

表4 不同丹酚酸水解液对小鼠常压耐缺氧能力的影响 (n=5)

Table 4 Effect of various phenolic acidity hydrolysate on antihypoxic capacity of mice at normal pressure (n=5)

组别	死亡时间($\bar{x} \pm s$)/min
对照	20.36 ± 1.52
1-1	26.83 ± 1.85**
1-2	37.74 ± 2.70**
1-3	39.91 ± 2.54**
1-4	43.41 ± 3.02**

与对照组比: * P < 0.01

** P < 0.01 vs control group

3 讨论

通过考察不同提取方法对丹参提取液中丹参素、原儿茶醛及总酚酸以及体内和体外的抗氧化作用效果的影响,推测:丹参素和原儿茶醛的质量浓度随加热时间的增加而提高,这说明它们是大分子丹酚酸的水解产物,且高温有助于丹酚酸的水解;根据提取液与体外猪红细胞作用后 SOD 活力和 MDA 的量测定结果,可以看出水热提的提取液抗氧化能力最强,其次是 50% 乙醇提,接着是水 + 95% 乙醇提和 95% 乙醇 + 水提,水冷提的最低,这与总酚酸的测定结果保持一致,说明总酚酸的量直接关系到抗氧化能力,丹参提取液中总酚酸的量越高,抗氧化能力越强;常压耐缺氧试验结果表明:水

热提和 95% 醇 + 水提以及水冷提液水解反应得到的样品均可显著延长小鼠在缺氧条件下的存活时间,其他的样品(水冷提、50% 醇提、水 + 95% 醇提)也可延长小鼠在缺氧条件下的存活时间,但无显著差异。可见,用水热提和 95% 醇 + 水提及对水冷提液进行加热处理的方法提取丹参的有效成分都可明显提高机体的有氧代谢能力。但这一结果并没有与样品中总酚酸的测定结果呈现出明显的相关性,可能是因为样品中还有脂溶性的丹参酮等成分,它们在动物体内也起了一定的作用,而对样品中水溶性的丹酚酸而言,丹参素和原儿茶醛的量越高,小鼠的耐缺氧能力越强。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Li G S, Wang G X. The assaying of the component of total phenolic acidity in Danshen Oral Liquid [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2001, 12 (8): 683-684.
- [3] Wang J H, Zhang M. Effect of component 3 of polysaccharides from *Fructus Lycii* on damage induced by hydroxyl radicals [J]. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 2001, 22 (1): 11-13.
- [4] Huang Y S, Zhang J T. Effect of antioxidation *in vitro* by three water-soluble components in Danshen [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1992, 27 (2): 96-100.
- [5] Jiang H F, Kong F Z. Study on resistance ability in mice by Shengmai Powder [J]. *Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med* (浙江中西医结合杂志), 2003, 6 (13): 86-87.
- [6] Huang X H, Tan X B. A Study of *Radix Rosa Laevigata* alcohol extract on anti-hypoxia effect [J]. *J Gannan Med Coll* (赣南医学院学报), 2003, 23 (5): 488-490.

正交试验优选獐牙菜的提取工艺

田 薇¹, 张喜民², 陈朝晖², 陈立仁³, 李永民³

(1. 浙江林学院食品与药学学院, 浙江 杭州 311300; 2. 甘肃省药物研究所, 甘肃 兰州 730070; 3. 中国科学院兰州化学物理研究所, 甘肃 兰州 730070)

龙胆科植物抱茎獐牙菜 *Swertia franchetiana* H. Smith 是一种多年生草本植物, 全草入药。有清热解毒、舒肝利胆之功效, 主治各种肝胆疾病, 临床对急性黄疸性肝炎、慢性肝炎、慢性胆囊炎等症疗效显著^[1]。其主要有效成分为环烯醚萜类、碳键黄酮苷类和吡啶酮苷类成分^[2-5]。目前, 中药提取工艺筛选试验中常用化学法、生物学法及有效浸出物综合评价的方法。用一种评价指标筛选提取工艺条件往往不够全面^[6]。现行的标准中对獐牙菜属药材的质量控制仅限于鉴别和检查^[7]。鉴于獐牙菜中环烯醚萜类

与吡啶酮类苷性成分的不同药理活性^[1,8], 本实验选择醇浸膏得率及以獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和獐牙菜吡啶酮苷为代表的总苷提取率为评价指标, 采用 L₉(3⁴) 正交试验筛选醇提取工艺条件, 同时考察了不同工艺条件对总苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜吡啶酮苷的提取率的影响, 可为研究和利用獐牙菜药材资源提供参考依据。

1 材料与仪器

岛津高效液相色谱仪: SPD-10Avp 泵系统, SPD-M10Avp 二极管阵列检测器, SIL-10ADVP

自动进样器,CTV-10Avp 柱温箱,CLASS-VP6.1 工作站。RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

獐牙菜药材为抱茎獐牙菜 *S. franchetiana* H. Smith 的全草,采购于青海西宁,由兰州大学生命科学院孙纪周教授鉴定;獐牙菜苦苷(批号为 785-9001)和龙胆苦苷(批号为 0770-200004)对照品购于中国药品生物制品检定所;獐牙菜苷(质量分数为 96%)和獐牙菜吡酮苷(质量分数为 90%)均由中国科学院西北高原生物所藏药现代化研究中心提供;甲醇为色谱纯(山东禹王),Millipore 超纯水(自制)。

2 方法与结果

2.1 醇浸膏得率的测定:精密吸取样品液 60 mL,置 105 °C 已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 °C 干燥 5 h,置干燥皿中冷却 30 min,迅速称重,计算醇浸膏得率。

2.2 獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和獐牙菜吡酮苷的测定

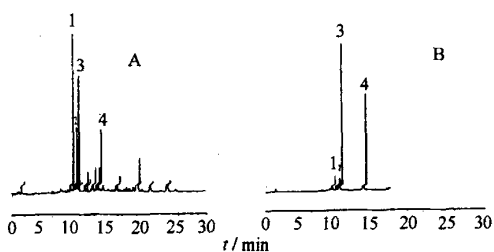
2.2.1 色谱条件:色谱柱:Kromusil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 A 为 10% 甲醇-水, B 为 80% 甲醇-水,分析时间 32 min,0~15 min,从 A-B(100:0)变化到 A-B(0:100),15~32 min 保持在 0%A;体积流量为 1.0 mL/min;色谱峰光谱采集范围:190~370 nm;检测波长:240 nm;柱温:40 °C;进样量:10 μL。以獐牙菜苦苷的色谱峰计算理论塔板数为 5 000。

2.2.2 对照品溶液的制备:分别精密称取 4 种对照品适量,加甲醇分别使成为 1.48、1.18、1.05、0.35 mg/mL,备用。

2.2.3 供试品溶液的制备:精密称取獐牙菜总苷提取物约 0.025 g,加甲醇溶解,定容于 25 mL。过 0.45 μm 膜,备用。

2.2.4 标准曲线的制备:分别精密吸取上述对照品溶液一定量按倍数关系稀释成 5 种不同质量浓度的溶液,分别吸取 10 μL 依上述方法做 HPLC 分析。以峰面积对进样量进行回归处理,得 4 种苷的回归方程。獐牙菜苦苷: $Y = 3 \times 10^7 X + 2.968 \times 10^5$, $r = 0.9996$; 龙胆苦苷: $Y = 4 \times 10^6 X + 6.598 \times 10^4$, $r = 0.9996$; 獐牙菜苷: $Y = 4 \times 10^7 X - 3.818 \times 10^5$, $r = 0.9994$; 獐牙菜吡酮苷: $Y = 9.602 \times 10^5 X + 5.557 \times 10^3$, $r = 0.9991$ 。供试品和混合对照品溶液的色谱图见图 1。

2.2.5 样品测定:分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,用外标法计算。



1-獐牙菜苦苷 2-龙胆苦苷 3-獐牙菜苷 4-獐牙菜吡酮苷
1-swertianmarin 2-gentiopicroside
3-sweroside 4-swertianolin

图 1 供试品(A)和混和对照品(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of sample (A) and mixed reference substances (B)

2.3 提取溶剂的选择:将阴干的獐牙菜药材制成粗粉,称取 100 g,加 8 倍量的溶剂,回流提取 2 次,每次分别滤过,合并滤液,浓缩,浓缩液置烘箱中,在 105 °C 烘干测定醇浸膏。分别精密称取一定量浸膏按样品测定法测定獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和獐牙菜吡酮苷。结果显示以水为溶剂对以 4 种苷为代表的总苷提取率偏低,故选择乙醇为对象考察其在一定体积分数下,对獐牙菜中环烯醚萜苷及吡酮苷及其为为代表的总苷提取率的影响。

2.4 因素水平的确定:根据预试验结果,提取次数、提取时间、乙醇体积分数对提取率影响较大,因此采用正交试验法,每个因素选择 3 个水平进行,因素及水平见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 提取次数/次	B 提取时间/h	C 乙醇体积分数/%
1	1	1	60
2	2	1.5	80
3	3	2	95

2.5 正交试验方法及结果:将阴干的獐牙菜药材制成粗粉,称取 100 g,加 8 倍量溶剂,用 L₉(3⁴) 正交表安排试验(表 2)。将提取液合并后滤过,浓缩,浓缩液置烘箱中,在 105 °C 烘干,备用。

考虑到对总苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜吡酮苷的考察是主要的,故将其正交试验结果进行方差分析,结果见表 3。

以总苷为考察指标,极差 R 值大小显示因素作用主次分别为 A>C>B;方差结果表明:A 和 C 因素对总苷的影响具有显著性意义,B 因素无显著意义,以 A₂B₃C₂ 为佳。以獐牙菜苦苷提取率为考察指标,极差 R 值大小显示因素作用主次为 C>A>B;方差结果表明:A 和 C 因素的影响具有显著意义,B

因素无显著意义,以 A₂B₂C₃ 为佳。以獐牙菜吡酮苷提取率为考察指标,极差 R 值大小显示因素作用主次为 C>A>B;方差结果表明:A、B 和 C 因素的影响具有显著意义,以 A₂B₃C₂ 为佳。

选用醇浸膏以及 4 种化学成分为代表的总苷为指标进行综合分析,结果显示提取次数与乙醇体积分数对提取方法的影响最大,提取时间对结果影响

不大(对獐牙菜吡酮苷例外)。根据 K 值比较,提取以獐牙菜苦苷为代表的环烯醚萜苷类成分最佳工艺为 A₂B₂C₃,即用 95%乙醇提取 2 次,每次 1.5 h。由表 3 显示,C₂ 和 C₃ 的 K 值差异不大,建议在生产实际中为节约成本采用 80%乙醇回流提取。提取以獐牙菜吡酮苷为代表的吡酮苷性成分最佳工艺条件与总苷提取最佳工艺条件一致。

表 2 L₉(3⁴)正交试验结果

Table 2 Results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A	B	C	D	醇浸膏/%	獐牙菜苦苷/%	龙胆苦苷/%	獐牙菜菜苷/%	獐牙菜吡酮苷/%	总苷/%
1	1	1	1	1	8.65	4.82	0.26	5.68	1.96	12.72
2	1	2	2	2	10.45	6.34	1.88	4.63	8.39	21.24
3	1	3	3	3	11.50	8.25	1.33	4.07	7.21	20.86
4	2	1	2	3	9.45	10.42	3.96	5.28	10.19	29.85
5	2	2	3	1	10.65	13.13	2.23	1.01	13.24	29.61
6	2	3	1	2	7.60	8.03	1.83	5.22	6.88	21.96
7	3	1	3	2	18.65	8.41	2.87	4.96	5.91	22.15
8	3	2	1	3	14.75	4.42	1.93	4.01	1.41	11.77
9	3	3	2	1	16.70	6.93	2.77	5.45	9.98	25.13
醇浸膏	K ₁	30.60	36.75	31.00	36.00					
	K ₂	27.70	35.85	36.60	36.75					
	K ₃	50.10	35.80	40.80	35.50					
	R	22.4	0.95	9.8	1.05					
獐牙菜苦苷	K ₁	19.41	23.65	17.27	24.88					
	K ₂	31.58	23.89	25.69	22.78					
	K ₃	19.76	23.24	29.79	23.09					
	R	12.17	0.65	12.52	2.10					
獐牙菜吡酮苷	K ₁	17.56	18.06	10.25	22.13					
	K ₂	30.31	23.04	28.56	21.18					
	K ₃	17.30	24.07	26.36	18.81					
	R	13.01	6.01	18.31	3.32					
总苷	K ₁	54.82	64.72	46.45	67.46					
	K ₂	81.42	62.62	76.22	65.35					
	K ₃	59.05	67.95	72.62	62.48					
	R	30.60	5.23	30.17	4.98					

表 3 方差分析

Table 3 Variance of analysis

误差来源	SS	f	S	F	P 值
总	A	136.20	2	91.56	32.74 P<0.05
	B	4.80	2	0.79	1.15
苷	C	176.00	2	99.73	42.31 P<0.05
	D(误差)	4.16	2	6.92	
獐苦	A	32.00	2	16.00	37.19 P<0.05
	B	0.55	2	0.28	0.64
牙	C	59.05	2	29.53	68.64 P<0.05
	D(误差)	0.86	2	0.43	
菜	A	80.01	2	40.00	41.05 P<0.05
	B	50.02	2	25.01	25.67 P<0.05
吡	C	109.76	2	54.88	56.32 P<0.05
	D(误差)	1.95	2	0.98	

F_{0.05}(2,2)=19.00 F_{0.01}(2,2)=99.00

2.6 验证试验:根据试验结果,按最佳优化条件进行 3 次试验,测得提取物中总苷的平均质量分数为

27%,与预测值接近,证明此方法可行。

3 讨论

獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和獐牙菜吡酮苷为药材中的主要有效成分,虽曾有相关成分的测定方法的报道^[9,10],但针对獐牙菜提取物的分离分析和作为本品的提取工艺的评价指标尚无报道。进行 4 种苷性成分测定时采用的甲醇-水梯度洗脱,无论从峰的理论塔板数和分离度来看均较为理想。

结果得到提示,当需要得到高质量分数的獐牙菜吡酮苷的提取物时,可以在此试验基础上适当增加提取时间。而獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷这类环烯醚萜的热不稳定性^[11],在提取过程中不宜过度延长提取时间。

References:

[1] Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of

Sciences. *Tibetan Medicine Glossary* (藏药志) [M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1991.

[2] Wang S S, Xiao H B, Liu X M, et al. Study on xanthenes from *Swertia franchitiana* H. Smith [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (10): 878-898.

[3] Ding J Y, Fan S F, Hu B L, et al. Xanthenes glycosides and flavonoids glycosides from *Swertia franchitiana* H. Smith [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1988, 30 (40): 414-419.

[4] Wang J N, Hou C Y. Study on the components from *Swertia franchitiana* H. Smith [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25 (8): 401-403.

[5] Wang Y, Yang J S. Reviews of study on the chemical constituents of *Swertia* plants [J]. *Res Dev Nat Prod* (天然产物与开发), 1992, 4 (1): 99-113.

[6] Xie X Q. *Development and Applying of Preparation Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中药新制剂开发与应用) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.

[7] *Standards of Tibetan Medicine of Medical Ministry of the People's Republic of China* (中华人民共和国卫生部藏药标准) [S]. 1995.

[8] Ma W G, Fuzzati N, Wolfender J, et al. Further acylated secoiridoid glucosides from *Gentiana Rhodantha* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43: 805-810.

[9] Sakamoto I, Morimoto K, Tanaka O, et al. Application of high performance liquid chromatography and field desorption mass spectroscopy to separative analysis of bitter secoiridoid glycosides of *Swertiae Herba* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31: 25-30.

[10] Takino Y, Koshioka M, Kawaguchi M, et al. Quantitative determination of bitter components in *Gentianaceous* plants [J]. *Planta Med*, 1980, 38: 344-350.

[11] Junior P. Recent developments in the isolation and structure elucidation of naturally occurring iridoid compounds [J]. *Plant Med*, 1990, 56: 2-12.

独一味滴丸的成型工艺研究

景明, 樊秦

(甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000)

独一味滴丸是由《中国药典》2005年版一部所载独一味胶囊经改变剂型而来, 由独一味单味药材组成, 具有活血止痛, 化瘀止血之功效, 临床应用于刀口疼痛、出血, 外伤骨折, 筋骨扭伤, 风湿痹痛和崩漏、痛经、牙龈肿痛等。滴丸具有生物利用度高、起效快、制备简便等特点, 因而制成滴丸以满足临床急症的需要。本实验针对影响独一味滴丸成型的因素进行了研究。

1 材料与仪器

独一味提取物由甘肃中医学院科研实验中心制备, 聚乙二醇 4000 (PEG 4000)、聚乙二醇 6000 (PEG 6000)、甲基硅油、液体石蜡均为分析纯。

DW-1 型滴丸机(江苏泰州市制药机械二厂), 瑞士 AE-240 电子分析天平。

2 方法与结果

2.1 处方配比和滴制温度的选择: 选择影响滴丸成型的 PEG 4000 与 PEG 6000 比例(A)、药物与基质比例(B)、滴制温度(C)为考察因素(表 1), 选用 $L_9(3^4)$ 正交表, 以丸重变异系数、滴丸圆整度作为评价指标, 并进行方差分析(表 2)。

将独一味滴丸的丸重评价指标按《中国药典》2005年版一部规定的质量差异限度进行评价, 其变

表 1 处方配比和滴制温度选择的因素水平

Table 1 Factors and levels of prescription proportion and dropping temperature

水平	因素		
	A/(g·g ⁻¹)	B/(g·g ⁻¹)	C/℃
1	1.0:1.5	1:2	80
2	1.0:1.0	1:3	85
3	1.5:1.0	1:4	90

表 2 处方配比和滴制温度选择的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Result of $L_9(3^4)$ orthogonal tests in prescription proportion and dropping temperature

实验号	A	B	C	D	丸重变		综合评分
					异系数	圆整度	
				(空白)	/%		
1	1	1	1	1	3.21	8	11.21
2	1	2	2	2	2.72	1	3.72
3	1	3	3	3	5.31	3	8.31
4	2	1	2	3	7.09	5	12.09
5	2	2	3	1	5.70	4	9.70
6	2	3	1	2	4.09	7	11.09
7	3	1	3	2	7.98	6	13.98
8	3	2	1	3	3.61	6	9.61
9	3	3	2	1	5.97	5	10.97
K_1	23.24	37.28	31.91	31.88			
K_2	32.88	23.03	26.78	28.79			
K_3	34.56	30.37	31.99	30.01			
R	11.32	14.25	5.21	3.09			

收稿日期: 2006-06-08

作者简介: 景明(1963-), 男, 甘肃人, 高级工程师, 硕士生导师, 1986年毕业于兰州医学院, 先后在甘肃省化工研究院、兰州佛慈制药集团从事中药研究, 2003年起在甘肃中医学院科研实验中心从事教学与科研工作, 研究方向为中药新制剂及质量标准研究。
Tel: (0931)8765459 Fax: (0931)8627950 E-mail: jm@gszy.edu.cn