

## 反相高效液相色谱法优选黄芩中黄芩苷的提取工艺

张凤梅(北京市药品监督管理局药品认证管理中心,北京 100053)

**摘要** 目的:研究黄芩中黄芩苷的最佳提取工艺。方法:采用  $L_9(3^4)$  正交试验法考察黄芩中黄芩苷提取的各影响因素(A 乙醇浓度、B 提取时间、C 容积量),以黄芩苷含量为指标进行直观分析及方差分析,确定最佳提取工艺。结果:黄芩中黄芩苷的最佳提取工艺条件为  $A_1B_3C_3$ ,即 50% 乙醇、热回流提取 3 h、12 倍药材量的乙醇。结论:此提取工艺简单易行,稳定可行,适于黄芩的大规模提取。

**关键词** 黄芩;黄芩苷;正交试验;高效液相色谱

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2008)05-0359-03

## Optimization of extraction technology of baicalin in radix scutellariae by RP-HPLC

Zhang Feng-mei(Certification Committee for Drugs of Beijing Drug Administration, Beijing 100053, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the extraction technology of baicalin in radix scutellariae. **Methods:** The  $L_9(3^4)$  orthogonal table was employed to speculate the influence factors of the extraction by means of inspecting alcohol concentration, extracting time and solvent volume, which were the major three influence factors. Then intuitive analysis and variance analysis were used to review the index of baicalin contents, by which the optimum extraction technology could be selected. **Results:** The optimum extraction technology were 12 times of 50% alcohol, hot reflux extraction and extracting for 1 time and 3 hours each time. **Conclusion:** This optimum extraction process of baicalin in radix scutellariae is simple and repeatable and it can be used in industrial production.

**KEY WORDS** radix scutellariae; baicalin; Orthogonal design; HPLC

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis Georgi.* 的干燥根。主产于河北、山西、内蒙古、辽宁等省区。具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效。现代药理研究证明黄芩具有明显的抗菌、抗病毒、抗炎、抗过敏、抗氧化等作用,而且能镇静、降血压、降脂、保肝、利胆、抗凝血和抗血栓形成,并且具有促进细胞免疫和抗肿瘤作用<sup>[1]</sup>。黄芩苷是黄芩的有效成分之一,有抗炎、抗变态反应、抗菌、利尿、利胆、解热、降压等功效。从黄芩中提取黄芩苷的工艺研究,大多以水为溶剂进行煎煮提取<sup>[2]</sup>,收率低,生产周期长。本文以乙醇为溶剂,采用正交试验法考查各影响因素,探讨黄芩苷的最佳提取工艺。

### 1 仪器与试剂

美国戴安高效液相色谱仪, UVD340U 二极管阵列检测器, ASI-100 自动进样器, 美国迪马公司  $C_{18}$  柱; R-201 型旋转蒸发器(上海申胜生物技术有限公司); 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司); 电子分析天平(北京塞多利斯天平有限公司)。

黄芩药材(2008 年 4 月份购自哈尔滨市安丰百

姓大药房,经鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis Georgi.* 的干燥根); 黄芩苷标准品(由中国药品生物制品检定所提供,批号 110715-200514); 95% 乙醇为分析纯, 甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水。

### 2 方法与结果

#### 2.1 含量测定方法的建立

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱为迪马  $C_{18}$  柱(4.6 mm × 200 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为甲醇:磷酸溶液(pH = 3.5) = 55:45, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 280 nm<sup>[3]</sup>, 柱温为 30  $^{\circ}$ C。

**2.1.2 对照品溶液制备** 精密称取黄芩苷对照品 3.00 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解定容, 摇匀, 即得每 1 mL 含 0.06 mg 的黄芩苷对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液制备** 分别精密量取各组提取液 100  $\mu$ L, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 用 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过, 即得。

#### 2.1.4 方法学考察

**2.1.4.1 线性关系考察** 按上述色谱条件分别取以上对照品溶液(0.06 mg/mL) 进样 2、4、6、8、10  $\mu$ L, 以峰面积积分值(Y)为纵坐标, 黄芩苷含量(X)

为横坐标进行线性回归,得回归方程  $Y = 49.94X + 0.76$  ( $r = 0.9999$ )。结果表明,黄芩苷在  $0.12 \sim 0.6 \mu\text{g}$  范围内线性关系良好,结果见表1。

表1 线性关系范围考察结果

进样量( $\mu\text{L}$ )	黄芩苷的量( $\mu\text{g}$ )	峰面积
2	0.12	51.8
4	0.24	99.7
6	0.36	150.5
8	0.48	199.1
10	0.60	251.8

**2.1.4.2 精密度试验** 精密吸取黄芩苷对照品溶液( $0.06 \text{ mg/mL}$ ),连续进样5次,按上述色谱条件测定峰面积, $RSD$ 为 $0.23\%$  ( $n=5$ ),表明本实验精密度良好,结果见表2。

表2 精密度试验结果

进样号	峰面积	峰面积平均值	$RSD(\%)$
1	250.6		
2	248.2		
3	250.1	250.1	0.23
4	251.9		
5	249.8		

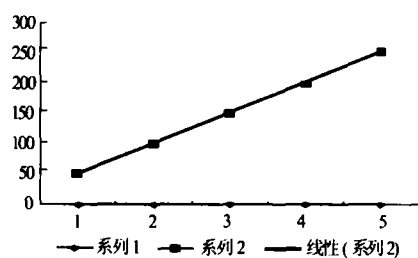


图1 线性关系考察图

**2.1.4.3 稳定性试验** 精密吸取黄芩苷对照品溶液( $0.06 \text{ mg/mL}$ ),于 $0, 2, 4, 6, 8, 10 \text{ h}$ 各进样 $10 \mu\text{L}$ ,按上述色谱条件测定峰面积, $RSD$ 为 $0.52\%$  ( $n=6$ ),表明对照品溶液在 $10 \text{ h}$ 内基本稳定,结果见表3。

表3 稳定性试验结果

进样号	黄芩苷峰面积	峰面积平均值	$RSD(\%)$
1	250.5		
2	250.1		
3	250.6	249.8	0.52%
4	249.8		
5	248.7		
6	249.1		

**2.1.4.4 重现性试验** 取同一批样品5份,按1组的方法提取和测定黄芩苷的含量,结果 $RSD$ 为 $0.73\%$ ,表明重现性良好,结果见表4。

**2.1.4.5 回收率实验** 精密量取已知含量的供试品溶液(黄芩苷含量为 $0.2706 \text{ mg/mL}$ )5份,每份 $1.0$

$\text{mL}$ ,再分别加入一定量的黄芩苷对照品,按“供试品溶液制备”项下方法处理,计算加样回收率。结果黄芩苷加样回收率为 $99.82 \pm 1.31\%$ , $RSD$ 为 $1.07\%$  ( $n=5$ ),表明该含量测定结果准确,结果见表5。

表4 重现性试验结果

进样号	峰面积	峰面积平均值	$RSD(\%)$
1	105.1		
2	103.2		
3	106.7	105.1	0.73
4	108.1		
5	102.6		

表5 加样回收率试验结果

进样序号	样品量( $\mu\text{g}$ )	加样量( $\mu\text{g}$ )	测得量( $\mu\text{g}$ )	回收率( $\%$ )	平均回收率( $\%$ )	$RSD(\%)$
1	270.6	301	568.2	98.87		
2	270.6	297	570.2	100.88		
3	270.6	300	571.3	100.23	99.82	1.07
4	270.6	303	569.1	98.51		
5	270.6	296	568.4	100.61		

**2.2 正交试验优选黄芩中黄芩苷的提取工艺** 根据预试验结果,选取乙醇浓度(A)、提取时间(B)、溶剂量(C)3个试验因素,每个因素3个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。每组精密称定黄芩粉末(40目)30g,加一定浓度乙醇一定量,加热回流一定时间,放冷,滤过,滤液置 $100 \text{ mL}$ 容量瓶中,用少量相应乙醇分次洗涤容器和残渣,合并,加相应乙醇至刻度,摇匀。各组按具体方案分别进行提取,并按“供试品溶液制备”项下方法制备相应的供试品溶液。按上述色谱条件,每个样品进样 $10 \mu\text{L}$ ,测定峰面积积分值,根据标准曲线计算各供试品中黄芩苷的含量,黄芩苷对照品及样品HPLC图谱见图2,图3。因素水平安排见表6,正交试验结果见表7,表8。

表6 正交实验因素水平

水平	因素		
	A 乙醇浓度( $\%$ )	B 提取时间(h)	C 溶剂量(倍)
1	50	1	8
2	70	2	10
3	90	3	12

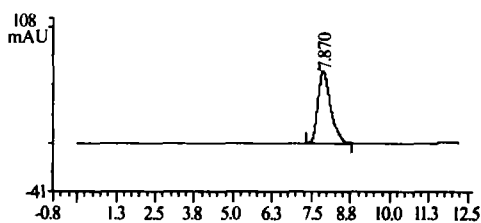


图2 黄芩苷对照品高效液相色谱图

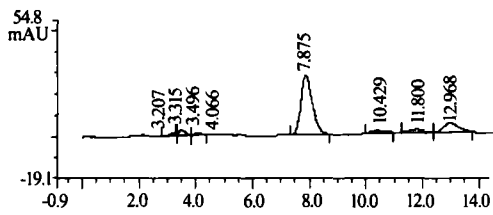


图3 黄芩高效液相色谱图

表7 黄芩中黄芩苷醇提工艺正交试验结果

编号	A	B	C	D(误差)	黄芩苷含量(%)
1	1	1	1	1	8.33
2	1	2	2	2	9.01
3	1	3	3	3	9.46
4	2	1	2	3	8.67
5	2	2	3	1	8.94
6	2	3	1	2	8.66
7	3	1	3	2	5.6
8	3	2	1	3	5.89
9	3	3	2	1	6.07
K <sub>1</sub>	8.93	7.53	7.62	7.78	
K <sub>2</sub>	8.76	7.95	7.92	7.76	
K <sub>3</sub>	5.85	8.06	8.00	8.01	
R	3.08	1.07	0.38	0.25	

表8 正交试验方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P
A	17.947	2	8.97	156.849	<0.01
B	0.465	2	0.23	4.067	
C	0.230	2	0.12	2.013	
误差	0.114	2	0.06		

$F_{0.05(2,2)} = 19.00, F_{0.01(2,2)} = 99.00$

从直观分析结果来看,各因素对黄芩苷提取率的影响程度为A>B>C,即乙醇浓度>提取时间>

溶剂量。结合均值,  $A_1 > A_2 > A_3, B_3 > B_2 > B_1, C_3 > C_2 > C_1$ ,最佳提取条件为:  $A_1B_3C_3$ ,即乙醇浓度为50%、提取时间为3h、溶剂量为12倍时是最佳提取工艺条件。由方差分析结果可知,乙醇浓度对黄芩苷的提取率有显著性影响,提取时间、溶剂量对黄芩苷的提取率无显著性影响。

### 3 讨论

为考察上述优选提取工艺的稳定性,按该工艺条件重复试验3次,分别测定其黄芩苷的含量,得到黄芩苷含量分别为9.53%,9.37%,9.49%。通过验证实验,黄芩苷的提取率比较稳定,说明所选的工艺是稳定而有效的,适合继续放大生产。

由实验结果可知,从黄芩中提取黄芩苷的影响因素中以乙醇浓度影响最大,而溶剂量及提取时间的影响则相对较小。

目前药品生产企业更改工艺现象普遍,原因之一是生产工艺的适用性较差。建议在注册报批含黄芩药材或饮片的新品种时,要根据科学试验结果,适当减少提取的溶剂量及提取时间,从而在今后的大生产中,能够在提高有效成分回收率的同时,节省生产成本,缩短生产周期,适合于放大生产,减少在后期规模生产带来的工艺变更等现象的发生。

### 参考文献:

- [1] 邱秀梅,肖秀玲,严绥平. 黄芩药理学作用研究进展[J]. 内蒙古中医药,2007,26(4):57.
- [2] 商萍,刘智. 黄芩苷水提工艺研究[J]. 黑龙江医药,2007,20(1):36.
- [3] 中国药典2005年版.一部[S].2005:211.

收稿日期:2008-03-28

(上接第358页)

从液相色谱图中可以看到盐酸林可霉素分离度良好,林可霉素乳膏中其它成分不干扰盐酸林可霉素的测定。

**3.2 提取盐酸林可霉素时采用超声提取后冷藏处理的办法,文献报道<sup>[6]</sup>盐酸林可霉素在高于60℃条件下不稳定,本法即可在超声时使盐酸林可霉素提取完全又可避免温度过高对盐酸林可霉素的影响,同时通过冷藏可除去制剂中的基质,减少对色谱柱的污染。**

**3.3 高效液相色谱法测定林可霉素乳膏中盐酸林可霉素的含量,具有简便、快捷、准确、重现性好等优点,适用于林可霉素乳膏的质量控制。**

### 参考文献:

- [1] 朱建平,张菁,高艳霞,等. 分光光度法测定盐酸林可霉素、盐酸麻黄碱、克林霉素磷酸酯三种胶囊剂的含量[J]. 中国药理学杂志,1999,34(7):498.
- [2] 中国药典1990年版.二部[S].1990:496.
- [3] 中国药典2000年版.二部[S].2000:630.
- [4] 魏国义,魏京海,钱春风,等. RP-HPLC法测定林麻滴鼻剂中盐酸林可霉素和盐酸麻黄碱的含量[J]. 药物分析杂志,2003,23(4):332.
- [5] 中国药典2005年版.二部[S].2005:531.
- [6] 王文清,汪秋兰,黄泽中,等. 盐酸林可霉素凝胶的稳定性考察[J]. 医药导报,2005,24(4):332.

收稿日期:2007-10-15