

表 3 微波辅助萃取与传统提取方法比较

Table 3 Comparison between microwave extraction and traditional method

萃取方法	溶剂体积分数/ %	萃取时间/ min	溶剂用量/ mL	浸泡时间/ min	产品得率/ %	绿原酸质量分数/ %
微波辅助萃取	60	20	900	30	18. 3	1. 212
传统加热回流	60	20	900	30	16. 8	0. 889

对比传统提取方式,微波辅助萃取所得的干膏中绿原酸的质量分数高,干膏得率大,具有显著优势。

3 讨论

实验发现萃取剂体积分数对微波辅助萃取野菊花中绿原酸的影响最大。其原因可能是乙醇体积分数决定了溶剂的极性大小,与微波的吸收效果关系密切,直接影响微波萃取的效果。乙醇体积分数不同,对绿原酸的溶解能力不一样,从而影响其溶出度。乙醇体积分数、微波萃取时间、微波辐射功率和固液比都会影响药材和萃取溶剂对微波辐射能量的吸收,所以各参数之间具有一定的交互作用。

微波辅助萃取不同于传统加热回流方式,其微波直接作用于溶剂和药材,热量和有效成分均由内向外传出,从而使得萃取时间短、提取效率高。结果表明,相同提取条件下,微波辅助萃取具有显著优势。由此可见,其产业化应用将为中医药领域中的提取技术注入新的活力。

参考文献:

[1] 石兰萍,田琳琳,袁劲松,等. 野菊花的研究概况[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 3(5): 434-436.
[2] 姜丽霞,徐世芳. HPLC 法测定野菊花中绿原酸的含量[J]. 中国药品标准, 2003, 4(6): 54-56.

胶原纤维吸附剂对银杏叶中鞣质的选择性去除作用

李 娟,廖学品,唐 睿,石 碧*

(四川大学 皮革化学与工程教育部重点实验室,四川 成都 610065)

摘 要: 目的 研究胶原纤维吸附材料对银杏叶中鞣质的选择性去除作用。方法 以皮胶原纤维为原料,通过戊二醛交联反应制备吸附材料。将此吸附材料用于选择性地去除银杏叶提取物中的鞣质,并用 HPLC 和明胶法对吸附实验结果进行检测。结果 HPLC 图谱和明胶法检测结果说明,所制备的胶原纤维吸附材料具有较好的吸附选择性,可以完全除去银杏叶提取物中的鞣质,而有效成分基本不损失。结论 胶原纤维吸附材料可用于中药提取物或制剂中鞣质的高选择性脱除。

关键词: 银杏叶; 胶原纤维; 鞣质; 吸附选择性

中图分类号: R 286. 1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008) 01-0062-04

银杏叶提取物 (*Ginkgo biloba* L. extract, GbE) 的主要成分是银杏黄酮和银杏苦内酯^[1], 这些成分具有清除自由基、抗病毒、抗肿瘤、抗辐射、保肾等作用^[2]。但银杏叶提取物中含有鞣质、蛋白质等杂质, 其中含鞣质为 12. 59% ~ 13. 92%^[3]。鞣质的存在不仅影响最终产品的稳定性和澄清度, 而且可能产生副作用^[3], 因此必须除去。常用的去除鞣质的方法主要有氨水沉淀法、明胶沉淀法、铅盐沉淀法、大孔树脂吸附法等^[4]。由于银杏黄酮分子与鞣质分子结构相似, 因此常用方法的选择性较差, 有效成分损失较多, 而且可能引入其他更加难以去除的杂质。胶原

纤维中含有羧基、氨基和羟基^[5], 能与鞣质分子的酚羟基发生多点氢键-疏水键结合^[6]。本课题组的前期研究发现, 胶原纤维对鞣质具有选择性吸附能力^[7]。因此本实验以戊二醛为交联剂制备胶原纤维吸附材料, 用于选择性地去除银杏叶提取物中的鞣质。

1 仪器与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪、DAD 检测器 (美国 Agilent 公司), UV-2501PC 型紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司)。

落叶松鞣质 (自制, 由落叶松树皮提取^[7])。胶原纤维 (实验室自制, 制备方法参阅文献方法^[8])。1%

* 收稿日期: 2007-03-22
基金项目: '973 重大基础前期研究专项(2004CC A06100); 杰出青年基金资助项目(20325619)
作者简介: 李娟(1982—), 女, 四川省西昌人, 硕士研究生, 研究方向为天然产物的分离。E-mail: blackgound@ 163. com
* 通讯作者 石 碧 Tel: (028) 85400356 Fax: (028) 85400365 E-mail: sibilitannin@ vip. 163. com

明胶-氯化钠溶液为含明胶 1%、氯化钠 10% 的水溶液,临用新配,按《中国药典》2005 年版配制^[9]。色谱纯甲醇,其他试剂均为分析纯。

干银杏叶采摘自江苏邳州银杏叶种植基地,经内江师范学院唐正义教授鉴定为银杏科银杏属植物银杏 *G. biloba*. L 的干燥叶片。

2 方法与结果

2.1 胶原纤维吸附剂的制备:取胶原纤维 15 g,用 300 mL 蒸馏水浸泡 12 h。加入 10 mL 50% 戊二醛,先在 25 °C 下反应 1 h,然后在 30 °C 下反应 4 h。滤过后用 1 000 mL 蒸馏水洗涤 3 次,然后再用 300 mL 无水乙醇洗涤,滤过,并在 45 °C 下干燥 12 h^[7]。

2.2 鞣质溶液的配制:精确称取落叶松鞣质 0.100 g,用 30% 乙醇溶液溶解,置于 100 mL 量瓶中,并加至刻度,得到质量浓度为 1.000 mg/mL 鞣质溶液。

2.3 银杏叶提取物的制备:称取干银杏叶(粉碎至直径 3 mm 左右) 50.0 g,用 60% 甲醇水溶液回流提取 2 次,每次 2 h,溶剂量分别为银杏叶质量的 8、7 倍。滤过后合并滤液,减压蒸发回收甲醇,滤去不溶物,用蒸馏水定容至 50 mL,即得含生药 1.0 g/mL 的溶液,冷藏静置备用。

2.4 HPLC 法分析条件的确定:由于鞣质类化合物的最大吸收波长为 280 nm^[6],银杏叶提取物中有效成分在 360 nm 下才有较强的吸收^[10],故本实验采用不同的色谱条件分析银杏叶提取物中的鞣质和有效成分。

银杏叶提取物中鞣质分析的色谱条件:色谱柱为 Capcell Pak C₁₈AQ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm);进样量:20 μL;柱温:30 °C;流动相:0.5% H₃PO₄ 水溶液(A) - CH₃OH(B);梯度洗脱:0~10 min B 液由 18% 增加至 24%, 10~25 min B 液由 24% 增加至 70%, 25~35 min 70% B 液, 35~40 min 100% B 液;体积流量:0.8 mL/min;检测波长:280 nm。

银杏叶提取物中有效成分分析的色谱条件:色谱柱为 Capcell Pak C₁₈AQ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm);进样量:20 μL;柱温:30 °C;流动相:[水-乙腈-异丙醇(500:100:15,加入 2.460 g 枸橼酸)](A) - [水-乙腈-异丙醇(500:235:25,加入 3.040 g 枸橼酸)](B);梯度洗脱:0~20 min B 液由 0% 增加至 50%, 20~25 min B 液由 50% 增加至 100%;体积流量:0.8 mL/min;检测波长:360 nm。

2.5 胶原纤维吸附剂对银杏叶提取物中鞣质的选择性吸附:取 10 mL 银杏叶提取物溶液于 100 mL 量瓶中,加 30% 乙醇溶液至刻度,摇匀(含生药 0.1 g/

mL)。取上述溶液 50 mL 于 250 mL 锥形瓶中,称取 0.500 g 胶原纤维吸附剂放入锥形瓶中,25 °C 下振荡吸附 24 h 后滤过。采用 HPLC 法比较银杏叶提取物吸附前后组成成分的变化,结果见图 1、2。

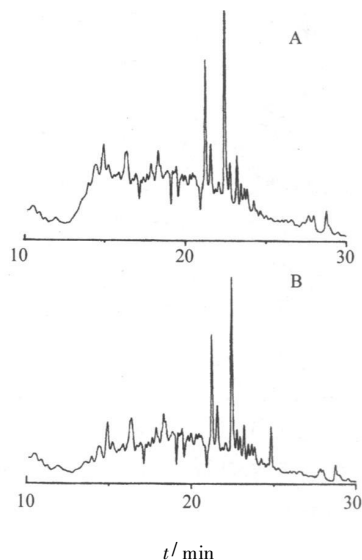


图1 银杏叶提取物溶液在280 nm 波长下吸附前(A)、后(B)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of GbE solution before (A) and after (B) adsorption at 280 nm wave length

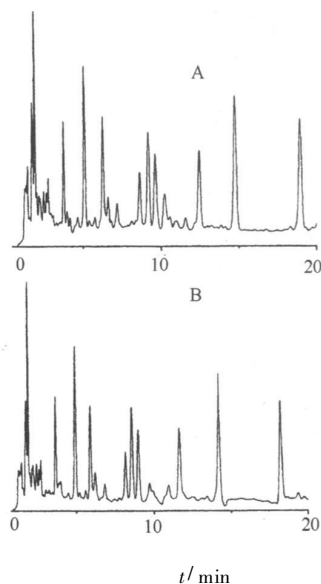


图2 银杏叶提取物在360 nm 波长下吸附前(A)、后(B)有效成分的HPLC图谱

Fig. 2 HPLC Chromatogram of active components in GbE before (A) and after (B) adsorption at 360 nm wave length

280 nm 波长下检测的成分主要是银杏叶提取物中的鞣质,其保留时间为12~25 min。吸附前后相比可见,峰高明显降低,但峰形基本不变。这是由于

鞣质是由一系列相对分子质量不同的化合物组成的混合物,在保留时间为12~25 min 无法得到分离的色谱峰,而表现为一个较宽的坡峰;同时由于银杏叶提取物中有效成分在280 nm 下也有一定的吸收,而且某些成分在280 nm 下有较强的吸收^[10],因此在鞣质被除去后,这些成分仍然保留,仍有明显的吸收坡峰。360 nm 波长下检测的银杏叶提取物有效成分有较强的吸收峰^[10],而鞣质的吸收峰很小^[6]。因此,360 nm 波长下各色谱峰为银杏叶提取物中的有效成分。并且吸附前后的HPLC 图谱中各组分的峰形完全一致,绝对峰高基本不变。表示胶原纤维对银杏叶提取物中鞣质具有选择性吸附能力,而对有效成分基本不吸附。

2.6 胶原纤维对银杏叶提取物-落叶松鞣质混合溶液的吸附:为了验证胶原纤维吸附剂对银杏叶提取物中鞣质的选择吸附特性,在银杏叶提取物中加入一定量的落叶松鞣质。取10 mL 银杏叶提取溶液(含生药1.0 g/mL)于100 mL 量瓶内,加入1.000 mg/mL 鞣质溶液50 mL,混合后用30%乙醇溶液定容至100 mL,摇匀。取溶液50 mL 于250 mL 锥形瓶中,称取0.500 g 胶原纤维吸附剂放入锥形瓶中,25 °C 下振荡吸附24 h 后滤过。采用HPLC 法比较银杏叶提取物吸附前后组成成分的变化,结果见图3。

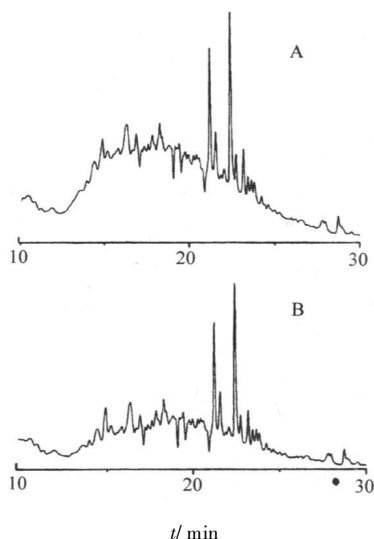


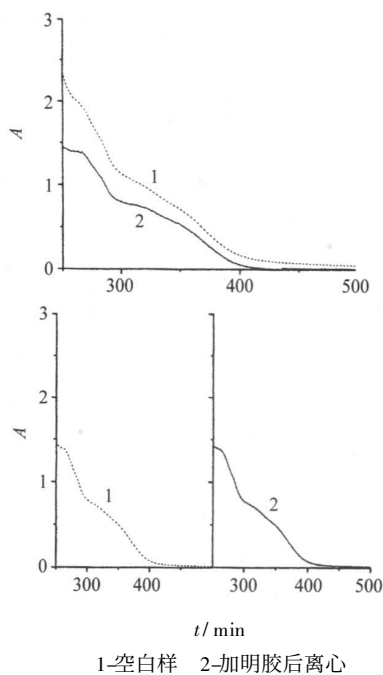
图3 银杏叶提取物-落叶松鞣质混合溶液在280 nm 条件下吸附前(A)、后(B)的HPLC 图谱

Fig.3 HPLC Chromatogram of GbE-larch tannin solution before (A) and after (B) adsorption at 208 nm wave length

可以看出,加入落叶松鞣质后,保留时间在12~25 min 的坡峰峰高明显增加,但峰形基本一致。落叶松鞣质与银杏叶提取物的色谱峰相互重叠,因而

吸收增强。吸附后与吸附前相比坡峰明显降低,峰形不变。峰高基本相同,峰形也一致,即银杏叶提取物-落叶松鞣质混合溶液吸附后与银杏叶提取物吸附后谱图完全一致。这表明,银杏叶提取物-落叶松鞣质混合溶液中的鞣质被吸附后,在HPLC 图谱上表现为保留时间12~25 min 的吸收峰降低,而且进一步证实胶原纤维吸附剂能够选择性吸附银杏叶提取物中的鞣质。

2.7 明胶法检测:为了验证银杏叶提取物中鞣质是否被胶原纤维吸附剂全部去除,进一步采用明胶-氯化钠法^[9]对鞣质进行检测。分别取吸附前和吸附后的溶液15 mL 各两份,在吸附前的两份溶液中分别加入10 mL 1%明胶-氯化钠溶液和10 mL 蒸馏水(空白样),在吸附后两份溶液中也分别加入10 mL 1%明胶-氯化钠溶液和10 mL 蒸馏水(空白样),离心30 min (10 000 r/min),取上清液1 mL 稀释10 倍后测定其紫外吸收,结果见图4。



1-空白样 2-加明胶后离心

1-control 2-adding NaCl-gelatin solution

图4 银杏叶提取物离心液的紫外吸收光谱

Fig.4 UV-Vis Absorption spectra of GbE supernatant after centrifugation

在1%明胶-氯化钠溶液检测试验中,吸附前银杏叶提取物溶液加入1%明胶-氯化钠溶液后有明显的浑浊现象,而吸附后加入1%明胶-氯化钠溶液后则是澄清的。由紫外吸收光谱图可见,加入1%明胶-氯化钠溶液离心后吸光度(A)值显著下降,其原因是明胶与鞣质结合,使鞣质发生沉淀^[6]。吸附后溶液加1%明胶-氯化钠溶液离心后的上清液和空白样的

吸光度(A)曲线几乎重合,这表明银杏叶提取物经胶原纤维吸附后,已经全部除去了所含的鞣质。

3 讨论

本研究以戊二醛交联胶原纤维为吸附剂去除银杏叶提取物中鞣质。该吸附剂对鞣质具有较好的吸附选择性,可以完全除去银杏叶提取物中的鞣质,而有效成分基本不损失。由于该吸附剂为天然胶原蛋白纤维,使用安全。因此,胶原纤维吸附材料可用于中药提取物或制剂中鞣质的高选择性脱除。但需要进一步对其安全性进行评价。

参考文献:

- [1] 谢燕,张钧寿.银杏叶提取物制剂研究概况[J].中草药,2005,36(8):1267-1269.
- [2] 陈丽红,林秋香.银杏叶及其提取物的研究进展[J].海峡药

学,2005,17(5):3-5.

- [3] 李俊,李健,苏小建.银杏叶提取物杂质去除方法的研究[J].化学世界,1998(5):243-247.
- [4] 周维书.银杏叶及其制剂[M].北京:化学工业出版社,1995.
- [5] 张铭让,陈武勇.鞣制化学[M].北京:轻工业出版社,2005.
- [6] 石碧,狄荧.植物多酚[M].北京:科学出版社,2000.
- [7] 廖学品,马贺伟,陆忠兵,等.中草药提取物中单宁(鞣质)的选择性脱除[J].天然产物研究与开发,2004,16(1):10-15.
- [8] Liao X P, Shi B. Selective removal of tannins from medicinal plant extracts using a collagen fiber adsorbent [J]. *J Sci Food Agric*, 2005, 85(8): 1285-1291.
- [9] 中国药典[S].一部.2005.
- [10] Mesbah M K, Khalifa S I, Gindy A E, *et al*. HPLC determination of certain flavonoids and terpene lactones in selected *Ginkgo biloba* L. phytopharmaceuticals [J]. *Il Farmaco*, 2005, 60: 583-590.

HPLC法测定血脂平胶囊中丹皮酚

郑林, 丁宁, 陈荣发*

(贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002)

血脂平胶囊由徐长卿、刺梨、绞股蓝、山楂4味药材配制而成,为贵阳中医学院药厂生产的中药复方制剂,活血祛瘀,用于高脂血症。处方徐长卿药材中的丹皮酚为控制生产工艺的指标性物质。丹皮酚在抗动脉粥样硬化、抗血栓形成、改善微循环、抗心律失常、抗肝纤维化、高血压等诸多方面都具有显著的疗效^[1]。国家药品监督管理局标准(试行)《WS-10513(ZD-0513)-2002血脂平胶囊质量标准》中采用紫外分光光度法测定,规定以徐长卿中丹皮酚计不得少于1.15 mg/粒。但紫外分光光度法在应用中出现重现性、稳定性差、前处理方法耗时长等不足。徐长卿药材中丹皮酚的测定方法有气相色谱法、高效液相色谱法等^[2,3]。《中国药典》2005年版一部徐长卿药材项下也采用HPLC法对丹皮酚进行控制。因此,本实验采用HPLC法对血脂平胶囊中指标性成分丹皮酚进行测定。

1 仪器、试剂与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪(在线脱气机、单泵、VWD检测器、自动进样器、Agilent 化学工作站),Specord 40 紫外分光光度计、超声提取器(功率

250 W、频率34 kHz);甲醇为色谱纯和分析纯、水为重蒸馏水;丹皮酚对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号0708-9704,供定量测定用);血脂平胶囊由贵阳中医学院药厂提供。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备:精密称取血脂平胶囊内容物0.5 g,置于圆底烧瓶中,精密加入25 mL 甲醇,称定质量,回流提取30 min,放冷后,用甲醇补足减失质量,摇匀,用0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。同法制备徐长卿的阴性供试品溶液。

2.2 系统适用性试验: Lichropher 5 C₁₈ 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-水(60:40);检测波长: 274 nm;体积流量: 1.0 mL/min;柱温: 室温。供试品中丹皮酚色谱峰与其他成分得到较好分离,理论板数达7 000 以上,分离值R_s>1.5,色谱图见图1。检测结果较为理想,空白试验无干扰。

2.3 标准曲线的制备:精密称取丹皮酚对照品3.33 mg 置于25 mL 量瓶中,加甲醇溶解,并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为133.2 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。精密吸取对照品溶液2、4、6、8、10、12、14 μL 进样,并

* 收稿日期: 2007-05-14

* 贵阳中医学院药学院07 届毕业实习生