

50 mg · g⁻¹干树脂。

通过对树脂动态吸附曲线、吸附速率、洗脱剂浓度以及洗脱溶媒用量的考察,确定上样体积为 1.5 BV 树脂体积(浓度为 5.205 mg · mL⁻¹)的药液,以 1.0 BV · h⁻¹的速度上样,用 30% 乙醇 5 BV 柱体积洗脱,可得到含总皂苷 80% 以上的固形物。

参考文献

[1] 孙维峰,徐伟,姚富庆,等.泄浊除痹汤颗粒治疗高尿酸血症临床研究[J].中国医学刊,2003,21(4):627-636.

[2] 秦汝兰,黄田玉,高璐.土茯苓中总黄酮提取方法及药理

作用[J].通化师范学院学报,2010,31(2):39-41.

[3] 吴新荣,刘志刚,颜仁梁,等.聚酰胺颗粒分离纯化土茯苓总黄酮研究[J].中药材,2009,32(10):1606-1608.

[4] 刘颖,刘树民,于栋华,等.大孔树脂纯化穿山龙总皂苷的工艺优化[J].医药导报,2011,30(5):635-637.

[5] 石忠峰,陈蔚文,李卫民,等.大孔吸附树脂纯化黄芪总皂苷的研究[J].中草药,2005,36(9):1322-1324.

[6] 徐先祥,孔树佳,何晓丽.大孔吸附树脂富集纯化牛膝总皂苷研究[J].中国药房,2006,17(5):396.

DOI 10.3870/yydb.2012.04.023

菝葜高效液相色谱指纹图谱的建立*

周雪苹,艾又生

(华中科技大学同济医学院附属协和医院药剂科,武汉 430022)

摘要 目的 建立菝葜提取物的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱测定方法,并同时对其落新妇苷和黄杞苷的含量进行测定。**方法** 采用 DIKMA Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以甲醇-0.1% 磷酸溶液梯度洗脱,体积流量 1.0 mL · min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 303 nm。**结果** 落新妇苷和黄杞苷分别在 0.08 ~ 20.52 μg 和 0.08 ~ 20.28 μg 范围内线性关系良好,r 分别为 0.997 和 0.998。建立 10 个不同产地样品的 HPLC 指纹图谱。**结论** 该方法准确、稳定、可靠,可用于菝葜的质量研究和评价。

关键词 菝葜;HPLC 指纹图谱;落新妇苷;黄杞苷

中图分类号 R282 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)04-0474-04

Finger Print of *Smilax china* L. by High Performance Liquid Chromatography

ZHOU Xue-ping, AI You-sheng(Department of Pharmacy, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT Objective To establish a finger print and quantitative determination of astilbin (A) and engelitin (E) simultaneously for *Smilax china* L. of different batches. **Methods** The samples were separated on a DIKMA Diamonsil C₁₈ column with gradient elution of methanol and 0.1% phosphoric acid at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹ and detected wavelength at 303 nm. **Results** The linear ranges of A and E were 0.08 - 20.52 μg (r=0.997) and 0.08 - 20.28 μg (r=0.998), respectively. The HPLC finger print of *Smilax china* L. of ten different places was established. **Conclusion** The method can be used for quality control of *Smilax china* L.

KEY WORDS *Smilax china* L.; HPLC finger print; Astilbin; Engelitin

菝葜(*Smilax china* L.)为百合科植物菝葜的干燥根茎,俗称金刚藤、金刚刺,具有祛风利湿、解毒散淤之功效,主治筋骨酸痛、小便淋漓、带下量多、疮痍痈肿。有研究表明,菝葜有明显的抗炎和活血化淤作用^[1]。

菝葜是胃乐益冲剂的主要成分之一。指纹图谱是中药质量控制的一种有效、方便的手段;2010 版《中华人民共和国药典》对菝葜的质量控制要求测定落新妇苷(astibin)和黄杞苷(engeletin)的含量^[2]。笔者建立完善的菝葜指纹图谱测定方法,使其在进行指纹图谱测定的同时也可以对落新妇苷和黄杞苷进行含量测定。

1 仪器与试剂

1.1 菝葜药材 不同批次药材来源见表 1。药材经专人收集,经本院艾又生副教授鉴定为正品菝葜(*Smilax china* L.)。

1.2 仪器及数据处理软件 Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪(配有 DGU-20A3 在线脱气机、LC-20A 二元

收稿日期 2011-09-18 修回日期 2011-10-25

基金项目 *武汉市重点攻关项目(0202040409)

作者简介 周雪苹(1988-),女,湖北荆门人,硕士,从事药物分析、药物新剂型研究。电话:027-85726073, E-mail: iamzou.xueping@163.com。

通讯作者 艾又生(1964-),男,湖北武汉人,副主任药师,硕士生导师,硕士,从事药物分析、药物新剂型研究。电话:027-85726073, E-mail: ays19640807@163.com。

梯度泵、SIL-20A 自动进样器、SPD-M20A DAD 检测器); LC solution 色谱工作站; Shimadzu AUW220D 电子分析天平; KQ-250B 型超声清洗器; 98-1-B 型电子调温电热套; 优普超纯水机; 国家药典委员会重要色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版(2004); 统计软件 SPSS 15.0。

表 1 10 种药材来源

Tab. 1 Origins of ten different samples

编号	产地	采收时间	编号	产地	采收时间
S1	湖北咸宁	2010 年 9 月	S6	湖北孝感	2011 年 6 月
S2	浙江温州	2010 年 8 月	S7	湖北大冶 1#	2011 年 8 月
S3	安徽亳州	2010 年 8 月	S8	湖北大冶 2#	2011 年 9 月
S4	湖北大悟 1#	2011 年 6 月	S9	湖北荆门 1#	2011 年 8 月
S5	湖北大悟 2#	2011 年 8 月	S10	湖北荆门 2#	2011 年 9 月

1.3 试剂 供含量测定的落新妇苷(编号: A0102)、黄杞苷(编号: A0533): 国家标准物质中心; 分析纯甲醇、磷酸; 色谱纯甲醇; 自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: DIKMA Diamonsil C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温: 30 ℃; 体积流量: 1 mL·min⁻¹; 流动相: A 为 0.1% 磷酸水溶液, B 为甲醇, 时间 0~40 min, B: 23%; ~80 min: 30%→35%; ~100 min: 35%→45%; ~120 min: 45%; 检测波长 303 nm; 进样 20 μL。

2.2 标准曲线的绘制 精密称取落新妇苷 10.26 mg, 黄杞苷 10.14 mg, 分别用甲醇-0.1% 磷酸溶液(30:70)定容于 5 mL 量瓶中, 作为对照品储备液。分别取适量对照品溶液于一个量瓶中, 用甲醇-0.1% 磷酸溶液(30:70)作为稀释液, 制备标准系列。落新妇苷标准系列浓度为 4.104, 20.520, 82.820, 123.120, 205.200, 513.000, 1026.000 μg·mL⁻¹, 黄杞苷标准系列浓度为 4.056, 20.280, 81.120, 121.680, 202.800, 507.000, 1014.000 μg·mL⁻¹。进样 20 μL。以峰面积对进样量(μg)作回归方程。结果落新妇苷回归方程为 $Y = 943138X + 41008$ ($r = 0.997$), 线性范围为 0.08~20.52 μg。黄杞苷回归方程为 $Y = 2 \times 10^6 X - 276402$ ($r = 0.998$), 线性范围为 0.08~20.28 μg。图 1 为标准系列第 6 号图谱。落新妇苷、黄杞苷的理论板数分别为 40000, 100000。

2.3 样品测定 取菝葜粉末(过 60 目筛)约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 摇匀, 称定质量, 超声提取 1 h, 加入甲醇补足损失质量, 滤过, 取滤液 30 mL 蒸干, 用甲醇-0.1% 磷酸溶液

(30:70)复溶, 定容至 5 mL, 过孔径 0.45 μm 滤膜, 进样 20 μL。计算样品中落新妇苷、黄杞苷的含量。

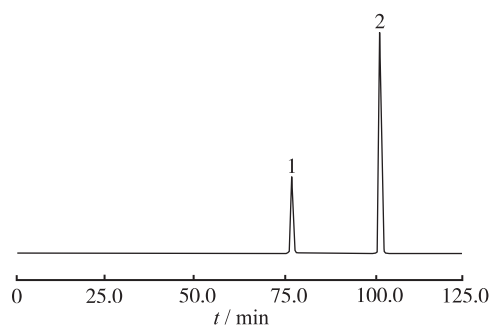


图 1 落新妇苷和黄杞苷对照品 HPLC 色谱图

1. 落新妇苷; 2. 黄杞苷

Fig. 1 The HPLC Chromatogram of reference substance of astilbin and engelitin

1. astilbin; 2. engelitin

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度实验 取同一供试品溶液(S4)连续进样 5 次, 测定 HPLC 图, 比较 10 个标定的共有峰, 结果表明共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.02%~0.73%, 共有峰的相似度均 >0.984, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性实验 取同一供试品溶液(S4), 分别于 0, 2, 4, 8, 24, 36, 48 h 检测, 其共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.11%~1.24%, 共有峰的相似度均 >0.945, 结果表明: 供试品在 48 h 内稳定。另有实验表明供试品在 4 ℃ 冰箱内放置 1 周后仍稳定。

2.4.3 重复性实验 取同一批次的供试品(S4)5 份, 按照“2.3”项下的供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 分别进样, 测得共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.04%~0.34%, 共有峰的相似度 >0.968, 表明方法重复性良好。

2.4.4 加样回收率实验 以重复性实验所得落新妇苷、黄杞苷平均含量为样品含量, 精密称取样品 5 份, 加入等量对照品溶液, 按样品测定方法操作, 计算落新妇苷、黄杞苷平均加样回收率分别为 99.3%, 100.3%, RSD 分别为 1.7%, 1.5%。

2.5 菝葜药材 HPLC 指纹图谱的建立和解析

2.5.1 共有峰的标记 依照“2.3”项下的条件和方法测定 10 批原药材的 HPLC 图谱, 根据所给出的相关参数, 菝葜原药材的色谱峰在 120 min 内全部出现。根据共有率 >80% 的原则, 共有 47 个峰可候选为共有峰, 标定其中 10 个分离度良好、峰面积较大且稳定的峰为共有峰, 分别是 1 号(22.864 min)、2 号

(30.384 min)、3号(34.048 min)、4号(42.965 min)、5号(60.894 min)、6号(69.762 min)、7号(76.141 min)、8号(81.807 min)和9号(94.901 min)和10号(101.87 min)。见图2。其中8号峰和10号峰经分析认定分别是落新妇苷和黄杞苷产生的峰。从指纹图谱中可以看出9号峰面积较大,出峰时间稳定适中,符合作为参照峰的条件,故选其作为参照峰。将各指纹峰保留时间与同一图谱中参照物的保留时间比较,其比值为各指纹峰的相对保留时间。计算10批药材指纹图谱中各指纹峰的相对保留时间,10批药材中各共有峰的相对保留时间值的RSD≤2.56%。

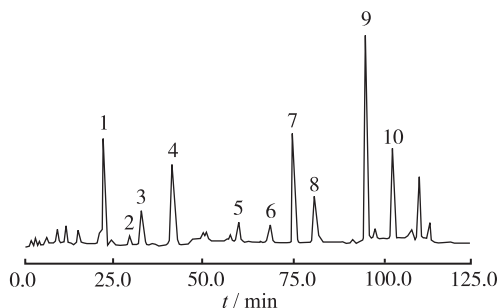


图2 菝葜药材 HPLC 指纹图谱

Fig.2 HPLC fingerprint of *Smilax china* L.

2.5.2 相似度计算 运用国家药典委员会制定的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版”,将10批次菝葜药材图谱数据导入,用平均值和中位数分别计算共有模式(时间窗宽度0.3),生成对照图谱,选择4个主要指纹峰作为校正的Mark峰,包括1号峰、8号峰、9号峰和10号峰进行多点校正及色谱峰匹配,得出10批菝葜药材的相似度,见表2。10批菝葜的色谱图见图3。

10批药材的相似度均>0.765,反映了药材在化学成分的组合上基本一样,但在组分的量上存在一定的差异。根据《中华人民共和国药典》2010版对菝葜药材质量的要求,按干燥品计算,含落新妇苷和黄杞苷的总量不得少于0.1%,除样品1外其他样品均达标。平均数和中位数所得的相似度结果有一定差异,应该综合考虑。

2.5.3 聚类分析 采用SPSS 15.0数据统计软件,将10个样品的共有峰面积数据,选用组间对比进行聚类,用余弦法计算样品相似度,聚类结果见图4。从树状聚类图可以看到S3、S6与其他样本区别较大,各为一类,从表2可以看到S3、S6无论用何种算法相似度均较低,与聚类分析结果一致,可以认为这两批药材质量较差。其他样本大致可以分为两类,其中S1、S7和S8为一类,

S2、S4、S5、S9和S10为一类,观察色谱图可发现,S1、S7和S8样本指纹图谱中9号峰面积均较大,是其他样本该峰面积的1.44倍以上,因而聚为一类。

表2 10批菝葜药材的相似度结果及LXF和HQ含量

Tab.2 Similarities of 10 batches of *Smilax china* L. and their content of astibin and engeletin

编号	落新妇苷 含量/%	黄杞苷 含量/%	相似度 (平均数)	相似度 (中位数)
S1	0.056	0.018	0.928	0.883
S2	0.214	0.007	0.877	0.888
S3	0.162	0.097	0.765	0.749
S4	0.086	0.048	0.958	0.969
S5	0.089	0.056	0.960	0.966
S6	0.079	0.069	0.855	0.826
S7	0.112	0.048	0.977	0.950
S8	0.139	0.045	0.964	0.939
S9	0.064	0.048	0.838	0.874
S10	0.15	0.027	0.959	0.972

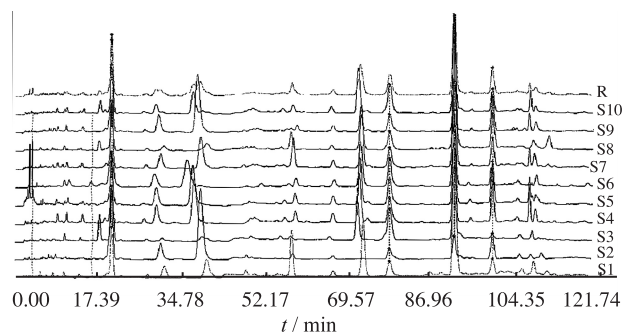


图3 10批菝葜药材的 HPLC 指纹图谱

Fig.3 HPLC fingerprint of 10 batches of *Smilax china* L.

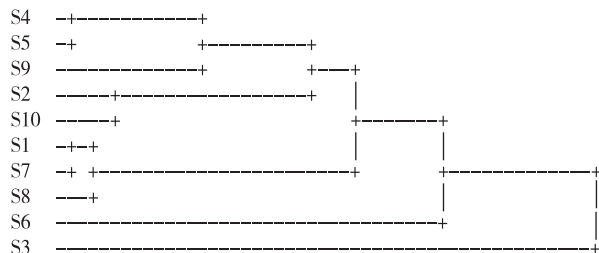


图4 10批菝葜药材的聚类分析图

Fig.4 Cluster analysis of 10 batches of *Smilax china* L.

3 讨论

3.1 提取方法和条件的考察 实验过程考察过70%甲醇、乙醇、乙醚和70%丙酮作为提取溶剂。其中乙醇提取液出峰数量少,其他溶剂提取液峰数量无明显变化,《中华人民共和国药典》2010年版菝葜含量测定项中选用甲醇作为提取溶剂,因此最终决定用甲醇作

为提取溶剂。考察回流法、超声提取法和煎煮法的提取效果,煎煮法的可控性较差,超声法和回流法提取效果相当,考虑到超声法操作简便,确定超声法为实验提取方法。

3.2 色谱条件的优化 本实验不仅要测落新妇苷和黄杞苷的含量,同时还要得到菝葜药材的指纹图谱。落新妇苷和黄杞苷的紫外最大吸收分别在 290 和 292 nm,指纹图谱要兼顾药材的整体性,因而要保证在所选波长下其他物质也要有较强吸收。由 DAD 检测器比较了波长在 210 ~ 400 nm 所测得的图谱,在 303 nm 下,基线平稳,出峰较多,信息较丰富,且落新妇苷和黄杞苷也有较大吸收,故选取 303 nm 作为测定波长。因菝葜成分中含有多羟基酚类化合物,在流动相中加入适量的磷酸,能使组分有较好的峰形和分离度^[3]。样品浓缩后,用甲醇复溶,发现有峰前延现象,可能是由于样品溶解的溶剂与流动相极性相差较大,

容易出现“溶剂效应”,用甲醇-0.1% 磷酸溶液(30 : 70)复溶后前延峰消失,峰对称性良好。

本实验对 10 批菝葜药材进行了 HPLC 指纹图谱的构建和解析,同时对《中华人民共和国药典》的规定成分进行含量测定。指纹图谱有助于药材的定性,含量测定则有利于评价药材质量。本文中所建立的方法准确度高、精密度高、易于操作、适用性强,可用于菝葜药材的质量分析。

参考文献

- [1] 陈东生,华小黎. 菝葜的研究现状[J]. 中药材,2006,29(1):90-93.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:290.
- [3] 周艳林,严海,钟小清,等. 菝葜药材脂溶性成分指纹图谱研究[J]. 中草药,2008,39(8):1246-1248.

DOI 10.3870/yydb.2012.04.024

大孔树脂纯化柞柳总黄酮工艺的研究

沈广志¹,金艳霞²,于春光³

(1. 牡丹江医学院药学院,黑龙江牡丹江 157011;2. 黑龙江省中医药学校,哈尔滨 151500;3. 哈尔滨乐泰药业有限公司,150025)

摘要 目的 研究 D-101 大孔吸附树脂分离纯化柞柳总黄酮的工艺条件。方法 以柞柳总黄酮为指标,对上样量、吸附时间、洗脱速度、乙醇浓度和上样药液 pH 进行考察。结果 大孔树脂分离柞柳总黄酮的最佳工艺条件为上样量 15 mL, pH 6 ~ 7, 吸附 30 min, 流速 3 BV · h⁻¹, 乙醇浓度 70%, 乙醇用量 3 BV。结论 D-101 大孔吸附树脂能有效分离纯化柞柳总黄酮。

关键词 柞柳;黄酮;大孔树脂

中图分类号 TQ460.6

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)04-0477-03

Study on the Technology for Extracting Flavonoids in *Tamarix chinensis* Lour by Macroporous Resin

SHEN Guang-zhi¹, JIN Yan-xia², YU Chun-guang³ (1. School of Pharmacy, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine of Heilongjiang Province, Harbin 151500, China; 3. Loctite Harbin Pharmaceutical Co. Ltd., Harbin 150025, China)

ABSTRACT Objective To study the conditions for isolating and purifying flavonoids in *Tamarix chinensis* Lour by D-101 type of macroporous adsorption resin. **Methods** The total flavonoids in *Tamarix chinensis* Lour was taken as a reference index. The sample volume, adsorption time, eluting velocity, ethanol concentration and pH value of the sample solution were investigated. **Results** The optimum conditions for isolating and purifying flavonoids in *Tamarix chinensis* Lour by D-101 type of macroporous adsorption resin were as follows: pH = 6-7, 15 mL sample of the original liquid, adsorption time of 30 min, 70% ethanol as an eluting reagent, and an eluting velocity of 3 BV · h⁻¹. **Conclusion** D-101 macroporous adsorptive resin can effectively isolate and purify total flavones from *Tamarix chinensis* Lour.

KEY WORDS *Tamarix chinensis* Lour; Flavonoids; D-101 Macroporous resin