangzhou 310007, China)

Key words Compound Jixuecao Granula; orthogonal test; asiaticoside; astragaloside IV; HPLC

* Compound Jixuecao Granula is a Chinese prescription made of *Herba Centellae*, *Radix Astragali*, *Se-men Persicae*, etc. It is used in the treatment of the disease of urinary and immune systems.

复方积雪草颗粒为医院制剂, 由积雪草、黄芪、桃仁等药材组成, 用于泌尿系统及免疫系统等疾病, 特别在治疗肾脏纤维化方面疗效较好。积雪草为伞形科植物积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urb. 的干燥全草, 有清湿热、解热消肿的功能。主要含积雪草苷 (asiaticoside)、羟基积雪草苷 (madecassoside) 等三萜皂苷类化合物^[1]。黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根, 有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌之功能。主要含有黄芪甲苷、黄芪苷、异黄芪苷等三萜皂苷类化合物和黄酮、多糖等^[2]。两者的有效成分均易溶于水, 故考虑将两者合并提取。本研究以积雪草苷和黄芪甲苷为考察指标, 采用正交试验法优选提取工艺的最佳条件, 为生产提供依据。

1 材料与仪器

积雪草由浙江昌化药材公司提供 (浙江产), 黄芪由甘肃省定西县中国药材公司提供 (甘肃产), 经杭州市药品检验所鉴定积雪草为伞形科植物积雪草 *C. asiatica* (L.) Urb. 的干燥全草, 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。积雪草苷对照

品 (批号 877-9901)、黄芪甲苷对照品 (批号 07819807) 均由中国药品生物制品检定所提供。甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

日本岛津 LG-10AT 高效液相色谱仪, SPD-10A 检测器

2 方法与结果

2.1 试验因素水平: 设定乙醇浓度 (A)、提取时间 (B)、溶媒量 (C)、提取次数 (D) 4 因素 3 水平 (表 1)。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

| 水平 | 因素 | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|
| | A/% | B/h | C/倍 | D/次 |
| 1 | 30 | 1 | 6 | 1 |
| 2 | 50 | 2 | 8 | 2 |
| 3 | 70 | 3 | 10 | 3 |

2.2 积雪草苷测定

2.2.1 色谱条件^[3]: 色谱柱为 FupelcosilTM LG-18-DB (15 cm×4.5 cm, 5 μ m), 柱温为室温, 流动相为甲醇-水 (55:45), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 204 nm。在此条件下, 供试品中积雪草苷峰与其他峰能达到基线分离, 积雪草苷色谱峰的保留时间约为 13.5 min。

2.2.2 线性关系考察: 精密称取积雪草苷对照品

* 收稿日期: 2003-02-21

作者简介: 李阳春 (1975-), 女, 浙江东阳人, 浙江中医学院讲师, 1997年在沈阳药科大学获学士学位, 现为沈阳药科大学 2001级在职硕士研究生, 主要研究方向为天然药物化学。Tel (0571) 86613601

* 通讯作者 Tel (0571) 88082214-3210

2.4 mg,加甲醇制成 0.48 mg/mL的溶液,作为对照品溶液 精密吸取上述对照品溶液 1, 5, 10, 15, 20 μ L,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积 以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标作线性回归,回归方程为 $Y=95\ 404.4X-4\ 721.6$, $r=0.999\ 92$ 表明积雪草苷进样量在 0.48~ 9.6 μ g与峰面积呈良好的线性关系

2.2.3 供试品测定方法: 每份回流提取液滤过,滤液蒸干,残渣用甲醇溶解并定容至 50 mL,分别精密吸取 2 mL,稀释至 10 mL,微孔滤膜 (0.45 μ m)滤过,滤液作为供试品溶液 取 10 μ L进样测定

2.2.4 精密密度试验: 取供试品溶液按上述色谱条件连续进样 5次,结果积雪草苷峰面积 RSD为 0.40%。

2.2.5 重现性试验: 按供试品测定方法,对同一批供试品依法测定 5份,结果积雪草苷峰面积 RSD为 0.76%。

2.2.6 回收率试验: 取已测知积雪草苷含量的供试品,平行 5份,分别精密加入积雪草苷对照品 0.35 mg,按含量测定方法操作,计算 5次平均回收率为 102.7%, RSD为 2.82%。

2.3 黄芪甲苷测定

2.3.1 色谱条件^[4]: 色谱柱为 Shimadzu VP- ODS (150 mm \times 4.6 mm),柱温为室温,流动相为乙腈-水 (1: 2),流速为 1 mL/min,检测波长为 200 nm 在此条件下,供试品中黄芪甲苷与其他峰能达到基线分离,黄芪甲苷色谱峰的保留时间约为 6.6 min

2.3.2 线性关系考察: 精密称取黄芪甲苷对照品 2.2 mg,加甲醇制成 0.44 mg/mL的溶液,作为对照品溶液 精密吸取上述对照品溶液 1, 5, 10, 15, 20 μ L,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰

面积 以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标作线性回归,回归方程为 $Y=19\ 794.37X+734.84$, $r=0.999\ 6$ 表明黄芪甲苷进样量在 0.44~ 8.8 μ g与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.3 精密密度试验: 取供试品溶液按上述色谱条件连续进样 5次,结果黄芪甲苷峰面积 RSD为 0.55%。

2.3.4 重现性试验: 按供试品测定方法,对同一批供试品依法测定 5份,结果黄芪甲苷峰面积 RSD为 0.83%。

2.3.5 回收率试验: 取已测知黄芪甲苷含量的供试品,平行 5份,分别精密加入黄芪甲苷对照品 0.25 mg,按含量测定方法操作,计算 5次平均回收率为 98.2%, RSD为 2.34%。

2.3.6 供试品测定方法: 同 2.2.3项,取供试品溶液 10 μ L进样,测定。

2.4 正交试验结果与分析: 以积雪草苷、黄芪甲苷为指标,按 $L_9(3^4)$ 正交设计安排试验。每份取积雪草、黄芪粗粉各 50 g,回流提取。由于无空白列,做了重复试验。结果见表 2 方差分析见表 3, 4

直观分析结果表明,以积雪草苷为评价指标,影响因素的大小顺序为 A> B> C> D; 以黄芪甲苷为评价指标,影响因素的大小顺序为 A> C> B> D 方差分析结果表明,以积雪草苷、黄芪甲苷为考察指标,因素 A, B, C, D差异均有显著性 以积雪草苷为考察指标,最佳工艺条件为 $A_2 B_3 C_2 D_2$; 以黄芪甲苷为考察指标,最佳工艺条件为 $A_3 B_1 C_3 D_2$ 鉴于积雪草为处方中君药,对试验结果综合考虑结果,以 $A_2 B_3 C_2 D_2$,即加 10倍量的 50% 乙醇,提取两次,每次 3 h 为复方积雪草颗粒的最佳提取工艺

2.5 最佳工艺验证试验: 取积雪草、黄芪各 100g,

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

| 试验号 | A | B | C | D | 积雪草苷 % | | | 黄芪甲苷 % | | | |
|-----|------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--|
| | | | | | X_1 | X_2 | X | Y_1 | Y_2 | Y | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.155 | 0.149 | 0.304 | 0.102 | 0.101 | 0.203 | |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0.188 | 0.176 | 0.364 | 0.151 | 0.142 | 0.293 | |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 0.231 | 0.233 | 0.464 | 0.142 | 0.146 | 0.288 | |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 0.366 | 0.348 | 0.714 | 0.261 | 0.257 | 0.518 | |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 0.323 | 0.336 | 0.658 | 0.216 | 0.209 | 0.425 | |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 0.384 | 0.373 | 0.757 | 0.226 | 0.234 | 0.460 | |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 0.252 | 0.249 | 0.501 | 0.405 | 0.385 | 0.790 | |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 0.156 | 0.162 | 0.318 | 0.095 | 0.092 | 0.187 | |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0.310 | 0.325 | 0.635 | 0.210 | 0.221 | 0.431 | |
| I | 积雪草苷 | 1.132 | 1.519 | 1.379 | 1.597 | 0.784 | 1.511 | 0.850 | 1.059 | | |
| II | | 2.129 | 1.340 | 1.713 | 1.622 | 1.403 | 0.905 | 1.242 | 1.543 | | |
| III | | 1.454 | 1.856 | 1.623 | 1.490 | 1.408 | 1.179 | 1.503 | 0.993 | | |
| | 黄芪甲苷 | 0.997 | 0.516 | 0.334 | 0.132 | 0.724 | 0.606 | 0.653 | 0.550 | | |

表 3 以积雪草苷为指标方差分析表

Table 3 Variance analysis with asiaticoside as marker

| 方差来源 | 离均差平方和 | 自由度 | 方差 | F 值 | 显著性 |
|-------|--------|-----|---------|------|------------|
| A | 0.086 | 2 | 0.043 | 774 | $P < 0.01$ |
| B | 0.023 | 2 | 0.012 | 207 | $P < 0.01$ |
| C | 0.01 | 2 | 0.005 | 90 | $P < 0.01$ |
| D | 0.0015 | 2 | 0.0008 | 13.5 | $P < 0.01$ |
| 误差 Se | 0.0005 | 9 | 0.00006 | | |

$F_{0.05}(2, 9) = 4.26$ $F_{0.01}(2, 9) = 8.02$

表 4 以黄芪甲苷为指标方差分析表

Table 4 Variance analysis with astragaloside IV as marker

| 方差来源 | 离均差平方和 | 自由度 | 方差 | F 值 | 显著性 |
|-------|--------|-----|---------|--------|------------|
| A | 0.043 | 2 | 0.0215 | 483.75 | $P < 0.01$ |
| B | 0.031 | 2 | 0.0155 | 348.75 | $P < 0.01$ |
| C | 0.036 | 2 | 0.018 | 405.00 | $P < 0.01$ |
| D | 0.030 | 2 | 0.015 | 337.50 | $P < 0.01$ |
| 误差 Se | 0.0004 | 9 | 0.00004 | | |

$F_{0.05}(2, 9) = 4.26$ $F_{0.01}(2, 9) = 8.02$

按最佳工艺条件进行提取 ($n=3$), 提取液滤过, 滤液蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 100 mL, 分别精密吸取 2 mL, 稀释至 10 mL, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。分别采用 HPLC 法按前述色

谱条件测定积雪草苷、黄芪甲苷含量, 结果积雪草苷转移率为 65.2%, 黄芪甲苷为 56.1%。

3 讨论

提取溶剂浓度选择是根据积雪草苷、黄芪甲苷的理化性质, 分别以水, 40%, 70%, 95% 乙醇溶液 8 倍量, 提取两次, 每次 2 h。供试品经处理后, 以积雪草苷、黄芪甲苷对照品为对照, 采用 TLC 法^[2], 定量点样, 以氯仿-甲醇-水 (13: 7: 2) 的下层溶液为展开剂, 10% 硫酸乙醇溶液显色, 结果 40% ~ 60% 乙醇斑点明显, 故设定 30%, 50%, 70% 乙醇为提取溶剂。

References

- [1] Ch P (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol II .
- [2] Zheng H Z. *Modern Study and Application of Chinese Materia Medica* (中药现代研究与应用) [M]. Vol I . Beijing Xueyuan Press, 1997.
- [3] Chen Y, Jiang Y. Determination of asiaticoside and made-casoside in *Centella asiatica* (L.) Urban by RP-HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22(3): 227-228.
- [4] Sha S Y, Xu L S. *The Analysis Method of Effective Constituents in Chinese Materia Medica* (中草药有效成分分析法) [M]. Beijing People's Medical Publishing House, 1997.

强极性大孔吸附树脂对三七皂苷的分离纯化研究

欧来良, 史作清*, 施荣富, 王重, 王瑞芳*

(南开大学 吸附分离功能高分子材料国家重点实验室 高分子化学研究所, 天津 300071)

摘要: 目的 探索一种高效、实用的分离纯化三七皂苷的技术。方法 根据三七皂苷的结构特征, 选用强极性吸附树脂 ADS-2, 并对 ADS-2 树脂的吸附性能进行了系统研究。采用 HPLC 法对产品中人参皂苷 R_{G1}, R_e, R_{b1} 和三七皂苷 R₁ 进行了测定。结果 ADS-2 树脂对三七皂苷具有较高的吸附选择性, 50% 乙醇作为脱附剂, 产品中有效成分含量为: 人参皂苷 R_{G1} 31.7%, R_e 5.40%, R_{b1} 5.79%, 三七皂苷 R₁ 29.7%, 产率为 7.73%。结论 大孔 ADS-2 吸附树脂对三七皂苷的分离纯化简单、高效, 易于工业化生产。

关键词: ADS-2 吸附树脂; 三七皂苷; 吸附分离

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2003)10-0905-03

Studies on separation and purification of saponins from *Panax notoginseng* with strongly polar macroporous adsorption resin

O U Lai-liang, SHI Zuo-qing, SHI Rong-fu, WANG Zhong, WANG Rui-fang

(State Key Laboratory of Functional Polymeric Materials for Adsorption and Separation,

Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Key words ADS-2 porous adsorption resin; saponins of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; adsorption and separation

三七为我国传统中药材, 具有化瘀止血、活血定

痛之功效, 主要含有皂苷、黄酮、甾醇、多糖等成分。

* 收稿日期: 2002-10-29
 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29974015)
 * 通讯作者 Tel (022) 23503935