

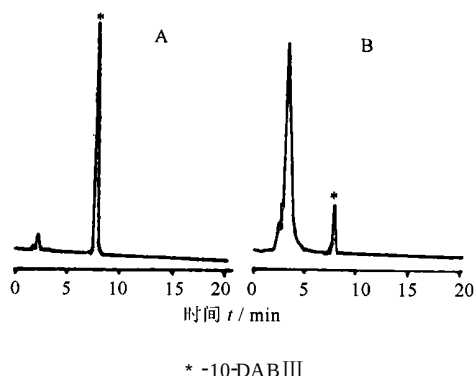


图1 10-DAB III对照品(A)和东北红豆杉枝叶提取物的HPLC图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of 10-DAB III reference substance (A) and *Taxus cuspidata* branches and leaves extract (B)

峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验: 取 $14.25 \mu\text{g/mL}$ 10-DAB III对照品溶液, 连续进样6次, 测定峰面积, 计算浓度, 结果浓度RSD为0.66% ($n=6$)

2.7 稳定性试验: 取供试品溶液1份, 每隔1h测定1次, 考察供试品溶液中10-DAB III含量变化。结果含量RSD为0.92% ($n=6$), 表明供试品溶液在5h内稳定。

2.8 重现性试验: 精密称取同一批样品6份, 平行制备6份供试品溶液, 进样测定, 10-DAB III含量为0.4233%, RSD为0.80% ($n=6$)。

2.9 回收率试验: 精密称取9mg样品粉末4份, 分别加9.5, 19, 28.5 $\mu\text{g/mL}$ 10-DAB III对照品溶液, 各1mL, 另一份做空白, 平行制备4份供试品溶液, 进样测定, 每份测3次, 结果平均回收率为100.5%, RSD为2.0% ($n=4$)。

2.10 样品的测定: 精密称取1批样品3份, 制备供

试品溶液, 进样测定, 结果10-DAB III的含量为0.4561% ($n=3$)。

3 讨论

3.1 本实验对检测波长、流动相系统、提取方法进行考察, 建立了HPLC测定东北红豆杉枝叶提取物中10-DAB III含量的方法。该方法简便、灵敏度高、专属性强, 未见报道。可用于红豆杉提取物中紫杉烷萜类10-DAB III的质量控制。

3.2 检测波长的选择: 10-DAB III对照品甲醇溶液在200~400nm波长中最大吸收波长在233.9nm, 故选233.9nm作为最大检测波长。

3.3 流动相的选择: 实验中选择了多种流动相体系, 包括不同配比的甲醇-水, 甲醇-乙腈-水, 乙腈-水等效洗脱及梯度洗脱, 结果以甲醇-乙腈-水(20:30:50)等效洗脱和乙腈-水梯度洗脱的分离效果较好, 但后者的重现性较差, 因此选甲醇-乙腈-水(20:30:50)作为流动相等效洗脱。

3.4 提取方法的选择: 实验中采用文献报道的提取方法^[2]将样品以甲醇-二氯甲烷研磨, 冷浸, 超声提取, 用水-二氯甲烷萃取。但测定结果的重现性差, 可能由于研磨后倾入冷浸容器的过程易造成误差。因此, 本实验采用甲醇-二氯甲烷冷浸24h后超声提取40min, 再以水-二氯甲烷萃取。本方法提取效果与前者相当, 且重现性好。

References:

- [1] Bissery M C, Guenad D, Voegelin G, *et al* Experimental antitumor activity of taxotere, a taxol analogue [J]. *Cancer Res*, 1991, 51 (18): 4845.
- [2] Gao S L, Zhu D N, Zhou R H, *et al* Content of the taxol and brevifolol in species of *Taxus* L. from east Asia and north America [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1995, 26(1): 8.

茜草提取工艺的研究

谭朝阳, 尤昭玲*

(湖南中医学院 中西医结合系, 湖南 长沙 410007)

摘要: 目的 优选茜草的最佳提取工艺。方法 比较渗漉法、浸渍法、加热回流法3种提取方式, 并采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以大叶茜草素含量和干浸膏收率为指标, 对影响茜草的乙醇加热回流提取工艺的因素水平进行了研究。结果 茜草的最佳提取工艺为用10倍量70%乙醇加热回流提取3次, 每次1h。提取次数影响差异具有显著性。结

* 收稿日期: 2003-08-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30271633); 国家中医药管理局新药开发专项基金项目(01X046B)

作者简介: 谭朝阳(1970—), 男, 湖南郴州人, 1992年毕业于武汉大学生物化学专业后, 在湖南省药品检验所从事中药新药研究和质量分析, 1999年获湖南中医学院中药学硕士学位, 现为湖南中医学院2001级在读博士, 研究方向为: 妇产科中药新药研究与中药质量分析。Tel: (0731) 2290699 E-mail: tom tzy@mail china com

论 乙醇加热回流提取工艺用于茜草的提取稳定可行。

关键词: 茜草; 大叶茜草素; 正交试验

中图分类号: R 284. 2; R 286. 02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)04-0399-03

Studies on extraction technology of dried rhizome of *Rubia cordifolia*

TAN Zhao-yang, YOU Zhao-ling

(Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Key words: the dried rhizome of *Rubia cordifolia* L.; mollugin; orthogonal test

茜草为茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* L. 的干燥根及根茎, 具有凉血、止血、祛瘀、通经之功效, 主治吐血、衄血、崩漏、外伤出血、经闭瘀阻、关节痹痛、跌扑肿痛等^[1]。在临床上, 茜草常与其他中药配伍制成各种中药制剂。蒽醌类物质是茜草的主要有效部位之一, 由于蒽醌类不易溶于水, 故宜用醇提取。本实验采用正交试验法, 以大叶茜草素含量和干浸膏得率为考察指标, 对茜草的醇提取工艺条件进行研究, 并优选最佳工艺条件。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪, 515 泵, 2487 紫外检测器(美国 Waters 公司); N-2000 色谱工作站(浙江大学); 大叶茜草素对照品由中国药品生物制品检定所提供(供含量测定用, 批号: 884-200001); 茜草为市场所购, 经湖南省药品检验所杨友良鉴定。水为双蒸水, 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 大叶茜草素的含量测定^[1]

2.1.1 色谱条件: 色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-四氢呋喃(340: 60: 3); 检测波长: 250 nm, 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

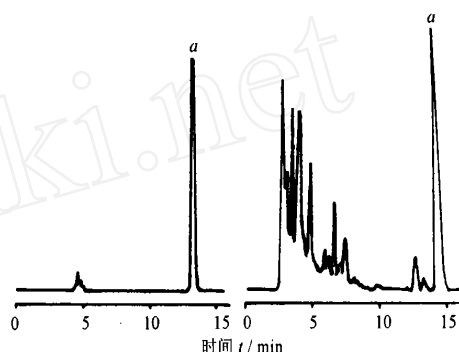
2.1.2 对照品溶液的制备: 精密称取大叶茜草素对照品 4.66 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备: 精密量取各提取液 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.4 测定法: 分别精密吸取上述供试品溶液和对照品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 色谱图见图 1。

2.2 干浸膏得率的测定: 精密量取各提取液 25 mL, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 在水浴上蒸干, 于 105 °C 干燥 3 h, 移置干燥器中, 冷却 30 min, 迅速精密称定质量, 计算干浸膏得率。

2.3 提取方法的比较



a-大叶茜草素

a-mollugin

图 1 大叶茜草素对照品(A)和茜草(B)的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of mollugin reference substance (A) and dried rhizome of *R. cordifolia* sample (B)

2.3.1 渗漉法: 取茜草粗粉 100 g, 照流浸膏与浸膏剂项下的渗漉法(《中华人民共和国药典》2000 年版一部附录 I O), 用 95% 乙醇 1 000 mL 浸渍 12 h 后, 以 1~3 mL/(kg · min) 速度缓缓渗漉, 收集渗漉液, 回收乙醇, 浓缩至 100 mL。

2.3.2 浸渍法: 取茜草粗粉 100 g, 用 95% 乙醇 1 000 mL 浸渍 24 h, 时时摇动, 滤过, 滤液回收乙醇, 浓缩至 100 mL。

2.3.3 加热回流法: 取茜草粗粉 100 g, 加 95% 乙醇 1 000 mL 回流提取两次, 每次 2 h, 合并提取液, 滤过, 滤液回收乙醇, 浓缩至 100 mL。

2.3.4 结果对比: 取 3 种提取液, 分别测定大叶茜草素含量和干浸膏得率, 结果见表 1。可见, 3 种提取方法中, 加热回流法提取所得大叶茜草素含量和干浸膏得率最高, 渗漉法次之, 浸渍法最低, 故宜选用加热回流法对茜草药材进行提取。

表 1 3 种提取方法的比较 (n=3)

Table 1 Comparison of three extracting methods (n=3)

方 法	大叶茜草素含量/%	干浸膏收率/%
渗漉法	0.39	7.23
浸渍法	0.24	5.32
加热回流法	0.73	10.31

2.4 乙醇回流提取条件的优化: 以乙醇浓度(A)、乙醇用量(B)、提取次数(C)和提取时间(D)为考察因素, 每个因素各取 3 个水平(表 2), 在平行操作条件下, 按 $L_9(3^4)$ 正交设计试验, 以干浸膏得率、大叶茜草素含量为评价指标, 结果见表 3。对表 3 结果进行统计学处理, 得方差分析(表 4, 5)。

表 2 试验因素水平表

Table 2 Factors and levels

水平	因 素			
	A/%	B/倍	C/次	D/h
1	70	8	1	1
2	80	10	2	1.5
3	90	12	3	2

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验方案与结果

Table 3 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D	大叶茜草素含量/%	干浸膏得率/%
1	1	1	1	1	0.595	8.55
2	1	2	2	2	0.851	12.80
3	1	3	3	3	0.881	15.01
4	2	1	2	3	0.789	11.54
5	2	2	3	1	0.836	13.10
6	2	3	1	2	0.627	9.44
7	3	1	3	2	0.808	10.70
8	3	2	1	3	0.690	7.57
9	3	3	2	1	0.805	9.52
大叶茜草素含量	K_1	2.327	2.192	1.912	2.236	
	K_2	2.251	2.376	2.444	2.286	
	K_3	2.303	2.313	2.525	2.359	
	k_1	0.776	0.731	0.637	0.745	
	k_2	0.750	0.792	0.815	0.762	
	k_3	0.768	0.771	0.842	0.786	
	R	0.026	0.061	0.205	0.041	
	K_1	36.36	30.79	25.56	31.17	
	K_2	34.08	33.47	33.86	32.94	
	K_3	27.79	33.97	38.81	34.12	
干浸膏得率	k_1	12.12	10.26	8.52	10.39	
	k_2	11.36	11.16	11.29	10.98	
	k_3	9.26	11.32	12.94	11.37	
	R	2.86	1.06	4.42	0.98	

由表 4 及表 5 结果分析可知, 以大叶茜草素含

表 4 大叶茜草素含量的方差分析结果

Table 4 Variance analysis of mollugin

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A (误差)	0.001 0	2	0.000 5		
B	0.005 8	2	0.002 9	5.83	
C	0.073 9	2	0.037 0	74.16	$P < 0.05$
D	0.002 6	2	0.001 3	2.58	

$$F_{0.05}(2, 2) = 19 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99$$

量为评价指标, 各因素对提取效果的影响程度依次为 $C > B > D > A$, C 因素影响差异有显著性; 以干浸膏得率为评价指标, 各因素对提取效果的影响程度依次为 $C > A > B > D$, C 因素影响差异也有显著性, 故影响最大的是提取次数 C, 应选用 C_3 即提取 3 次。其他各因素影响差异均无显著性。

因评价指标大叶茜草素含量优于干浸膏得率, 故以大叶茜草素含量为评价指标, B 因素选用 B_2 , 即用 10 倍量。D 因素影响较小, 为节省能源与时间, 选用 D_1 即每次提取 1 h。A 因素(乙醇浓度)在所考察的范围内影响很小, 为节省乙醇用量, 故选用 70% 乙醇作为提取溶媒。

表 5 干浸膏得率的方差分析结果

Table 5 Variance analysis with solid extract rate

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	13.13	2	6.56	8.96	
B	1.96	2	0.98	1.33	
C	29.88	2	14.94	20.39	$P < 0.05$
D (误差)	1.47	2	0.73		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99$$

3 验证试验:

根据试验结果, 最终确定茜草提取工艺: 将茜草用 70% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 1 h, 每次 10 倍量。并将此工艺经 3 批验证试验, 与正交试验结果基本一致, 以大叶茜草素计转移率约为 70%, 说明此工艺稳定可行。

Reference:

[1] Ch P (中国药典) [S]. 2000 ed Vol I.

声 明

为适应我国信息化建设需要, 扩大作者学术交流渠道, 本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入光盘及网络数据库, 请在来稿时声明, 本刊将作适当处理。本刊所付稿酬包含刊物内容编入数据库服务报酬, 不再另付。

《中草药》杂志编辑部