

图 2 黄金菊含片的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC Chromatogram of Huangjinju Buccal Tablets

References:

- [1] Lin Q F, Feng S Q, Li Y L, et al. Study on the antibacterial and antiviral activity compositions of *Trollius chinensis* Bunge [J]. *J Zhejiang Univ: Sci* (浙江大学: 科学版), 2004, 31 (4): 412-415.
- [2] Wen Y H, Lin Y S, Huang H, et al. Study on the antiviral activity of the solution extracted from *Trollius chinensis* Bunge with water [J]. *Chin J Microbiol Immunol* (中华微生物学和免疫学杂志), 1999, 19 (1): 21.
- [3] Li Y L. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 79: 356.

大孔吸附树脂分离纯化侧柏叶中槲皮苷的研究

杨庆胜, 张京健, 张龙海, 贾春华, 樊小勇

(河南仲景保健药业有限公司, 河南 郑州 450001)

侧柏叶是柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥嫩枝及叶, 具有凉血止血、生发乌发之功效, 用于吐血衄血、咯血、便血、崩漏下血、血热脱发、须发早白等症^[1]。所含主要成分为黄酮类化合物、鞣质和挥发油类等, 其中镇咳祛痰和止血主要有效成分为黄酮类化合物中的槲皮苷类^[2,3]。

大孔吸附树脂是一类有机高聚物吸附剂, 具有吸附快、解附快、吸附容量大、易于再生等特点, 已广泛应用于天然产物的分离和富集。侧柏叶中黄酮类成分结构比较复杂, 一般方法较难将它们分开, 目前侧柏叶总黄酮提取物常用的分析方法多为以芦丁为对照品采用紫外分光光度法测定总黄酮^[4], 因芸香苷(芦丁)与侧柏叶中槲皮苷的结构上有所不同, 在吸收波长上也有所差异, 不能正确地反映出侧柏叶总黄酮提取物的内在质量。本实验选用高效液相色谱法, 以槲皮苷为指标, 对用大孔树脂分离纯化侧柏叶总黄酮进行测定, 以确定大孔树脂分离纯化的工艺条件。实验表明, 该法准确、灵敏、快速简便, 所选指标槲皮苷能够准确地反映侧柏叶总黄酮提取物的内在质量, 所优选的工艺条件具有实际意义。

1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 型高效液相色谱仪, HP1050/3D 化学工作站; 玻璃色谱柱 (280 mm × 20 mm); 吸附树脂均购自南开大学化工厂; 槲皮苷对

照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号 111538-200301); 色谱分析用甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为重蒸馏水(自制), 侧柏叶药材购自河南省药材公司, 经鉴定符合《中国药典》2005 年版一部侧柏叶项下规定。

2 方法与结果

2.1 树脂的预处理: 各吸附树脂经筛选后, 用乙醇浸泡 12 h, 倾倒入上层乙醇, 然后加入吸附柱中, 待树脂装好后, 用乙醇 3 BV/h 通过树脂层, 至流出液加水不呈白色浑浊为止, 并用水以同样速度洗涤乙醇, 然后用 2 BV 2% HCl 溶液以 2.6 mL/min 通过树脂层, 并浸泡 4 h 后用水以同样速度洗至流出液 pH 值呈中性, 最后用 2 BV 2% NaOH 溶液以 2.6 mL/min 通过树脂层, 并浸泡 4 h 后, 用水以同样速度洗至流出液 pH 值呈中性, 滤取, 室温晾干, 即得。以 95% 乙醇湿法装柱, 继续用乙醇在柱上流动清洗至流出液乙醇-水 (1:5) 不呈白色为止, 然后用蒸馏水洗至无醇味, 备用。

2.2 上柱液的制备: 取侧柏叶药材粗粉, 用 10 倍 70% 乙醇提取 2 次, 每次 2 h, 药液滤过, 合并, 减压浓缩(每毫升药液相当于生药 1 g)。

2.3 槲皮苷的 HPLC 法测定^[1]

2.3.1 色谱条件与系统适应性试验: 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 以甲醇-0.01 mol/L 磷酸二

收稿日期: 2005-10-25

作者简介: 杨庆胜 (1969—), 男, 郑州人, 主管中药师, 执业药师, 1993 年毕业于河南中医学院中药系, 一直主要从事中药的新产品开发, 发表科研论文 10 余篇。

氢钾溶液-冰醋酸(40 : 60 : 1.5)为流动相;体积流量:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:室温;进样量 10 μ L;理论板数按槲皮苷峰计算应不低于 2 000。

2.3.2 标准曲线的绘制:精密称取槲皮苷对照品 15.5 mg,置 25 mL 量瓶中,加乙醇溶解,并稀释至刻度,摇匀,得 0.62 mg/mL 槲皮苷对照品储备液,备用。分别精密量取储备液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,置于 25 mL 量瓶中,用乙醇稀释至刻度,作为对照品溶液。分别精密量取对照品溶液 10 μ L,按上述 HPLC 条件,进样分析。以进样量(X)与峰面积积分值(Y)绘制标准曲线。回归方程 $Y=3.21\times 10^{-7}X+0.00616$, $r=0.9998$,表明槲皮苷在 0.248~1.240 μ g 时,进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.3 供试品溶液的制备及测定:先把液体样品定容至适当体积,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液 1 mL,置于 50 mL 量瓶中,加 95%乙醇至刻度,摇匀,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 10 μ L,按上述 HPLC 条件,进样分析。色谱图见图 1。

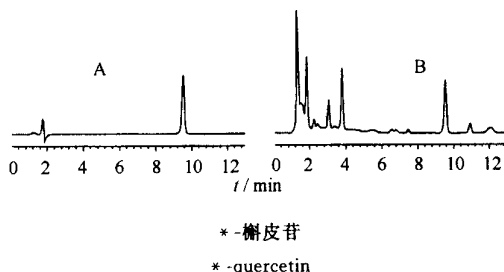


图 1 槲皮苷对照品(A)和洗脱样品(B)的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC Chromatograms of quercetin references substance (A) and desorption sample (B)

2.4 树脂型号的筛选:取 50 mL 药液,加至已处理好的 4 种型号的大孔吸树脂上,药液反复吸附,水洗,再用 300 mL 70% 乙醇洗脱。分别收集吸收后的药液、水洗液、醇洗液,定容,得各样品。检测槲皮苷,按下式计算各树脂的吸附量和洗脱率。结果见表 1。

表 1 4 种树脂对槲皮苷的吸附和洗脱性能
Table 1 Adsorption and desorption properties of four resins on quercetin

树脂型号	极性	吸附量/(mg · g ⁻¹)	洗脱率/%
D-101	非极性	17.5	65.2
D-301	非极性	16.7	61.5
AB-8	弱极性	26.8	90.6
HPD-600	极性	22.3	76.7

$$\text{吸附量}=(C-C_e)\times V_A/W$$

$$\text{洗脱率}=C_D\times V_D/[(C-C_e)\times V_A]\times 100\%$$

式中 C 为吸附液起始质量浓度, C_e 为吸附平衡质量浓度, V_A 为吸附液体积, W 为树脂质量, C_D 为洗脱液质量浓

度, V_D 为洗脱液体积

可以看出,以 AB-8 树脂的吸附量较大、洗脱率较高,故选择 AB-8 树脂来分离和纯化侧柏叶中的槲皮苷。

2.5 洗脱剂及洗脱条件的条件

2.5.1 洗脱体系的确定:最常用的洗脱剂是水、甲醇、乙醇、丙酮、醋酸乙酯以及它们的混合液等。试验结果(表 2)显示,采用甲醇-水、乙醇-水、丙酮体系对槲皮苷均有较好的洗脱效果。考虑到甲醇的毒性,丙酮的易挥发性等因素,以及实际工作中的安全、成本等问题,确定以乙醇-水体系作为洗脱剂。先以大量水洗脱除去无机盐、蛋白质、多糖等杂质,再以不同体积分数的乙醇-水进行洗脱。

表 2 洗脱剂体系对动态吸附性能的影响

Table 2 Effects of eluent system on dynamical adsorption property

洗脱体系	洗脱率/%	洗脱体系	洗脱率/%
水	1.6	醋酸乙酯	61.8
甲醇	42.1	70% 甲醇	91.4
乙醇	63.8	70% 乙醇	91.8
丙酮	89.5		

2.5.2 洗脱剂体积分数对树脂动态洗脱性能的影响:对已经吸附样品的树脂用一系列不同体积分数的乙醇-水进行洗脱,测洗脱液浓度,计算洗脱率,结果见表 3。可见,10%、30% 乙醇洗脱率较低,而且洗脱剂用量较大;50% 乙醇洗脱,洗脱率不高;60%~90% 乙醇的洗脱率较高,且洗脱剂用量少,起到了浓缩的效果。考虑到随着洗脱剂体积分数的增加,洗脱液洗下脂溶性杂质也会增多,故选择 70% 乙醇作为洗脱剂。

表 3 洗脱剂浓度对动态吸附性能的影响

Table 3 Effects of eluent concentration on dynamical elution property

洗脱剂体 积分数/%	洗脱体 积/BV	洗脱 率/%	洗脱剂体 积分数/%	洗脱体 积/BV	洗脱 率/%
10% 乙醇	12	31.6	70% 乙醇	6	91.8
30% 乙醇	10	42.1	80% 乙醇	5	92.4
50% 乙醇	9	63.8	90% 乙醇	5	93.1
60% 乙醇	8	81.5			

2.6 最佳脱附条件下的洗脱曲线:在常温下,用 70% 乙醇做洗脱剂,以 3~5 mL/min 的洗脱速率对已吸附了样品的树脂进行洗脱,得到洗脱曲线,见图 2。

2.7 工艺验证及样品纯度的测定:取 50 mL 药液,加至已处理好的 AB-8 型号的大孔吸附树脂上,药液反复吸附,水洗,再用 330 mL 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,浓缩,除去溶剂,减压干燥,得槲皮苷初产

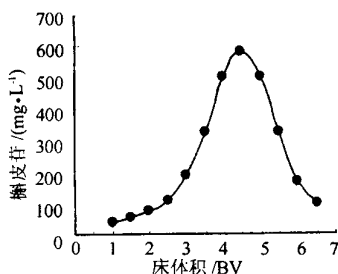


图 2 槲皮苷洗脱曲线

Fig. 2 Desorption curve of quercetin

品,经 HPLC 测定分析,考察 AB-8 型号树脂的吸附量,洗脱率以及样品中槲皮苷的质量分数。结果 AB-8 树脂的吸附量为 26.8 mg/g,洗脱率为 91.6%,槲皮苷的质量分数为 321.8 mg/g。对上柱液也进行浓缩干燥处理,粗提物中槲皮苷的收率为 1.82%。

3 讨论

一般说来,树脂吸附性能的优劣是有其化学和物理结构决定的,树脂的极性(功能基)和空间结构(孔径、比表面积、及孔容)是影响其吸附性能的重要因素。研究结果显示:极性的 HPD-600 大孔吸附树

脂和弱极性的 AB-8 型大孔吸附树脂对侧柏叶提取液中槲皮苷的吸附量均较大,可能与槲皮苷具有较强的极性有关。另一方面,在某些情况下吸附作用力强,解析起来也会困难一些,如 HPD-600 型大孔吸附树脂的吸附量大,但解析率较低。

实验表明,AB-8 型大孔吸附树脂对槲皮苷有较大静态吸附量,也容易解吸附,表现出较好的综合分离纯化能力;同时,其动态吸附、脱附性能也较好。吸附量达 26.8 mg/g;6.5 倍床体积的 70%乙醇可将吸附在树脂上的样品洗脱下来,解吸率达 91.6%。因此,本方法可以用来分离纯化侧柏叶中槲皮苷。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986.
- [3] Ding H, Liu H M, Liang T. The effect of anthoxanthin in *Platycladus orientalis* (L) Franco on oxidation in human RBC induced by H₂O₂ [J]. *Prac Clin Med* (实用临床医学), 2003, 3 (4): 30-31.
- [4] Cheng L F, Tian Y. In oriental *Arborvitae* leaf effective component content change research [J]. *Shizhen J Tradit Chin Med Res* (时珍国药研究), 1995, 6(4): 15-16.

RP-HPLC 法测定金屏风胶囊中菊苣酸

邵国良, 邵建峰

(正大青春宝药业有限公司, 浙江 杭州 310023)

紫锥菊 *Echinacea purpurea* L. 为紫菀科的全草,连续数年入选美国最畅销植物药行列^[1]。近几年我国已从北美和欧洲引进了该药材。我公司为了市场需要已研制成含紫锥菊的制剂-金屏风胶囊。金屏风胶囊系由紫锥菊、黄芪等药味组成的复方制剂,具有提高机体免疫的功能,对病毒性感冒有很好的预防作用,菊苣酸是主要生理活性成分,故选用菊苣酸作为质量控制指标。菊苣酸的测定主要采用高效液相色谱法^[2~5]。本实验采用乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相与 C₁₈ 反相柱,选择紫外检测器,准确、快速地定量分析了金屏风胶囊中菊苣酸,结果可靠。

1 仪器和试剂

Agilent 1100 型系列高效液相色谱仪,包括柱温箱、自动进样系统、紫外检测器,岛津 UV-2401PC 紫外可见分光光度计。乙腈为色谱纯,磷酸

为分析纯,水为重蒸馏水。菊苣酸对照品(自制,经浙江省药品检验所鉴定结构,质量分数≥96%),金屏风胶囊(本公司产品,规格为 0.5 g/粒)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备:精密称取菊苣酸对照品,加适量 70%甲醇制成 20.8 μg/mL 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备:取金屏风胶囊的内容物 0.4 g,精密称定,置 50 mL 棕色量瓶,加适量 70%甲醇超声溶解,流水冷却至室温后,70%甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,过 0.45 μm 滤膜,即得。

2.3 测定波长的确定:取菊苣酸对照品溶液(20.8 μg/mL),在 200~450 nm 波长扫描,结果在 330 nm 处有最大吸收,故选择 330 nm 作为菊苣酸的检测波长。

2.4 流动相的选择:比较了甲醇-水体系和乙腈-水