

水浸提多糖正交实验结果与极差分析见表 2, 方差分析表见表 3。

表 2 红松松塔多糖提取工艺正交实验结果 ($n=3$)

实验号	A	B	C	多糖得率/(mg/g)
1	1	1	1	10.1
2	1	2	2	11.5
3	1	3	3	12.2
4	2	1	2	13.1
5	2	2	3	12.7
6	2	3	1	14.7
7	3	1	3	12.3
8	3	2	1	13.5
9	3	3	2	14.1
K_1	33.81	35.49	38.31	
K_2	40.50	37.71	38.70	
K_3	39.90	41.01	37.20	
k_1	11.27	11.83	12.77	
k_2	13.50	12.57	12.90	
k_3	13.30	13.67	12.40	
R	2.23	1.83	0.5	

表 3 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	$F_{比}$	$F_{临界值}$	显著性
A	9.162	2	22.791	19	*
B	5.109	2	12.709	19	*
C	0.402	2	1	—	—
误差	0.4	2			

由表 2 和表 3 结果分析表明, 料液比、浸提温度和浸提时间对红松松塔多糖得率有显著影响。影响因素的主次顺序为: 料液比 > 浸提温度 > 浸提时间。多糖最佳提取工艺参数为: $A_2B_3C_2$, 即: 浸提温度为 100℃, 料液比为 1:12, 浸提时间为 4 h; 以所得最佳条件进行验证实验, 红松松塔多糖得率为 15.2 mg/g。

4 讨论

为了提高以多糖为有效成分的药材的利用率, 探索多糖

的提取及含量测定方法具有极其重要的意义。该试验采用传统水提醇沉的方法提取红松松塔多糖中的可溶性多糖, 建立了苯酚-硫酸比色法测定多糖的含量, 此法具有操作简单、显色稳定、灵敏度高、重现性好。

本实验采用正交法优化了红松松塔多糖的提取工艺, 该工艺具有稳定、准确、操作简单、生产成本较低的优点, 为红松松塔的进一步开发打下了良好基础。

参考文献:

- [1] Serge R, Ange B, Vincent C, et al. Composition and chemical variability of the oleoresin of *Pinus Nigra* Ssp. *Laricio* from Corsica [J]. *Ind Crops Prod*, 2005, 21: 71-79.
- [2] Sakagami H, Konno K, Sato T, et al. Induction of antimicrobial activity by antitumor substances from pine cone extract of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc [J]. *Anticancer Res*, 1988, 8 (4): 581-587.
- [3] Sakagami H, Ikeda M, Unten S, et al. Antitumor Activity of Polysaccharide Fractions from Pine Cone Extract of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc [J]. *Anticancer Res*, 1987, 7 (6): 1153-1159.
- [4] Kurakata Y, Sakagami H, Takeda M, et al. Mitogenic activity of pine cone extracts against cultured splenocytes from normal and tumor-bearing animals [J]. *Anticancer Res*, 1989, 9 (4): 961-966.
- [5] Hiroshi N, Yoshiaki I, Mineko I, et al. Suppression by a pine cone extract of *Pinus parviflora* Sieb et Zucc of mammary tumour virus in milk of mice. [J]. *Anticancer Res*, 1992, 12: 845-847.
- [6] Sakagami H, Konno K, Nonoyama M. Anti-HIV agents: U S, 4, 985 249 [P]. 1991-01-15.
- [7] Patrick K L, Janet D, Hideaki T. Modification of human immunodeficiency viral replication by pine cone extracts [J]. *Aids Res Hum Retroviruses*, 1990, 6 (2): 205-217.
- [8] Nagata K, Sakagami H, Harada H, et al. Inhibition of influenza virus infection by pine cone antitumor substances [J]. *Antiviral Res*, 1990, 13 (1): 11-21.

HPLC 同时测定没食子中没食子酸与没食子酸甲酯的含量

秦冬梅¹, 胡利萍², 张跃新²

(1 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002; 2. 新疆医科大学第一附属医院感染科, 新疆 乌鲁木齐 830054)

关键词: 没食子酸; 没食子酸甲酯; 含量测定; 高效液相色谱; 没食子

摘要: 目的: 建立同时测定没食子中没食子酸与没食子酸甲酯含量的高效液相色谱法。方法: 色谱柱为 YMC-Pack ODS-A S-5 μ m, 12 nm (250 mm $\times$ 4.6 mm), 流动相: 乙腈-0.5% 磷酸溶液 (21: 79); 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 273 nm; 柱温:

收稿日期: 2010-10-12

基金项目: 国家自然科学基金 (81060255)

作者简介: 秦冬梅 (1976 -), 女, 医学硕士, 讲师, 主要从事中药民族药研究。Tel: 13999738518

室温;进样量:10 μL 。结果:没食子酸在0.050 6~0.406 0 μg 范围内,没食子酸甲酯在0.116~1.044 μg 范围内与峰面积值呈良好的线性关系;没食子酸和没食子酸甲酯的平均回收率分别为99.8% (RSD=1.5%, $n=9$)、98.5% (RSD=1.26%, $n=9$)。结论:本方法简便可靠,结果稳定,重复性好,可作为没食子质量控制方法之一。

中图分类号:R 284.1

文献标识码:B

文章编号:1001-4528(2011)02-0353-03

没食子(*Turkish galls*)为壳斗科植物没食子树 *Quercus infectoria* Oliv. 幼枝上的干燥虫瘿,由没食子蜂科昆虫没食子蜂 *Cynips gallae-tinctoriae* Oliv. 幼虫寄生而形成。没食子是维吾尔医常用药,没食子中含有大量的可水解鞣质,具有固涩、收敛、燥湿、止血、消炎的作用^[1]。没食子鞣质多数为无定形粉末,并且具有较多的邻位酚羟基,易被氧化,因此,很难获得单体。从没食子鞣质中分离得到了单体鞣质没食子酸与没食子酸甲酯,故制订了高效液相法同时测定没食子酸与没食子酸甲酯的含量,以控制药品质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂

Waters 液相色谱仪;DK-S26 型电热恒温[水浴锅(上海精密实验设备有限公司);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);单盘光电分析天平(北京光学仪器厂, $d:0.01\text{ mg}$);实验用植物购于新疆参茸药业有限公司,品种鉴定由新疆石河子大学药学院中药系完成,没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号:831-9501);没食子酸甲酯对照品(自制),经鉴定纯度达99.42%,其 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、UV、IR 和 ESI-MS 数据与文献[2]对照一致。甲醇为色谱纯,水为重蒸水,磷酸(分析纯),甲醇(分析纯)。

1.2 色谱条件^[3]色谱柱:

YMC ODS-A C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm $S-5\text{ }\mu\text{m}$,12 nm);检测波长:273 nm;流动相:乙腈-0.5%磷酸溶液(21:79);流速:0.50 mL/min;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$ 。理论板数按没食子酸甲酯峰计算为2 100,外标法。

2 方法和结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称取没食子酸对照品适量,用甲醇定容制成含没食子酸0.050 mg/mL,精密称取没食子酸甲酯对照品适量,用甲醇定容制成含没食子酸甲酯0.130 0 mg/mL 的溶液。

2.1.2 供试品溶液的配制^[4] 取本品研细,精密称取适量(约1 g),置于棕色具塞锥形瓶中,加甲醇25 mL,密塞,超声提取30 min,放冷致室温,过微孔滤膜(0.45 μm),即得。

2.2 系统适应性试验

分别取对照品溶液、样品溶液注入色谱仪,按1.2项下色谱条件进样,1号峰为没食子酸,2号峰为没食子酸甲酯,结果见图1。

2.3 方法学验证

2.3.1 标准曲线的制备 精密吸取浓度为0.050 0 mg/mL 没食子酸与0.130 0 mg/mL 的没食子酸甲酯对照品溶液,进样量分别为0.5、2、5、8、10 μL ,在上述色谱条件下进样,以峰面积积分值(A)对进样量(μg)绘制标准曲线,没食子酸与

没食子酸甲酯分别得回归方程 $y=3\ 697\ 526x-9\ 965$ $r=0.999\ 6$; $y=4\ 434\ 792x-14\ 628$ $r=0.999\ 2$,没食子酸在0.050 6~0.406 0 μg 范围内峰面积值(y)对进样量(x)有良好线性关系,没食子酸甲酯在0.116~1.044 μg 范围内,峰面积值(y)对进样量(x)有良好线性关系。

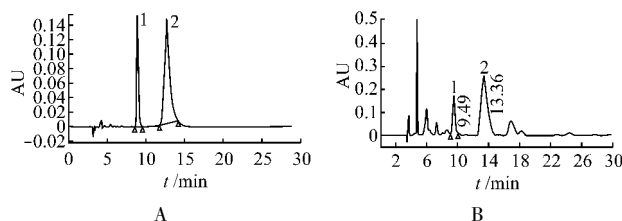


图1 对照品(A)、供试品(B)色谱图

1. 没食子酸 2. 没食子酸甲酯

2.3.2 精密度试验 精密吸取上述没食子酸与没食子酸甲酯对照品溶液10 μL ,在上述色谱条件下,按1.2项下色谱条件连续进样5次,计算含量的RSD分别为0.84%、1.05%;供试液分别连续5d测定没食子酸与没食子酸甲酯含量,计算含量的RSD分为0.95%、1.08%。

2.3.3 稳定性试验 精密吸取同一样品溶液10 μL ,分别在0、2、4、6、8、10 h进样,试验结果表明样品溶液在10 h内稳定性良好,没食子酸与没食子酸甲酯的RSD分别为1.09%、1.62%。

2.3.4 重复性试验 对同一批样品6份,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,测峰面积,并计算没食子酸与没食子酸甲酯含量。没食子酸平均含量为9.52 mg/mL, RSD为0.96%,没食子酸甲酯平均含量为2.76 mg/mL, RSD为0.71%。

2.3.5 加样回收率试验 采用加样回收法。分别称取已知含量的供试品9份,采用标准添加法精密加入对照品溶液,制备高、中、低3个浓度的溶液,依条件进行测定,计算各组分回收率。没食子酸的平均回收率为98.8%, RSD为1.50%,没食子酸甲酯的平均回收率为98.50%, RSD为1.26%。见表1。

2.4 样品含量测定

按2.1.2项下处理方法配置,依上述方法分别精密吸取供试品溶液与对照品溶液各10 μL ,注入液相色谱仪,以外标法计算样品中没食子酸与没食子酸甲酯含量,结果见表2。

3 讨论

3.1 以流动相作溶剂,在200~400 nm波长范围内测定了没食子酸紫外光谱图,结果在273 nm处有最大吸收,确定273 nm为测定波长。

3.2 溶剂的选择 本实验比较了没食子酸在甲醇与水中的

稳定性^[5-7] 结果没食子酸甲酯在甲醇中 8h 内稳定,在水中 不稳定,故选用甲醇为溶剂。

表 1 回收率试验结果

序号	对照品加入量/mg		对照品检测量/mg		回收率 A /%	平均回收 率/%	RSD/%	回收率 B /%	平均回收 率/%	RSD/%
	A	B	A	B						
0	0	0	0.304	0.291						
1	0.200	0.116	0.498	0.403	98.0			97.1		
2	0.200	0.116	0.509	0.404	101.6			97.9		
3	0.200	0.116	0.503	0.407	99.7			99.8		
4	0.300	0.232	0.598	0.518	98.0			97.8		
5	0.300	0.232	0.590	0.515	95.4	98.8	1.50	96.5	98.50	1.26
6	0.300	0.232	0.602	0.521	99.3			99.1		
7	0.400	0.348	0.702	0.637	99.3			99.5		
8	0.400	0.348	0.706	0.641	100.6			100		
9	0.400	0.348	0.696	0.632	97.4			98.0		

表 2 没食子酸与没食子酸甲酯含量测定结果(n=3)

批号	没食子酸平均		RSD/%
	含量/(mg/g)	平均含量/(mg/g)	
0901001	30.52	12.65	0.54
0901110	30.04	13.06	0.60
0901202	30.95	12.96	0.73

3.3 提取方式以及提取时间的选择 实验中考察了不同提取方式(加热回流和超声提取)、不同提取时间(30、45、60 min)。结果表明,精密加入甲醇 25 mL 超声处理 30 min,可将样品中的没食子酸提取完全^[8-10]。

3.4 建立了测定没食子中没食子酸与没食子酸甲酯的高效液相色谱法,该方法可作为测定药材和制剂中没食子酸与没食子酸甲酯含量的方法^[9-10],可作为其质量控制指标之一。

参考文献:

[1] 石 碧,狄 莹,何有节,等.鞣质的药理活性[J].中草药,1998,29(7):487.
[2] Fu F Y, Shong T M, Xu Z P. Studies on the chemical constitu-

ents of the Chinese medical drug, root of *Paeonia lactiflora* Pall [J]. *Acta Pharm Sinica*, 1963, 29 (10):555-557.
[3] 中国药典[S].一部.2005:219.
[4] 师 涛,孟宪生,罗国安. HPLC 法测定健脾养胃颗粒中厚朴酚的含量研究[J]. 中医药导报, 2008, 14(1):54-55.
[5] 任 源,堵年生. HPLC 法测定没食子中没食子酸的含量的含量[J]. 华西药理学杂志, 2005, 20(1):071-072.
[6] 丁家欣,张秋海,李淑莉. HPLC 测定虎耳草中没食子酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3):19-20.
[7] 孙国祥,刘唯芬,朱澄云,等. RP-HPLC 测定射干抗病毒注射液中原绿原酸和咖啡酸含量[J]. 中成药, 2006, 28(7):621.
[8] 周 锐. HPLC 法测定结石通茶中绿原酸的含量[J]. 中国药房, 2007, 18(27):1281.
[9] 顿 珠,刘 青,索朗其美,等. HPLC 法测定余甘子膏中没食子酸[J]. 中草药, 2010, 41(9):1477-1478.
[10] 郑 虹. 高效液相色谱测定七味红花殊胜丸中没食子酸的含量[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3):667-668.

淫羊藿动态逆流提取工艺的研究

章志雄¹, 熊富良^{2,3*}, 石召华³, 吴木琴³

(1. 湖北中医学院,湖北 武汉 430061;2. 武汉理工大学化工学院,湖北 武汉 430070;3. 武汉健民药业集团,湖北 武汉 430052)

关键词:淫羊藿;动态逆流;正交试验

摘要:目的:以乙醇为溶媒对淫羊藿药材进行提取工艺的研究。方法:用动态逆流提取的方法,选用 L₉(3⁴) 正交表,以干膏得率和淫羊藿苷含量为指标,对提取工艺进行优选,并对新旧工艺进行对比。结果:动态逆流提取工艺乙醇的用量低

收稿日期:2010-10-12

基金项目:国家十一五科技支撑计划(2006BAI06A04-03)。

作者简介:章志雄(1983-)男,在读硕士,研究方向:中药新制剂、新剂型。Tel:15172530743 E-mail:zhangzx0743@163.com

* 通讯作者:熊富良,男,教授,硕士生导师。Tel:(027)84523239 E-mail:fuliang_xiong@holley.cn