

固定化蜗牛酶同时生物转化淫羊藿中4种黄酮苷

彭 静^{1,2}, 马益华¹, 陈 彦^{1,2*}, 刘聪燕¹, 高 霞^{1,2}, 周 静¹

(1. 中国中医科学院江苏分院中药组分与微生态研究中心, 江苏 南京 210028; 2. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028)

摘要: **目的** 采用固定化蜗牛酶同时生物转化淫羊藿 *Epimedii Folium* 中4种黄酮苷, 并对工艺进行优化。**方法** 交联-包埋法制备固定化蜗牛酶, 单因素试验优化生物转化工艺, HPLC法测定转化率, LC-MS/MS法鉴定转化产物。**结果** 在最佳条件(pH值5, 温度50℃, 蜗牛酶与底物比例1:1, 底物质量浓度1.0 mg/mL, 转化时间2 h)下, 朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷可分别转化为箭藿苷A、箭藿苷B、鼠李糖基淫羊藿次苷Ⅱ, 以及宝藿苷I和淫羊藿苷元(两者均为淫羊藿苷转化产物), 平均转化率分别为73.69%、74.01%、73.46%、75.52%。**结论** 该工艺稳定简单, 重复性好, 可用于淫羊藿中4种黄酮苷的高效转化。

关键词: 淫羊藿; 朝藿定A; 朝藿定B; 朝藿定C; 淫羊藿苷; 固定化蜗牛酶; 生物转化

中图分类号: Q55

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)09-1984-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.09.023

Simultaneous biotransformation of four flavonoid glycosides in *Epimedii Folium* by immobilized snailase

PENG Jing^{1,2}, MA Yi-hua¹, CHEN Yan^{1,2*}, LIU Cong-yan¹, GAO Xia^{1,2}, ZHOU Jing¹

(1. Multi-component of Traditional Chinese Medicine and Microecology Research Center, Jiangsu Branch of China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanjing 210028, China; 2. Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

ABSTRACT: AIM To apply immobilized snailase to the simultaneous biotransformation of four flavonoid glycosides in *Epimedii Folium* and to optimize the processing. **METHODS** Immobilized snailase was prepared by crosslink-embedding method. Single factor test was applied to optimizing the biotransformation technology. The conversion rate was determined by HPLC. LC-MS/MS was then adopted in the identification of converted products. **RESULTS** Under the optimal conditions (5 for pH value, 50℃ for temperature, 1:1 for ratio of snailase to substrate, 1.0 mg/mL for substrate concentration, and 2 h for conversion time), epimedin A, epimedin B, epimedin C and icarrin could be transformed into sagittatoside A, sagittatoside B, 2''-O-rhamnosylcariside II, together with baohuoside I and icaritin (both of them were the converted products of icarrin), whose average conversion rates were 73.69%, 74.01%, 73.46% and 75.52%, respectively. **CONCLUSION** This technology was stable and simple with good reproducibility, which can be used for the efficient transformation of four flavonoid glycosides in *Epimedii Folium*.

KEY WORDS: *Epimedii Folium*; epimedin A; epimedin B; epimedin C; icarrin; immobilized snailase; biotransformation

收稿日期: 2015-09-17

基金项目: 国家自然科学基金(81173557); 中国中医科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(ZZ08080016)

作者简介: 彭 静(1989—), 女, 硕士生, 从事中药药剂学研究。Tel: 18351895657, E-mail: pengjing5657@163.com

* 通信作者: 陈 彦(1968—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事生物药剂学及中药新型给药系统研究。Tel: 13805157904, E-mail: ychen202@hotmail.com

淫羊藿 *Epimedii Folium* 始载于《神农本草经》，历代本草均有记载，是传统补益中药，具有补肾阳、强筋骨、祛风湿等作用^[1]，淫羊藿总黄酮为其主要药效成分，主要为朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷 4 种黄酮苷^[2]，但其在肠道中的吸收均较差^[3]，口服后经肠道酶和肠道菌水解，分别转化为箭藿苷 A、箭藿苷 B、鼠李糖基淫羊藿次苷 II，以及宝藿苷 I 和淫羊藿苷元（两者均为淫羊藿苷转化产物），主要以代谢产物形式被吸收，从而发挥出良好的药效作用^[4-5]。

前期，本课题组利用游离酶在仿生条件下生物转化这 4 种黄酮苷，并分析其转化过程，同时研究了固定化酶体外生物转化淫羊藿苷单体成分。本实验进一步采用固定化蜗牛酶，同时生物转化淫羊藿中的黄酮苷成分（朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷），并优化其工艺条件，以期充分利用淫羊藿总黄酮原料药和固定化蜗牛酶的酶活，提高该类成分的生物转化效率。

1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；岛津 LC-20A 高效液相色谱仪（日本岛津公司）；API 4000 三重四级杆质谱仪（美国应用生物系统公司）；Foxy R2 自动馏分收集仪（美国 ISCO 公司）；Mettler AL204 电子分析天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；THZ-82AHS 气浴恒温恒速振荡器（江苏金坛市金城国胜实验仪器厂）；40SH 千分尺（德国马尔公司）。

朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、箭藿苷 A、箭藿苷 B、鼠李糖基淫羊藿次苷 II、宝藿苷 I、淫羊藿苷元对照品（上海源叶生物科技有限公司，含有量 ≥ 99%，批号分别为 20110618、20110520、20110703、20110206、20120406、20120213、20120517、20120222、20120420，结构见图 1）；淫羊藿总黄酮（自制，主要含有淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C，含有量 70%）；蜗牛酶（破壁率 90%，上海源叶生物科技有限公司，批号 JJ0703TA14）。海藻酸钠、BaCl₂、戊二醛（国药集团化学试剂有限公司）；甲醇、乙腈均为色谱纯；水为超纯水；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 淫羊藿总黄酮 HPLC 测定方法

2.1.1 色谱条件 Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相乙腈-水，梯度洗脱(0 ~

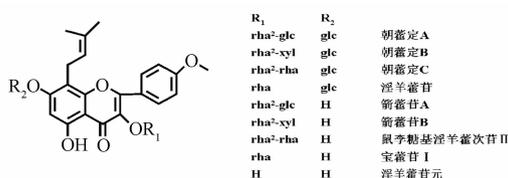
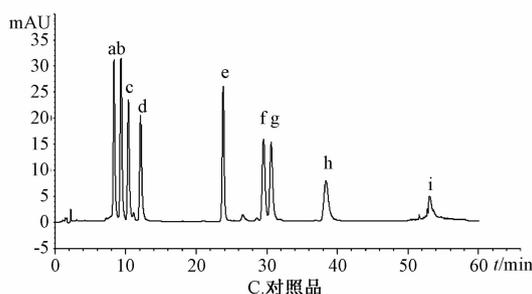
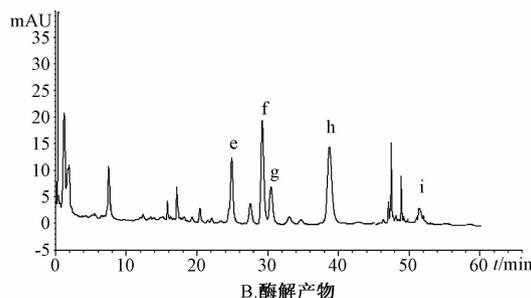
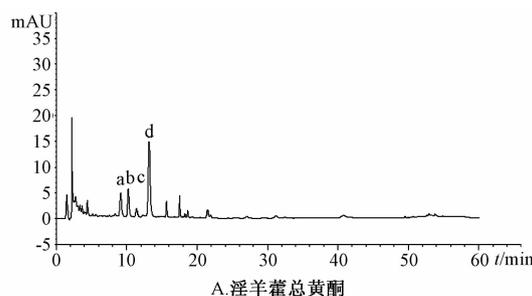


图 1 各对照品结构式

Fig. 1 Structures of various reference substances

10 min, 25% 乙腈; 10 ~ 15 min, 25% ~ 34% 乙腈; 15 ~ 41 min, 34% 乙腈; 41 ~ 47 min, 34% ~ 48% 乙腈; 47 ~ 50 min, 48% ~ 85% 乙腈; 50 ~ 55 min, 85% 乙腈); 检测波长 270 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。HPLC 色谱图见图 2。



- a. 朝藿定 A b. 朝藿定 B c. 朝藿定 C d. 淫羊藿苷 e. 箭藿苷 A f. 箭藿苷 B g. 鼠李糖基淫羊藿次苷 II h. 宝藿苷 I i. 淫羊藿苷元
a. epimedin A b. epimedin B c. epimedin C d. icariin e. sagittatoside A f. sagittatoside B g. 2''-O-rahmonosylarside II h. baohuoside I i. anhydroicartin

图 2 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms

2.1.2 供试品溶液的制备 取淫羊藿总黄酮转化后的混悬液 100 μL ，加入 900 μL 甲醇终止反应，涡旋后以 13 000 r/min 转速离心 10 min，取上清液，0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.1.3 标准曲线绘制 甲醇分别精密配制朝藿定 A、箭藿苷 A、朝藿定 B 和箭藿苷 B 对照品溶液 (256.0、128.0、64.0、32.0、16.0、8.0、4.0、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，朝藿定 C 和鼠李糖基淫羊藿次苷 II 对照品溶液 (256.0、128.0、64.0、32.0、16.0、8.0、4.0、2.0、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，淫羊藿苷和宝藿苷 I 对照品溶液 (640.0、320.0、160.0、80.0、40.0、20.0、10.0、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，淫羊藿苷元对照品溶液 (256.0、128.0、64.0、32.0、16.0、8.0、4.0、2.0、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，以对照品质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标 (x)，峰面积为纵坐标 (y) 进行线性回归，结果见表 1。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

| 成分 | 回归方程 | r | 线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) |
|--------------|------------------------|---------|---|
| 朝藿定 A | $y = 6.773x + 9.348$ | 0.999 8 | 2.0 ~ 256.0 |
| 朝藿定 B | $y = 8.122x + 14.784$ | 0.999 8 | 2.0 ~ 256.0 |
| 朝藿定 C | $y = 7.832x + 22.503$ | 0.999 5 | 1.0 ~ 256.0 |
| 淫羊藿苷 | $y = 11.101x + 11.273$ | 0.999 9 | 5.0 ~ 640.0 |
| 箭藿苷 A | $y = 11.476x + 5.283$ | 0.999 9 | 2.0 ~ 256.0 |
| 箭藿苷 B | $y = 13.087x - 2.621$ | 0.999 9 | 2.0 ~ 256.0 |
| 鼠李糖基淫羊藿次苷 II | $y = 12.873x + 4.692$ | 0.999 9 | 1.0 ~ 256.0 |
| 宝藿苷 I | $y = 14.040x + 48.695$ | 0.999 5 | 5.0 ~ 640.0 |
| 淫羊藿苷元 | $y = 4.662x - 0.859$ | 0.999 8 | 1.0 ~ 256.0 |

2.2 固定化蜗牛酶的制备 采用交联-包埋法^[6-7]，精密称取蜗牛酶 40 mg，溶于 10 mL 水中，加入 0.1% 戊二醛充分混匀，静置 20 min，将酶液与 90 mL 1.5% 海藻酸钠水溶液均匀混合至终质量浓度为 0.4 mg/mL。将无痛针头固定于距液面 4 cm 处，以 2.0 mL/min 滴速将混匀液滴入搅拌转速为 100 r/min 的 1.0% BaCl_2 溶液中，滴加结束后静置固化 10 min，取出固定化蜗牛酶海藻酸钡球，蒸馏水洗涤 3 次，4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。其外观圆整均一，直径 1 ~ 2 mm，圆整度可达 98.47%。

2.3 生物转化工艺优化

2.3.1 pH 值对生物转化工艺的影响 取固定化蜗牛酶适量，以淫羊藿总黄酮为底物，在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下，选择不同 pH 值 (2、3、4、5、6、7、8)，蜗牛酶 (其质量为实际结合游离酶的质量，下同) 与底物比例 1 : 1，底物质量浓度 1.0 mg/mL，在 10 mL 酶

解体系中反应 1 h 后取样，甲醇终止反应，HPLC 测定 4 种黄酮苷的生物转化情况，计算转化率，公式为转化率 = (反应初始该成分质量 - 反应终止该成分质量) / 反应初始该成分质量 $\times 100\%$ 。结果见图 3。

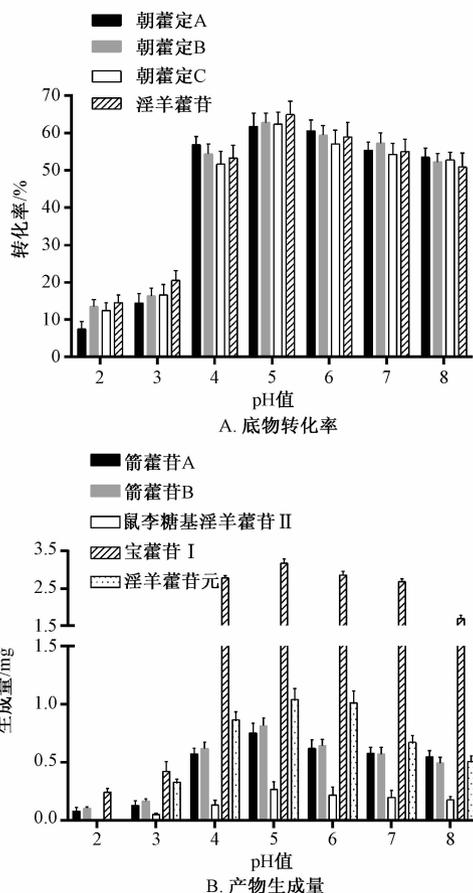


图 3 pH 值对生物转化工艺的影响 ($n = 3$)

Fig. 3 Effect of pH value on the biotransformation technology ($n = 3$)

由图可知，pH 2 ~ 3 时，转化率较低；pH 为 4 时，转化率显著升高，达到 50% 以上；pH 为 5 时，转化率最大，约为 65%；pH 5 ~ 8 时，转化率略有降低，但仍保持在 50% 以上。其酶解产物箭藿苷 A、箭藿苷 B、鼠李糖基淫羊藿次苷 II、宝藿苷 I、淫羊藿苷元均在 pH 2 ~ 3 时生成量较少，在 pH 为 4 时随转化率升高而增多，在 pH 为 5 时最多，在 pH 5 ~ 8 时随转化率缓慢降低而略微减少。因此，最佳 pH 值为 5，而且其范围较宽。

2.3.2 温度对生物转化工艺的影响 取固定化蜗牛酶适量，以淫羊藿总黄酮为底物，在 pH 为 5 时，选择不同温度 (4、25、37、50、60 $^{\circ}\text{C}$)，蜗牛酶与底物比例 1 : 1，底物质量浓度 1.0 mg/mL，

在 10 mL 酶解体系中反应 1 h 后取样, 甲醇终止反应, HPLC 测定 4 种黄酮苷的生物转化情况, 计算转化率, 公式同“2.3.1 项”。结果见图 4。

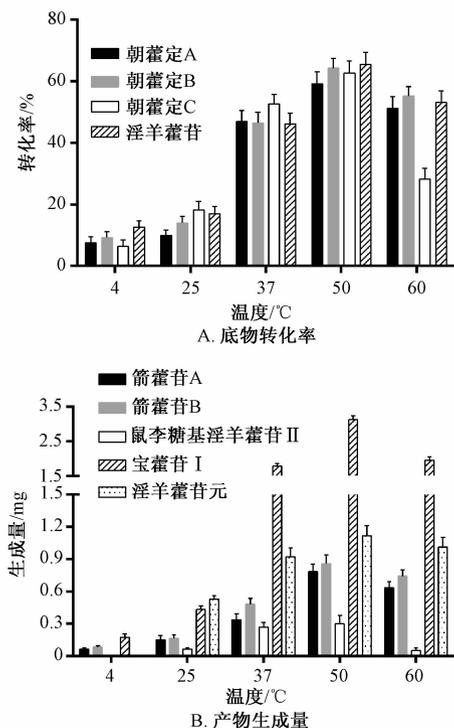


Fig. 4 Effect of temperature on the biotransformation technology (n=3)

由图可知, 温度小于 25 °C 时, 转化率较低, 未达到 20%, 表明低温显著抑制了酶活力; 随着温度升高, 转化率迅速增加, 于 50 °C 时最大, 约为 65%; 50~60 °C 时, 转化率缓慢降低。温度小于 25 °C 时, 生成量较少; 随着转化率增加, 生成量上升, 于 50 °C 时最大; 50~60 °C 时, 生成量随转化率的降低而减少。因此, 最佳温度为 50 °C。

2.3.3 蜗牛酶与底物比例对生物转化工艺的影响

取固定化蜗牛酶适量, 以淫羊藿总黄酮为底物, 在 50 °C 下, 于 pH 5 的磷酸缓冲盐溶液中, 选择蜗牛酶与底物不同比例(0.5:1、1:1、2:1、3:1、4:1), 底物质量浓度 1.0 mg/mL, 在 10 mL 酶解体系中反应 1 h 后取样, 甲醇终止反应, HPLC 法测定 4 种黄酮苷的生物转化情况, 计算转化率, 公式同“2.3.1”项。结果见图 5。

由图可知, 蜗牛酶与底物比例在 0.5:1~1:1 时, 转化率均缓慢升高; 在 1:1 时, 转化率最大, 约为 65%; 进一步增加比例后, 转化率迅速降低至最大值的 1/2 左右。蜗牛酶与底物比例在

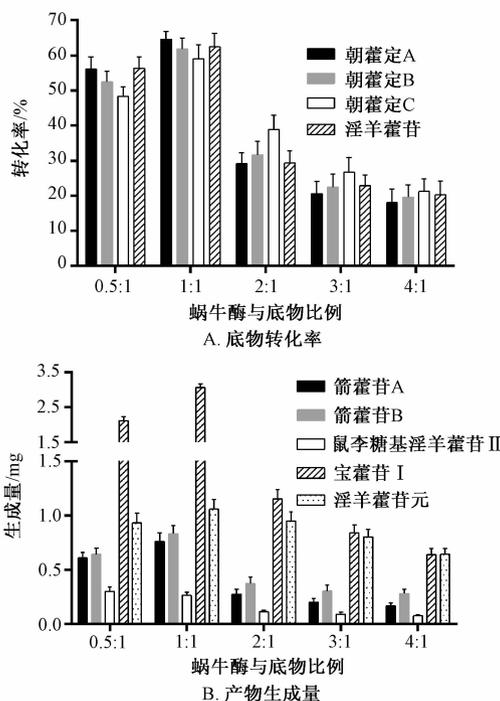


Fig. 5 Effect of ratio of snailase to substrate on the biotransformation technology (n=3)

0.5:1~1:1 时, 生成量随转化率升高而缓慢增加; 在 2:1~4:1 时, 生成量均随转化率降低而减少; 在 1:1 时, 生成量最大。因此, 蜗牛酶与底物最佳比例为 1:1, 这可能与酶在反应体系中的饱和作用有关, 在比例大于 1:1 时, 酶量呈现饱和; 在比例为 2:1 时, 由于酶量过多, 出现了竞争抑制作用, 影响了酶的活性, 从而降低其对底物的转化和产物的生成。

2.3.4 底物质量浓度对生物转化工艺的影响

取固定化蜗牛酶适量, 以淫羊藿总黄酮为底物, 在 50 °C 下, 于 pH 5 的磷酸缓冲盐溶液中, 蜗牛酶与底物比例 1:1, 选择底物质量浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mg/mL, 在 10 mL 酶解体系中反应 1 h 后取样, 甲醇终止反应, HPLC 测定 4 种黄酮苷的生物转化情况。结果见图 6。

由图可知, 底物质量浓度为 0.2 mg/mL 时, 4 种黄酮苷的转化率均最大, 而且均随底物质量浓度增大而略有降低, 这是由于淫羊藿总黄酮水溶性较差, 在其质量浓度较小时, 酶与该成分的接触更加充分, 有利于酶活的发挥。另外, 4 种黄酮苷的转化量和产物生成量均随着底物质量浓度的增大而上升, 在 2.0 mg/mL 时均达到最大。由于在

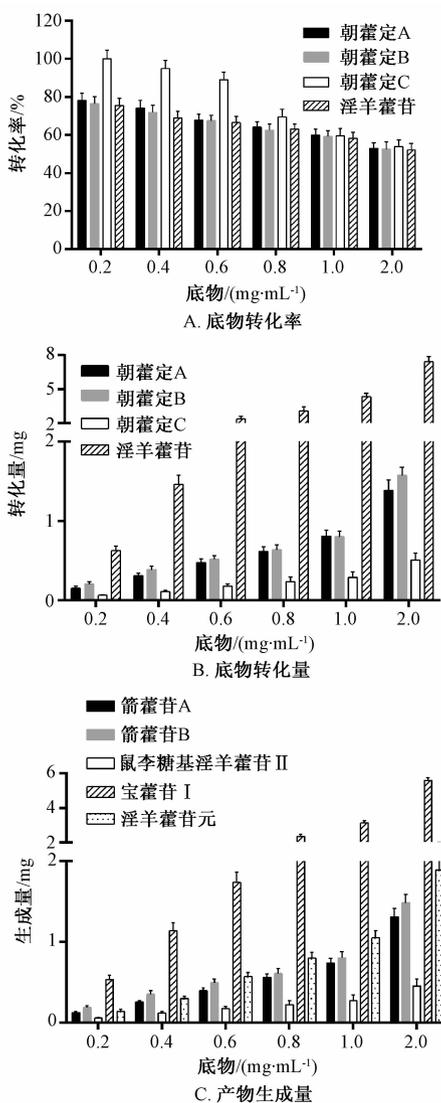


图6 底物质量浓度对生物转化工艺的影响 (n=3)
Fig. 6 Effect of substrate concentration on the biotransformation technology (n=3)

1.0 mg/mL时, 底物转化率和转化量的乘积最大, 即单位时间内底物转化量最多, 故底物最佳质量浓度为1.0 mg/mL。

2.3.5 转化时间和转化次数对生物转化工艺的影响 取固定化蜗牛酶适量, 以淫羊藿总黄酮为底物, 在50℃下, 于pH 5的磷酸缓冲盐溶液中, 蜗牛酶与底物比例1:1, 底物质量浓度1.0 mg/mL, 在10 mL酶解体系中反应4 h, 每1 h取样一次, 甲醇终止反应, HPLC测定4种黄酮苷的生物转化情况。再将蜗牛酶从酶解反应系统中分离, 蒸馏水充分冲洗3次, 在相同条件下反应1 h后取样, HPLC测定4种黄酮苷的生物转化情况。结果见图7。

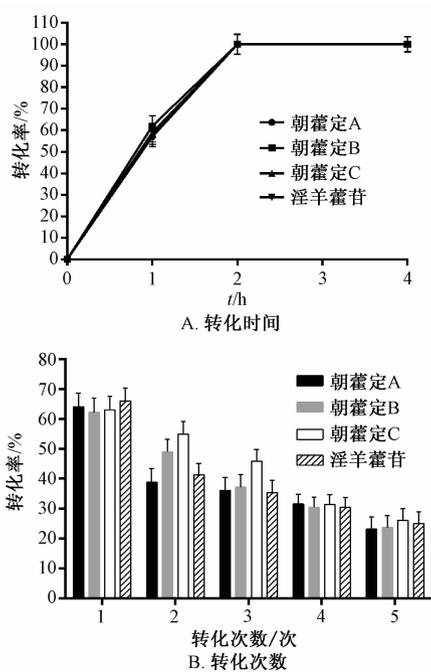


图7 转化时间和转化次数对生物转化工艺的影响 (n=3)
Fig. 7 Effects of conversion time and conversion times on the biotransformation technology (n=3)

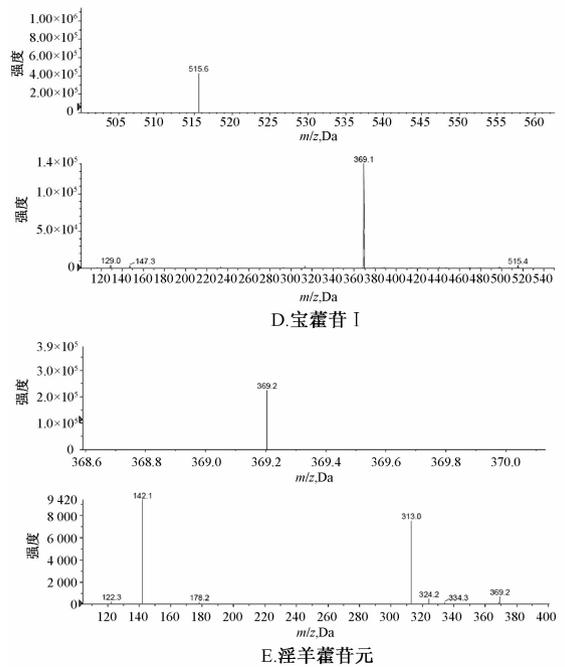
由图可知, 4种黄酮苷均在2 h内酶解转化完全, 首次转化1 h的转化率均为60%左右, 经过5次转化后约为30%, 保持首次转化率的50%, 仍可有效同时转化。因此, 最佳转化时间为2 h, 最佳转化次数为5次。

2.3.6 优化工艺验证 取淫羊藿总黄酮3份, 按最佳转化工艺进行酶解, 即pH值5, 温度50℃, 蜗牛酶与底物比例1:1, 底物质量浓度1.0 mg/mL, 转化时间2 h, 转化5次, HPLC法测得朝藿定A转化率分别为73.47%、73.92%、73.68%, 平均值73.69%; 朝藿定B分别为74.02%、73.92%、74.08%, 平均值74.01%; 朝藿定C分别为73.47%、73.52%、73.38%, 平均值73.46%; 淫羊藿苷分别为75.47%、75.52%、75.58%, 平均值75.52%, 表明该工艺稳定, 重复性好。

2.4 转化产物的结构鉴定 固定化蜗牛酶转化朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷的产物分别为箭藿苷A、箭藿苷B、鼠李糖基淫羊藿苷II, 以及宝藿苷I和淫羊藿苷元(两者均为淫羊藿苷转化产物), 本实验转化产物利用LC-MS/MS法进行鉴定, 结果见图8, 与文献[8]一致。

准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 677.3 与箭藿苷

A 相对分子质量吻合, 其二级质谱中脱去葡萄糖得到离子碎片 m/z 515.1, 再脱去鼠李糖得到离子碎片 m/z 369.1, 见图 8A; 准分子离子峰 $[M + H]^+$ m/z 647.3、 $[M + K]^+$ m/z 685.5 与箭藿昔 B 相对分子质量吻合, 其二级质谱中脱去木糖得到离子碎片 m/z 515.0, 再脱去鼠李糖得到离子碎片 m/z 369.2, 见图 8B。准分子离子峰 $[M + H]^+$ m/z 661.4、 $[M + K]^+$ m/z 699.4、 $[M + Na]^+$ m/z 683.5 与鼠李糖基淫羊藿次苷 II 相对分子质量吻合, 其二级质谱中脱去葡萄糖得到离子碎片 m/z 515.1, 再脱去鼠李糖得到离子碎片 m/z 369.1, 见图 8C。准分子离子峰 $[M + H]^+$ m/z 515.6 与宝藿昔 I 相对分子质量吻合, 其二级质谱中脱去鼠李糖得到离子碎片 m/z 369.1, 见图 8D。准分子离子峰 $[M + H]^+$ m/z 369.2 与淫羊藿昔元相对分子质量吻合, 其二级质谱中脱去基团 $-C_4H_7$ 得到离子碎片 m/z 313.0, 见图 8E。



注: 每张小图上方均为一级质谱, 下方均为二级质谱

图 8 LC-MS/MS 色谱图

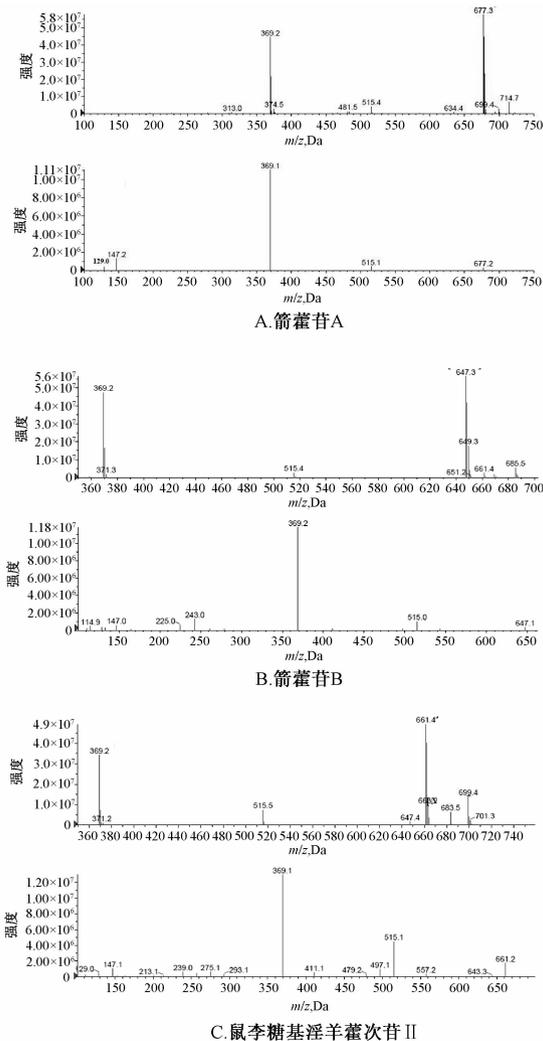
Fig. 8 LC-MS/MS chromatograms

3 讨论

蜗牛酶经固定化后, 可通过离心、过滤等方法分离^[9-10], 经过 5 次回收循环利用后, 其转化淫羊藿黄酮苷的效率仍可保持原来的 50%, 催化作用显著。而且, 固定化酶延长了酶的使用寿命, 减小了环境变化对酶活的影响, 对酶具有保护作用^[11-12], 有利于扩大其适用范围, 从而满足大规模生产的要求^[13-14]。本实验将固定化蜗牛酶用于同时生物转化淫羊藿中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿昔, 并筛选出最佳工艺条件, 保证 4 种黄酮苷的高效转化, 充分利用淫羊藿总黄酮原料药和固定化蜗牛酶酶活, 达到该成分经济高效、简便稳定转化的目的。然而, 该工艺也存在底物质量浓度低、生成产物被吸附等问题, 故需要研究提高其质量浓度的方法, 如通过双相酶解体系减弱吸附作用, 还可采用其他载体材料固定蜗牛酶, 提高其重复使用次数, 具体有待今后作进一步探索。

参考文献:

- [1] 高霞, 刘璇, 陈彦, 等. 淫羊藿总黄酮的生物转化过程分析[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(23): 4079-4083.
- [2] 贾晓斌, 兰雪莲, 陈彦, 等. 淫羊藿黄酮类成分抗骨质疏松作用及其机制研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(3): 269-270.



- [3] 陈彦, 贾晓斌, Hu M, 等. Caco-2 细胞单层研究淫羊藿黄酮类成分的吸收转运 [J]. 中草药, 2009, 40 (2): 220-224.
- [4] Chen Y, Wang J, Jia X, *et al.* Role of intestinal hydrolase in the absorption of prenylated flavonoids present in Yinyanghuo [J]. *Molecules*, 2011, 16(2): 1336-1348.
- [5] 陈彦, 谭晓斌, 范晨怡, 等. 大鼠在体肠灌流模型研究淫羊藿不同黄酮苷的吸收代谢 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2928-2931.
- [6] Corporation H P. Kinetic characterization and effect of immobilized thermostable β -glucosidase in alginate gel beads on sugarcane juice [J]. *ISRN Biochemistry*, 2014, 2014: 178498.
- [7] Tsai C T, Meyer A S. Enzymatic cellulose hydrolysis: enzyme reusability and visualization of β -glucosidase immobilized in calcium alginate [J]. *Molecules*, 2014, 19(12): 19390-19406.
- [8] Zhou J, Chen Y, Wang Y, *et al.* A comparative study on the metabolism of *Epimedium koreanum* Nakai-prenylated flavonoids in rats by an intestinal enzyme (lactase phlorizin hydrolase) and intestinal flora [J]. *Molecules*, 2013, 19(1): 177-203.
- [9] Zhang X, Guan R F, Wu D Q, *et al.* Enzyme immobilization on amino-functionalized mesostructured cellular foam surfaces, characterization and catalytic properties [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2005, 33(1): 43-50.
- [10] Khoshnevisan K, Bordbar A K, Zare D, *et al.* Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability [J]. *Chem Eng J*, 2011, 171(2): 669-673.
- [11] 于兆慧, 刘其媛, 崔莉, 等. 微球固定化蜗牛酶转化人参皂苷 Rb₁ 制备人参稀有皂苷 Compound K 研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3092-3097.
- [12] Ruan G H, Wei M P, Chen Z Y, *et al.* Novel regenerative large-volume immobilized enzyme reactor: preparation, characterization and application [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 967: 13-20.
- [13] 李彦锋, 李军荣, 伏莲娣. 固定化酶的制备及应用 [J]. 高分子通报, 2009(2): 13-17.
- [14] Zheng P, Wang J, Lu C, *et al.* Immobilized β -glucosidase on magnetic chitosan microspheres for hydrolysis of straw cellulose [J]. *Process Biochem*, 2013, 48(4): 683-687.

强力天麻杜仲胶囊的 HPLC 特征图谱

张锦^{1,2}, 刘俊宏^{1,2}, 赵珊^{1,3}, 王爱民^{1,2}, 李霞⁴, 何迅^{1,3*}, 李勇军^{1,3*}

(1. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州宏宇药业有限公司, 贵州 贵阳 550018)

摘要: 目的 建立强力天麻杜仲胶囊(天麻、杜仲、独活等)的 HPLC 特征图谱。方法 强力天麻杜仲胶囊 70% 乙醇提取液的分析采用 Cortecstm C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 2.7 μ m); 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 检测波长 220 nm。结果 该药物碱性、酸性乙酸乙酯部位的 HPLC 特征图谱分别有 28 个和 18 个共有峰, 鉴定出 3 个(天麻素、紫花前胡苷、7-羟基香豆素)和 4 个(没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、紫云英苷)色谱峰, 10 批样品特征图谱相似度为 0.85 ~ 0.99。结论 该方法准确可靠, 可用于强力天麻杜仲胶囊的质量控制。

关键词: 强力天麻杜仲胶囊; 特征图谱; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)09-1990-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.09.024

Characteristic HPLC chromatograms of Qiangli Tianmaduzhong Capsules

收稿日期: 2015-12-26

基金项目: 贵州省科技厅项目(20126009, 20134001); 贵州省卫生厅项目(gzkwj2013-1-131); 科技支撑计划项目(2013BAI11B01)

作者简介: 张锦(1991—), 女, 硕士生, 从事中药、民族药的质量控制研究工作。E-mail: 1208552141@qq.com

* 通信作者: 何迅(1969—), 男, 教授, 从事中药新药制备工艺及质量标准研究。Tel: (0851) 6908468, E-mail: 2812878586@qq.com

李勇军(1973—), 男, 教授, 从事中药药效物质基础及质量标准研究。Tel: (0851) 6908468, E-mail: liyongjun@