

表 3 洗脱溶媒用量对紫丁香苷和刺五加总苷洗脱率的影响

Table 3 Effect of eluent volume on eluting rate of springin

柱体积	紫丁香苷洗脱率/%	刺五加总苷洗脱率/%
1	45.17	50.71
2	42.12	36.42
3	9.11	6.85
4	2.15	3.89
5	1.45	2.03
6	0	0.02
7	0	0.01
8	0	0.01
9	0	0.01
10	0	0.01

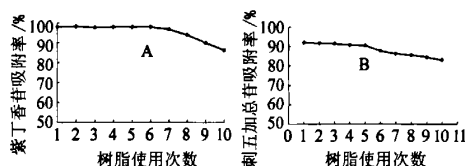


图 2 以紫丁香苷(A)和刺五加总苷(B)为指标 D-101 树脂再生周期的考察

Fig. 2 Evaluation of regeneration period of D-101 resin taking absorptive rate of springin (A) and total eleutheroside (B) as indexes

2.10 验证试验:取刺五加 200 g 粉碎成粗粉,加水 4 L 煎煮两次,每次 3 h,合并煎液,滤过,滤液浓缩成浸膏 20 g,加水溶解,离心。沉淀再以适量水加热溶解,离心;合并两次上清液,加水至 1 000 mL,上 D-101 型大孔吸附树脂柱,水洗至糖的反应为基本阴性后,以 5 倍柱体积 75% 乙醇洗脱大孔树脂柱,合并洗脱液回收乙醇,干燥,测定浸膏中紫丁香苷和刺五加总苷,计算保留率,结果见表 4,可见药材中

表 4 工艺重复试验($n=3$)Table 4 Results of repetitive test ($n=3$)

样品	干燥物/g	干燥物中紫丁香苷/%	干燥物中刺五加总苷/%
上样前样品	18.379 6	0.59	5.17
树脂富集后样品 1	6.075 2	1.67	14.0
树脂富集后样品 2	5.996 3	1.70	14.4

有效成分的量与纯化产物的对比,富集比约为 3:1。

3 讨论

大孔树脂吸附容量考察时,初采用预吸附 1 h,过柱重吸附 1 次,收集洗脱液,计算上样液与流出液中紫丁香苷或者刺五加总苷之差,确定大孔树脂的吸附容量,后因与工业生产中动态洗脱相脱离,故采用动态吸附曲线的考察确定吸附容量。

树脂的再生或被吸附溶质的解吸通常可以用溶剂来实现。乙醇是常用的再生剂。采用 80% 左右的含水醇、酮或含有酸、碱的含水醇、酮进行洗涤,再生效果也很好,某些低极性的有机杂质吸附过牢不能洗除时,可采用低极性溶剂进行再生。

参考文献:

- [1] 封国峰,王春华,魏 晶.注射用刺五加对脑缺血的保护作用[J].沈阳药科大学学报,2003,20(1):38.
- [2] 程嘉艺,李降薇,柳 倩.刺五加提取物对实验性急性脑缺血的保护研究[J].中草药,2003,34(4):358.
- [3] 中国药典[S].一部.2005.
- [4] 曲中原,金哲雄,高文昊,等.刺五加总苷提取工艺研究[J].哈尔滨商业大学学报,2005,21(1):14-16.
- [5] 周跃华,吴笑如,徐德生,等.大孔吸附树脂纯化麦冬总皂苷的工艺研究[J].中草药,2003,34(12):1089-1091.
- [6] 于红宇,张 军,詹丽玲,等.赤芍药材提取液的大孔树脂精制工艺研究[J].中药材,2004,27(11):871-872.
- [7] 毕红霞,李建伟,陈 玮,等.AB-8 吸附树脂对耿李红色素的吸附和精制[J].郑州工程学院学报,2004,25(2):40-42.

正交试验优选九节龙皂苷 I 的提取工艺研究

孙立炜^{1,2},王晓娟^{1*},孙文基²,顾 宜¹,宋娟娜²,王 荣¹

(1.第四军医大学口腔医院 药剂科,陕西 西安 710032; 2.西北大学 陕西省生物医药重点实验室,陕西 西安 710069)

摘 要:目的 筛选九节龙中九节龙皂苷 I 的最佳提取工艺,并建立 HPLC-ELSD 法对九节龙皂苷 I 的测定方法。方法 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,以九节龙皂苷 I 提取率和干浸膏得率为检测指标。HPLC-ELSD 色谱条件:Phenomenex C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-水(75:25); 体积流量:1.0 mL/min; 检测器漂移管温度:73.8 $^{\circ}$ C; 载气体积流量:2.0 L/min。结果 最佳提取工艺为 75% 乙醇,第 1 次 8 倍量提取 4 h,第 2 次 6 倍量提取 3 h。九节龙皂苷 I 在 0.88~4.42 μ g 范围内线性关系良好($r=0.999\ 9$); 样品平均回收率为 100.37%, RSD 为 1.88% ($n=6$)。结论 建立的正交试验优选九节龙的提取方法可行,采用的 HPLC-ELSD 法测定九节龙皂苷 I 的方

收稿日期:2007-12-16

作者简介:孙立炜(1983—),男,北京人,西北大学 2005 级中药学在读研究生,研究方向为药用植物结构鉴定与提取分离。

E-mail: nodoubtkarajan@126.com

* 通讯作者 王晓娟 Tel(029)84776189 E-mail: WXJYH231@fmmu.edu.cn

法可用于九节龙皂苷 I 的质量控制。

关键词:九节龙;九节龙皂苷 I;正交试验;HPLC-ELSD 法

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)09-1330-04

九节龙系紫金牛科紫金牛属植物九节龙 *Ardisia pusilla* A. DC. 的全草,广泛分布于我国四川、贵州、湖南、广西等地,具有清热解毒,消炎止痛的功效。九节龙的药用有效部位为九节龙皂苷^[1],主要含于根茎部分。九节龙皂苷具有显著提高免疫力和良好的抗肿瘤功效,其中九节龙皂苷 I 为九节龙皂苷的主要成分,可作为九节龙皂苷的标识性物质,并且九节龙皂苷 I 同样具备良好的抗肿瘤功效^[2,3],具有开发为抗肿瘤药物的良好前景。本实验通过正交试验以九节龙皂苷 I 的提取率和干浸膏得率为检测指标,考察乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间和提取次数对九节龙中九节龙皂苷 I 的影响,筛选九节龙皂苷提取工艺,并建立了 HPLC-ELSD 法测定九节龙皂苷 I 的测定方法。

1 仪器与材料

Hitachi L-7110 色谱仪, Alltech ELSD 2000ES 型蒸发光散射检测器(美国 Alltech 公司), T2000P 色谱工作站, ELSD 2000 蒸发光散射检测器控制软件, BT125D 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

九节龙皂苷 I 对照品由第四军医大学口腔医院药剂科提供,质量分数为 99%。甲醇为色谱纯,水为二次重蒸馏水,无水乙醇、95%乙醇均为分析纯。

九节龙购于四川夹江县,为 2006 年 8 月花期时采摘收集,由四川大学药学院沈联得教授和四川省中药学校邬家林教授鉴定为九节龙 *A. pusilla* A. DC. 的根茎,去枝叶后,洗净,阴干,粗粉备用。

2 方法与结果

2.1 因素水平的确定:影响九节龙中九节龙皂苷 I 提取的因素主要为乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间和提取次数,因此选择作为因素,并选择相关的水平,见表 1。

2.2 提取工艺流程:将九节龙粗粉精密称取 9 份,

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 乙醇体 积分数/%	B 液固比 /倍	C 提取时间 /h	D 提取次数 /次
1	75	6	2	2
2	85	8	3	3
3	95	10	4	4

每份 100 g,按 1~9 进行试验编号,按照正交试验要求进行操作。合并滤液,减压回流至合适体积,转移至已干燥至恒重的蒸发皿上挥干溶剂,制得稠膏,每份稠膏称定质量,冷藏保存备用。

2.3 干浸膏得率的计算:精密称取一定量稠膏,于 105 ℃干燥至恒重,称定质量,可得稠膏的含水量,计算药材的干浸膏得率。

2.4 九节龙皂苷 I 的 HPLC 法测定

2.4.1 色谱条件:Phenomenex C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(75:25);体积流量:1.0 mL/min;检测器漂移管温度:73.8 ℃;载气体积流量:2.0 L/min。九节龙皂苷 I 保留时间为 5.6 min,理论板数不低于 3 000。见图 1。

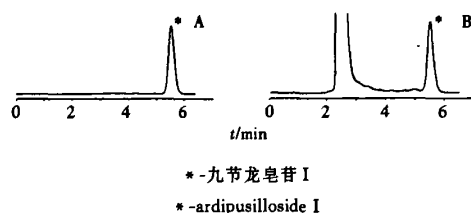


图 1 九节龙皂苷 I 对照品(A)和九节龙提取物(B)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of ardisioside I reference substance (A) and *A. pusilla* extract (B)

2.4.2 供试品溶液的制备:每份稠膏平行称取粗粉测定含水量,每份稠膏称取相同的量用甲醇溶解,定容于 10 mL 量瓶中摇匀放置,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4.3 线性关系考察:精密称取九节龙皂苷 I 对照品 4.42 mg 置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度。分别进样 2、4、6、8、10 μL,得到相应的峰面积值。以峰面积的常用对数为纵坐标,进样量的常用对数为横坐标,绘制标准曲线,得其回归方程为 $Y = 1.8313X + 12.758$, $r = 0.9999$ 。可知九节龙皂苷 I 在 0.88~4.42 μg 与峰面积具有良好的线性关系。

2.4.4 精密度试验:精密吸取九节龙皂苷 I 对照品溶液重复进样 6 次,每次进样 6 μL,测定九节龙皂苷 I 的峰面积,计算得其 RSD 值为 1.13%。

2.4.5 稳定性试验:精密吸取同一九节龙提取物供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8、10 h 进样测定,进样量为 10 μL,测定峰面积,计算,结果九节龙皂苷 I

峰面积的 RSD 值为 1.61%。结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.4.6 重现性试验:精密称取同一批九节龙提取物样品适量,6 份,制备供试品溶液,进样 10 μ L,测定九节龙皂苷 I 峰面积,计算,九节龙提取物中九节龙皂苷 I 的平均质量分数为 11.86%,RSD 为 1.54%。

2.4.7 加样回收率试验:称取含九节龙皂苷 I 8.34% 的同一样品,约 21 mg,6 份,分别加入 0.442 mg/mL 九节龙皂苷 I 对照品溶液 4 mL,制备供试品溶液,进样测定,计算,结果平均回收率为 100.37%,RSD 为 1.88%。

2.4.8 测定:精密称取 9 份正交试验样品,制备供试品溶液,进样测定。每批样品测定 2 次,按回归方程计算,结果以 2 次测定的平均值作为测定值,计算九节龙皂苷 I 的提取率。

2.5 正交试验设计与结果:采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,以九节龙皂苷 I 提取率和干浸膏得率为检测指标,结果见表 2。方差分析见表 3 和 4。

表 2 正交试验结果和分析
Table 2 Results and analysis of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	九节龙皂苷 I 提取率/%	干浸膏得率/%
1	1	1	1	1	1.31	12.53
2	1	2	2	2	1.62	15.58
3	1	3	3	3	1.90	17.47
4	2	1	2	3	1.80	14.08
5	2	2	3	1	1.60	13.43
6	2	3	1	2	1.63	14.12
7	3	1	3	2	1.02	9.63
8	3	2	1	3	1.01	9.55
9	3	3	2	1	0.78	8.45
九节龙皂苷 I K_1	4.83	4.13	3.95	3.69		
皂苷 I K_2	5.03	4.23	4.20	4.27		
皂苷 I K_3	2.81	4.31	4.52	4.71		
R	0.81	0.09	0.30	0.49		
干浸膏 K_1	45.57	36.23	36.19	34.40		
膏得率 K_2	41.63	38.56	38.11	39.33		
率 K_3	27.63	40.04	40.53	41.10		
R	17.94	3.81	4.34	6.70		

极差分析表明,4 个因素对九节龙皂苷 I 影响的顺序为:以九节龙皂苷 I 提取率为检测指标: $A > D > C > B$;以干浸膏得率为检测指标: $A > D > C > B$,即依次是乙醇体积分数,提取次数,提取时间,乙醇用量液固比(倍)。

对上述两个指标进行方差分析表明,因素 A 对

表 3 以九节龙皂苷 I 提取率为指标的方差分析
Table 3 Variance analysis based on extract rate of ardisioloside I as index

误差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	3.02	2	1.51	100.67	$P < 0.01$
C	0.16	2	0.08	5.33	
D	0.52	2	0.26	17.33	
B(误差)	0.03	2	0.015		
$F_{0.05}(2,2)=19.00 \quad F_{0.01}(2,2)=99.00$					

表 4 以干浸膏得率为指标的方差分析
Table 4 Variance analysis based on dry extract rate as index

误差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	59.26	2	29.63	23.70	$P < 0.05$
C	3.15	2	1.58	1.26	
D	8.03	2	4.02	3.22	
B(误差)	2.50	2	1.25		
$F_{0.05}(2,2)=19.00 \quad F_{0.01}(2,2)=99.00$					

提取工艺有显著影响,而因素 B、C、D 各水平之间差异不显著,以九节龙皂苷 I 提取率为检测指标:可以见到 A 因素二水平(85%乙醇)的九节龙皂苷 I 提取率最高,A 因素一水平(75%乙醇)的九节龙皂苷 I 提取率略低,而 A 因素三水平(95%乙醇)的九节龙皂苷 I 提取率明显降低,B、C、D 因素均为三水平九节龙皂苷 I 提取率最大;以干浸膏得率为检测指标:可见 A 因素一水平的干浸膏得率最高,并且干浸膏得率随着乙醇体积分数增加而减小,B、C、D 因素均为三水平干浸膏得率最大。

综合以上因素,考虑到实际生产上 85%乙醇成本较高、挥发快的特点,且实际上与九节龙皂苷 I 提取率于 75%乙醇提取时差异不大,故确定乙醇体积分数为 75%,进一步试验优化提取次数。

2.6 正交优化的补充试验:根据正交试验的优化结果,以正交最优试验组合,进行了补充试验,取药材粗粉 100 g,每次提取的滤液分别收集后,制成供试品溶液,测定并计算相对提取率和干浸膏得率,结果见表 5。

由正交试验可知最优组合为 $A_1B_3C_3D_3$,但考虑到工业生产上操作简便、省时、经济,故进行补充试验,以求得到最适于生产的正交组合。以正交试验 3 号的药材中九节龙皂苷 I 提取率 1.90%为 100%,九节龙皂苷 I 的相对转移率前两次总和已达到 59%,九节龙皂苷 I 提取率为 1.13%,提取 3、4 次占相对转移率不到 4%,九节龙皂苷 I 提取率仅为

表 5 正交试验的补充试验
Table 5 Supplemental results of orthogonal test

提取次数	乙醇体积分数 /%	乙醇用量(液固比) /倍	提取时间/h	九节龙皂苷 I 提取率/%	药材中九节龙皂 苷 I 相对提取率/%	干浸膏得率 /%
1	75	800	4	0.86	45.00	12.90
2	75	600	3	0.27	14.24	4.20
3	75	600	3	0.05	2.85	1.65
4	75	600	3	0.01	0.57	0.82

0.06%；从干浸膏得率来看，前两次的干浸膏得率以占总量的 87%。因此考虑到生产上的可行性，正交试验的最优组合为 75%乙醇，第 1 次 8 倍量提取 4 h，第 2 次 6 倍量提取 3 h。

2.7 工艺验证试验：按照工艺优化条件制备 3 批样品，结果九节龙皂苷 I 提取率为 1.15% (RSD 为 1.41%)，干浸膏得率为 17.24% (RSD 为 2.66%)，说明该工艺条件下，九节龙皂苷 I 提取率和干浸膏得率均较高，从经济角度考虑在实际生产上比较节省成本，且生产效率较高。

3 讨论

对于九节龙皂苷 I 测定方面，通常用比色皿法，由于九节龙皂苷 I 的结构特殊，没有生色基，需加入显色剂方可进行，一般加入 6%香草醛-冰醋酸 0.2 mL，高氯酸 0.8 mL 作为显色剂；或使用 HPLC-UV 法利用末端吸收，检测波长为 205 nm。本实验对九节龙皂苷 I 的测定采用高效液相色谱法，利用蒸发光散射检测器进行测定。该方法结果准确，弥补了九节龙皂苷 I 因缺少生色基无共轭结构对检测带来的不便。

考虑到九节龙皂苷有效成分包含有脂溶性成

分，故选择适当体积分数的乙醇作为溶剂，因其主要成分为九节龙皂苷 I，故确定九节龙皂苷 I 为本工艺研究的指标成分。

实验中比较了多种色谱柱，不同流动相体系，最终选择了甲醇-水作为流动相，结果分离效果良好，继而进一步试验选择了不同流动相配比的甲醇-水分离九节龙皂苷 I 的效果，包括纯甲醇、90%甲醇、80%甲醇、70%甲醇、60%甲醇。结果显示，80%甲醇出峰时间过早，达不到完全分离的效果，而 70%甲醇出峰时间拖后造成时间和试剂上的浪费，故而最终选定 75%甲醇为流动相，考虑到九节龙皂苷 I 热稳定性良好，结构稳定等因素，直接运用蒸发光检测器的标准推荐参数即可得到良好的分离效果，所以色谱柱条件最终确定为 75%甲醇，检测器漂移管温度：73.8℃；载气体积流量：2.0 L/min。

参考文献：

- [1] 张清华,王晓娟,缪振春,等.川产九节龙皂苷的化学研究[J].药学报,1993,28(9):673-678.
- [2] 陶小军,曹永孝.九节龙皂苷 I 的抗肿瘤作用和免疫调节作用[J].中国药理学通报,2005,21(9):1070-1073.
- [3] 王晓娟,高迎春.九节龙皂苷对荷瘤小鼠放化疗的增效作用[J].中药材,2006,29(9):951-953.

RP-HPLC 法测定竹叶提取物中异荭草素

吴 巍,程秀凤

(天津市尖峰天然产物研究开发有限公司,天津 300457)

摘 要:目的 建立竹叶提取物中异荭草素的 RP-HPLC 的检测方法。方法 色谱条件为 Kromasil C₁₈ 分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温: 30℃, 波长: 330 nm, 流动相为乙腈-0.1% 磷酸, 梯度洗脱。结果 异荭草素峰面积与质量浓度成良好线性关系, 其线性范围为 25.65~256.5 μg/mL, $r=0.999\ 98$ 。回收率为 100.45%, RSD 为 0.36% ($n=6$)。结论 该法可使竹叶提取物中异荭草素得到良好分离, 结果准确、重现性好。

关键词: 竹叶提取物; 异荭草素; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)09-1333-03

收稿日期: 2008-01-24

作者简介: 吴 巍 (1970—), 男, 天津人, 工程师, 长期从事葡萄籽、苹果等提取物检测工作。

Tel: (022)66237090-8023 E-mail: tjnkwwwei@hotmail.com

正交试验优选九节龙皂苷 I 的提取工艺研究

作者: [孙立炜](#), [王晓娟](#), [孙文基](#), [顾宜](#), [宋娟娜](#), [王荣](#)
作者单位: [孙立炜\(第四军医大学口腔医院药剂科, 陕西, 西安, 710032; 西北大学, 陕西省生物医药重点实验室, 陕西, 西安, 710069\)](#), [王晓娟, 顾宜, 王荣\(第四军医大学口腔医院药剂科, 陕西, 西安, 710032\)](#), [孙文基, 宋娟娜\(西北大学, 陕西省生物医药重点实验室, 陕西, 西安, 710069\)](#)
刊名: [中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名: [CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年, 卷(期): 2008, 39 (9)

参考文献(3条)

1. [张清华; 王晓娟; 缪振春](#) [川产九节龙皂苷的化学研究](#) 1993 (09)
2. [陶小军; 曹永孝](#) [九节龙皂苷 I 的抗肿瘤作用和免疫调节作用](#) [期刊论文]-[中国药理学通报](#) 2005 (09)
3. [王晓娟; 高迎春](#) [九节龙皂苷对荷瘤小鼠放疗的增效作用](#) [期刊论文]-[中药材](#) 2006 (09)

本文读者也读过(3条)

1. [李乐翔. 牛晚堂. 王玲. LI Le-xiang. NIU Xiao-tang. WANG Ling](#) [九节龙皂苷对小鼠胰腺癌p53、Bcl-2和Bax表达的影响](#) [期刊论文]-[实用医药杂志](#) 2009, 26 (4)
2. [陶小军. 龙静雯. 贺建宇. 姚鸿萍. 刘静. 曹永孝. TAO Xiao-jun. LONG Jing-wen. He Jian-yu. YAO Hong-ping. LIU Jing. CAO Yong-xiao](#) [九节龙皂苷 I 的抗肿瘤作用和免疫调节作用](#) [期刊论文]-[中国药理学通报](#) 2005, 21 (9)
3. [缪振春. 冯锐. 周永新. 李光玉. 张清华. MIAO Zhen-Chun. FENG Rui. ZHOU Yong-Xin. Li Guan-Yi. ZHANG Qing-Hua](#) [四川九节龙中新四糖三萜皂苷结构和核磁共振研究](#) [期刊论文]-[有机化学](#) 2000, 20 (3)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200809017.aspx