

白土苓中大泽明素与总黄酮的含量测定

李进冉^{1*}, 张思巨², 李琳¹, 海丽娜¹, 苑秀芝¹, 蒯玉花¹, 仰振球¹

(1. 北京振东光明药物研究院有限公司, 北京 100120; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 考察白土苓药材中大泽明素、总黄酮的含量。方法: 分别采用高效液相法和紫外-可见分光光度法对白土苓药材中的大泽明素和总黄酮进行了含量测定。结果: 白土苓药材中大泽明素的平均含量为 0.48%, 在 0.148 8 ~ 0.744 1 μg 呈良好的线性关系 ($r = 0.999 4$), 回收率为 101.07%, RSD 1.27%; 总黄酮的平均含量为 0.52%, 橙皮苷在 3.708 ~ 25.956 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度呈良好的线性关系 ($r = 0.999 9$), 回收率为 99.44%, RSD 1.46%。结论: 该方法准确、简便, 为科学评价白土苓药材的质量提供依据。

[关键词] 白土苓; 大泽明素; 总黄酮; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)08-0068-04

Studies on Content Determination of Macrozamin and Total Flavonoids in Rhizoma Heterosmilacis

LI Jin-ran^{1*}, ZHANG Si-ju², LI Lin¹, HAI Li-na¹, YUAN Xiu-zhi¹, KUAI Yu-hua¹, YANG Zhen-qiu¹

(1. Beijing Zhendong Guangming Pharmaceutical Institute Co., Ltd, Beijing 100120, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the content of macrozamin and total flavonoids in Rhizoma Heterosmilacis. **Method:** The content of macrozamin and total flavonoids was determined separately by HPLC and ultraviolet spectrophotometry (UV). **Result:** The average content of macrozamin in Rhizoma Heterosmilacis was 0.48%. The calibration curve of macrozamin showed good linearity in the range of 0.148 8-0.744 1 μg ($r = 0.999 4$), with recovery rate 101.07% and RSD 1.27%. The average content of total flavonoids was 0.52%. The calibration curve of hesperidin showed good linearity in the range of 3.708-25.956 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.999 9$), with recovery rate 99.44% and RSD 1.46%. **Conclusion:** The methods were approved accurate and simple. They could be used to scientifically evaluate Rhizoma Heterosmilacis.

[Key words] Rhizoma Heterosmilacis; macrozamin; total flavonoids; HPLC

白土苓为百合科植物短柱肖菝葜、华肖菝葜或肖菝葜的干燥块茎, 具有清热、除湿、解毒、通利关节的功效, 临床用于湿热淋浊、带下、疥癣、杨梅毒疮、筋骨挛痛、瘰疬痈肿及钩端螺旋体等病^[1-3]。乔蕾^[4], 秦文杰^[5]等均以芦丁为对照品, 应用亚硝酸钠、硝酸铝法对白土苓药材进行了总黄酮的含量测

定。为了对复方苦参注射液中的臣药白土苓药材进行有效的质量控制, 本实验对其活性成分大泽明素进行了 HPLC 含量测定; 并以白土苓所含的橙皮苷为对照品^[5], 用紫外-可见分光光度法对白土苓药材进行了总黄酮含量测定, 为白土苓药材的质量评价提供参考。

1 仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪, Waters 2487 检测器, T6-新世纪型紫外-可见分光光度计, 德国赛多利斯 CP225D 型电子分析天平, 昆山超声仪器厂 Q5200DE 型超声波清洗器。

大泽明素对照品 (纯度 > 99.0%, 自制); 橙皮

[收稿日期] 20110530(010)

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项(2008ZX09202-009)

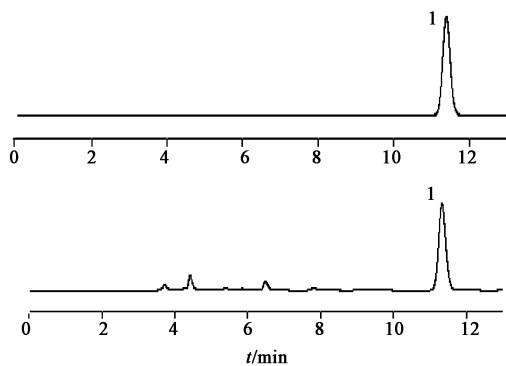
[通讯作者] * 李进冉, 硕士, 从事药用植物有效成分的提取分离及分析, Tel: 010-62035456, Fax: 010-82082586, E-mail: ellizar@sina.com

苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110721-2006),色谱纯乙腈(B&J),色谱纯甲醇(天津四友精细化学品有限公司),纯净水(娃哈哈),其余试剂均为分析纯。白土苓药材经中国科学院植物研究所林祁馆长鉴定为百合科植物短柱肖菝葜 *Heterosmilax yunnanensis* Gagnep.。

2 方法和结果

2.1 HPLC 法测定白土苓药材中大泽明素的含量

2.1.1 色谱条件 RP-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2%磷酸溶液(7:193),检测波长 215 nm,流速 0.6 mL·min⁻¹,柱温室温,进样量为 10 μL。对照品与样品色谱图见图 1。



1. 大泽明素

图1 对照品(A)和白土苓药材样品(B)色谱

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取大泽明素对照品适量,加水制成每 1 mL 含 0.037 2 mg 的溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过四号筛)约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入水 50 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz)1 h,放冷,再称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取 0.037 2 g·L⁻¹的大泽明素对照品溶液各 4, 8, 12, 16, 20 μL,注入高效液相色谱仪,测定峰面积值,以进样量(*X*) (μg)为横坐标,峰面积平均积分值(*Y*)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y = 1\ 312\ 098.45X - 8\ 712.45$ ($r = 0.999\ 4$),结果表明大泽明素在 0.148 8~0.744 1 μg 呈良好的线性关系。

2.1.5 精密密度试验 取上述对照品溶液,精密吸取 10 μL,连续进样 6 次,测定峰面积积分值, RSD 2.96%,仪器精密密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取新鲜配制的供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样,测定峰面积积分值, RSD 0.58%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定

性良好。

2.1.7 重复性试验 取白土苓药材粉末(过四号筛)6 份,按 2.1.3 项方法制备供试品溶液并检测,测得的平均含量为 8.73 mg·g⁻¹, RSD 2.35%,表明本法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的白土苓药材粉末(与重复性试验同一批)9 份,各 0.1 g,编号 80% (1~3#), 100% (4~6#), 120% (7~9#)。1~3#中精密加入对照品 0.70 mg(0.174 g·L⁻¹的对照品溶液 4 mL), 4~6#中精密加入对照品 0.87 mg(0.174 g·L⁻¹的对照品溶液 5 mL), 7~9#中精密加入对照品 1.04 mg(0.174 g·L⁻¹的对照品溶液 6 mL),按上述供试品溶液制备方法制备并检测,计算回收率,测得平均回收率为 101.07%, RSD 1.27%,表明方法回收率良好,结果见表 1。

表1 大泽明素加样回收率测定

No.	取样量 /g	含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.106 1	0.93	0.70	1.62	98.57		
2	0.104 0	0.91	0.70	1.61	100.00		
3	0.106 6	0.93	0.70	1.64	101.43		
4	0.108 4	0.95	0.87	1.84	102.30		
5	0.109 7	0.96	0.87	1.85	102.30	101.07	1.27
6	0.107 6	0.94	0.87	1.82	101.15		
7	0.107 4	0.94	1.04	2.00	101.92		
8	0.106 6	0.93	1.04	1.97	100.00		
9	0.106 8	0.93	1.04	1.99	101.92		

2.2 紫外-可见分光光度法测定白土苓药材中总黄酮的含量

2.2.1 溶液的制备 对照品储备液的制备:取橙皮苷对照品适量,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含 0.103 mg 的对照品溶液,备用。

供试品储备液的制备:取白土苓药材(过 80 目)约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,回流提取 5 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。

测定波长的选择:精密吸取对照品和供试品储备液各 2 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。以甲醇为空白,照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010 年版第一部附录 V A),分别在 200~400 nm 波长进行光谱扫描。

供试品溶液和橙皮苷对照品有相似的最大吸收

波长,选择测定波长为 282 nm。

2.2.2 线性关系考察 精密吸取对照品储备液 9.0 mL,至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,为对照品溶液。分别精密吸取 2.2.1 项下对照品溶液 1,2,3,4,5,6,7 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。照紫外-可见分光光度法,在 282 nm 波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $A = 0.0326C + 0.0045$ ($r = 0.9999$)。结果表明,橙皮苷在 3.708 ~ 25.956 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度的线性关系良好。

2.2.3 精密度试验 取同一份供试品溶液,在 282 nm 波长处连续测定吸光度 6 次, RSD 1.00%,表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在 0,2,4,6,12,24 h,于 282 nm 波长处测定其吸光度,结果 RSD 0.61%,表明本品在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 重复性试验 取同一批次的白土苓药材 6 份,按照 2.2.1 项方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,分别精密吸取供试品溶液 2 mL 至 10 mL 量瓶中,甲醇定容,摇匀,分别在波长 282 nm 处测定吸光度,测得的平均含量为 $4.08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.43%,表明本法重复性良好。

2.2.6 加样回收率试验 取已知总黄酮含量的白土苓药材粉末 0.5 g,精密称定,按下表对照品加入量精密加入对照品,按 2.2.1 项方法制备供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,甲醇定容,摇匀。在波长 282 nm 处测定吸光度,并计算回收率,测得平均回收率为 99.44%, RSD 1.46%,表明方法回收率良好,结果见表 2。

表 2 总黄酮加样回收率试验

No.	取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.503	2.054	2.221	4.287	100.54	99.44	1.46
2	0.503	2.054	2.221	4.279	100.20		
3	0.504	2.058	2.221	4.237	98.12		
4	0.501	2.046	2.221	4.237	98.67		
5	0.509	2.078	2.221	4.329	101.34		
6	0.503	2.054	2.221	4.225	97.78		

2.3 样品的含量测定 取 6 批样品,按 2.1.3 项方法制备供试品溶液,每个样品平行测定 2 份,并在上述色谱条件下测定,计算样品中大泽明素的含量;在 282 nm 下进行吸光度测定,由标准曲线计算总黄酮

的含量,结果见表 3。

表 3 不同产地白土苓药材中大泽明素和总黄酮的含量 %

产地	大泽明素	总黄酮
贵州安顺	0.93	0.46
贵州紫云	0.97	0.52
云南文山州	0.53	0.56
四川宜宾	0.19	0.55
广西沙河	0.10	0.55
湖南怀化	0.19	0.51

结果表明,6 批白土苓药材中大泽明素平均含量为 0.48%,总黄酮平均含量为 0.52%。

3 讨论

3.1 高效液相色谱法大泽明素含量测定 通过比较了不同粉碎粒度、不同提取溶剂(50% 乙醇溶液、1% 乙酸溶液和水)、不同提取时间的提取效果,最后确定文中供试品溶液的制备方法。考察了 3 种流动相系统①甲醇-水(1:9)、②乙腈-水(1:9)、③乙腈-0.2% 磷酸溶液(7:193)。结果表明第③种流动相能达到基线分离,且保留时间适宜,确定以乙腈-0.2% 磷酸溶液(7:193)为流动相。

3.2 总黄酮含测

3.2.1 总黄酮含量测定方法的选择 中药总黄酮含量测定方法主要有紫外-可见分光光度法、薄层扫描法、高效液相色谱法、荧光分光光度法和毛细管电泳法等^[6]。紫外-可见分光光度法包括直接分光光度法与比色法(三氯化铝比色法和碱性硝酸铝比色法)。

比色法是《中国药典》收载用于测定总黄酮的方法,其中常用硝酸铝比色法^[7]。郭亚健等^[8]曾对硝酸铝比色法测定总黄酮进行过研究,认为有些黄酮类物质(黄芩素、山奈酚等)在 500 nm 测定波长处无最大吸收或吸收很弱,而具有邻二酚羟基的非黄酮类物质(咖啡酸、绿原酸等)在 500 nm 处有最大吸收或有较强吸收,此研究结果说明该方法存在非黄酮类物质的干扰,专属性不强,测定结果误差较大。我们对此进行了考察,比较了三氯化铝比色法和直接分光光度法。以芒果苷为对照品,用三氯化铝比色法测定,对照品显色前后最大吸收波长发生了红移;但样品用三氯化铝显色前后未显示红移,因此不能采用三氯化铝比色法测定样品,选择了直接分光光度法。

3.2.2 对照品的选择 白土苓药材中含有大豆素、甘草素、橙皮苷、芒果苷等黄酮类成分。选择了芒果

炒苦杏仁饮片指纹图谱研究

魏惠珍¹, 王信², 王跃生¹, 饶毅^{1*}, 胡景婷²

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;
2. 江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 建立炒苦杏仁饮片的高效液相指纹图谱, 提高药材质量控制水平。方法: 采用高效液相色谱法, C₁₈ 色谱柱, 流动相乙腈-0.1% 磷酸, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 225 nm。采用国家食品药品监督管理局推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”计算处理, 确定了炒苦杏仁饮片指纹图谱研究方法。结果: 各批次药材共获得 10 个共有峰, 超过总面积 95%, 所得指纹图谱方法学考察结果良好, 采用色谱指纹图谱相似度评价软件, 对炒苦杏仁饮片指纹图谱进行相似度计算, 其 10 批样品相似度在 0.5~0.9。结论: 指纹图谱的运用实现了炒苦杏仁饮片的全面和整体评价, 能体现炒苦杏仁饮片的多个成分的指纹信息, 为有效提高炒苦杏仁饮片质量控制提供参考。

[关键词] 苦杏仁; 高效液相色谱法; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)08-0071-04

Fingerprint Research of Semen Armeniacae Semen Amarum

WEI Hui-zhen¹, WANG Xin², WANG Yue-sheng¹, RAO Yi^{1*}, HU Jing-ting²

(1. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 China)

[Abstract] **Objective:** To instruct the fingerprint of Armeniacae Semen Amarum, enhance the method of quality control. **Method:** The separation was performed on an C₁₈ chromatography column, using acetonitrile-0.1% of phosphoric acid as mobile phase, with the flow rate of 1 mL·min⁻¹; the wavelength was set at 225 nm. ‘TCM chromatographic fingerprint similarity evaluation system (2004A edition)’ recommended by state food and drug

[收稿日期] 20110413(014)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(2010CB530602)

[通讯作者] * 饶毅, 教授, 博士, 从事中药质量控制研究工作, Tel:0791-7119609, E-mail: raoyi99@126.com

昔和橙皮昔进行了紫外光谱全波长扫描, 橙皮昔的最大吸收波长与样品十分相近, 因此选择活性成分橙皮昔作为对照品。本实验用橙皮昔作为标准品, 用紫外-可见分光光度法进行总黄酮含量的测定。该方法具有所用仪器简单、操作方便、准确度高、重复性好等优点, 其稳定性及精密度均能满足测定要求。故本方法可作为检测白土苓药材中总黄酮含量的一种有效手段。

[参考文献]

[1] 四川省卫生厅. 四川省中药材标准[S]. 1987:69.

[2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵阳:贵州省科技出版社, 1988:46.

[3] 湖南省卫生厅. 湖南省中药材标准[S]. 长沙:湖南科学技术出版社, 1933:9.

[4] 乔蕾. 中药白土茯苓质量控制方法研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2007.

[5] 秦文杰. 短柱苜蓿莫化学成分及质量控制研究[D]. 北京:北京中医药大学博, 2007.

[6] 马陶陶, 张群林, 李俊, 等. 三氯化铝比色法测定中药总黄酮方法的探讨[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1):54.

[7] 中国药典. 一部[S]. 2010:30.

[8] 郭亚健, 范莉, 王晓强, 等. 关于比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(2):97.

[责任编辑 蔡仲德]