

溶液,取 20 μL 注入色谱仪,测定。以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标,进行线性处理,得回归方程 $Y=19\ 055 X-278.08$, $r=0.999\ 9$ 。结果表明,淫羊藿苷在 0.51~15.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内呈良好的线性关系。最低检测质量浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.4 精密性试验:精密吸取淫羊藿苷对照品溶液,重复进样 5 次,测峰面积,结果其 RSD 为 0.56%。

3.5 重现性试验:取同一批号的样品 5 份,制备供试品溶液,进样,测定,计算淫羊藿苷的质量浓度,结果其 RSD 为 0.97%。

3.6 稳定性试验:取配制好的待测供试品溶液,每隔 4 h 测定 1 次。结果表明淫羊藿苷的面积在 48 h 内保持稳定,RSD 为 1.2%。

3.7 回收率试验:精密量取含淫羊藿苷 9.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 样品适量,各 5 份,分别精密加入 4.00 μg 淫羊藿苷对照品,在上述色谱条件下测定并计算回收率。结果平均回收率为 100.29%,RSD 为 1.12%。

3.8 样品的测定:将二仙汤用蒸馏水稀释 10 倍后,摇匀,微孔滤膜滤过,滤液为供试品溶液。精密吸取 20 μL ,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定。根据标准曲线计算淫羊藿苷,结果见表 1。色谱图见图 1。

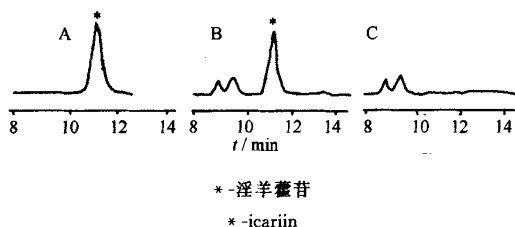


图 1 淫羊藿苷对照品(A)、二仙汤(B)和缺淫羊藿阴性对照(C)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of icariin reference substance (A), Erxian Decoction (B), and negative sample (C)

4 讨论

4.1 黄酮显色剂的选择:由于复方成分复杂,紫外吸收相互干扰大,必须运用显色剂。比较了亚硝酸钠-硝酸铝法、硝酸铝、三氯化铝显色系统,发现只有氯化铝显色后,峰形稳定且回收率可靠。显色时间和显色剂用量反复考察后,发现在本法显色剂用量下,对照品和供试品溶液显色后 15~40 min 内显色稳定,吸光度变化不大。

4.2 紫外检测波长的选择:在控制的显色时间内将对照品溶液与供试品液在 200~600 nm 波长进行扫描。结果均在 410 nm 波长处有良好的吸收峰,且阴性对照在此波长处无干扰。故选择 410 nm 波长处测定总黄酮。

4.3 高效液相色谱条件的选择:对淫羊藿苷对照品在 200~600 nm 波长进行紫外扫描,淫羊藿苷在 270 nm 处有最大吸收,并且供试品色谱中其他组分在淫羊藿苷出峰处可以达到基线分离,且灵敏度高,故确定 270 nm 作为测定波长。通过对流动相分离效果的反复比较,本实验的色谱条件分离效果最佳,杂质干扰最少。

4.4 本研究采用紫外分光光度法和高效液相色谱法直接测定复方二仙汤中总黄酮和淫羊藿苷,无需进一步纯化提取过程。该法简便易行,快速,结果准确可靠,可为二仙汤质量控制标准的制定提供参考。

References:

- [1] Chai Y, Ji S, Zhang G *et al.* Determination of icariin in traditional Chinese medicine by capillary zone electrophoresis [J]. *Biomed Chromatogr*, 1999, 13 (5): 373-375.
- [2] Gao S Q, Fu D X, Song Y H, *et al.* Determination of icariin in Huozhen Capsules by TLC scanning [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1999, 34 (12): 843-845.
- [3] Zhang G G, Zeng H, Xu S X. Quantitative determination of icariin in "Tangzhi Shuangjiang Cha" by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2001, 19 (4): 365-366.

羊栖菜多糖酶法提取工艺研究

张华芳, 金京顺, 周来温, 沈 澄

(绍兴文理学院 医学院, 浙江 绍兴 312000)

羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setchell 习称小叶海藻,其干燥藻体全体入药,称为海藻,具

有消痰软坚、利水消肿的功效。现代药理研究表明,羊栖菜有增强免疫功能、降胆固醇、抗肿瘤等作

收稿日期:2005-04-17

基金项目:浙江省教育厅项目(20031130)

作者简介:张华芳(1976—),女,浙江绍兴人,讲师,硕士,主要从事天然药物的研究和开发工作。E-mail: huafang_zhang@hotmail.com

用^[1],其中羊栖菜多糖是主要有效成分之一。传统的羊栖菜多糖提取方法包括水提醇沉法、碱(或酸)提醇沉法等^[2,3],但一般提取温度高、提取率低、成本高。酶工程技术是近几年来用于天然植物有效成分提取的一项生物工程技术。本实验将纤维素酶用于羊栖菜多糖的提取,以褐藻胶得率和羊栖菜粗多糖为定量指标,采用正交设计优选酶法提取条件,为制定科学、经济的羊栖菜多糖制备工艺提供实验依据。

1 材料与仪器

羊栖菜购于浙江省温州洞头县,由浙江大学药学院生药教研室郭汉身教授鉴定为马尾藻科植物羊栖菜 *S. fusiforme* (Harv.) Setchell 的干燥藻体。纤维素酶由浙江省微生物研究所提供;岩藻糖购于 Sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯试剂。Hitachi 公司 U-2000 分光光度计,离心沉淀机。

2 方法和结果

2.1 提取工艺路线:羊栖菜粉用纤维素酶处理,热水搅拌提取(水与原料比为 15:1),离心,减压浓缩后用乙醇沉淀;先用乙醇分级洗涤,再用丙酮洗涤,减压真空干燥后即得粗多糖干品。

2.2 多糖测定方法的建立

2.2.1 标准曲线制备:精密称取干燥至恒重的岩藻糖 16.6 mg 于 50 mL 量瓶中,加适量水稀释至刻度,摇匀。分别精密吸取上述溶液 0.2、0.4、0.8、1.2、1.4、1.6 mL 于 10 mL 具塞试管中,加入 5% 苯酚 1.0 mL,混匀,迅速加入 5.0 mL 浓硫酸,摇匀。置 70 °C 水浴中加热 15 min,然后置冰水浴中 15 min,加入蒸馏水使总体积为 8.0 mL(在冰浴中进行),混匀后,室温放置 45 min。同时 2.0 mL 蒸馏水平行操作空白。于 477 nm 测定吸光度。以吸光度(A)对质量浓度(C)进行回归,得回归方程: $A = 0.02558C - 0.04517$, $r = 0.9997$ 。

2.2.2 样品测定:精密称取干燥至恒重的样品约 5 mg 于 100 mL 量瓶中,加适量水使溶解,再加水稀释至刻度,摇匀。精密吸取 0.8 mL 样品溶液于 10 mL 具塞试管中,加入 5% 苯酚 1.0 mL,混匀,迅速加入 5.0 mL 浓硫酸,摇匀。其余操作按 2.2.1 项下方法。

2.3 正交试验法优选羊栖菜多糖酶法提取工艺:纤维素酶法提取的影响因素有酶处理时间、酶量、pH 值和温度,因此选择 4 个因素作为考察因素,并结合生产实际,每因素又选取 3 个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,以褐藻胶得率和羊栖菜多糖作为衡量提取效率的双重客观指标,优选最佳工艺,为了提高统

计分析的可靠性,每一条件下都作了重复试验($n=3$),测定结果取其平均值供统计分析用。因素水平安排见表 1,结果见表 2。其中得率=样品干品质量(g)/原料质量(g)×100%。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水 平	因 素			
	A 酶处理时间/min	B 酶量/(10 ² U·g ⁻¹)	C pH 值	D 温度/°C
1	10	0.8	4.0	42
2	20	1.0	4.5	45
3	30	1.2	5.0	48

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

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

编号	A	B	C	D	褐藻胶得率/%	粗多糖/%
1	20	0.8	4.0	42	5.40	0.38
2	30	1.2	4.5	42	4.19	1.73
3	10	1.0	5.0	42	3.90	1.97
4	30	0.8	4.5	48	4.15	1.73
5	20	1.0	5.0	48	2.23	3.30
6	10	1.2	4.0	48	5.86	1.04
7	10	0.8	5.0	45	0.53	4.26
8	30	1.0	4.0	45	4.87	0.20
9	20	1.2	4.5	45	0.89	4.49
K_1	17.56	16.45	17.55	17.57		
K_2	16.69	16.27	17.18	18.31		
K_3	16.67	18.20	16.19	15.04		
R	0.89	1.93	1.36	3.27		

正交试验极差分析发现,因素 D 对羊栖菜粗多糖的提取有显著影响,而因素 A(酶处理时间)、B(酶量)、C(pH 值)对提取无显著影响。由极差 R 得出影响因素大小顺序为:D>B>C>A。由此得出最佳提取工艺为: $A_1B_3C_2D_2$,即在酶法提取羊栖菜粗多糖时选择最佳条件为:10 min, 1.2×10^2 U/g, pH 4.5, 45 °C。

2.4 验证试验:按照理论最佳工艺 $A_1B_3C_2D_2$ 进行重复试验($n=3$),褐藻胶得率和羊栖菜粗多糖分别为 1.53% 和 4.89%,与试验结果一致。

3 讨论

本研究表明,用纤维素酶法提取羊栖菜多糖最佳的条件为:在 pH 值为 4.5,温度为 45 °C 下,用 1.2×10^2 U/g 的酶量预处理 10 min,得到的羊栖菜粗多糖色泽为灰白色,质量佳。由于滤渣中还有残余的多糖,通过增加提取次数,尚可提高得率。

细胞壁的主要成分是纤维素。恰当地利用纤维素酶处理,可使细胞壁软化、膨胀和崩溃等,从而可改变细胞壁的通透性,提高细胞内含物(蛋白质、淀粉、糖等)的提取率。在常规的水提之前对原料进行酶预处理,可大大提高多糖得率,简单易行。有文献报

道^[3],用水提醇沉法、碱提醇沉法等得到的羊栖菜多糖的质量分数为 2.30%左右,而本研究用酶法提取所得的多糖的质量分数为 4.89%,和一般方法相比有了很大的提高,提示羊栖菜多糖以酶法提取为佳。

References:

[1] Editorial Board of China Herbal, State Administration of

Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.

[2] Guo F, Xu S Y. Study of extraction of *Sargassum fusiforme* polysaccharide [J]. *Food Ind* (食品工业), 2002, (3): 11-13.

[3] Bian J, Wu Y F, Zhang D J, et al. Study the different extraction on polysaccharide from *Sargassum fusiforme* [J]. *Chin J Naut Med Hyperbar Med* (中华航海医学与高气压医学杂志), 2002, 9 (3): 187-188.

HPLC 法测定清热化滞颗粒中大黄酚

新朝东¹, 许瑞征¹, 刘书堂²

(1. 天津药物研究院, 天津 300193; 2. 承德颈复康药业集团有限公司, 河北 承德 067000)

清热化滞颗粒由大黄(酒炒)、焦槟榔、大青叶、北寒水石、山楂(焦)、薄荷、化橘红、草豆蔻、广藿香、前胡、麦芽(焦)11味中药组成,主要功效为清热化滞、表里双解,用于乳食内积、久滞化热兼外感风热症。大黄(酒炒)是清热化滞颗粒的君药之一,主要有效成分为蒽醌类化合物,以大黄酚为标志性成分,因此本实验对清热化滞颗粒中大黄酚进行了HPLC法测定。

1 仪器和试剂

RAININ SD-200 泵, RAININ UV-C 检测器, SP4600 积分仪。甲醇、冰醋酸、醋酸乙酯、乙醇、盐酸均为分析纯,去离子水,大黄酚对照品购自中国药品生物制品检定所(批号 96-200107)。清热化滞颗粒剂为承德颈复康药业集团有限公司制备。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(天津市三维色谱仪器配件厂); 检测波长 288 nm, 体积流量: 1.0 mL/min, 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(90:10:1)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取大黄酚对照品 5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 用醋酸乙酯溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 用醋酸乙酯溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得(含大黄酚 0.02 mg/mL)。

2.2.2 缺大黄供试品溶液的制备: 按清热化滞颗粒的制备方法制备缺大黄(酒炒)的阴性样品, 按供试品溶液的制备方法制得阴性溶液, 进样, 记录色谱图。结果其他药味对大黄酚测定无干扰。见图 1。

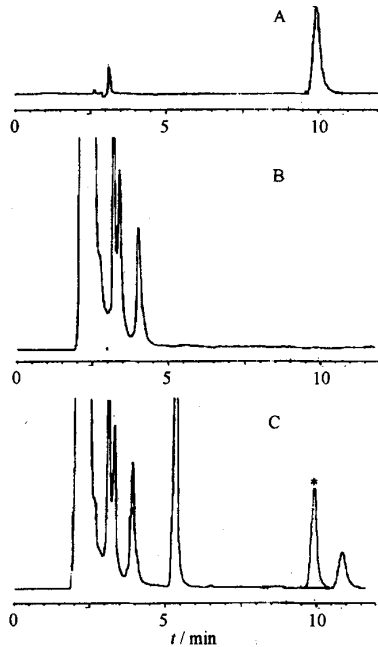


图 1 大黄酚对照品(A)、缺大黄的阴性对照(B)和清热化滞颗粒(C)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of chrysophanol reference substance (A), negative sample (B), and Qingre Huazhi Granules (C)

2.2.3 供试品溶液的制备: 因大黄(酒炒)所含蒽醌类成分主要为结合型的, 故选用乙醇提取后加酸水解后进行测定。将样品研细, 精密称取 5.0 g, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 加乙醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 室温下浸泡 1 h 后于水浴中加热回流 1 h, 放冷, 用乙醇补足减失的质量, 滤过, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 20.0 mL 置烧瓶中, 水浴上蒸至近干, 加入盐