

摇匀。精密吸取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 置 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀。按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积积分值为纵坐标,蝙蝠葛碱进样量为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y=3\ 348\ 626.22 X-142\ 520.0$, $r=0.999\ 9$ 。表明蝙蝠葛碱在 1.0~5.0 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.5 精密度试验:取供试品溶液,重复进样 5 次,测定峰面积,结果蝙蝠葛碱峰面积的 RSD 为 0.33%。

2.6 重现性试验:取批号 20010202 蝙蝠葛酚性碱片约 0.1 g,共 6 份,制备供试品溶液,分别进样 20 μL ,测定,结果蝙蝠葛碱质量分数 RSD 为 0.88%。

2.7 稳定性试验:取同一供试品溶液分别在 0、1、2、4、6、8 h 精密吸取 20 μL 注入液相色谱仪中测定。结果表明,供试品溶液在 8 h 内稳定性良好,其中蝙蝠葛碱峰面积的 RSD 为 0.86%。

2.8 回收率试验:精密称取含蝙蝠葛碱 194.82 mg/g 样品 0.1 g,共 6 份,分别加入 4.03、4.11、8.05、8.09、11.87、12.04 mg 蝙蝠葛碱对照品,制备供试品溶液,在上述试验条件下进样测定,计算回收率。结果平均回收率为 97.26%,RSD 为 0.89% ($n=6$)。

2.9 样品测定:取批号为 200010311、20010315、20010318 的蝙蝠葛酚性碱片 0.1 g,精密称定,制备

供试品溶液,在上述色谱条件下进样,测定,按外标法计算,结果蝙蝠葛碱的质量分数分别为 57.60、56.16、55.88 mg/片 ($n=3$)。

3 讨论

考察提取溶剂时,曾对甲醇、流动相进行了比较,发现超声处理相同时间一致,但用甲醇溶解样品时溶剂峰较大,故选择用流动相超声溶解样品。曾对超声时间进行了考察,发现超声处理 20 min 后,蝙蝠葛碱质量分数稳定,可认为对蝙蝠葛碱基本被提取完全,故选择超声处理 30 min。

采用 UV-2000 紫外分光光度计对蝙蝠葛碱在 200~400 nm 波长进行扫描,结果在 279 nm 波长处有最大吸收,故选择 279 nm 作为检测波长。

流动相为乙腈-水-磷酸-三乙胺 (15 : 85 : 0.2 : 0.2),蝙蝠葛碱与其他杂质峰达到基线分离。

本实验所建方法简单易行、重现性好,测定蝙蝠葛酚性碱片中蝙蝠葛碱,具有很强的实用性,为蝙蝠葛酚性碱片质量控制提供了一个可靠的方法。

References:

- [1] Chen S J, Xiao Z. RP-HPLC Analysis of several alkaloids of *Menispermum dauricum* D.C. from different district [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1999, 19 (2): 79-81.
- [2] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.

金钱草总黄酮提取工艺研究

王宇杰,孙启时,曹林

(沈阳药科大学中药学院,辽宁 沈阳 110016)

金钱草为报春花科珍珠菜属植物过路黄 *Lysimachia christinae* Hance 的新鲜或干燥全草,清利湿热,通淋,消肿,用于热淋,沙淋,尿涩作痛,黄疸尿赤,痈肿疔疮,毒蛇咬伤,肝胆结石,尿路结石^[1]。金钱草含有酚性成分、黄酮类、苷类、鞣质、挥发油、氨基酸、胆碱、甾醇、氯化钾、内酯类等成分。其中,以黄酮类成分的研究较为深入。因此,本实验以总黄酮和浸膏得率为考察指标,对金钱草总黄酮的最佳提取工艺进行研究。

1 仪器与试剂

721B 型分光光度计(上海第三分析仪器厂),电子天平(沈阳龙腾称量仪器有限公司)。

芦丁对照品(自制,HPLC 测定质量分数 98.0%以上),所用试剂均为分析纯。

金钱草购于四川,经沈阳药科大学孙启时教授鉴定为报春花科珍珠菜属植物过路黄 *L. christinae* Hance。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的测定

2.1.1 对照品溶液制备:精密称取芦丁对照品适量,加蒸馏水制成 0.204 mg/mL 对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液制备:将各正交试验所得提取液合并,回收滤液,定容至 1 000 mL 量瓶中,精密移取 2 mL 定容至 10 mL 量瓶中备用。

2.1.3 显色方法^[2]:精密称取 1.5 mL 定容液至 25 mL 量瓶中,加入 5 mL 蒸馏水,摇匀。精密加入 5% 亚硝酸钠 1.0 mL,摇匀,放置 6 min。精密加入 10% 的硝酸铝 1.0 mL,摇匀,放置 6 min。精密加入 4% 氢氧化钠 10.0 mL,蒸馏水定容至刻度。

2.1.4 标准曲线的制备^[2]:分别精密移取芦丁对照品储备液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,于 25 mL 量瓶中,再分别加入 7.0、6.0、5.0、4.0、3.0、2.0 mL 蒸馏水,摇匀,按 2.1.3 项方法显色 15 min 后于 500 nm 波长测定吸光度(A)。以 A 值为纵坐标,质量浓度为横坐标进行回归,得方程 $A=15.368 C-0.0048$, $r=0.9997$,线性范围为 0~32.64 μg/mL。

2.1.5 样品测定:供试品溶液按 2.1.3 项方法显色,15 min 后于 500 nm 波长测定 A 值,按回归方程计算溶液中总黄酮的质量浓度。

2.2 浸膏得率的测定^[3]:取金钱草提取液 100 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干后,置烘箱内 105 ℃ 干燥 3 h,取出置干燥器内,冷却 30 min,迅速精密称定质量。按浸膏质量/药材质量×100% 计算浸膏得率。

2.3 不同提取方法提取效果比较

2.3.1 水提醇沉法:取金钱草药材 100 g,加水 1 000 mL,浸泡 30 min,水提 2 次,每次 2 h。滤过,合并滤液,将水提液浓缩,调乙醇体积分数为 75%,醇沉,滤过,浓缩,定容至 1 000 mL 量瓶。

2.3.2 乙醇回流提取法:取金钱草药材 100 g,加 50% 乙醇 1 000 mL,浸泡 30 min,回流提取 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,浓缩,定容至 1 000 mL 量瓶。

2.3.3 结果比较:上述溶液分别取 2 mL 定容至 10 mL 量瓶中备用,显色 15 min 后于 500 nm 波长测定 A 值,按回归方程计算样品溶液中总黄酮在生药中的质量分数,并测定浸膏得率,结果见表 1。表明乙醇回流提取效果最佳。

表 1 不同提取方法提取效果的比较

Table 1 Comparison of different extracting methods

提取方法	总黄酮/%	浸膏得率/%
水提醇沉	0.967 5	12.4
乙醇回流	2.543 8	18.6

2.4 提取次数的考察:精密称取 100 g 药材粉末 9 份,浸泡 30 min,用 10 倍量 50% 乙醇回流提取 2 h,提取次数分别为 1、2、3 次,回收滤液,定容至 1 000 mL 量瓶中,精密移取 2 mL 定容至 10 mL 量瓶中备用。计算总黄酮在生药中的质量分数,并测定浸膏得率,结果见表 2。表明以 3 次为最佳。

2.5 正交试验及其结果:采用正交试验法,拟定 3 种因素,各取 3 个水平(表 3)。按照 $L_9(3^4)$ 正交表进行回流提取 2 次,分别测定总黄酮在生药中的质量分数和浸膏得率,并进行多指标综合评分^[3],评分时以各指标最大值为参照将数据进行归一化,再给出不同的权重,总黄酮质量分数的权重系数设为 0.7,在有效成分明显的前提下,浸膏得率越高则质量分数越低,所以设负权重系数 -0.3,以综合值进行统计分析。结果见表 4。其中综合评分 $Y=0.7 \times X_1 \times 100/2.1756 - 0.3 \times X_2 \times 100/19.0$ 。可知最佳提取工艺是 $A_1B_2C_2$,即 8 倍量 50% 乙醇回流提取 2 h。表明乙醇体积分数对金钱草总黄酮的提出率影响较大,其次为提取时间和溶剂用量,但均无显著性差异。

表 2 不同提取次数的考察

Table 2 Comparison of different extracting number of times

提取次数	总黄酮/%	浸膏得率/%
1	1.630 1	15.8
2	2.551 0	19.0
3	3.095 6	23.6

表 3 因素与水平

Table 3 Factors and levels

水平	因 素		
	A 乙醇体积分数/%	B 提取时间/h	C 溶剂用量/倍
1	50	1	6
2	70	2	8
3	95	3	10

表 4 $L_9(3^4)$ 正交试验设计结果

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

编号	A	B	C	D	总黄酮/%	浸膏得率/%	综合评分
1	1	1	1	1	1.712 4	14.3	32.52
2	1	2	2	2	1.996 3	15.7	39.44
3	1	3	3	3	2.175 6	19.0	40.00
4	2	1	3	2	1.590 2	12.9	30.79
5	2	2	1	3	1.741 9	13.2	35.20
6	2	3	2	1	1.222 0	13.2	18.47
7	3	1	2	3	1.227 5	6.9	28.60
8	3	2	3	1	1.563 3	6.1	40.67
9	3	3	1	2	1.579 5	6.5	40.56
k_1	37.320	30.637	30.557	36.093			
k_2	28.157	38.437	36.930	28.840			
k_3	36.610	33.013	34.600	37.153			
R	9.163	7.800	6.373	8.313			

2.6 验证试验:根据筛选得到的最佳工艺 $A_1B_2C_2$ 提取 3 次,进行验证试验,得总黄酮在生药中的质量分数为 3.25%,浸膏得率为 23.9% ($n=3$)。

3 讨论

本实验以总黄酮在生药中的质量分数和浸膏得率为指标综合评分优选金钱草总黄酮的最佳提取工

艺条件,符合减少服用剂量、提高疗效的要求,可以较好的保证制剂质量。

用多指标正交试验进行工艺筛选时,要针对指标间的重要性差异给出各指标权重,综合评分后再进行统计分析,应用多指标综合评分法时,如何设置指标权重具体情况具体分析,在有效成分明确的情况下浸膏得率越高纯度越低,因此本实验设为负权重系数;如果有效成分不明确而以浸出物多少代

表有效成分时,权重系数应相应增大,并设为正值。

References:

[1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.

[2] Zhu D Q, Luo Q J, Cui L, et al. Determination of total flavonoids in *Gluechoma longituba* (Nakai) Kupr. [J]. *Pharm Care Res* (药学服务与研究), 2003, 3 (1): 62-63.

[3] Zhang T, Xu L Y, Tao J S, et al. Applying grading methods of synthesizing multiple guidelines to optimizing extract technology for *Radix Purariae* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (1): 38-40.

HPLC 测定藏成药七味诃子散中没食子酸

潘国庆¹, 卢永昌¹, 德吉措姆²

(1. 青海民族学院 化学系, 青海 西宁 810007; 2. 青海省藏医院 检验科, 青海 西宁 810007)

七味诃子散由诃子、波棱瓜子、草果、甘松、笨拔等 7 味藏药组成,方源于《四部医典》,临床常用于治疗劳伤引起的脾脏肿大、疼痛、脾热等症,是藏医治疗临床脾病的常用药物。诃子的化学成分中主要为鞣质,其中所含没食子酸具有抗菌、抗病毒和抗肿瘤的药理作用^[1],与诃子具有抗菌、强心、抗氧化及解痉、抗肿瘤、抗艾滋病病毒活性一致^[2]。诃子及其活性成分没食子酸的作用与七味诃子散的作用密切相关。七味诃子散质量标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》藏药第一册,但该标准中规定的检测项目只有性状鉴别和制剂常规检查项^[3]。为了提高藏药质量标准,达到更有效控制制剂内在质量的目的,本实验对方中主药诃子所含成分没食子酸,结合相关研究^[4~6],采用高效液相色谱法建立了测定方法。经方法学考察及阴性对照试验,表明方法专属性较强,处方中其他成分对没食子酸的测定无干扰,并且操作简便、快速、准确、重现性好,能够控制七味诃子散的质量。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括 G1315A/B DAD 检测器,Agilent 1100 色谱工作站(美国安捷伦科技有限公司);KQ3200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SZ-97 自动三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

没食子酸对照品由中国科学院西北高原生物研究所胡凤祖研究员提供,质量分数大于 99%;甲醇

(色谱纯,山东禹王实业有限公司禹城化工厂);水为重蒸馏水。七味诃子散由青海省藏药厂提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Kromasil—C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,流动相为甲醇-0.02%磷酸(5:95),体积流量为 1 mL/min,检测波长 274 nm,柱温 30 ℃。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取没食子酸适量,加甲醇溶解制成 20.6 μg/mL 的溶液作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:取样品约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50%甲醇水溶液 100 mL,摇匀,称定质量,超声处理 30 min,放冷,称定质量,用 50%甲醇水溶液补足减失的质量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得供试品溶液。

2.4 阴性对照试验:取按制剂处方比例制备缺诃子的阴性对照,按供试品溶液制备法制得阴性对照溶液。分别精密吸取对照品溶液、阴性对照溶液、供试品溶液各 10 μL,分别注入高效液相色谱仪。结果阴性对照色谱图中在与没食子酸对照品以及供试品色谱图相对应的保留时间处无色谱峰出现,表明其他成分对没食子酸的测定无干扰。测定结果见图 1。

2.5 线性关系试验:取没食子酸对照品 2.06 mg 置 100 mL 量瓶中,加甲醇使溶解,并稀释至刻度,摇匀(20.6 μg/mL)。精密吸取 1.0、3.0、6.0、10.0、12.0 μL 溶液进样,测定。以峰面积对进样量进行回

收稿日期:2005-12-20

作者简介:潘国庆(1964—),女,河北清河人,主要从事天然药物的研究工作。E-mail: mypgq@sina.com