

重),以各因素作用综合考虑分析,以 $A_3B_2C_1$ 为各因素的最佳水平,即浸膏浓缩至比重为 1.15 g/mL,加乙醇至体积分数为 60% 沉淀,静置 24 h。称取药材按照 $A_3B_2C_1$ 进行验证试验,结果与正交试验结果吻合,说明该醇沉工艺可行。

3 讨论

上述结果表明,金泽胶囊水提醇沉的最佳工艺为:适量水浸泡药材后,加 12 倍的水回流提取 3 次,

每次 1.5 h,合并滤液浓缩至比重为 1.15 g/mL,加乙醇至体积分数为 60%,沉淀,静置 24 h,滤过,滤液浓缩至稠浸膏,干燥即得。

References:

[1] Xing J G, Huang H, Wu T. Determination of glycyrrhizinic acid in Wean cough relieving syrup [J]. *Tradit Chin Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2002, 13 (4): 255-256.
 [2] Yin Y Z, Li Z J, Cao Y, et al. Orthogonal test for Jiannaoling Oral Liquids extracting procedure [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (3): 233-234.

番泻叶的提取工艺研究

曹蔚¹, 李教社¹, 李小强², 路平¹, 方翠芬¹, 杨银京¹

(1. 西安交通大学药学院, 陕西 西安 710061; 2. 第四军医大学药理学教研室, 陕西 西安 710032)

番泻苷是番泻叶中的主要泻下活性成分。近年来的研究表明,番泻苷具有多种生物活性,如致泻、抗氧化、抗病毒、止血等。为了更好的开发利用这一传统中药材,本实验对番泻叶中番泻苷 A 的提取工艺进行了研究,希望对番泻叶工业化生产提供参考。

1 仪器与材料

TSP2000 高效液相色谱仪,UV100 紫外检测器。番泻叶药材购自陕西,经西安交通大学药学院牛晓峰副教授鉴定为狭叶番泻 *Cassia angustifolia* Vahl 的干燥叶;番泻苷 A 对照品(自制,经 NMR、MS 鉴定,面积归一化法测质量分数为 98.90%),四氢呋喃为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为三蒸水。

2 方法与结果

2.1 番泻苷 A 的测定

2.1.1 色谱条件:色谱柱:Planetsil C_{18} (150 mm × 4.6 mm, 10 μ m);流动相:四氢呋喃-水-醋酸(15:85:1);体积流量:1 mL/min;检测波长:365 nm;柱温:室温。色谱图见图 1。

2.1.2 标准曲线的建立:取番泻苷 A 对照品适量,加 50% 甲醇及少量 $NaHCO_3$ 溶液配制 0.20 mg/mL 对照品储备液。精密吸取该储备液,依次配制 0.20、0.10、0.05、0.02、0.01、0.005 mg/mL 的对照品溶液。分别吸取 10 μ L,按上述色谱条件进行测定。以峰面积积分值为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $Y = 6.019 \times 10^5 X - 0.424 \times 10^5$, $r = 0.999 5$,线性范围 0.05~2.00 μ g。

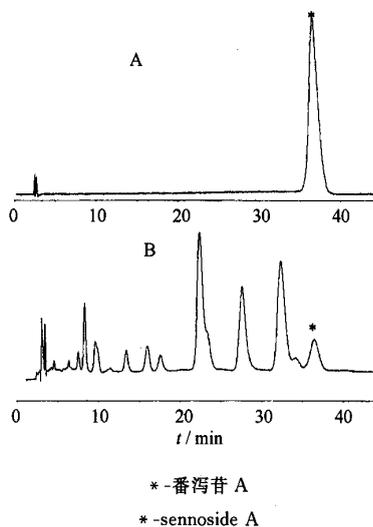


图 1 番泻苷 A 对照品(A)和番泻叶药材(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of sennoside A reference substance (A) and *C. angustifolia* (B)

2.1.3 精密度试验:在上述色谱条件下,精密吸取番泻苷 A 对照品溶液 10 μ L,连续进样 5 次,测定峰面积积分值,计算得其 RSD 为 0.72%。

2.1.4 稳定性试验:取同一份供试品溶液,分别于 2、4、6、8、10、12、24 h 对样品进行分析,测定峰面积积分值,计算得其 RSD 为 2.0%。

2.1.5 加样回收率试验:含番泻苷 A 分别为 1.071、1.070、1.071、1.069、1.073 mg 的供试品溶液中分别精密加入番泻苷 A 1.000 mg,按上述测定

收稿日期:2004-10-10

作者简介:曹蔚(1977—),女,陕西省西安市人,西安交通大学 2000 级硕士研究生,主要进行中药新药的开发研究。

Tel: (029) 81910263 E-mail: caowei2002@hotmail.com

方法测定番泻苷 A 的质量分数,计算平均回收率为 97.4%,RSD 为 1.00% (n=5)。

2.1.6 药材中番泻苷 A 的测定:取药材样品粉末 0.5 g,精密称定,精密加入 80%甲醇 25 mL,称质量,超声 15 min,补加溶剂至原质量,滤过。取续滤液 15 mL 于 25 mL 量瓶中,用 80%甲醇加至刻度,过 0.45 μm 微孔滤膜,滤液进样 10 μL。用外标法计算药材中番泻苷 A^[1]。本批药材中含番泻苷 A 为 3.70 mg/g (n=5)。

2.2 提取工艺的优选

2.2.1 提取温度的选择:精密称取 9 份番泻叶中粉各 10 g,加入 250 mL 70%乙醇,称定质量,分别在不同温度下提取 30 min,补加溶剂至原质量,滤过,取续滤液 15 mL 定容于 25 mL 量瓶中,测定提取液中番泻苷 A,并计算番泻苷 A 提取率(提取率为提取所得番泻苷 A 的质量与药材所含番泻苷 A 的质量的比率),见表 1。结果表明,室温浸提效果比加热回流提取效果好。

表 1 不同提取温度下的番泻苷 A 提取率 (n=3)

Table 1 Extracting rate of sennoside A at different temperatures (n=3)

提取温度/℃	番泻苷 A/(μg·mL ⁻¹)	提取率/%
20	79.2	89.2
30	81.6	91.9
40	84.2	94.6
50	85.5	96.3
60	83.6	94.1
70	78.0	87.8
80	74.4	83.8
90	60.1	67.6
100	36.0	40.5

2.2.2 乙醇提取浓度的选择:精密称取 9 份番泻叶中粉各 10 g,分别加入 250 mL 不同体积分数乙醇,烧瓶加盖密封,室温浸泡提取 24 h,滤过,取续滤液 15 mL 定容于 25 mL 量瓶中,测定提取液中番泻苷 A,计算提取率,见表 2。结果表明,50%乙醇提取效果最好。

2.2.3 药材粒度的选择:精密称取不同粒度的番泻叶药粉各 2 g,加入 50%乙醇 50 mL,烧瓶加盖密封,室温浸泡提取 24 h,将提取液蒸干,用 80%甲醇溶解,定容于 100 mL 量瓶中,测定,结果见表 3。故选择中粉进行试验。

2.2.4 其他提取条件的优选:在确定了乙醇体积分数、药材粒度的基础上,对影响提取的其他主要因素:提取溶剂用量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)进行正交试验优选。每次试验用中粉 10 g,加入

表 2 不同体积分数乙醇提取的番泻苷 A 提取率 (n=3)

Table 2 Extracting rate of sennoside A with different concentration of ethanols (n=3)

乙醇体积分数/%	番泻苷 A/(μg·mL ⁻¹)	提取率/%
0(水)	52.7	59.3
20	55.7	62.7
30	61.7	69.5
40	79.8	89.8
50	87.6	98.7
60	82.5	92.9
70	79.3	89.3
80	51.1	57.6
95	19.5	22.0

表 3 不同粒度药材提取物中的番泻苷 A (n=4)

Table 3 Contents of sennoside A in extract with different granularities (n=4)

粉碎度	番泻苷 A/(mg·g ⁻¹)	粉碎度	番泻苷 A/(mg·g ⁻¹)
叶片	15.0	中粉	19.1
粗粉	14.0	细粉	14.2

表 4 因素水平

Table 4 Factors and levels

水平	因素		
	A/倍	B/h	C/次
1	8	12	2
2	10	24	3
3	12	48	4

50%乙醇室温浸渍提取。因素水平选择见表 4,试验安排见表 5,方差分析见表 6。

表 5 正交试验设计及结果

Table 5 Designs and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D(误差)	提取率/%
1	1	1	1	1	55.44
2	1	2	2	2	68.03
3	1	3	3	3	37.60
4	2	1	2	3	81.35
5	2	2	3	1	92.19
6	2	3	1	2	58.00
7	3	1	3	2	88.83
8	3	2	1	3	82.71
9	3	3	2	1	57.32
K ₁	161.08	225.62	196.15	204.96	
K ₂	231.54	242.94	206.70	214.86	
K ₃	228.86	152.92	218.63	201.66	
R	70.46	90.02	22.48	13.20	

表 6 方差分析

Table 6 Variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	1 063.11	2	531.56	33.79	P<0.05
B	1 520.74	2	760.37	48.34	P<0.05
C	84.30	2	42.15	2.68	
D(误差)	31.46	2	15.73		

F_{0.01}(2,2)=99.0 F_{0.05}(2,2)=19.0

极差值和方差分析结果表明,3种因素对番泻苷A提取率的影响程度依次为 $B>A>C$ 。由于提取次数对提取率的影响不明显,且多次提取增长了提取的时间,增加了溶剂的用量,故提取次数确定为2次。3种因素的优化组合为 $A_2B_2C_1$,即每次10倍原料量的50%乙醇为溶剂,室温浸提24h,提取2次。

2.2.5 验证试验:按上述确定的提取工艺条件,取10g药材中粉,精密称定,用10mL 50%乙醇室温浸提24h,提取2次,提取液合并,定容至25mL,测定番泻苷A的质量浓度为1.35mg/mL,计算得提取率为91.2% ($n=4$)。

3 讨论

3.1 番泻苷包括番泻苷A、B、C、D等^[2],由于番泻苷类对照品不易得到,而此类物质物理、化学性质相近,所以暂以番泻苷A为考察指标,建立测定方法,优选番泻苷类化合物的提取工艺。

3.2 《中国药典》2000年版一部,采用比色法测定番泻叶中总蒽酮,方法需多次回流、萃取,操作复杂。通过多种流动相:水-甲醇、水-乙腈、水-乙腈-磷酸盐缓冲液等的优化,本研究建立了HPLC测定番泻叶中番泻苷A的方法,此方法简单、准确、快速。可作为番泻叶中番泻苷A测定的方法。

3.3 通过提取温度的选择试验可以明显看出番泻苷类物质在较高温度下不稳定。因此建议在进行HPLC测定时,番泻苷A对照品不宜过久放置,样品保存时温度不应超过60℃。

References:

- [1] Stuppner H, Sturm V. LC-MS and CZE of dianthrone from *Cassia angustifolia* and *C. acutifolia* [J]. *Chromatographia*, 1996, 42 (11-12): 697.
- [2] Tanaka H, Murata R, Yoshida A, et al. Analytical studies on the active constituents in crude drugs V. The structure of sennoside G, a new glucoside from *Senna* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30 (5): 1550-1556.

HPLC法测定丹苓滴丸中黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮Ⅰ_A

刘刚,王杰松,姜初,薛克昌,徐冰心,谭生建

(中国人民解放军第306医院药剂科,北京 100101)

丹苓滴丸由丹参和黄芩等经提取加工制备而成,具有抗菌、抗炎和镇痛等作用,临床用于耐青霉素、红霉素、金霉素的金黄色葡萄球菌、乙类链球菌和绿脓杆菌等感染所致的外耳道炎、外耳道疔肿、中耳炎等。黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮Ⅰ_A为丹苓滴丸中抗菌、抗炎的活性成分。因此本实验建立了高效液相色谱法同时测定丹苓滴丸中黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮Ⅰ_A的方法。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:含2800液相色谱泵,7215型手动进样器,BIO-DIMENSION紫外可见分光光度检测器(美国BIO-RAD公司);TL 9900色谱数据工作站(北京泰乐公司)。

黄芩苷对照品(批号:0715-9708)、隐丹参酮对照品(批号:0852-9902)和丹参酮Ⅰ_A对照品(批号:0766-200010)购自中国药品生物制品检定所。丹苓滴丸由本院制剂室制备(批号:20030208、20030209、20030211)。乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备:分别精密称取黄芩苷、隐丹参酮和丹参酮Ⅰ_A对照品24、10、12mg,置100mL棕色量瓶中,加乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取5mL,置10mL棕色量瓶中,加乙醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液,分别含黄芩苷120μg/mL、隐丹参酮50μg/mL和丹参酮Ⅰ_A60μg/mL。

2.2 供试品溶液的制备:取丹苓滴丸20粒,研匀,精密称定125mg,置50mL锥形瓶中,精密加入乙醇25mL,称定,超声5min使溶解,擦干瓶壁,补足减失的乙醇,摇匀,即得。

2.3 色谱条件和系统适用性试验: MZ C₁₈分析色谱柱(250mm×4.6mm, 5μm), C₁₈保护柱(北京分析仪器厂, 5.0mm×4.6mm, 5μm);流动相A为85%乙腈水溶液(含0.5%三乙胺,磷酸调pH 3.0),流动相B为10%乙腈水溶液(含0.5%三乙胺,磷酸调pH 3.0),梯度洗脱,程序为0~15min, A 20%~

收稿日期:2004-11-22

作者简介:刘刚(1961—),男,北京人,副主任药师,解放军306医院药剂科副主任,主要从事药物分析研究。

Tel: (010) 66356187 66356172