

- [11] Karlsson RM, Holmes A, Heilig M, et al. Anxiolytic-like actions of centrally-administered neuropeptide Y, but not galanin, in C57BL/6J mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005, 80(3): 427-436.
- [12] Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2001, 58(5): 445-452.
- [13] Hernandez E, Lastra S, Urbina M, et al. Serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid and serotonin transporter in blood peripheral lymphocytes of patients with generalized anxiety disorder [J]. *Int Immunopharmacol* 2002, 2(7): 893-900.
- [14] Arranz L, Guayerbas N, De-la-Fuente M. Impairment of several immune functions in anxious women [J]. *J Psychosom Res*, 2007, 62(1): 1-8.
- [15] 张晋碛, 黄兴兵, 关念红, 等. 广泛性焦虑症与抑郁症患者免疫、内分泌及单胺递质的对照研究 [J]. *中华精神科杂志*, 2004, 37(4): 211-214.
- [16] Karrenbauer BD, Ho YJ, Ludwig V, et al. Time-dependent effects of striatal interleukin-2 on open field behaviour in rats [J]. *J Neuroimmunol*, 2009, 208(1-2): 10-18.
- [17] Cragolini AB, Schiöth HB, Scimone TN. Anxiety-like behavior induced by IL-1beta is modulated by alpha-MSH through central melanocortin-4 receptors [J]. *Peptides*, 2006, 27(6): 1451-1456.
- [18] Pawlak CR, Schwarting RK, Bauhofer A. Cytokine mRNA levels in brain and peripheral tissues of the rat: relationships with plus-maze behavior [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, 137(1-2): 159-165.
- [19] Krysiak R, Obuchowicz E, Herman ZS. Diazepam and buspirone alter neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat brain [J]. *Neuropeptides*, 1999, 33(6): 542-549.
- [20] 汪军, 姚珂, 王瑞元. 8周跑台运动对肥胖大鼠血浆和下丘脑神经肽Y蛋白及其基因表达的影响 [J]. *中国运动医学杂志* 2008, 27(6): 707-709.

草豆蔻中山姜素和小豆蔻明的 HPLC 测定及提取工艺优化

邹毓兰, 吕海涛*

(青岛农业大学化学与药学院, 山东 青岛 266109)

关键词: 草豆蔻; 山姜素; 小豆蔻明; 提取工艺; 正交实验; 测定

摘要: 目的: 建立起高灵敏度的草豆蔻中山姜素和小豆蔻明的 HPLC 测定方法和最佳提取工艺。方法: 利用高效液相色谱测定山姜素和小豆蔻明含量, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计法, 考察乙醇浓度、提取次数、提取温度、提取时间和溶剂用量对二者提取的影响, 并对其稳定性进行探讨。结果: 色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相梯度: 0~16 min, 甲醇-1%乙酸 = 52:48; 16~36 min, 甲醇-1%乙酸 = 62:38。检测波长梯度: 0~16 min, 286 nm; 16~36 min, 346 nm。最佳提取工艺为 20 倍量的 100% 乙醇回流, 每次 2 h, 提取 3 次。结论: 测定方法灵敏、可靠, 提取工艺稳定, 为草豆蔻的药物综合利用提供了依据。

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1001-1528(2011)01-0145-04

草豆蔻是姜科山姜属植物, 其性温, 味辛辣, 具有健胃止吐、祛寒止泻、收敛等作用。主治胃寒腹痛、寒湿吐泻、食欲不振等病症^[1, 2]。现代医学研究表明, 草豆蔻浸出液可显著提高胃蛋白酶的活力, 提取物具有明显的抗氧化性作用, 中成药“复方草豆蔻酊”、“抗栓再造丸”、“散风活络丸”、“健胃片丸”等均以草豆蔻为主要组分^[3, 4]。山姜素和小豆蔻明是草豆蔻中的主要有效成分, 其结构式分别为 7-羟基-5-甲氧基二氢黄酮和 2, 4-二羟基-6-甲氧基查耳酮^[5], 在抑制血小板聚集、抑制肿瘤形成以及抗炎抑菌方面均有较强活性, 并且毒性低, 安全性好^[6]。

本试验利用高效液相色谱法建立了草豆蔻中山姜素和

小豆蔻明含量的高灵敏度测定方法, 采用正交实验法对草豆蔻中山姜素和小豆蔻明提取工艺进行优化, 并对山姜素和小豆蔻明的稳定性进行了初步的探讨, 以期为深入开发利用草豆蔻提供实验基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪 LC-10AVP、紫外检测器 SPD-10AVP (岛津仪器有限公司)、色谱工作站 N2000 (浙江大学智达信息工程有限公司)、CASCADA 超纯水系统 (Pall Corporation)、AR2140 电子分析天平 (上海奥豪国际工贸公司)、RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)、TDL-50B 离

收稿日期: 2010-02-01

基金项目: 青岛农业大学自然科学类重点项目 (610608)

作者简介: 邹毓兰 (1986 -), 女, 硕士生, 主要从事天然产物化学及其应用。

* 通讯作者: 吕海涛 (1968 -), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事天然产物化学及其应用。Tel: (0532) 86080540 E-mail: htlu6@sina.com

心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试剂与试药

草豆蔻药材样品购于山东省青岛市城阳区当地药店,经鉴定为姜科植物草豆蔻 *Alpinia katsumadai* Hayata 的干燥种子团。

甲醇、乙醇、醋酸等均为色谱纯试剂,山姜素和小豆蔻明对照品购于中国药品生物制品检定所,批号分别为110762-200303(供鉴别用)和110763-200302(供含量测定用),水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 山姜素和小豆蔻明的含量测定

2.1.1 流动相的选择 山姜素和小豆蔻明的羟基在水溶液中容易发生电离,极性增强,在固定相表面形成双重保留机理,色谱峰拖尾严重。加入少量醋酸,可使电离受到抑制,有利于增强在固定相上的保留,使分离效果和峰形得到改善。由于二者保留时间差别较大,为了保证分离效果和缩短分离时间,采用梯度洗脱:0~16 min,甲醇-1%乙酸=52:48;16~36 min,甲醇-1%乙酸=62:38。

2.1.2 检测波长的选择 利用光电二极管阵列检测器,可以获得吸光度(A)、波长(λ)和时间(t)的三维空间的色谱图。在200~400 nm波长范围得到紫外吸收光谱图,见图1(a)和(b),山姜素和小豆蔻明的最大吸收波长分别为286 nm和346 nm,确定检测波长梯度为:0~16 min,286 nm;16~36 min,346 nm。

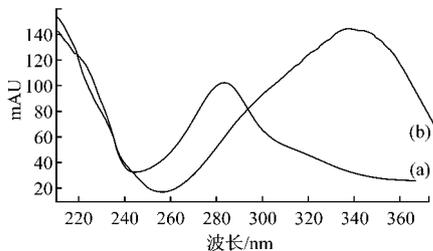


图1 山姜素(a)和小豆蔻明(b)的紫外光谱图

2.1.3 流速的选择 流速过快,造成分离效果不好,柱前压过大;流速过慢,分析时间将延长,色谱峰扩展严重。综合考虑快速检测和分离效果,确定流动相流速为1.0 mL/min。

2.1.4 对照品溶液的制备 用移液器移取1 mg/mL的山姜素对照品和0.5 mg/mL的小豆蔻明对照品,配制成混合对照品溶液,混合后山姜素和小豆蔻明的浓度分别为600 μ g/mL和200 μ g/mL,备用。

2.1.5 供试品溶液的制备 将草豆蔻样品粉碎过50目筛,取1.0 g,精密称量,置于250 mL圆底烧瓶中,加入一定量的乙醇,水浴加热回流,冷却,过滤;用乙醇分次洗涤烧瓶及滤器,合并提取液和洗涤液,用旋转蒸发器蒸干,残留物用60%的甲醇溶解,移入50 mL量瓶中,定容,摇匀,即得供试品溶液。

2.1.6 标准曲线的制备 配制标准溶液时,用流动相逐级稀释法配成一系列浓度的混合标准溶液。在上述色谱条件下进样分离分析,直至不出峰为止。以浓度c为横坐标,峰

面积A为纵坐标,得到山姜素和小豆蔻明的回归方程分别为: $A = 17\ 864c + 37\ 521$; $A = 90\ 191c + 18\ 745$,相关性系数均达到0.999 9。山姜素和小豆蔻明的检出限分别为0.001 9 μ g/mL和0.013 μ g/mL,均低于文献检出限。

2.1.7 样品分离测定 分别对对照品溶液和供试品溶液进样分离,尽管实际样品所含成分复杂,杂质峰多,但仍可将山姜素和小豆蔻明分离、测定,结果见图2,并用外标法进行定量计算。

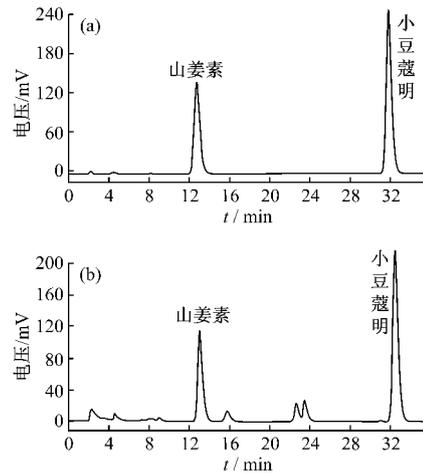


图2 混合标准品(a)和提取样品(b)的色谱图

2.1.8 精密度试验 将在最佳提取工艺条件下制备的样品提取液按含量测定方法,在高效液相色谱上连续进样5次,按上述色谱条件进行测定,山姜素的平均含量为5.156 mg/g,测定量RSD为0.74%;小豆蔻明的平均含量为2.195 mg/g,测定量RSD为0.37%。结果表明,测定方法具有良好的精密度。

2.1.9 加样回收率试验 在最佳提取工艺条件下的提取样品中,加入标准品,用同样的检测方法测出加样后样品中山姜素和小豆蔻明的含量,计算加样回收率,结果见表1。表明山姜素和小豆蔻明的高效液相色谱检测法具有良好的回收率。

表1 加样回收率测定结果

被测成分	编号	样品量	加入量	测得量	回收率	平均回收率/%
		/ μ g	/ μ g	/ μ g	%	
山姜素	1	2.510	7.968	11.032	106.95	
	2	5.343	5.204	10.661	102.19	102.38
	3	16.027	5.204	21.127	98.00	
小豆蔻明	1	1.058	2.932	3.963	99.08	
	2	2.155	1.977	4.096	98.18	97.08
	3	6.465	1.977	8.323	93.98	

2.2 草豆蔻中山姜素和小豆蔻明的提取工艺优化

2.2.1 因素水平的确定 根据单因素实验结果,乙醇浓度、提取次数、提取温度、提取时间和溶剂用量对山姜素和小豆蔻明的提取效果影响较大。因此,采用正交实验法,进行提取工艺条件选择优化,每个因素选4个水平,因素及水平见表2。

表2 山姜素和小豆蔻明提取工艺正交实验因素水平

水平	因素				
	A 乙醇浓度/%	B 溶剂用量/倍	C 提取时间/h	D 提取次数/次	E 提取温度/℃
1	25	10	0.5	1	50
2	50	20	1	2	60
3	75	40	1.5	3	70
4	100	60	2	4	回流

2.2.2 实验设计与结果 将干燥的草豆蔻按正交实验表安排实验,以被测样品中山姜素和小豆蔻明的总含量为考察指标,结果见表3。

数据统计分析,用正交设计助手Ⅱ V3.1,方差分析结果见表4。

从正交结果可知:各因素对山姜素和小豆蔻明总含量的影响大小顺序为:A(乙醇浓度) > D(提取次数) > E(提取温度) > C(提取时间) > B(溶剂用量);每个因素四个水平之

表3 正交设计结果

实验号	因素					实验结果/(μg/mL)		
	A	B	C	D	E	山姜素	小豆蔻明	总含量
1	1	1	1	1	1	24.843	3.581	28.424
2	1	2	2	2	2	65.022	14.289	79.311
3	1	3	3	3	3	84.883	18.258	103.141
4	1	4	4	4	4	118.197	22.734	140.931
5	2	1	2	3	4	98.785	35.028	133.813
6	2	2	1	4	3	94.985	41.307	136.292
7	2	3	4	1	2	88.336	35.963	124.299
8	2	4	3	2	1	86.050	36.536	122.586
9	3	1	3	4	2	87.540	39.114	126.654
10	3	2	4	3	1	91.479	41.225	132.704
11	3	3	1	2	4	88.671	38.677	127.348
12	3	4	2	1	3	85.660	37.992	123.652
13	4	1	4	2	3	93.261	43.189	136.450
14	4	2	3	1	4	91.134	39.014	130.178
15	4	3	2	4	1	92.643	43.772	136.415
16	4	4	1	3	2	93.106	44.057	137.163
K ₁	87.952	106.335	107.307	101.638	105.032			
K ₂	129.248	119.621	118.298	116.424	116.857			
K ₃	127.590	122.801	120.640	126.705	124.884			
K ₄	135.052	131.083	133.596	135.073	133.067			
R	47.100	24.748	26.289	33.435	28.035			

表4 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
乙醇浓度	5 586.993	3	2.243	3.290	
溶剂用量	1 270.158	3	0.510	3.290	
提取时间	1 397.081	3	0.561	3.290	
提取次数	2 488.371	3	0.999	3.290	
提取温度	1 714.071	3	0.688	3.290	
误差	12 456.67	15			

间的趋势为 A₄ > A₂ > A₃ > A₁, B₄ > B₃ > B₂ > B₁, C₄ > C₃ > C₂ > C₁, D₄ > D₃ > D₂ > D₁, E₄ > E₃ > E₂ > E₁。直观分析得提取工艺为 A₄B₄C₄D₄E₄,即采用100%乙醇回流提取、60倍溶剂用量、提取2h、提取4次。方差分析结果表明:乙醇浓度对小豆蔻明含量有显著性影响,故选择最佳乙醇浓度选为100%乙醇,而提取次数、提取温度、提取时间和溶剂用量对山姜素和小豆蔻明无显著影响,本着经济有效的选取原则,最后确定以 A₄B₄C₄D₃E₄ 组合最佳,即采用20倍量的100%乙醇回流、每次提取2h、提取3次。

2.3 验证实验

2.3.1 等量工艺验证 取1g草豆蔻粉末,在最佳提取工艺条件下提取,用同样方法检测,重复5次,被测样品中山姜素和小豆蔻明的平均含量分别为103.138 μg/mL和43.908 μg/mL,总含量为147.046 μg/mL,高于正交设计表中的最大值。表明,被测样品中山姜素和小豆蔻明含量高,提取工艺稳定可靠。

2.3.2 最佳工艺放大实验 取10g草豆蔻粉末,在最佳提取工艺条件下提取,用同样方法检测,山姜素和小豆蔻明的提取量分别为4.843 mg/g和1.928 mg/g,与草豆蔻中山姜素和小豆蔻明的含量分别为5.156 mg/g和2.195 mg/g相比,表明上述提取工艺条件为草豆蔻中山姜素和小豆蔻明的最佳提取工艺。

2.4 温度对提取样品稳定性的影响

将提取样品放置于90℃和100℃环境下,分别于1、2、3、4、8h后测定样品中山姜素和小豆蔻明的含量。结果表明,在90℃条件下,山姜素和小豆蔻明含量基本无变化,表明在90℃条件下提取样品稳定;在100℃条件下,前2h山姜素含量明显增加,小豆蔻明含量明显下降;2h后,山姜素

和小豆蔻明含量基本无变化,表示在 100 °C 条件下,部分小豆蔻明会转化为山姜素,转化后,提取样品中相关成分的含量基本稳定。

3 结论

本研究采用乙醇为提取溶剂,随温度升高,山姜素和小豆蔻明含量呈增加趋势。但是,温度过高时,部分小豆蔻明会转化为山姜素,故本文以两者的总含量作为考察指标。

研究所得最佳提取工艺条件为 20 倍量的 100% 乙醇回流,每次回流 2 h,共提取 3 次。最佳分离条件为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱,流动相梯度:0~16 min,甲醇-1%乙酸=52:48;16~36 min,甲醇-1%乙酸=62:38。检测波长梯度:0~16 min,286 nm;16~36 min,346 nm。方法操作简便、准确、可靠。

pH 值对丹参水提动力学过程的影响

陈 桥^{1,2}, 章弘扬¹, 王 帅¹, 张 敏², 王月荣¹, 姜志宏^{2,3}, 胡 坪^{1*}

(1. 华东理工大学 化学与分子工程学院,上海 200237; 2. 华东理工大学 药学院,上海 200237; 3. 香港浸会大学中医药学院,香港)

关键词:pH 值;提取;丹酚酸 B;原儿茶醛;丹参素;动力学模型

摘要:目的:考察提取液 pH 值对丹参水提动力学过程的影响。方法:采用高效液相色谱法测定不同 pH 提取条件下丹参提取物中丹参素、原儿茶醛与丹酚酸 B 的含量。综合考虑丹酚酸 B 的提取和分解两个影响因素,建立丹酚酸 B 的水提动力学模型,并对不同 pH 值下的模型参数进行计算。结果:随着 pH 值的增大,提取液中丹酚酸 B 含量下降,丹参素与原儿茶醛含量提高;丹酚酸 B 的分解速率常数增大,提取速率常数减小。结论:提取参数 pH 值对丹参制剂中丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛等有效成分的含量及其比例控制十分重要。

中图分类号:R284.2

文献标识码:B

文章编号:1001-4528(2011)01-0148-03

丹参(*Salvia*)为双子叶植物唇形科 Labiatae 植物 *Miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,苦,微寒,归心、肝经^[1],为一味常见的中药材。传统中医认为丹参具有活血调经,祛瘀止痛,凉血消痛,清心除烦,养血安神的功效,现多用于治疗心血管疾病^[2,3]。丹参中的丹酚酸类化合物被普遍认为是丹参的有效成分之一,其中丹酚酸 B 作为含量最高的酚酸类化合物,已有大量相关的药理研究报道^[4,5]。丹参用药多为水煎剂,研究表明,丹酚酸 B 在煎煮过程中分解生成丹参素和原儿茶醛^[6],两产物亦是治疗心脑血管疾病的有效成分^[7]。因此,丹参水提工艺参数对丹酚酸 B 提取过程的影响及其动力学的研究,对于丹参制剂中丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛等有效成分的含量及其比例控制具有重要意义。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

收稿日期:2010-06-10

基金项目:上海市科委资助项目(08DZ1971100)

作者简介:陈 桥(1986-),男,硕士生,从事中药制药工程研究。Tel:(021)64252844 E-mail:bridge1986@hotmail.com。

* 通讯作者:胡 坪,副教授。Tel.:(021)64252844 E-mail:huping@ecust.edu.cn。

参考文献:

- [1] 中国医科院药物研究所:中药志[M].第2版,人民卫生出版社,1984:15-19.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草(下册)[M].上海:上海科学技术出版社,1998:2249.
- [3] 刘学平,汤明辉,戴 涌,等.中药石斛类粉末的显微鉴定研究[J].中国药科大学学报,1992,23(3):148-151.
- [4] 全国中草药汇编编写组.全国中草药汇编.上册[M].北京:人民卫生出版社,1988:1609.
- [5] 乔春峰,徐珞珊.山姜素和豆蔻明的研究概况[J].中国野生植物资源,2007,20(6):11-15.
- [6] 本村雄四郎,高桥周七,吉田郁夫,等. *Alpinia* 属植物的成分研究[J].药学杂志,1968,88(2):239-241.

丹参饮片(产地湖北),去离子水,甲醇(色谱级,Tedia),娃哈哈纯净水,Na₂CO₃,HP 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),MP120 pH 计(METTLER TOLEDO 上海有限公司)。

1.2 供试品溶液制备

取粉碎的丹参饮片(过 20 目筛)50.0 g 5 份,分别加入含 0、0.25、0.35、0.50 g 与 0.75 g Na₂CO₃ 的水溶液 500 mL,混匀,测得五份提取液的 pH 值分别为 6.55、6.90、7.25、7.70 和 9.55。加热回流提取 1 h,其间每 10 min 取样 1 mL,过 0.45 μm 微孔滤膜后进行高效液相色谱分析。

1.3 分析方法

色谱柱 Agilent Eclipse C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm);流动相:A 相为 0.3% 甲酸水溶液,B 相为甲醇,梯度洗脱(0 min,A:B=80:20;25 min,A:B=55:45;45 min,A:B=