

细菌内毒素检查法经济、快速、简便、可定量、可标准化等,已替代 80% 家兔法检测。但鲎作为一种远古生物,并非取之不绝,BET 法同样存在伦理和动物保护以及在将来没有足够来源的问题。而且鲎试剂只能特异性地检查革兰阴性菌的内毒素,对其他热原质表现为阴性,而除内毒素外有很多的物质对人和动物有潜在的致热性<sup>[5]</sup>。

为弥补现有热原检查方法的不足,一种结合 BET 体外高灵敏度和家兔法宽检测谱优点的新方法被提出来。人外周血单核细胞法由全血法发展而来,其实质为全血法的一种。在欧洲一共有 6 种方法系统被正式确认而向《欧洲药典》推荐<sup>[6]</sup>。新的热原试验方法重复性好、灵敏度高、检测谱广、检测限完全能满足热原检查的要求,能够替代传统热原试验方法。《欧洲药典》已成立专家组对方法考察确认,美国、日本也在开展研究<sup>[6]</sup>。至今,对新的热原试验方法研究热点趋势是:早期的人全血法到单核细胞系法,近期又转向人全血法,认为全血法最能反映人体发热反应,是最佳方法。

热原检查是非肠道给药药品生物安全性检查的重要项目之一,有必要对此研究并吸收利用国际研究成果。经过多年的研究,全血法优势明显,是最有可能推广应用的方法,故选择此法进行研究、应用。在试验中摸索出完成试验所需条件及解决办法,细化每一试验步骤以求标准化,为扩大范围的确认试验作铺垫。

[DOI] 10.3870/yydb.2011.07.036

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005:附录99-102.
- [2] HOFFMANN S, PETERBAUER A, SCHINDLER S. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells[J]. *J Immunol Methods*, 2005, 298: 161-145.
- [3] EPERON S, DE G D, WERNER F G, et al. Human monocytoid cell lines as indicators for endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and limulus amoebocyte lysate assay[J]. *J Immunol Methods*, 1997, 207: 135-145.
- [4] SUFFREDINI A F, HOCHSTEIN H D, GILBERT F, et al. Dose-related inflammatory effects of intravenous endotoxin in humans: evaluation of a new clinical lot of *Escherichia coli* O: 113 endotoxin[J]. *J Infect Dis*, 1999, 179(5): 1278-1282.
- [5] HARTUNG T, AABERGE I, BERTHOLD S, et al. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction, the report and recommendations of ECVAM workshop 43, European centre for the validation of alternative methods[J]. *Altern Lab Anim*, 2001, 29: 99-121.
- [6] HOFFMANN S, PETERBAUER A, SCHINDLER S. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells[J]. *J Immunol Methods*, 2005, 298(6): 161-173.

## 高效液相色谱法测定三叶委陵菜中 $\beta$ -谷甾醇含量

邓凤玲

(武汉市汉口医院药剂科 430012)

[摘要] 目的 建立测定三叶委陵菜中  $\beta$ -谷甾醇含量的方法。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法,Agilent TC C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:甲醇-水(96:4);流速:1.2 mL · min<sup>-1</sup>;检测波长:210 nm;柱温:30  $^{\circ}$ C。结果  $\beta$ -谷甾醇在 40.48 ~ 202.4  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup>范围内线性关系良好,  $r = 0.9998$ ,平均回收率为 98.11%,RSD 为 1.36%; $\beta$ -谷甾醇在三叶委陵菜中平均含量为 1.83 mg · g<sup>-1</sup>。结论 该方法简便、准确、可控,可作为该产品的质量控制方法。

[关键词] 三叶委陵菜;  $\beta$ -谷甾醇; 色谱法; 高效液相; 含量测定

[中图分类号] R286; R927.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2011)07-0939-02

三叶委陵菜(*Protentilla Freyniana* Borm)为多年生草本植物,其根茎或全草入药,味苦涩,具清热、解毒、凉血、镇痛之功效,可用于治疗骨结核、口腔炎、跌打损伤、外伤出血等<sup>[1-2]</sup>。三叶委陵菜中含有多种甾体

化合物,其中  $\beta$ -谷甾醇( $\beta$ -sitosterol)为主要活性成分之一<sup>[3-4]</sup>。笔者采用高效液相色谱(HPLC)法对  $\beta$ -谷甾醇进行测定,方法简便,分离结果令人满意,重复性好,可为三叶委陵菜的质量控制提供参考。

### 1 仪器与试剂

Agilent 高效液相色谱仪(单元泵,手动进样器,紫外检测器,柱温箱,变色龙工作站), $\beta$ -谷甾醇(中国药

[收稿日期] 2010-08-04 [修回日期] 2010-10-27

[作者简介] 邓凤玲(1975-),女,湖北恩施人,药师,从事医院药学工作。电话:027-51175047, E-mail: 564315612@qq.com。

品生物制品检定所,批号:110851-200708),三叶委陵菜根茎于2009年7月采自江西省庐山,由华中科技大学同济医学院药学院生药系陈家春教授鉴定,粉碎成粒径0.250~0.425 mm(40~60目)粉末,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent TC-C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(96:4),检测波长210 nm,流速1.2 mL · min<sup>-1</sup>,进样量:20 μL,柱温:30 °C。

2.2 检测波长的确定 取β-谷甾醇对照品适量,加流动相制成每毫升含β-谷甾醇10 μg的溶液,经紫外全波长扫描,结果在206 nm波长处有最大吸收,但流动相在此有末端吸收,不适宜做检测波长,因210 nm离最大吸收处最近,避开流动相末端吸收,故以210 nm为检测波长。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取β-谷甾醇对照品10.12 mg,置于25 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成对照品储备液。

2.4 样品溶液的制备 取三叶委陵菜根茎粉末样品约1.0 g,精密称定,精密量取并加入甲醇10 mL,精密称定质量,超声处理15 min,放置至室温,加甲醇补足损失的质量,过滤,续滤液为供试品溶液。

2.5 方法专属性 分别吸取β-谷甾醇对照品储备溶液、供试品溶液各20 μL,进样,按上述色谱条件进样检测,可见β-谷甾醇对照品、供试品约在13 min出现β-谷甾醇特征吸收峰,可达到基线分离。

2.6 标准曲线的绘制 分别精密吸取β-谷甾醇储备液1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 mL,以流动相定容至10 mL,摇匀,得到浓度分别为40.48 80.96 121.44 161.92 202.40 μg · mL<sup>-1</sup>的β-谷甾醇对照品溶液,按上述色谱条件测定,以对照品浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,进行线性回归,得标准曲线为:Y = 0.048 7X - 0.512 7 r = 0.999 8,β-谷甾醇线性范围为40.48 ~ 202.40 μg · mL<sup>-1</sup>。

2.7 稳定性实验 取供试品溶液在0,1,2,4,8,12 h分别进样测定,结果基本一致,其RSD为1.45%,表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.8 精密度实验 精密吸取浓度为121.44 μg · mL<sup>-1</sup>的对照品溶液20 μL,在上述相同色谱条件下连续进样5次,测得峰面积的RSD为1.27%。

2.9 重复性实验 取同一批样品5份,精密称定,制成供试品溶液,按上述色谱条件进样,测定β-谷甾醇含量,平均含量0.18%,RSD为1.24%。

2.10 回收率实验 分别精密称取已知含量的粉末样

品(批号:090712)约0.5 g,精密加入适量的β-谷甾醇对照品,按供试品溶液的制备法制备样品溶液9份。依次进样,平均回收率为98.11%,RSD为1.36%。见表1。

表1 β-谷甾醇加样回收率实验结果

称样量/ g	样品量	加入量 mg	测得量	回收率/ %
0.512 7	0.96	0.50	1.45	98.00
0.471 7	0.88	0.50	1.38	100.00
0.527 5	0.98	0.50	1.46	96.00
0.486 4	0.91	0.75	1.64	97.33
0.491 7	0.92	0.75	1.65	97.33
0.570 7	1.07	0.75	1.80	97.33
0.501 0	0.94	1.00	1.94	100.00
0.531 7	0.99	1.00	1.97	98.00
0.489 0	0.91	1.00	1.90	99.00

2.11 样品测定 分别精密称取3批样品,按上述样品溶液的制备法制备样品溶液,依上述方法操作,记录色谱峰面积,用标准曲线法计算其含量。结果见表2。

表2 3批样品中β-谷甾醇含量测定结果 n = 3

批号	含量/(mg · g <sup>-1</sup> )	RSD/%
090711	1.78	1.38
090712	1.87	1.46
090713	1.86	1.07

3 讨论

笔者在本研究建立的高效液相色谱法对三叶委陵菜有效成分β-谷甾醇的含量测定有较好的精密度和准确度。β-谷甾醇无紫外吸收,采用低波长进行检测,无需衍生化,结果令人满意<sup>[5]</sup>。

通过以上结果可以看出,三叶委陵菜中β-谷甾醇的含量超过千分之一,本方法灵敏、准确,可以为三叶委陵菜质量控制提供参考。

[DOI] 10.3870/yydb.2011.07.037

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 69 - 70.  
 [2] 刘梁, 韩定献, 周军, 等. 三叶委陵菜根中三萜类化合物抗病毒作用研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(8): 1484 - 1485.  
 [3] 蔡玉华, 刘梁, 韩丁献, 等. 三叶委陵菜根化学成分的研究[J]. 武汉理工大学学报, 2005, 25(9): 32 - 33.  
 [4] 刘新国, 魏元锋, 韩建伟, 等. 正交实验法优选三叶委陵菜渗漉提取的工艺条件[J]. 医药导报, 2007, 26(6): 652 - 654.  
 [5] 吴家红, 徐文芬, 文雯, 等. HPLC法测定秋海棠属药材中β-谷甾醇的含量[J]. 微量元素与健康研究, 2009, 26(6): 24 - 26.