

由于三七药材中淀粉的含量高, α -淀粉酶可以迅速水解淀粉,再结合半仿生提取,模拟了肠胃环境,为药效成分创造了更好的溶出环境。提取过程中由于淀粉酶可以很快降低糊化淀粉的黏度,不仅有利于传质溶出,还可提高原料药的起始投放浓度,所以半仿生- α -淀粉酶法可以显著节约时间,提高生产效率;又由于其直接用弱酸和弱碱溶液提取,可以减少乙醇用量;另外, α -淀粉酶在食品工业普遍使用,食用安全性良好并且价格低廉,所以,综合考虑提取效果及经济效益,半仿生- α -淀粉酶提取法是最佳提取工艺。

实验结果分别以提取液中总皂苷得率和干膏收率为考察指标,总皂苷得率可以直接评价该工艺提取粗三七皂苷的能力。而干膏收率一方面可直观地

表明酶解后产物量增多,如酶解产生的小分子(其他水溶性物质,糖、糊精等),但高提取物得率也表明总提取物中必定存在较多的杂质,甚至是非药效成分。这些通过酶作用后与三七皂苷共同被提取的小分子化合物,是否会与三七皂苷的药效产生协同作用,使传统中药复方多组分更有效,这些都有待于进一步的成分解析及药效学研究。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 唐红芳,毛丽珍,徐世芳.正交试验法研究三七提取工艺[J].中草药,2001,32(1):26-28.
- [3] 周琳,李元波,曾英.超声酶法提取三七总皂苷的研究[J].中成药,2006,28(5):642-645.
- [4] 陈晓娟,周春山.酶法及半仿生法提取杜仲叶中绿原酸和黄酮[J].精细化工,2006,23(3):257-260.

HPLC法测定注射用双黄连中黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸

阎 姝¹,田书霞¹,徐茂玲²,李惠芬^{2*}

(1. 天津市南开医院 药剂科,天津 300100; 2. 天津医科大学药学院,天津 300070)

摘要:目的 建立同时测定注射用双黄连中黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸5种有效成分的方法。方法 高效液相色谱法。Phenomenex C₁₈色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-1%冰醋酸水溶液,作梯度洗脱;检测波长为327 nm;体积流量为1 mL/min;柱温为40℃,灵敏度为0.100 0 AUFS。结果 在筛选色谱条件下,测定了注射用双黄连中的黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸5种有效成分。结论 本方法简便、快速、准确、可靠,可用于注射用双黄连中有效成分的测定。

关键词:注射用双黄连;黄芩苷;野黄芩苷;黄芩素;咖啡酸;绿原酸;高效液相色谱

中图分类号:R286.02 **文献标识码:**B **文章编号:**0253-2670(2009)06-0907-03

注射用双黄连由金银花、黄芩和连翘提取精制而成,用于治疗细菌和病毒感染引起的疾病,临床应用广泛^[1]。《中国药典》2005年版一部注射用双黄连(冻干)项下采用3个不同的色谱条件分别对绿原酸、黄芩苷和连翘苷进行了测定。另有文献采用HPLC法同时测定该制剂中3个组分^[2]。本实验采用梯度洗脱高效液相色谱法对注射用双黄连中黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸5种有效成分进行测定,方法简单易行,测定结果准确可靠,为注射用双黄连的质量控制提供了一种有效的方法。

1 仪器与试剂

Agilent1100全自动液相色谱仪系统(四元梯度泵,二极管检测器)(美国安捷伦公司);注射用双黄连(冻干粉针)(哈药集团中药二厂);黄芩苷(批号715-8501)、野黄芩苷(批号110842-200605)、黄芩素(批号111595-200604)、咖啡酸(批号110885-200102)、绿原酸(批号110753-200413)对照品均由中国药品生物制品检定所提供;水为纯化水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Phenomenex C₁₈色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-1%冰醋酸水溶

* 收稿日期:2008-12-15

作者简介:阎 姝(1968—),女,天津市人,副主任药师,博士,南开医院药剂科副主任,研究方向:中药及中药制剂分析、临床药学。

E-mail: ysyx0234@126.com

*通讯作者 李惠芬 E-mail: lihuifen@tjmu.edu.cn

液(B),作梯度洗脱,0~15 min,A-B(92 8),15~25 min,A-B(80 20),25~28 min,A-B(70 30),28~30 min,A-B(40 60),30~40 min,A-B(55 45),40~45 min,(A-B 92 8);检测波长为 327 nm;体积流量为 1 mL/min;柱温为 40 ,灵敏度为 0.100 0 AUFS。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取黄芩苷对照品 15 mg、野黄芩苷对照品 10 mg、黄芩素对照品 10 mg、咖啡酸对照品 10 mg 和绿原酸对照品 15 mg 分别置 5 个 10 mL 量瓶中,各加 70 %甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 5 种对照品储备溶液。分别精密量取黄芩苷和绿原酸对照品储备液各 5 mL、咖啡酸对照品储备液 0.1 mL,野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸对照品储备液各 0.5 mL 置 25 mL 量瓶中,加 70 %甲醇稀释至刻度,混匀,即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:精密称取样品 10 mg 置 10 mL 量瓶中,加 70 %甲醇稀释至刻度,混匀,即得。

2.4 系统性试验:在上述色谱条件下,黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸的理论塔板数均大于 2 500,见图 1。样品中各指标成分分离良好,分离度大于 2.0。

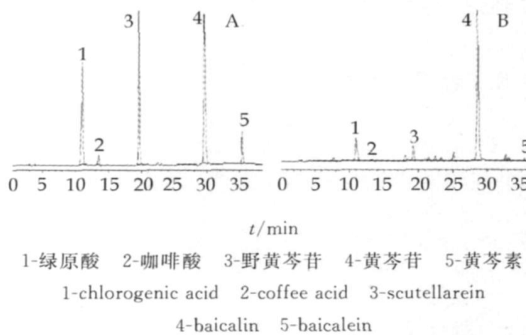


图 1 对照品(A)和注射用双黄连(B)的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A) and Shuanghuangliang Powder for Injection (B)

2.5 线性关系考察:精密吸取混合对照品溶液,按对倍稀释的方法配置一系列溶液,取 20 μ L 在上述色谱条件下分别进样,记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标进行线性回归,线性范围和回归方程见表 1。

2.6 精密度试验:精密取混合对照品溶液 20 μ L,重复进样 6 次,按峰面积计算黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸的 RSD 分别为 0.80 %、1.77 %、1.91 %、1.65 %、1.91 %。

2.7 稳定性试验:将供试品溶液(批号:0711001)室温下储存,分别于 1、2、4、8、12 h 时测定样品中有效

表 1 各成分的线性范围及回归方程

Table 1 Linear ranges and regression equation

成 分	线性范围/ (μ g $\cdot$ mL $^{-1}$)	回归方程	r
黄芩苷	100.4~702.8	$A = 2.774 \times 10^4 C + 311.7$	0.999 7
野黄芩苷	1.92~11.5	$A = 4.487 \times 10^4 C - 17.07$	0.999 5
黄芩素	1.04~8.32	$A = 5.003 \times 10^4 C - 8.048$	0.999 9
咖啡酸	0.5~3.0	$A = 9.896 \times 10^4 C - 2.860$	0.999 8
绿原酸	8.9~53.4	$A = 5.289 \times 10^4 C - 41.15$	0.999 9

成分的质量分数,结果黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸的 RSD 分别为 1.85 %、1.93 %、1.91 %、1.53 %、1.90 % ($n = 3$),表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 重现性试验:取同一批样品(批号:0711001),分别制备 5 份供试品溶液,按上述方法测定该样品有效成分的质量分数,结果黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸的 RSD 分别为 1.12 %、1.40 %、1.85 %、1.48 %、1.70 %。

2.9 回收率试验:取注射用双黄连适量(其中含有黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸的质量分别为 2 176、28.18、26.86、11.06、1 802 μ g),分别加入黄芩苷 2 460 μ g、野黄芩苷 28.80 μ g、黄芩素 29.12 μ g、咖啡酸 10.50 μ g、绿原酸 186.9 μ g 对照品,制备供试品溶液,进样测定,计算回收率,结果平均回收率分别为 100.3 %、100.9 %、101.2 %、100.7 %、100.8 %,RSD 分别为 1.27 %、1.71 %、0.83 %、1.56 %、1.00 % ($n = 9$)。

2.10 样品测定:取 3 批样品,制备供试品溶液,进行测定,采用外标法计算各有效成分的质量分数,结果见表 2。

表 2 注射用双黄连中有效成分的测定结果($n = 3$)

Table 2 Determination of active components in Shuanghuanglian Powder for Injection ($n = 3$)

批 号	黄芩苷/ (μ g $\cdot$ mg $^{-1}$)	野黄芩苷/ (μ g $\cdot$ mg $^{-1}$)	黄芩素/ (μ g $\cdot$ mg $^{-1}$)	咖啡酸/ (μ g $\cdot$ mg $^{-1}$)	绿原酸/ (μ g $\cdot$ mg $^{-1}$)
0711001	271.4	3.612	3.021	1.131	220.2
0711002	260.1	3.373	3.491	1.257	207.3
0711003	251.0	3.241	3.189	1.256	209.2

3 讨论

注射用双黄连中所含成分复杂,其理化性质相差较大。本实验采用高效液相色谱法同时测定了其中的黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸 5 种有效成分,操作简单易行,结果准确可靠,为注射用双黄连的质量控制提供了一种方法。

中药材及中药的质量评价是中医药走向世界的关键问题之一。《中国药典》多采用高效液相色谱法

对选定处方中某味药的主要成分定量检测,质量评价覆盖面小,应逐渐增加中药复方制剂中多种成分的测定。本实验通过优化色谱条件,同时测定了注射用双黄连中的 5 种有效成分。

参考文献:

- [1] 任玲玲,张春枝,陈吉平. 黄芩的抗菌活性及 HPLC 分析[J]. 精细化工,2005,22 (8):589-591.
- [2] 胡世林,冯学峰. 黄芩研究的某些新进展[J]. 中国药杂志,2001,36 (11):728-731.

正交试验优化黄芪的乙醇提取工艺

崔红花¹,赵英日²,尹永芹¹,沈志滨^{1*}

(1. 广东药学院中药学院,广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学国际学院,广东 广州 510405)

摘要:目的 建立黄芪中黄芪甲苷的 RP-HPLC 测定方法,探讨黄芪提取的工艺条件。方法 以黄芪甲苷作为定量指标成分,采用 HPLC-ELSD 法测定,确定乙醇体积分数、乙醇量、煎煮时间及煎煮次数为影响因素,并以 L₉(3⁴) 正交设计表安排试验。结果 黄芪的最佳工艺条件为:95%乙醇常压回流提取 2 次,每次为药材量 10 倍,每次提取时间为 3 h 最好。结论 优选的提取条件提取效率高,质量稳定,重现性好,可为确定黄芪提取工艺提供实验依据。

关键词:蒙古黄芪;黄芪甲苷;正交设计;提取工艺;HPLC-ELSD

中图分类号:R284.2;R286.06

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2009)06-0909-03

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根,味甘,性微温,具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌之功效,临床上主要用于气虚水肿、痈疽难溃、久溃不敛、血虚痿黄、内热消渴。黄芪甲苷是黄芪的主要成分之一,具有增强机体免疫功能,也是多种制剂中的定量指标成分。黄芪皂苷的提取方法主要采用索氏提取、微波提取法和超声波提取法、直接加热提取法^[1~3]。本实验采用 L₉(3⁴) 正交设计法,以黄芪甲苷作为检测指标,考察影响黄芪乙醇提取工艺的因素,采用高效液相色谱法-蒸发光散射检测法 (HPLC-ELSD) 测定黄芪甲苷,优选出黄芪的最佳提取工艺,为生产提供科学依据。

1 仪器和试剂

Waters 高效液相色谱仪,Alltech 2000 型蒸发光散色检测器,Millennium³² 色谱工作站,SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

D101 型大孔吸附树脂柱(南开大学化工厂);黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所);甲醇为美国 Sigma 公司产品,色谱纯;其他试剂为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

黄芪购自广州市药材公司,经广州中医药大学高幼衡教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *A. membra-*

naceus (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao. 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 因素水平的确定:对于从黄芪中提取黄芪甲苷的工艺,根据有关文献和资料,采用正交试验设计。考虑黄芪甲苷极性较大,且在黄芪中的量不高,故选取乙醇体积分数(A)、乙醇用量(B)、提取时间(C)和提取次数(D)为因素,各自取 3 个水平,因素与水平见表 1。

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因 素			
	A/ %	B/ 倍	C/ h	D/ 次
1	50	8	1	1
2	75	10	2	2
3	95	12	3	3

2.2 黄芪甲苷的 HPLC 法测定

2.2.1 色谱条件:色谱柱为 Kromasil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(75:25);柱温:室温;体积流量:1.0 mL/min;进样量:20 μL;ELSD 参数:漂移管温度为 107℃;气体流速为 2.85 mL/min。

2.2.2 供试品溶液的制备:黄芪药材经粉碎为粗品,过 60 目筛,精密称取 1.5 g,加乙醇热回流提取,

* 收稿日期:2008-11-10

作者简介:崔红花(1976—),女(朝鲜族),讲师,博士,研究方向为中药及中药制剂的分析研究与开发,发表论文 20 余篇。

Tel: 13710768642 E-mail: honghuacui@163.com

*通讯作者 沈志滨 Tel: (020) 39352179 E-mail: szb8113@yahoo.com.cn