

## 秦皮提取工艺的正交试验研究

顾苏俊, 刘萍, 张玉萌, 马凤彩, 马桂花  
(解放军总医院药品库, 北京 100853)

秦皮为木犀科植物苦枥白蜡树 *Fraxinus rhynchophylla* Hance、白蜡树 *F. chinensis* Roxb.、尖叶白蜡树 *F. chinensis* Roxb. var. *acuminata* Lingelsh 或宿柱白蜡树 *F. stylosa* Lingelsh. 的树干皮。具有清热解毒、清肝明目的功效, 用于热痢、泄泻、赤白带下、目赤肿痛、目生翳膜等症。收载于《中国药典》2005 年版一部。其主要有效成分为秦皮甲素(aesculin)等。原材料采用 HPLC 法测定秦皮甲素和秦皮乙素的总量为控制标准, 方法较繁琐。本实验采用正交试验优选工艺, 并以改良的 HPLC 法测定秦皮甲素, 取样量小, 而且简便、快速、准确, 在实际工作中同样可达到控制秦皮质量的目的。

### 1 材料

美国安捷伦 1050 高效液相色谱仪, 离心机(中国上海鑫晶医疗器厂)。秦皮购自北京同仁堂, 经鉴定为木犀科植物白蜡树 *F. chinensis* Roxb. 干燥枝皮。秦皮甲素对照品购自中国药品生物制品检定所, 甲醇为 AR 级。

### 2 方法与结果

2.1 因素水平的确定: 以粉碎粒度、加水量、煎煮时间、温度为因素, 因素水平见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

| 水平 | 因素             |         |            |        |
|----|----------------|---------|------------|--------|
|    | A 粉碎粒度         | B 加水量/倍 | C 煎煮时间/min | D 温度/℃ |
| 1  | 8 mm×3.5 mm 左右 | 6       | 60         | 100    |
| 2  | 5 mm×5 mm 左右   | 10      | 120        | 110    |
| 3  | 1 mm×1 mm 左右   | 12      | 180        | 125    |

2.2 提取方法: 取秦皮样品共 9 份, 各 50 g, 按照正交试验设计条件进行处理, 提取浓缩至含秦皮原药材 1 g/mL。取该浓煎液 2 mL, 加入醋酸乙酯 2 mL, 振摇 3 min, 离心 3 min, 吸出醋酸乙酯, 同法操作 6 次, 合并醋酸乙酯, 75 ℃ 水浴上挥干溶剂, 密塞。

2.3 秦皮甲素的 HPLC 测定

2.3.1 色谱条件: 色谱柱  $C_{18}$ ; 流动相甲醇-水(24:76), 体积流量 1.2 mL/min, 检测波长 348 nm, 灵敏度 0.04, 进样量 10  $\mu$ L。理论塔板数以秦皮甲素计大

于 2 000, 分离度为 6.0。

2.3.2 对照品溶液制备: 精密称取秦皮甲素对照品适量, 在 80 ℃ 干燥至恒重, 加流动相配制 0.2 mg/mL 的对照品溶液, 备用。

2.3.3 标准曲线制作: 精密量取对照品溶液 20.00、16.00、8.00、2.00、1.00 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 分别取 10  $\mu$ L 进行测定。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行回归分析, 得回归方程  $Y=59.13 X-7.026 0$ ,  $r=0.999 8$ , 结果表明秦皮甲素在 0.07~6.00 mg 与峰面积的线性关系良好。

2.3.4 测定: 用少量流动相超声溶解提取物, 移至 25 mL 量瓶中, 加流动相稀释到刻度, 摇匀, 用微量注射器准确移取 10  $\mu$ L, 进行分析。外标法定量。

2.4 结果: 正交试验结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 2 正交设计结果

Table 2 Results of orthogonal test

| 试验号   | A        | B        | C        | D        | 秦皮甲素/(mg·mL <sup>-1</sup> ) |
|-------|----------|----------|----------|----------|-----------------------------|
| 1     | 1        | 1        | 1        | 1        | 5.879 3                     |
| 2     | 1        | 2        | 2        | 2        | 5.802 2                     |
| 3     | 1        | 3        | 3        | 3        | 6.841 3                     |
| 4     | 2        | 1        | 2        | 3        | 4.701 6                     |
| 5     | 2        | 2        | 3        | 1        | 6.655 2                     |
| 6     | 2        | 3        | 1        | 2        | 7.683 9                     |
| 7     | 3        | 1        | 3        | 2        | 7.418 8                     |
| 8     | 3        | 2        | 1        | 3        | 6.134 4                     |
| 9     | 3        | 3        | 2        | 1        | 6.241 8                     |
| $K_1$ | 18.522 8 | 17.999 7 | 19.697 6 | 18.776 3 |                             |
| $K_2$ | 19.040 7 | 18.591 8 | 16.745 6 | 20.904 9 |                             |
| $K_3$ | 19.795 0 | 20.767 0 | 20.915 3 | 17.677 3 |                             |
| R     | 0.090 9  | 0.471 8  | 1.021 6  | 0.598 3  |                             |

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

| 方差来源 | 离差平方      | 自由度 | 方差      | F 值     | P 值      |
|------|-----------|-----|---------|---------|----------|
| A    | 0.090 9   | 2   | 0.045 5 | 0.324 8 | $P<0.01$ |
| B    | 0.471 8   | 2   | 0.235 9 | 1.683 8 | $P<0.01$ |
| C    | 1.021 6   | 2   | 0.510 8 | 3.646 0 | $P<0.01$ |
| D    | 0.598 3   | 2   | 0.299 2 | 2.135 6 | $P<0.01$ |
| 误差   | 2.521 7   | 18  | 0.140 1 |         |          |
| 总平方和 | 126.556 1 |     |         |         |          |

提取条件重要排序为  $C>D>B>A$ , 由于残留

指标越小越好,所以较好的提取方法应为 C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>B<sub>1</sub>A<sub>1</sub>,即煎煮 120 min、125 ℃、粉碎粒度为 8 mm×3.5 mm、加水 8 倍。

2.5 验证试验:为进一步考察上述优选工艺的稳定性,选用上述优化条件,取 50 g 药材,采取用水 8 倍量、煎煮 120 min、125 ℃、粉碎粒度 8 mm×3.5 mm、重复 3 次,结果所得秦皮甲素的质量分别为 5.44、5.38、5.67 mg。

### 3 讨论

秦皮始载于《神农本草经》,列为中品。秦皮甲素为秦皮的有效成分,具香豆素类母体结构,收载于《中国药典》2005 版一部中,采用 HPLC 法测定秦皮甲素和秦皮乙素的总量为控制标准,方法较繁琐。有

关文献对秦皮进行测定分别有 HPLC 法、容量法、紫外分光光度、纸色谱比色法、电泳-光密度计法、薄层色谱-荧光法等法<sup>[1,2]</sup>。经多种条件比较,实验用改良的 HPLC 法测定秦皮甲素。

曾考虑将秦皮乙素一起测定,但由于提取效果不佳,出峰结果不理想而放弃,有待于今后继续研究。

### References:

[1] Sun D M, Fan S L, Tu Y S. Determination of aesculin in Qinpi Granule by HPLC [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2000, 11 (3): 172.

[2] Liang Y A, Zhu J J. Quantitative determination of aesculin in Cortex Fraxini Caulis by second-derivative differential pulse polarography [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 2000, 16 (5): 254.

## HPLC 法测定养血当归精合剂中芍药苷

吴瑾瑾<sup>1</sup>, 石森林<sup>2</sup>, 徐菲拉<sup>3</sup>

(1. 杭州市第四医院, 浙江 杭州 310003; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310000; 3. 金华市中心医院, 浙江 金华 312000)

养血当归精合剂由当归、川芎、熟地、黄芪、白芍、阿胶、甘草等组成,具有补虚益气、养血调经的功效,主要用于妇女气血两虚所致月经不调、闭经及痛经等病症。该品目前有 15 家企业生产,但是临床疗效不稳定。究其原因,是原生产工艺较粗糙,缺少量化质量控制标准。为保证药品质量,进一步修订药品质量标准,本实验采用 HPLC 法测定养血当归精中芍药苷。

### 1 材料与仪器

AgiLent 1100 高效液相色谱仪、UV 检测器(美国 AgiLent 公司),CQ250 型超声波清洗器(上海超声波仪器厂),PL5124 型纯水机(美国 PALL 公司),C<sub>18</sub>固相萃取小柱(江苏汉邦科技有限公司),AB-204-N 电子天平(梅特勒-托利多),101A-2 电热鼓风机(上海市实验仪器总厂),SX2-4-10 箱式电阻炉(沈阳市节能电炉厂)。

芍药苷对照品(批号 0736-200117,中国药品生物制品检定所),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,养血当归精合剂(150 mL/瓶)由浙江中医药大学药学院提供。

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件:Zorbax XDB-C<sub>18</sub>(150 mm×3.9 mm, 5 μm)色谱柱;流动相:甲醇-水-磷酸(35:65:0.1);检测波长:230 nm;柱温:室温;体积流量:0.8 mL/min。理论板数按芍药苷峰计算不低于 3 500。

#### 2.2 溶液的配制

2.2.1 供试品溶液的制备:准确移取养血当归精合剂 4.0 mL 于 50 mL 量瓶中,加入甲醇 36 mL,密塞,摇匀,冰箱放置 6 h 以上,滤过,残渣用少量甲醇洗涤,合并滤液,滤液水浴蒸干,残渣用蒸馏水溶解于 5 mL 量瓶中,以蒸馏水稀释至刻度,密塞,摇匀,准确吸取该溶液 300 μL 于 C<sub>18</sub>固相萃取小柱(15 mm×8 mm, 500 mg)上,分别用蒸馏水 3.0 mL、35%甲醇 5.0 mL 洗脱,收集 35%甲醇洗脱液于 5 mL 量瓶中,并用流动相稀释至刻度,密塞,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备:芍药苷对照品真空干燥 24 h 后,取约 17 mg,精密称取,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,密塞,摇匀,即得对照品储备液。精密吸取此对照品储备液 40 μL 于 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,密塞,摇匀,即得对照品溶液(含芍药苷 6.8 μg/mL)。