

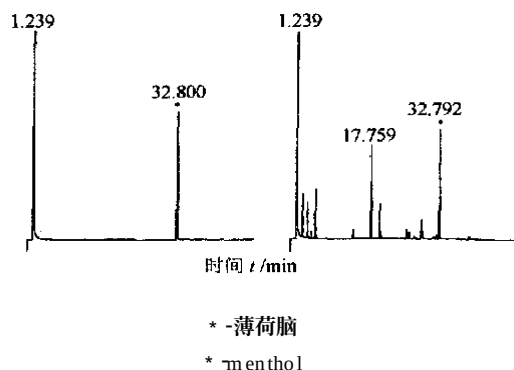


图 1 薄荷脑对照品(A)和薄荷油(B)的 GC 图谱

Fig. 1 GC chromatograms of menthol (A) and Oleum Menthae Dementholatum (B)

2.3 供试品溶液的制备: 取薄荷油约 50 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加适量正己烷溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 线性关系考察: 取薄荷脑对照品适量, 精密称定, 加正己烷溶解制成 15.00 mg/mL 的溶液, 作为储备液。分别精密称取储备液 0.2、0.6、1.0、1.4、2.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 用正己烷稀释至刻度, 摇匀, 分别进样 1 μ L。以薄荷脑峰面积和对应质量浓度绘制标准曲线, 得回归方程: $Y = 120\,779 X + 1\,112.2$, $r = 0.999\,8$ 。结果表明: 薄荷脑在 0.25~2.50 mg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验: 取薄荷脑对照品溶液, 进样 1 μ L, 重复进样 5 次, 测定峰面积, 计算得其 RSD 为

0.93%。

2.6 重现性试验: 取同批薄荷油 6 份, 制备供试品溶液, 进样, 测定, 计算薄荷脑的质量分数, 结果其 RSD 为 0.90%。

2.7 稳定性试验: 取供试品溶液于制备后 0、2、6、8、12 h 依法测定峰面积, 结果薄荷脑峰面积的 RSD 为 0.97%。

2.8 回收率试验: 精密称取含薄荷脑 300.36 mg/g 的薄荷油样品 25.00 mg, 共 6 份, 各加入薄荷脑对照品 7.50 mg, 制备成供试品溶液, 每次进样 1 μ L, 依法测定并计算加样回收率。结果平均回收率为 99.72%, RSD 为 1.10%。

2.9 样品测定: 取供试品溶液和对照品溶液, 分别进样 1 μ L, 测定峰面积, 按外标法计算薄荷脑的含量, 见表 1。

表 1 薄荷油中薄荷脑的测定结果 (n = 3)

Table 1 Menthol in Oleum Menthae Dementholatum (n = 3)

厂 家	批 号	薄荷脑/(mg · g ⁻¹)	RSD/%
上海万香日化有限公司	20209132	328.20	1.02
中南药业有限公司	031106	301.27	0.98
	031108	310.04	1.34
	031205	296.38	1.13

3 讨论

采用本法测定薄荷油中薄荷脑的含量, 方法灵敏、结果准确, 各成分能达到基线分离, 可以作为控制薄荷油质量的检测手段。

梔子中京尼平苷的分离及其含量测定

张丽茹¹, 于治国^{1*}, 范 岩², 涂继辉^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药大集琦药业有限责任公司, 辽宁 沈阳 110016)

梔子为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 味苦、性寒, 主治热病心烦、黄疸尿赤, 具有泻火除烦、清热利尿等作用。梔子化学成分复杂, 主要成分为环烯醚萜苷类, 京尼平苷 (geniposide, 梔子苷) 为主要有效成分之一。京尼平苷的提取分离方法主要有铅盐沉淀法、活性炭吸附法、中性氧化铝除杂质法等^[1]。本实验根据京尼平苷的理化特性, 通过硅胶柱色谱分离、醋酸乙酯-丙酮重结晶纯化, 制备京尼平苷单体, 并采用 HPLC 法

对各产地梔子药材中京尼平苷的含量进行测定, 为梔子的深入研究及质量控制提供可行方法。

1 仪器与试剂

岛津高效液相色谱仪 (配有 LC-10A Tvp 输液泵, SPD-10A vp 可变波长紫外检测器, TA-130 柱温箱, ANA STAR 色谱数据处理系统)。

甲醇 (色谱纯), 重蒸水 (自制), 其他试剂均为分析纯。梔子药材购自各地药材公司及药店。

2 方法与结果

* 收稿日期: 2003-12-12

作者简介: 张丽茹 (1977—), 女, 山东菏泽人, 沈阳药科大学药物分析学硕士研究生。

* 通讯作者 Tel: (024) 23843711-3366 E-mail: yzg-cnn@163.com

2.1 京尼平苷的分离鉴定: 取栀子仁 100 g, 加 75% 乙醇回流提取 3 次, 每次 500 mL, 提取 4 h, 合并提取液, 回收乙醇, 得浸膏。取浸膏用热水 90 mL 超声溶解, 石油醚萃取 4 次, 每次 30 mL。取水层用水饱和正丁醇萃取, 萃取至正丁醇层显淡黄色, 合并萃取液, 回收正丁醇得干浸膏。干浸膏用约 2 倍量硅胶拌样后上样于硅胶柱, 先以 5 倍体积氯仿洗脱, 再用氯仿-甲醇(14:1)洗脱, 分别收集洗脱液。经 TLC 跟踪, 合并含京尼平苷的洗脱液。回收溶剂, 得淡棕色粉末。用醋酸乙酯-丙酮(1:1)为溶剂, 进行重结晶, 得白色针状结晶。

结晶熔点为 148~150 °C, 易溶于水, 溶于甲醇、乙醇, 在热醋酸乙酯、丙酮中溶解度较大, 放冷后析出结晶, 难溶于乙醚、氯仿、吡啶等。EIMS 数据与文献报道一致^[2]。经 HPLC 分析, 确定该晶体为京尼平苷, 纯度为 99.8%。

2.2 色谱条件: 色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(33:66:1); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 40 °C; 检测波长: 238 nm。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称取京尼平苷对照品适量, 加流动相制成 0.5 mg/mL 的对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备^[3]: 取干燥栀子仁粉末约 0.2 g, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 超声处理 20 min, 放冷, 用甲醇补充至刻度, 摇匀, 静置。取上清液滤过, 精密量取续滤液 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.5 系统适用性考察: 取供试品溶液依法测定, 记录色谱图, 结果京尼平苷的保留时间为 5.9 min, 对称因子为 0.9~1.2, 理论板数大于 3 000, 与相邻峰的分离度大于 1.5, 见图 1。

2.6 线性范围考察: 精密吸取京尼平苷对照品溶液(0.5 mg/mL) 适量, 用流动相稀释制成质量浓度为 10、20、40、80、100、150、200 μg/mL 的系列溶液, 分别各精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪, 在上述色谱条件下测定。以质量浓度为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 其线性回归方程为: $A = 7976.2C + 2437.4$, $r = 0.9999$, 线性范围为 10~200 μg/mL。

2.7 精密度考察: 精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 重复进样 6 次, 记录色谱图, 测定京尼平苷峰面积, 计算得其 RSD 为 0.08%。

2.8 稳定性考察: 精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 在 0、1、2、4、8、12 h 进样, 记录色谱图, 测定京尼

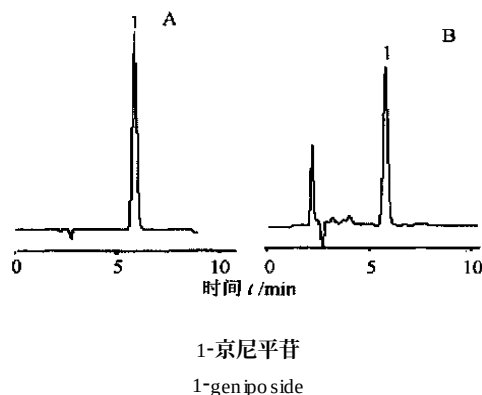


图1 京尼平苷对照品(A)和江西产栀子(B)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of geniposide (A) and Fructus Gardeniae from Jiangxi Province

平苷峰面积, 计算得其 RSD 为 0.29% ($n=6$), 结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验: 精密称取已知含量的样品各 0.1 g, 分别加入高、中、低 3 种质量浓度的对照品溶液适量, 进样测定, 结果平均回收率为 102.2%, RSD 为 0.7%。

2.10 样品中京尼平苷的测定: 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积按外标法计算。结果见表 1。

表1 栀子中京尼平苷的含量测定结果

Table 1 Geniposide in Fructus Gardeniae

产 地	京尼平苷/(mg · g ⁻¹)
浙江宁波	36.05
江西赣州	47.38
江苏	9.80
广西柳州	7.20
广西	8.88
广东	30.95
江西	19.88
江西吉水	17.80

3 讨论

3.1 萃取溶剂的选择: 萃取时不同的萃取溶剂的性质对萃取效果有显著影响, 通过实验证明以水饱和的正丁醇作为萃取溶剂时实验效果最佳。

3.2 TLC 展开剂的选择: 曾试用醋酸乙酯-丙酮-甲醇-水(10:6.2:0.5)为展开剂, 京尼平苷的斑点扩散严重, 并时有拖尾现象, 而采用氯仿-甲醇(5:2)展开时斑点较集中无明显扩散现象。

3.3 色谱条件的选择: 用京尼平苷测定的流动相有乙腈-水、乙腈-水-磷酸、甲醇-水等多种系统^[4], 《中华人民共和国药典》2000 年版一部栀子项下采用乙腈-水(15:85), 经考察以甲醇-水较佳, 当加入适量冰醋酸可进一步改善峰形, 故采用甲醇-水-醋酸

(33:66:1)。

References

- [1] Yan Y H. Simple separation method of geniposide in *Gardenia jasminoides* Ellis [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 4(4): 227-229.
- [2] Wang B Q. *Quality Standard and Standard Substance of Chinese Traditional Patent Medicine* (中成药质量标准与标准物质研究) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1986.
- [3] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [4] Chen F K. *Determination of Active Constituents in Common Chinese Herbal Medicine* (常用中草药有效成分含量测定) [M]. Beijing: Peoples Medical Publishing House, 1997.

HPLC 法定量分析熊胆中胆酸类化合物

朱丽玢¹, 洪筱坤^{2*}

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 上海中医药大学 化学教研室, 上海 201203)

国外常采用离子抑制色谱法^[1,2]和离子对色谱法^[3,4]分别测定结合型胆酸和游离型胆酸来实现胆酸类化合物的分离, 该方法无法一次性测定含胆酸类物质中胆酸类化合物的种类和含量。在洗脱方式上, 因为胆酸类化合物的 UV 检测波长很低 (205 nm), 而洗脱剂又是在该波长下有一定吸收的乙腈、甲醇等溶剂, 因而均采用等梯度洗脱, 这样就无法一次性分离极性相差较大的结合型和游离型胆汁酸。本实验建立了分离胆酸类化合物的双泵双比例反相离子抑制高效液相色谱法, 效果良好。

1 仪器与材料

P-E series 200 pump, 235C 二极管阵列检测器, 1022 plus 工作站。

乙腈 (HPLC 级), 水为市售 Spaklin 纯蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。胆酸 (CA)、脱氧胆酸 (DCA)、脱氢胆酸 (DHCA)、牛磺胆酸 (TCA)、牛磺去氧胆酸 (TDCA)、鹅去氧胆酸 (CDCA)、牛磺鹅去氧胆酸 (TCDCA)、牛磺熊去氧胆酸 (TUDCA) 对照品为 Sigma 产品; 熊去氧胆酸 (UDCA) 由上海医科大学提供。

熊胆样品由国家中药制药工程技术研究中心提供, 经叶愈青教授鉴定为熊科动物黑熊 *Selenarctos tibetanus* Cuvier 的胆囊。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制: 精确称取 CA、DCA、UDCA、CDCA、DHCA、TCA、TDCA、TUDCA、TCDCA 对照品适量, 用甲醇溶解, 配成浓度分别为 2 mg/mL 的单个对照品溶液。再精确称取上述对照品适量, 用甲醇溶解, 配成各组份浓度均为 2 mg/

mL 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备: 将熊胆风干后研成粉末 (密度约为 1 g/cm³), 精确称取约 100 mg, 加 25 倍体积的甲醇, 混合后超声 15 min, 2 500 r/min 离心 10 min, 吸取上清液置 10 mL 量瓶中, 重复 3 次, 补充甲醇溶液至刻度, 进样前用 4.5 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 流动相 pH 值的选择: 实验考察了在 pH 2.5~6.0 时混合对照品溶液的分离情况。结果表明: 流动相的 pH 值对各组份的保留时间及分离度的影响是至关重要的。随着流动相 pH 值的降低, 分离效率也越来越好。考虑到柱的承受能力, 本实验选择流动相的 pH 值为 3。

2.4 缓冲溶液浓度的选择: 本实验考察了磷酸盐浓度为 2~50 mmol/L 时混合对照品溶液的分离情况。缓冲溶液浓度的增加提高了各组份的 K 值, 这是由于流动相的离子强度增加的缘故。但各组份的分离度并无明显改进, 为了避免不必要的麻烦 (柱的堵塞), 选用缓冲溶液的浓度为 5 mmol/L。

2.5 流动相组成比例对分离的影响: 首先考察了等梯度分离时的情况。在乙腈含量为 60% 时, TDCA、DHCA、CA、DCA、UDCA、CDCA 6 种组份得到分离, 而 TCA、TUDCA、TCDCA 则混在一起出峰。当乙腈含量为 25% 时, 先洗脱出柱的成分虽然可以分开但极性小的成分由于保留时间过长而引起的区带扩散导致峰形过宽, 甚至未见洗出。而试图采用梯度洗脱时, 基线漂移严重。因而, 考虑采用分级洗脱方式, 首先用低乙腈含量的洗脱剂分离极性大的组份, 再在适当的时候换上高乙腈含量的洗脱剂以使极性

* 收稿日期: 2004-01-25

* 通讯作者