

胶色谱纯化, 合理结合 HPGPG-ELSD 专著性强, 显色反应或旋光测定快速、简便的优点, 才能做到兼顾分离纯化的速度和质量。故确定麦冬多糖分离纯化方法: 取麦冬多糖粗提物, 少量水溶解, 上 DEAE Sepharose 柱, 水洗脱, 蒽酮-硫酸法在线检测, 收集合并同一洗脱峰, 减压浓缩后, 上 Sephadex G-25 柱, 水洗脱, 蒽酮-硫酸法检测确定峰位后, 抽样 HPGPG-ELSD 法测定, 取呈单一对称色谱峰且保留时间在一定范围内的流份为要收集部分, 合并合格流份, 冷冻干燥, 即得。

2.5 验证试验: 经验证该方法简便、可靠且得率较高, 对于色谱柱 (100 cm × 2.6 cm), 上样 3.0 g 麦冬粗提物, 最终纯化产物得率为粗提物质量的 (37.1 ± 3.6)% ($n=3$)。

2.6 数均/重均相对分子质量麦冬多糖的量效关系: 由于多糖的生物活性往往与它的分子大小密切相关, 故研究确定多糖的相对分子质量与其生物活性的关系具有重要意义, 但从事这方面研究的一个前提也是一个难题是首先需要分离纯化得到不同数均/重均相对分子质量的多糖样品。通过 HPGPG-ELSD 监控, 选择性合并糖凝胶色谱洗脱峰的不同洗脱段是获得所需各种数均/重均相对分子质量多糖样品的一种简便方法。本实验即用这种方法获得了在 Shodex Sugar KS-802 高效凝胶色谱柱上达基线分离的各种数均/重均相对分子质量麦冬多糖纯品 (图 4)。随后的药理实验发现重均相对分子质量为 4 800、聚分散度为 1.407 的麦冬多糖具有最强的抗心肌缺血活性, 相对分子质量增加或下降, 麦冬多糖的活性都有所下降, 当相对分子质量小于 2.0×10^3 时则活性几乎完全消失, 说明一定的空间

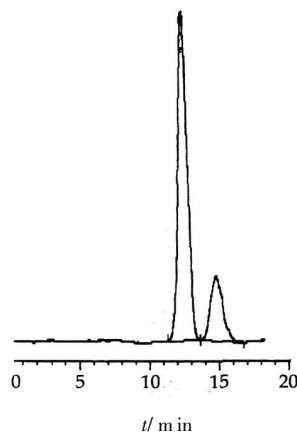


图 4 达基线分离的不同数均/重均相对分子质量麦冬多糖的 HPGPG-ELSD 色谱图

Fig. 4 HPGPG-ELSD Chromatograms of baseline separated OJP with different number/weight average relative molecular weights

结构是麦冬多糖产生抗心肌缺血活性的必备条件。

3 讨论

综上所述, 以 HPGPG-ELSD 测定结果作为糖色谱洗脱峰收集标准特别适合于较难分离或纯化要求较高的多糖类成分的分离纯化。

参考文献:

- [1] 郑 琴, 冯 怡, 徐德生, 等. 麦冬多糖 MDG-1 对鼠实验性心肌缺血的保护作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(12): 1116-1120.
- [2] 董 群, 方积年. 山豆根多糖的性质和化学组成 [J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(2): 85-87.
- [3] Chen X M, Tian G Y. Structural features of fructans from the root of *Cyathula officinalis* Kuan. [J]. *Chin J Chem*, 2003, 21(7): 858-863.
- [4] Yamauchi S, Nakai C, Nimura N, *et al.* Development of a highly sensitive fluorescence reaction detection system for liquid chromatographic analysis of reducing carbohydrates [J]. *Analyst*, 1993, 118: 773-776.

水提工艺中黄芩内源酶降解黄芩苷的研究

李建华^{1,2}, 王力生², 邹节明^{1,2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004)

摘要: 目的 研究黄芩药材中内源酶在不同温度下降解黄芩苷的活性, 减少提取过程中黄芩苷的损失。方法 采用 HPLC 法检测在不同温度下浸泡处理不同时间后的提取液中黄芩苷的量。结果 黄芩药材中内源酶在不同温度下, 降解黄芩苷的活性存在显著差异; 其中在水温为 50 ℃ 时, 黄芩内源酶降解黄芩苷的活性最强, 并且 0~45 min 内黄芩苷的量随时间的变化符合一级动力学过程。结论 在以水为溶媒提取黄芩药材中的黄芩苷时, 宜在 80

* 收稿日期: 2008-10-27

作者简介: 李建华 (1974—), 男, 湖南新宁人, 工程师, 在读博士生, 主要从事中药现代工艺及新剂型研究。

Tel: (0773) 5823082 E-mail: lijianhua614@sohu.com

* 通讯作者 邹节明 Tel: (0773) 5842588 E-mail: zjm@sanjin.com.cn

℃以上条件下浸泡处理,或者将黄芩药材预先通过炮制将内源酶灭活,以减少黄芩苷的降解。

关键词:黄芩;黄芩苷;内源酶;降解

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)03-0397-04

黄芩为多年生草本植物唇形科黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效,是临床常用中药。黄芩中含有多种黄酮类化合物,主要为黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等,其中黄芩苷的量最高,并且黄芩苷为黄芩主要的有效成分^[1,2]。目前,黄芩苷的提取工艺基本上是水提酸沉工艺,但水提条件对黄芩苷的收率影响比较大,原因是由于黄芩药材中存在内源酶,在一定温度和湿度下,可使黄芩苷降解成黄芩素。黄芩药材中内源酶降解黄芩苷的化学动力学初步研究表明:水温 40 ℃时,黄芩药材中内源酶降解黄芩苷的活性最强;50 ℃时,酶活性迅速降低;60 ℃时,酶活性已丧失^[3]。笔者在 60 ℃时进行黄芩投料提取,发现黄芩苷的损失仍然比较大,而且文献报道 2 h 测定一次,时间跨度比较大,总考察时间达 24 h,实验数据对工业提取的指导性欠佳。在黄芩的实际水提生产工艺中,药材投料后加热至沸腾这一阶段大概需要 1~2 h,而能够发生酶降解反应的恰恰是这段时间。因此,本实验将在不同的温度下重点对黄芩药材中内源酶在 0~2 h 降解黄芩苷的活性进行详细研究,为黄芩苷生产工艺优化提供指导。

1 仪器与试药

美国 Waters 2690 色谱仪,996DAD 检测器,Empower 液相色谱工作站。

黄芩苷、黄芩素对照品(自制, HPLC 归一化检测质量分数>98%);甲醇(色谱纯);水(超纯水);磷酸(分析纯);黄芩药材购自国药集团医药控股柳州有限公司,经桂林三金药业股份有限公司钟小清工程师鉴定为黄芩 *S. baicalensis* Georgi 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 黄芩苷的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件^[1]:色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇-水-磷酸(47:53:0.2);检测波长:280 nm;体积流量:0.8 mL/min;柱温 35 ℃。理论塔板数以黄芩苷峰计算不得低于 2 500。

2.1.2 对照品溶液的制备:精密称取在 60 ℃减压干燥 4 h 的黄芩苷对照品适量,加甲醇制成 116.80 μg/mL 的溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备:取黄芩药材粉末 10 g,精密称定,加 10 倍量的水,加热煎煮 2 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,精密量取 1 mL 滤液,置 100 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察:精密称取在 60 ℃减压干燥 4 h 的黄芩苷对照品 20.20 mg,加甲醇使溶解并稀释至 50 mL,再精密量取此溶液 0.1、1、2、3、4、5 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。分别精密吸取上述溶液各 5 μL,依次注入液相色谱仪,测定峰面积。以黄芩苷进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归分析,得回归曲线方程 $Y = 8.168 \times 10^5 X + 3.397 \times 10^3$, $r = 0.9999$,表明黄芩苷进样量在 0.020 2~1.01 μg 时与峰面积呈良好线性关系。

2.2 黄芩药材中内源酶降解黄芩苷的活性考察:取黄芩药材粉末 10 g,精密称定,加 10 倍量的相应温度的水,在相应的温度下浸泡一定的时间,再加热煎煮两次,每次 1 h,滤过,合并滤液,精密量取 1 mL 滤液,置 100 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。分别精密吸取黄芩苷对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪测定,采用外标法计算黄芩苷。对照品及样品色谱图见图 1,不同温度水浸泡黄芩后黄芩苷变化见表 1。

经线性回归分别得到 10~70 ℃下的黄芩苷降解动力学方程、线性相关系数及降解速率常数,结果见表 2。可以看出,黄芩药材中黄芩苷的量与浸泡时间成反比,且在 10~50 ℃,随着温度的升高,黄芩苷降解速度越快:每增高 10 ℃,黄芩苷的降解速率约增加 1.5 倍;60~70 ℃时,黄芩苷的降解速度迅速减弱,其中 70 ℃的降解速率是 60 ℃的 1/6;到达或超过 80 ℃时,酶活性已经丧失,黄芩苷的量不随时间发生变化。

2.3 黄芩药材中内源酶在黄芩提取物的制备工艺中对黄芩苷的影响

2.3.1 工艺一:取 10 kg 黄芩药材,破碎,加 10 倍量的水,缓慢加热,1 h 后,沸腾,分别提取 2 次,每次 1 h,滤过,混匀,即得。

2.3.2 工艺二:取 10 kg 黄芩药材,破碎,加 10 倍量的水,快速加热,0.5 h 后,沸腾,分别提取 2 次,

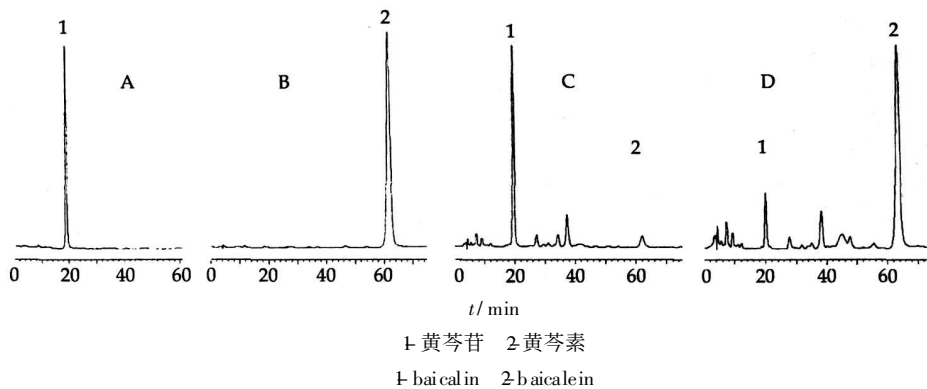


图 1 黄芩苷对照品(A)、黄芩素对照品(B)、反应前(C)和反应后(D)供试品的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC Chromatograms of baicalin reference substance (A), baicalein reference substance (B), before reaction (C), and after reaction (D) sample

表 1 不同温度水浸泡黄芩后黄芩苷的测定结果($n=2$)

Table 1 Determination of baicalin in *S. baicalensis* by soaking in water at different temperatures ($n=2$)

时间/min	黄芩苷/%								
	10℃浸泡	20℃浸泡	30℃浸泡	40℃浸泡	50℃浸泡	60℃浸泡	70℃浸泡	80℃浸泡	90℃浸泡
0	11.75	11.75	11.75	11.75	11.75	11.75	11.75	11.75	11.75
15	10.24	8.827	8.615	7.832	5.498	8.199	10.815	11.69	11.64
30	9.346	7.073	6.578	4.831	2.463	5.502	9.888	11.52	11.88
45	8.729	5.574	4.588	2.998	1.023	3.536	8.982	11.79	11.78
60	8.506	4.539	3.233	1.891	0	2.309	8.583	11.64	11.59
90	6.983	2.93	1.764	0	0	1.055	7.855	11.38	12.03
120	5.561	1.856	0	0	0	0	7.099	11.67	11.76

表 2 不同温度下黄芩的内源酶降解黄芩苷的动力学方程

Table 2 Dynamical equation of degradation of baicalin in *S. baicalensis* at different temperatures

温度/℃	降解动力学方程	r	速率常数 K /min ⁻¹
10	$\lg C = -2.52 \times 10^{-3} t + \lg C_0$ (0~120 min)	0.991 5	2.52×10^{-3}
20	$\lg C = -6.60 \times 10^{-3} t + \lg C_0$ (0~120 min)	0.999 4	6.60×10^{-3}
30	$\lg C = -9.23 \times 10^{-3} t + \lg C_0$ (0~90 min)	0.999 4	9.23×10^{-3}
40	$\lg C = -1.35 \times 10^{-2} t + \lg C_0$ (0~60 min)	0.999 3	1.35×10^{-2}
50	$\lg C = -2.35 \times 10^{-2} t + \lg C_0$ (0~45 min)	0.999 4	2.35×10^{-2}
60	$\lg C = -1.19 \times 10^{-2} t + \lg C_0$ (0~90 min)	0.997 8	1.19×10^{-2}
70	$\lg C = -1.80 \times 10^{-3} t + \lg C_0$ (0~120 min)	0.985 1	1.80×10^{-3}

每次 1 h, 滤过, 混匀, 即得。

2.3.3 工艺三: 取 10 kg 黄芩药材, 破碎, 加 10 倍量的 80℃ 的水, 加热至沸腾, 分别提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 混匀, 即得。

2.3.4 工艺四: 取 10 kg 黄芩药材, 破碎, 用蒸汽蒸 0.5 h, 取出, 加 10 倍量的水, 加热至沸腾, 分别提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 混匀, 即得。

2.3.5 样品测定: 精密量取 1 mL 提取液置 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。分别精密吸取黄芩苷对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪测定, 采用外标法计算黄芩苷的量, 结果工艺一~四得到的黄芩苷的收率分别为 3.5%、7.8%、12.2%、11.4%。可知, 工艺三和工艺四中的黄芩苷几乎没有被黄芩药材中内源酶降解, 而在工艺一和工艺二中, 黄芩药材中内源酶在一定的温度下存在降解黄芩苷的活性, 导致大量的黄芩苷在提取过程中已被降解。

3 讨论

本实验结果与文献报道的结论存在一定的差异。文献认为 30、40℃ 浸泡时, 黄芩苷的量迅速降低, 浸泡 24 h 后, 黄芩苷才基本降解完全, 50℃ 时, 酶活性迅速降低, 60℃ 时, 酶活性已丧失。但在实验中我们发现水温为 40~60℃ 时, 黄芩药材中内源酶降解黄芩苷的活性是非常强的, 1 h 左右可以将黄芩苷降解完全, 并且黄芩药材中内源酶降解黄芩

苷符合一级动力学过程,当水温超过 80 ℃时,黄芩的内源酶已被灭活,黄芩苷的含量不再降低。实验所用的药材为黄芩的生品,文献中所选择的药材可能是炮制品,因此,笔者将继续对黄芩的生品和各种炮制品的酶活性进行系统研究,为黄芩的炮制工艺研究提供参考。

在实际生产中,药材投料量大,以水为溶媒提取药材时,升温缓慢,缓慢的升温过程容易造成黄芩苷的降解,因而黄芩药材宜在 80 ℃以上投料,或者将黄芩药材预先进行炮制,使黄芩的内源酶灭活后再进行煎煮,从而保证黄芩苷的提取率。

黄芩苷是葡萄糖醛酸苷类,由于空间位阻效应, H^+ 不易进攻糖苷键,使其比较难于酸水解,即使在剧烈酸水解条件下也只能使部分苷水解。本实验发现通过黄芩的内源酶催化水解作用,可将药材中的黄芩苷全部降解,产生大量的黄芩素。因此,黄芩的内源酶催化降解黄芩苷为生产黄芩素提供一种可选择的途径。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 肖崇厚.中药化学[M].北京:人民卫生出版社,1984.
- [3] 李晓芳,傅 军,金描真,等.黄芩水提取工艺中黄芩苷降解动力学研究[J].现代食品和药品研究杂志,2006,16(4):27-29.

固相萃取-高效液相色谱法测定青银注射液中蒿酮

何 兵,田 吉,李春红,冯文字*

(泸州医学院药学院 药物研究所,四川 泸州 646000)

摘要:目的 建立固相萃取-高效液相色谱法测定青银注射液中蒿酮的分析方法。方法 采用高效液相色谱法测定。色谱柱为 Dikma Kromasil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(75:25);检测波长:242 nm;柱温:30 ℃;体积流量:0.8 mL/min;进样量:10 μ L。供试品溶液的制备采用 C_{18} 固相萃取小柱(甲醇 10 mL 活化,水 10 mL 平衡),用 50% 甲醇洗脱,弃去洗脱液,再用甲醇洗脱。结果 蒿酮在 0.220 5~3.527 2 μ g 具有良好的线性关系($r=0.9999$),平均回收率为 98.28%,RSD 为 0.35%。结论 该方法简便、快速、准确,具有良好的重复性和回收率,可作为青银注射液中蒿酮的定量分析方法。

关键词: 青银注射液;蒿酮;高效液相色谱;固相萃取

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)03-0400-03

青银注射液是我所研究的中药新药,是由青蒿油和金银花提取物组成的中药注射剂,具有宣肺透邪,清热解毒之功效,临床用于外感高热证所致的高热、微恶风寒、汗泄不畅、头痛、咳嗽、痰粘、咽燥或咽喉红肿疼痛及上呼吸道感染、急性肺部感染等。青蒿油中主要有效成分为蒿酮(45%)和樟脑(12%)^[1]。原质量标准是采用气相色谱法测定樟脑^[2]。本实验尝试采用高效液相色谱法测定其中的蒿酮,结果该方法简单快速,重现性好,可作为该制剂中蒿酮的定量分析方法。

1 仪器与试剂

戴安高效液相色谱仪(P680A 四元低压梯度泵, PDA-100 二极管阵列检测器, TCC-100 柱温箱, Chromeleon 色谱工作站);瑞士 Precisa XR 205SM-DR 电子天平。HSE-12 固相萃取装置

(天津恒奥科技发展有限公司);Besep SPE C_{18} 固相萃取小柱(500 mg/6 mL)。

青银注射液(自制,规格:10 mL/支);蒿酮对照品(Sigma-Aldrich 公司提供,批号:053989/1,质量分数大于 98.0%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Dikma Kromasil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(75:25);检测波长:242 nm;柱温:30 ℃;体积流量:0.8 mL/min;进样量:10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备:精密吸取蒿酮对照品 0.5 mL,精密称定为 0.440 9 g,加甲醇稀释 5 000 倍制成质量浓度为 88.18 μ g/mL 的溶液,作为蒿酮

* 收稿日期:2008-06-28

基金项目:“九五”国家科技攻关项目(96-901-05-20)

作者简介:何 兵(1978-),男,四川泸州人,助理研究员,理学学士,主要从事新药质量标准研究工作。

Tel:13982770721 E-mail:lyhb2008@126.com