

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]. 中国药理学杂志, 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 $L_9(3^4)$ 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3h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 $L_9(3^4)$ 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

提取液蒸干,残渣加水 20 mL 微热溶解,置于分液漏斗中,加水饱和正丁醇振摇提取 3 次,每次 30 mL,合并正丁醇提取液,用氨试液洗涤 2 次,每次 40 mL,弃去氨液;然后用正丁醇饱和水将正丁醇层洗至中性,正丁醇液蒸发至干,残渣加水 1.5 mL 使溶解,放冷。通过 D-101 型大孔吸附树脂柱(12 cm × 1.5 cm),80 mL 水洗脱,40%乙醇 80 mL 洗脱,70%乙醇 100 mL 洗脱,收集 70%乙醇洗脱液,蒸干,用甲醇溶解,并定容至 5 mL 量瓶中,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后,作为供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备:精密称取黄芪甲苷对照品适量,溶于甲醇配制成质量浓度为 0.96 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.4 线性关系的考察:分别精密吸取黄芪甲苷对照品溶液 0.5、1.0、2.0、6.0、10.0、20.0 μL 注入高效液相色谱仪,以进样量自然对数为横坐标,峰面积积分值自然对数为纵坐标,得线性回归方程 $Y = 11.176 + 1.825 X$, $r = 0.9998$ 。结果表明黄芪甲苷在 0.48 ~ 19.20 μg 线性关系良好。

2.2.5 精密度试验:取黄芪甲苷对照品溶液 2 μL

进样测定峰面积,以保留时间和峰面积计算得 RSD 分别为 0.21%、1.64%。

2.2.6 稳定性试验:取供试品溶液 2 μL,分别在 0、2、4、8、16、24 h 进样测定黄芪甲苷峰面积,计算得其 RSD 为 1.95%。

2.2.7 重现性试验:取黄芪药材粉末 6 份,制备供试品溶液,进样测定峰面积,计算黄芪甲苷的质量分数,得其 RSD 为 2.57%。

2.2.8 回收率试验:采用加样回收法。精密称取黄芪药材粉末(黄芪甲苷质量分数 5.61 mg/g)约 0.75 g,共 6 份,分别精密加入 3.50 mg 黄芪甲苷,制备供试品溶液,依法操作,进样测定,计算得黄芪甲苷的平均方法回收率为 99.8%,RSD 为 1.765%。

2.2.9 样品测定:取黄芪药材粉末的供试品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,依上述色谱条件测定,采用外标两点法计算样品中黄芪甲苷的质量分数。

2.3 正交设计及结果:取药材,每一个样品连续提取 3 次,以黄芪甲苷为考察指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,结果见表 2。不考虑交互作用,进行方差分析,结果见表 3。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果($n=3$)

Table 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test ($n=3$)

试验号	A	B	C	D	黄芪甲苷/(mg·g ⁻¹)			
					1	2	3	合计
1	1	1	1	1	1.433 6	1.280 0	1.418 6	4.132 2
2	1	2	2	2	1.689 2	1.847 6	2.048 5	5.585 3
3	1	3	3	3	1.778 8	1.891 4	1.906 1	5.576 3
4	2	1	2	3	1.798 7	1.510 2	1.774 3	5.083 2
5	2	2	3	1	1.685 1	1.720 7	1.620 6	5.026 4
6	2	3	1	2	1.810 4	1.788 2	1.858 8	5.457 4
7	3	1	3	2	1.730 2	1.813 5	1.954 4	5.498 1
8	3	2	1	3	1.649 4	2.059 0	1.900 5	5.608 9
9	3	3	2	1	1.546 0	1.535 5	1.464 8	4.546 3
	15.293 8	14.713 5	15.198 5	13.704 9				
	15.567 0	16.220 6	15.214 8	16.540 8				
	15.653 3	15.580 0	16.100 8	16.268 4				
R	0.359 5	1.507 1	0.902 3	2.835 9				

表 3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	0.007 8	2	0.003 9	0.267 1	
B	0.127 1	2	0.063 6	4.356 2	$P < 0.05$
C	0.059 2	2	0.029 6	2.027 4	
D	0.544 0	2	0.272 0	18.630 1	$P < 0.01$
误差	0.262 8	27	0.009 7		

$F_{0.01}(2,27) = 5.49$

$F_{0.05}(2,27) = 3.35$

从直观分析知,影响黄芪甲苷提取的 4 个因素中,提取次数的影响最大,乙醇体积分数影响最小,从煎煮时间来看,3 h 效果最佳,1 h 与 2 h 时差别不大,即最佳的提取条件是 $A_3B_2C_3D_2$ 。进一步的方差分析知,因素 B 和 D 对黄芪甲苷的提取具有显著性意义,其影

响程度为提取次数 > 乙醇量 > 提取时间 > 乙醇体积分数。因此选择的最佳参数组合为最佳的提取条件为 $A_3B_2C_3D_2$,即最佳提取条件为加 10 倍量 95%乙醇,回流提取 2 次,每次 3 h。

2.4 工艺验证试验:按照优选工艺安排 5 次试验,黄芪甲苷的质量分数分别为 5.67、5.59、5.64、5.60、5.72 mg/g,其结果均较为稳定,说明该正交设计筛选工艺可行。

3 讨论

本实验采用正交试验优化黄芪的乙醇提取工艺,最佳提取条件为加 10 倍量 95%乙醇,回流提取 2 次,每次 3 h。考虑到实际生产上 95%乙醇成本较高、挥发快的特点,且实际上黄芪甲苷提取率与

75 %乙醇提取时差异不大,故建议采用 75 %乙醇提取,在此基础上进一步优化提取次数。

本实验运用正交设计,以有效成分黄芪甲苷作为指标,采用 HPLC-ELSD 法,优化了蒙古黄芪的提取工艺,可提高黄芪药材中有效成分黄芪甲苷的提取率,对确定黄芪药材及制剂的质量标准提供科

学依据。

参考文献:

- [1] 马英丽,赵怀清,田振坤,等. 黄芪质量的化学模式识别研究. 中草药,2003,34(5):460-462.
- [2] 陈韩英,李炳奇,刘红,等. 黄芪皂甙提取工艺的研究[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2004,(22)2:170-172.
- [3] 杨晓雷,曹云. 从黄芪生药中提取黄芪甲苷的工艺研究[J]. 现代化工,2008,28(增刊2):373-376.

HPLC 法测定消栓通络软胶囊中丹参素

叶荣飞¹,石森林^{2*},高敏²

(1. 台州市中西医结合医院,浙江 台州 317500; 2. 浙江中医药大学药学院,浙江 杭州 310053)

摘要:目的 建立消栓通络软胶囊中丹参素的高效液相色谱测定方法。方法 色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.5 %冰醋酸溶液(10:90),体积流量为 1.0 mL/min;检测波长为 280 nm;柱温为室温,进样量为 20 μL。结果 丹参素进样量在 0.439 2~2.196 0 μg 峰面积值线性关系良好($r=0.999\ 8$);平均回收率为 98.30 %,RSD 为 1.02 %。结论 建立的测定方法简便、准确、灵敏,可用于消栓通络软胶囊中丹参素的测定。

关键词:消栓通络软胶囊;丹参素;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)06-0911-02

消栓通络软胶囊系由川芎、丹参、黄芪、泽泻、三七等 11 味药材组成,具有活血化瘀、温经通络的功效,用于治疗血脂增高,脑血栓引起的精神呆滞,舌质发硬、言语迟涩、发音不清、手足发凉、活动疼痛等症。丹参性微寒、味苦,有祛瘀止痛,活血调经,养心除烦的功效,有效成分菲醌类化合物丹参素具有抗菌作用,对心绞痛,心肌梗死有一定疗效。原标准中仅收载了人参皂苷 Rg₁ 的定量方法。为了有效控制其内在质量,本实验以方中主药丹参的水溶性成分丹参素为考察指标,进行 HPLC 法测定,结果表明,该方法灵敏度、稳定性和重现性好,回收率高,适用于该产品的质量控制。

1 仪器与试剂

Agilent1100 液相色谱仪;岛津 TU-4901 紫外分光光度计;SartoriusBP211D 电子天平;USC-502 超声波清洗器。甲醇为色谱纯,水为双蒸水(自制),其余试剂均为分析纯。消栓通络软胶囊(自制);丹参素钠对照品(批号:110855-200104)购自中国药品生物制品检定所)。

2 方法与结果

2.1 检测波长的选择:对丹参素钠对照品溶液进行

紫外扫描(200~400 nm),结果丹参素钠在 280 nm 波长处有最大吸收,因此选择 280 nm 作为检测波长。

2.2 色谱条件:色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.5 %冰醋酸溶液(10:90),体积流量为 1.0 mL/min,检测波长为 280 nm,柱温为室温,进样量为 20 μL。理论板数按丹参素计算应不低于 3 000。

2.3 对照品溶液的制备:精密称取丹参素钠对照品 15.02 mg,置 25 mL 量瓶中,加 0.5 %醋酸溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取上述溶液 10 mL,置 100 mL 量瓶中,加 0.5 %冰醋酸至刻度,摇匀,即得对照品溶液(含丹参素钠 60 μg/mL,相当于含丹参素 54 μg/mL)。

2.4 供试品溶液的制备:取本品内容物约 1.0 g,精密称定,置 100 mL 量瓶中,精密加入 25 mL 水,称定质量,超声处理(150 W,50 kHz)20 min,放冷,称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,离心,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.5 阴性对照溶液的制备:取缺丹参阴性样品 1.0 g,按供试品溶液的制备方法制备缺丹参的阴性对照溶液。

2.6 线性关系考察:精密称取丹参素钠对照品

* 收稿日期:2008-10-11

作者简介:叶荣飞,男,主管药师,浙江温岭人,从事中药房业务及管理工作。Tel:(0576)86440817

* 通讯作者 石森林 Tel:(0571)86613524 E-mail:pjstone@163.com