

鉴于以上原因,果糖的一个峰与葡萄糖的峰重叠,另外一个峰的保留时间因与甘露糖的保留时间相近,导致混合标准单糖的色谱图上只出现 5 个峰。

RPO-1 水解后样品中残留的 TFA 会使还原反应时加入的硼氢化钠分解,故要用甲醇反复洗至中性,以完全除去 TFA,还原反应结束后,加入冰醋酸分解未反应完的硼氢化钠,生成醋酸钠和硼酸钠。醋酸钠是无色透明晶体,是乙酰化反应的催化剂,硼酸钠呈白色而不透明状,并且硼酸根会减慢糖醇乙酰化的反应速率,故必须反复用甲醇以除去硼酸根,直到管壁上无白色物质为止。

糖醇乙酸酯衍生化方法能够较好地实现 RPO-1 水解产物的衍生化,衍生物经干燥及氯仿溶液溶解后没有出现色谱峰拖尾现象,各峰分离效果较好,而且该方法具有反应时间短、试剂易得、定性简单、可靠和定量准确等优点,适于单糖衍生化产物气相色谱分析的前处理。目前,在国内外临床上使用较为普遍的植物多糖,如香菇多糖、裂褶菌多糖、茯苓多糖等都是葡萄糖为主聚合形成的葡聚糖,具有较好的抗癌及抗菌消炎等生物活性^[7]。本实验通过气相分析所得出的结果与之相类似,黄精低聚糖具体结构与生物活性的关系有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Roller M, Rachkemmer G, Watzl B. Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats[J]. *J Nutr*, 2004, 13(4): 153-156.
- [2] 郭丽民,张汝学,贾正平,等.寡糖的药理作用和机制研究进展[J]. *中成药*, 2006, 28(9): 1353-1355.
- [3] Debrecq G, Domon B, Fournet B. Structure determination of a novel uronic acid residue isolated from the exopolysaccharide produced by a bacterium originating from deep sea hydrothermal vents [J]. *Carbohydrate Res*, 1996, 290: 175.
- [4] 田福利,其木格,高安社,等.糖醇乙酸酯衍生物制备方法的改进-气相色谱法分离木糖,核糖,阿拉伯糖,葡萄糖和甘露糖[J]. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 1995, 26(2): 181-184.
- [5] 张威,何红波,张明,等.糖醇乙酸酯衍生气相色谱法测定土壤水解性单糖[J]. *土壤通报*, 2008, 39(4): 913-916.
- [6] 韩丽,欧阳臻.茅苍术多糖的分析[J]. *中药材*, 2008, 31(12): 1841-1843.
- [7] 陈惠黎.糖复合物的结构和功能[M].上海:上海医科大学出版社, 1997: 336-339.

[收稿日期]2010-09-16

高效液相色谱法测定黔不同产地的续断中川续断皂苷 VI 的含量

杨武德,彭娇平,冯静 (贵阳中医学院药学院,贵州 贵阳 550002)

[摘要] 目的:用 HPLC 法测定黔不同产地的中药材续断中川续断皂苷 VI 的含量,为评价贵州省药材续断的质量标准提供参考。方法:采用高效液相色谱法测定 16 个贵州省不同地区的续断药材,色谱柱为 Hypersil ODS (4.6 mm × 250

mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (30:70); 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 212 nm; 柱温 35 °C。结果:川续断皂苷 VI 在该色谱条件下获得良好分离,线性范围为 0.007 41~0.051 87 mg · L⁻¹, r=0.999 6, 平均加样回收率为 96.82%, RSD 为 2.4%, 重复性 RSD 为 2.7%。结论:方法快速简便,结果准确可靠。[关键词] 黔不同地区;续断;川续断皂苷 VI;高效液相色谱 [中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)17-1469-03

续断为常用中药材,始载于《神农本草经》,列为上品,性微温,味苦、辛、甘,归肝、肾经。本种为广布种,全国各省区多数都有分布;我省主产毕节、大方、兴义、安顺、贵阳、遵义、都匀、独山、松桃、镇远、凯里、雷山及江口(梵净山)等,并有栽培种植,资源丰富。生于山坡下部草丛、沟边、路旁、田埂及撂荒地等潮湿处,资源十分丰富。具有补肝肾、强筋骨、调血脉、续折伤、止崩漏、安胎等功效^[1]。主治风湿性骨疼,腰膝酸疼,肝肾虚弱,遗精,尿频,胎动不安,先兆流产,月经不调,崩漏,跌打损伤^[2]。

已有研究表明,续断补肝肾、强筋骨、续折伤的主要活性成分是三萜皂苷类成分,其中川续断皂苷 VI 为主要的有效成分^[3],具有抗骨质疏松、增加骨密度的作用^[4]。随着对续断研究及应用的不断深入(贵州仙灵骨葆胶囊的生产等),对资源需求量不断增加,我省种植面积也不断扩大。本文用 HPLC 测定贵州省不同产地的续断中川续断皂苷 VI 的含量,为更好地评价黔产续断药材质量,合理开发利用贵州续断药材资源提供参考。

1 材料

高效液相色谱仪 SPD-20A (日本岛津公司) (二元泵,手动进样器,柱温箱,紫外检测器,化学色谱工作站); Hypersil ODS 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 对照品:川续断皂苷 VI Asperosaponin VI (纯度 ≥ 98%, 供含量测定用, 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 批号 1051-100810); 甲醇为分析纯; 乙腈为色谱纯; 水为纯化水。

续断药材采于贵州各地,产地:盘县红果,龙里那榜,威宁哈喇河乡,开阳禾丰乡,赫章韭菜坪,扎佐林场,盘县大平地,大方,龙里职校,水城野钟,息烽县南极,水城赫章交界,施秉双锦,龙里猫猫头,龙里湾寨,盘县板桥镇梅子冲基地(种植一年生); 经贵阳中医学院鉴定教研室副教授魏升华鉴定为正品续断 (*Dispsacus aspercides* C. Y. Cheng et T. M. Ai)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypersil ODS 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温: 35 °C, 流动相: 乙腈-水 (30:70); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 212 nm, 进样体积: 20 μL。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取川续断皂苷 VI 对照品 7.40 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈-水 (30:70) 至刻度, 摇匀, 使成每 1 mL 含川续断皂苷 VI 0.148 2 mg 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈-

[作者简介] 杨武德,男,学士,副教授,电话:13885078995, E-mail: ywd_680708@sina.com

水(30:70)至刻度,摇匀,用0.45 μm 滤膜滤过,即得。

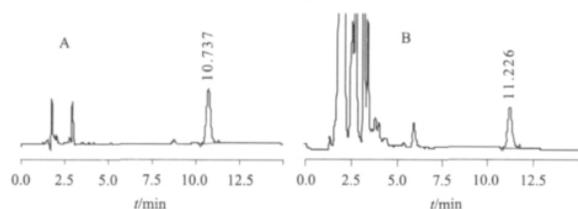


图 1 高效液相色谱图
A. 对照品; B. 样品(威宁哈喇河乡)
Fig 1 HPLC chromatogram
A. reference substance; B. sample

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取样品(威宁哈喇河乡)按照“2.3”项下方法制得样品溶液。取样品溶液连续进样 5 次,进样体积为 20 μL,测定并计算峰面积 RSD 为 0.6%,说明该仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取样品溶液(威宁哈喇河乡),按照“2.3”项制备样品溶液,制备后 0,2,4,6,8,10 h 分别测定,进样体积为 20 μL,测定并计算峰面积 RSD 为 1.1%。结果表明样品液在 10 h 内稳定。

2.4.3 线性范围的考察 精密称取适量对照品,配成系列表 1 加样回收率试验

Tab 1 Result of recovery test

取样量/g	样品中皂苷 VI 含量/mg	加入对照品的量/mg	测得的皂苷 VI 的含量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.251	3.889 2	3.111 4	6.870 8	95.83		
0.251	3.889 2	3.111 4	6.879 4	96.11		
0.251	3.889 2	3.111 4	6.848 2	95.11		
0.249	3.858 3	3.858 3	7.544 3	95.65		
0.249	3.853 8	3.858 3	7.810 3	102.55	96.81	2.4
0.249	3.853 8	3.858 3	7.595 7	96.99		
0.252	3.904 7	4.685 6	8.328 1	94.41		
0.252	3.904 7	4.685 6	8.520 7	98.52		
0.252	3.904 7	4.685 6	8.360 8	95.11		

表 2 黔不同产地的续断药材中川续断皂苷 VI 的含量($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Result of content comparison of Asperosaponin VI in different areas of Guizhou province($\bar{x} \pm s, n=6$)

药材产地	川续断皂苷 VI 的平均百分含量/%	RSD/%
龙里职校	2.73±0.04	1.5
龙里猫猫头	2.71±0.06	2.4
龙里湾寨	1.77±0.02	1.0
龙里那榜	1.64±0.01	0.7
威宁哈喇河乡	1.55±0.04	2.6
赫章大韭菜坪	1.25±0.04	2.8
大方	1.32±0.02	1.4
盘县大平地	1.09±0.03	2.3
施秉双锦	0.85±0.02	2.9
盘县红果	0.81±0.02	3.0
盘县板桥镇梅子冲基地(种植一年生)	0.78±0.02	1.9
扎佐林场	0.73±0.02	2.7
水城野钟	0.60±0.02	3.6
息烽县南极	0.36±0.01	2.5
开阳禾丰乡	0.34±0.01	1.9
水城赫章交界	0.18±0.00	2.5

3 讨论

实验表明,野生或是种植、地域海拔、地理生长环境(如土壤性质)、药材生长年限及气候等条件的不同,对贵州续断中的皂苷 VI 含量变化存在一定的关系。从研究结果来看,有些地区达到了用药标准(中国药典标准为续断皂苷 VI 含量

不同含量的对照品溶液,分别进样 20 μL,在 212 nm 测定其峰面积测定,以峰面积积分为纵坐标,川续断皂苷 VI 含量为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程为: $Y=176\ 618X+6\ 728.1$, $r=0.999\ 6$,表明川续断皂苷 VI 在 7.41 ~ 51.87 μg·L⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.4.4 重复性试验 精密称取威宁哈喇河乡同一批样品 6 份,分别为 0.503,0.502,0.499,0.504,0.503,0.498 g,置 25 mL 锥形瓶中,照“2.3”项下方法操作,得供试品溶液。分别进样 20 μL,并测定其峰面积。该批样品的川续断皂苷 VI 的平均含量为 1.55%,RSD 为 2.7%,表明方法的重复性好。

2.4.5 加样回收率试验 取威宁哈喇河乡同一批样品 9 份,每份约 0.25 克,精密称定,置 25 mL 量瓶中,分别加入标准品 3.111 4,3.858 3,4.685 6 mg,照“2.3”项下方法操作,得供试品溶液。将上述供试品溶液分别进样 20 μL,在 212 nm 测定其峰面积,结果见表 1。

结果显示,平均回收率为 96.82%,RSD 为 2.4%,回收率符合要求。

2.5 样品的含量测定 分别精密称取贵州省不同地区的续断药材各 6 份,每份约 0.5 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,照“2.3”项下方法操作,得供试品溶液。分别在 212 nm 波长处测定其峰面积。采用外标法进行含量测定。结果见表 2。

1.2%的标准),贵州省大面积种植药材续断,主要在六盘水地区,但几年的监测结果证明,符合药厂及价值要求尚需进一步完善。因此考察不同属地含量差异的规律及可能原因,显得尤为重要,它可为贵州药材续断种植和开发利用提供参考和指导。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 第七十三卷 第一分册. 北京: 科学出版社, 1986: 45-46.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2005: 231.
- [3] 张永文, 薛智. 川续断的化学成分研究[J]. 药学学报, 1991, 26(9): 676.
- [4] 王蕊, 邱明才. 单剂量补肾中药防治去卵巢大鼠骨质疏松的骨形态计量学研究[J]. 天津医药, 1999, 273: 131-134.

[收稿日期] 2010-11-03

健尔片的质量控制

缪珊¹, 石小鹏², 吴振宇³, 孙纪元¹, 党碧艳¹, 王四旺¹
(1. 第四军医大学药理学系药物研究所, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学西京医院药剂科, 陕西 西安 710032; 3. 总后勤部卫生部药品供应站, 北京 100071)

[摘要] 目的: 建立健尔片的质量控制方法。方法: 用薄层色谱法鉴别健尔片中葛根、丹参、续断, 采用高效液相色谱法对方中葛根素进行定量分析。结果: 定性鉴别分离效果好, 专属性强; 葛根素含量测定在 0.024~0.120 g·L⁻¹ 范围内, 线性关系良好, $r=0.9998$; 平均加样回收率为 99.29%, RSD 为 0.43%。结论: 所建立的方法准确、专属性强、重复性好, 可有效控制健尔片的质量。

[关键词] 健尔片; 质量控制; 薄层色谱; 高效液相色谱; 葛根素

[中图分类号] R927.11 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)17-1471-03

健尔片为我单位院内制剂, 由葛根、丹参、黄芪等 8 味中药组成, 具有益气补肾、活血化瘀、行气升阳通窍之功效。为有效控制其质量, 本实验对其中的葛根、丹参、续断做了薄层鉴别, 并采用高效液相色谱法对葛根中葛根素做了含量测定。

1 材料

日本岛津色谱仪; LC-20AT 二元高压梯度泵; SPD-M20A 二极管阵列检测器; CBM-20A 系统连接器; 微量定量阀(20 μL); Lc-solution 工作软件。

葛根素对照品(批号 752-200108)、丹参酮 II A 对照品(批号 110766-200417)、川续断皂苷 VI 对照品(11685-200401)由中国药品生物制品检定所提供。薄层层析用硅胶 G 由青岛海洋化工厂提供; 甲醇、乙腈为色谱纯, 超纯水, 其余试剂均为分析纯。健尔片由我单位质检室提供(批号 100401、100402、100403)。

2 方法

2.1 薄层色谱定性鉴别

2.1.1 葛根^[1] 精密称取葛根素对照品, 加甲醇制成 1.5 g·L⁻¹ 的对照品溶液。取 3 批健尔片, 粉碎研磨后各称取 2 g, 加醋酸乙酯 20 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取缺葛根的样品, 按

供试品制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述供试品溶液与阴性对照溶液、对照品溶液各 3 μL, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠溶液为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水(7:2.5:0.25)为展开剂, 展开, 取出, 晾干。置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照溶液色谱在相应位置上无此斑点, 见图 1A。

2.1.2 丹参^[2] 精密称取丹参酮 II A 对照品, 加醋酸乙酯制成 2 g·L⁻¹ 的对照品溶液。取 3 批健尔片, 粉碎研磨后各称取 6 g, 加乙醚 30 mL, 振摇, 放置 1 h, 滤过, 滤液挥干, 残渣加醋酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取缺丹参的样品, 按供试品制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述 3 种溶液各 5 μL 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-醋酸乙酯(19:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干。供试品色谱中, 在对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 见图 1B。

2.1.3 川续断^[3] 精密称取川续断皂苷 VI 对照品, 加甲醇制成 1 g·L⁻¹ 的对照品溶液。取 3 批健尔片, 粉碎研磨后各称取 3 g, 加甲醇 15 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 用水饱和的正丁醇提取 4 次, 每次 15 mL, 合并正丁醇液, 蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取缺川续断的阴性样品按供试品制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述 3 种溶液各 5 μL, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水(13:7:2)10 °C 以下放置的下层液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点, 见图 1C。

2.2 含量测定^[4]

2.2.1 色谱条件和系统适用性试验 色谱柱: Kromasil 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 检测波长: 249 nm; 流动相为乙腈-水(13:87); 柱温: 室温; 流速: 1 mL·min⁻¹; 理论塔板数按葛根素峰计算, 应不低于 2 000。进样量: 20 μL。

2.2.2 对照品、供试品溶液制备 (1)对照品溶液: 精密称取葛根素对照品 1.20 mg 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释定容至刻度, 摇匀, 其质量浓度为 0.120 g·L⁻¹, 作为对照品溶液; (2)供试品溶液: 取健尔片粉末约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 20 mL 甲醇, 加热回流 30 min, 滤过, 续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 滤液定容至 25 mL, 作为供试品溶液。

2.2.3 线性范围考察 精密吸取葛根素对照品溶液, 分别配成质量浓度为 0.024, 0.048, 0.072, 0.096, 0.120 g·L⁻¹ 的溶液, 摇匀, 进样量为 20 μL, 记录色谱图, 记录其峰面积积分值。以浓度(X)为横坐标, 色谱峰面积(Y)为纵坐标, 计算线性回归方程, $Y=7E+07X+81737$ ($r=0.9998$)。结果表明: 葛根素在 0.024~0.120 g·L⁻¹ 范围内, 呈良好线性关系。

2.2.4 精密度试验 精密称取葛根素对照品适量制成质量浓度为 0.058 g·L⁻¹ 的对照品溶液; 精密称取健尔片粉末(批号 100401) 0.1 g, 按供试品溶液的制备方法处理。精密吸取对照品、供试品溶液各 20 μL, 分别重复进样 5 次。结果表

[作者简介] 缪珊, 女, 博士, 实验师, E-mail: miaoshan@fmmu.edu.cn

@fmmu.edu.cn

[通讯作者] 王四旺, 博士生导师, 电话: 029-84774748, E-mail: wangsiw