

苷,杂质却因未到饱和而很少析出,所以固体沉淀量增加(从0.864 g增加到2.967 g),但其表观纯度下降不大(从79.32%下降到74.08%)。从C到E过程,柚皮苷等杂质也逐渐达到饱和析出,所以固体沉淀量迅速增加(从2.967 g增加到4.858 g),表观纯度下降明显(从74.08%下降到62.96%)。从结晶的角度看,在D和E中,虽然固体沉淀量很多,但由于固体沉淀中杂质太多,其中不单只有柚皮苷,还有许多色素类杂质都沉淀析出,对结晶产生很大的影响,直至E无法结晶。所以,本实验中新橙皮苷的分离是一种基于新橙皮苷和柚皮苷在正丁醇溶解度差异的分离方法,所以正丁醇萃取液的减压浓缩的程度是非常关键的一步,直接关系到新橙皮苷的纯度和

生产得率。

3.3 杂质促溶作用对新橙皮苷产品得率的影响:表1显示的促溶能力暗示着枳壳的提取方法对最终新橙皮苷产品得率的影响是非常复杂的,一方面是新橙皮苷提取率对最终产品得率的影响;还有另一个不能忽略的方面是不同的提取方法会带入不同的杂质,这也会对最终产品得率和质量产生影响。

#### References:

- [1] Del Rio J A, Fuster M D, Sabate F, *et al.* Selection of *Citrus* varieties highly productive for the neohesperidin dihydrochalcone precursor [J]. *Food Chem*, 1997, 59: 433-437.
- [2] Li J, Shi R B, Lin B. Quantitative determination of neohesperidin in the antidepressive fraction of Sini Powder by RP-HPLC [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2004, 27 (1): 54-56.

## RP-HPLC 法测定金槐冠心病片中薯蓣皂苷元的含量

徐雄良<sup>1</sup>, 向 轶<sup>1</sup>, 柯尊洪<sup>2</sup>, 张志荣<sup>1\*</sup>

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 成都康弘科技实业(集团)有限公司, 四川 成都 610041)

**摘要:**目的 建立 RP-HPLC 法测定金槐冠心病片中薯蓣皂苷元含量的方法。方法 采用 RP-HPLC 法, Shim-pack CLC-ODS 柱(150 mm×6.0 mm, 5 μm), 以甲醇-乙腈(3:2)为流动相, 在 206 nm 波长下测定样品水解后的薯蓣皂苷元含量。结果 该方法专属性强; 平均空白回收率为 95.6%, RSD 为 2.44%, 平均加样回收率为 98.7%, RSD 为 2.66% (n=6)。结论 该方法简便, 分离效果好, 可用于金槐冠心病片中薯蓣皂苷元的质量控制。

**关键词:**金槐冠心病片; 薯蓣皂苷元; 高效液相色谱

**中图分类号:**R286.02

**文献标识码:**B

**文章编号:**0253-2670(2005)04-0527-03

### Quantitative analysis of diosgenin in Jinhuai Guanxin Tablet by RP-HPLC

XU Xiong-liang<sup>1</sup>, XIANG Yi<sup>1</sup>, KE Zun-hong<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-rong<sup>1</sup>

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Chengdu Kanghong Science and Technology Industry (Group) Co., Ltd., Chengdu 610041, China)

**Key words:** Jinhuai Guanxin Tablet; diosgenin; HPLC

金槐冠心病片由四川省中药研究所于1973年研制,对冠状动脉粥样硬化性冠心病具有较好的治疗效果<sup>[1]</sup>,收载于《四川省药品标准》(中药成方制剂,1993年版)。本品由穿山龙、槐米、雪胆3味药材经提取压制而成,具有活血、散结、通脉等功效。原标准未对其质量进行控制。穿山龙为方中主药,主要含有多种水溶性和水不溶性皂苷,其中水不溶性皂苷主要为薯蓣皂苷元与不同糖类结合而成的薯蓣皂苷,常通过测定水解后生成的薯蓣皂苷元来控制穿山龙的质量。由于本品穿山龙是以70%乙醇渗漉后的提

取物投料,因此可通过直接水解穿山龙总皂苷来测定片中的薯蓣皂苷元。文献报道<sup>[2]</sup>在低波长下采用 RP-HPLC 测定穿山龙中薯蓣皂苷元的含量,本实验在此基础上进一步考察其色谱条件,测定金槐冠心病片中薯蓣皂苷元的含量。该方法简便、分离效果好,可用于控制本品的质量。

#### 1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10Avp 高效液相色谱仪,包括 SPD-10Avp 紫外可见光检测器,CLASS-VP V5.03 色谱数据处理工作站;CQ-250 型超声波清

收稿日期:2004-07-06

基金项目:四川省重点科技项目(01SG008-01)

\* 通讯作者 Tel: (028) 85501566 Fax: (028) 85456898 E-mail: zrzl@vip.sina.com

洗器(中国船舶工业总公司第七研究院第七二六研究所);薯蓣皂苷元对照品(供含量测定用,批号:1539-200001,中国药品生物制品检定所);金槐冠心病片(自制,批号:010901、010902、011007、011008);甲醇、乙腈为色谱纯;水为重蒸水;其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Shim-pack CLC-ODS 柱(150 mm×6.0 mm, 5 μm)(日本岛津),流动相为甲醇-乙腈(3:2),体积流量为 1 mL/min,检测波长为 206 nm,柱温为 30 °C,进样量为 10 μL。理论板数按薯蓣皂苷元峰计不低于 7 000,分离度大于 2.0。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取在 60 °C 减压干燥 4 h 的薯蓣皂苷元对照品适量,加甲醇制成 0.15 mg/mL 的溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 水解时酸种类和浓度的选择:取本品素片适量,研细,取适量(相当于穿山龙 0.25 g),精密称定,置 50 mL 圆底烧瓶中,分别加入 1 mol/L 硫酸、2 mol/L 硫酸、2 mol/L 盐酸各 30 mL,水浴回流 5 h,冷却,滤过,用适量水洗涤容器及滤渣,烘干(70~80 °C),加氯仿 20 mL,超声处理 10 min,滤过;滤渣与滤纸再加氯仿 20 mL,同法超声处理 2 次,滤过,合并滤液,挥干氯仿,残渣加甲醇使溶解,移置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,离心,取上清液,按上述色谱条件测定,结果表明 2 mol/L 盐酸水解较 2 mol/L 硫酸稍好。因此选择 2 mol/L 盐酸。

2.3.2 水解时酸量和时间的选择:按上述试验条件,考察样品分别在 2 mol/L 盐酸 30 mL 水解 5 h、40 mL 水解 4 h 和 40 mL 水解 5 h 时的程度。结果以 40 mL 盐酸水解 5 h 时的水解条件最优。

2.3.3 超声提取溶剂的选择:在上述条件下,分别以氯仿、石油醚、醋酸乙酯、苯为超声提取溶剂,同法制样,测定。结果表明,上述 4 种溶剂的超声提取效率依次减小。因此,选择氯仿为超声提取溶剂。

2.3.4 超声提取次数的选择:由于本品经酸水解后生成的薯蓣皂苷元与槲皮素等均不溶于酸水中,水解液冷却后滤过,取滤渣与滤纸于 70~80 °C 烘干(约 2 h),加氯仿 20 mL,在超声(35 kHz、320 W)处理 10 min 的条件下考察薯蓣皂苷元提取完全的次数。结果表明,在上述条件下,第 3 次提取仅为前 2 次的 1%。因此,超声提取 3 次即可达到完全提取。

2.3.5 供试品溶液的制备:取本品适量,除去薄膜衣,研细,取适量(相当于穿山龙 0.25 g),精密称定,

置 50 mL 圆底烧瓶中,加 2 mol/L 盐酸 40 mL,沸水回流 5 h,取出,冷却,滤过,用适量水洗涤容器及滤渣,烘干(70~80 °C),加氯仿 20 mL,超声处理 15 min,滤过;滤渣与滤纸再加氯仿 20 mL,同法超声处理 2 次,每次 10 min,滤过,合并滤液,挥干氯仿,残渣加甲醇使溶解,移至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,离心,取上清液,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备:精密称取阴性样品(全处方中缺穿山龙,按样品制备工艺制备)适量,按上述供试品溶液的制备方法制样,即得。

2.5 精密度试验:精密吸取供试品溶液,在上述色谱条件下连续进样 6 次,测定薯蓣皂苷元的峰面积,计算其 RSD 为 1.72% ( $n=6$ )。

2.6 稳定性试验:精密吸取供试品溶液,在上述色谱条件下,每 2 h 测定 1 次。结果表明,供试品溶液在 10 h 内稳定,样品中薯蓣皂苷元质量分数的 RSD 为 1.44% ( $n=6$ )。

2.7 重现性试验:取同一批样品 6 份,按上述供试品溶液的制备方法和测定条件,平行测定,每份样品进样 3 次,计算样品中薯蓣皂苷元的质量分数,结果其 RSD 为 1.34%。

2.8 回收率试验:取上述阴性对照溶液和已知薯蓣皂苷元含量的金槐冠心病片粉末各 6 份,精密称定,分别加入 1.512 mg/mL 薯蓣皂苷元对照品溶液 1.0 mL 和 0.5 mL,同法制样,测定,计算回收率。结果薯蓣皂苷元的平均空白回收率为 95.6%,RSD 为 2.44%;平均样品回收率为 98.7%,RSD 为 2.66% ( $n=6$ )。

2.9 样品测定:按上述供试品溶液的制备方法和测定条件,测得 4 批样品中薯蓣皂苷元的质量分数分别为:0.61% (RSD=2.36%)、0.59% (RSD=1.97%)、0.53% (RSD=1.09%)、0.54% (RSD=1.57%) ( $n=3$ )。即样品中薯蓣皂苷元的平均质量分数为 0.56%,每片按 0.2 g 计算则为 1.1 mg,故确定本品每片含穿山龙以薯蓣皂苷元( $C_{27}H_{42}O_3$ )计,不得少于 1.0 mg。色谱图见图 1。

## 3 讨论

3.1 流动相的优化:参照文献报道<sup>[2]</sup>比较了甲醇-乙腈的体积比为 4:1、7:3 和 3:2 时供试品溶液的色谱图,结果仍以甲醇-乙腈(3:2)时基线平直、分离效果最佳。

3.2 供试品溶液的水解条件:本品由穿山龙、槐米、雪胆 3 味药材的提取物组成,其中槐米提取物水解后主要为槲皮素,雪胆提取物主要为雪胆总皂苷。在

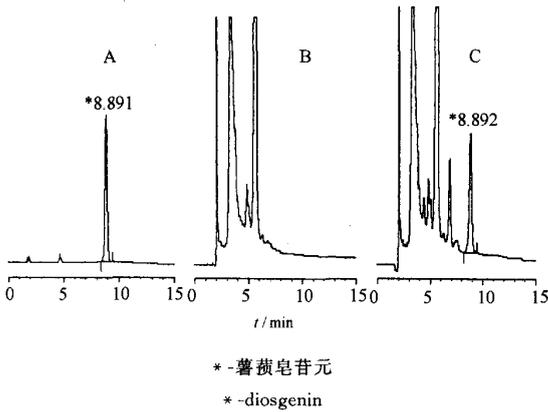


图 1 薯蓣皂苷元对照品(A)、阴性对照(B)和金槐冠心片(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of diosgenin (A), negative sample (B), and Jinhui Guanxin Tablet (C)

酸性条件下水解穿山龙总皂苷时,雪胆总皂苷也可被水解,其主要皂苷元为齐墩果酸<sup>[3]</sup>。经优化,本试验选择 2 mol/L 盐酸 40 mL 水浴回流 5 h,而文献报道<sup>[2]</sup>选择 1 mol/L 硫酸 20 mL 水解 5 h 测定 0.25 g 穿山龙中的薯蓣皂苷元,说明雪胆总皂苷等成分的影响而需要更多的酸才能使穿山龙总皂苷完全水解。经与齐墩果酸对照品(供含量测定用,批号:0709-9803,中国药品生物制品检定所)比较,样品水解后约在 22 min 处可见齐墩果酸峰,进一步表明雪胆总皂苷水解为齐墩果酸并消耗一定量的酸。另外,文献报道<sup>[1]</sup>采用 3 mol/L 盐酸 50%乙醇溶液测定本片中穿山龙和雪胆皂苷水解产物的总量。在水解甾体皂苷时,通常使用硫酸、盐酸进行水解。文献报道认为穿山龙水解为薯蓣皂苷元时使用 2 mol/L 盐酸较 2 mol/L 硫酸佳<sup>[4]</sup>。本试验亦表明,使用 2 mol/L 盐酸较 2 mol/L 硫酸稍好,而使用 1 mol/L 硫酸水解较差。因此,对于不同的药材和不同组成的制

剂,其水解时酸的种类、浓度、酸量、时间各不相同,必须对水解条件进行优化。

3.3 在上述色谱条件下,供试品中薯蓣皂苷元的分离度较大,阴性对照溶液在薯蓣皂苷元峰对应处基线平直,对测定无干扰。由于本品中雪胆总皂苷的主要水解物齐墩果酸,不溶于水,亦可被氯仿提取,且在 208 nm 波长处有最大吸收,但在上述色谱条件下的  $t_R$  值约为 22 min,因此对薯蓣皂苷元的测定无干扰。而槲皮素在水中几乎不溶,氯仿中微溶,在低波长处无紫外吸收,因此,对测定亦无干扰。

3.4 由于本品中的槲皮素比例较大,不利于供试品溶液的制备,采用氯仿超声提取经干燥后的滤渣,不仅可有效提取薯蓣皂苷元,也可除去大量的槲皮素。

3.5 本品水解液冷却后的滤液,经氯仿提取 3 次,每次 20 mL,同法制样,在上述色谱条件下测定。结果表明,滤液中未检出薯蓣皂苷元。

3.6 原质量标准采用重量法间接测定穿山龙和雪胆皂苷水解产物的总量,质量难以控制。本实验采用 RP-HPLC 法测定其薯蓣皂苷元,方法简单、准确可靠,可用于控制本品的质量。同时,在该条件下,亦可考察雪胆总皂苷的水解程度,以实现在同一条件下同时测定本品中薯蓣皂苷元和齐墩果酸,从而更好地控制本品的质量。

References:

[1] Chao C L. *Handbook of Preparations of Chinese Materia Medica* (中药制剂汇编) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1983.  
 [2] Xu X L, Zhang Z R, Ke Z H. Quantitative analysis of diosgenin in *Rhizoma Dioscoreae Nipponicae* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28 (9): 885-887.  
 [3] Lin X Q, Shi Y Q, Yang P Q, et al. Studies on the saponins *Xiaohuaxuedan* (*Hemsleya graciliflora*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28 (3): 136-138.  
 [4] Guo W S, Liu D W, Zhou X Q, et al. Extraction of dioscorea-saponin and diosgenin [J]. *Guizhou Chem Ind* (贵州化工), 1996, 21 (2): 14-17.

美国 ALPHA 实验室认可  
 美中国际合作中国企业

# 葡萄籽提取物

(原花青素 ≥ 95%)

专业生产厂家  
 电话: 0086-22-25293102; 25295475  
 传真: 0086-22-25293103  
 网址: <http://www.jf-natural.com>  
 Tianjin Jianfeng Natural Product R & D Co., Ltd  
**天津尖峰天然产物公司**  
 天津经济技术开发区第十二大街