

20); 体积流量: 1.0 mL/min; 紫外检测波长: 205 nm; 进样量为 20 μ L。

2.5.2 待测液的制备: 把制备所得样品用流动相定容于 100 mL 量瓶中, 超声处理 20 min, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.5.3 测定法: 精密吸取待测液 20 μ L 注入高效液相色谱仪, 平行测定 5 次并取平均值, 结果九节龙皂苷 I 的保留时间为 11.968 min, 面积归一化定量确定产品质量分数大于 99%, 外标法定量确定产品质量分数为 99.3%, 色谱图见图 3。通过对制备色谱系统的色谱条件优化, 从九节龙皂苷 I 粗品中可分离出九节龙皂苷 I, 其质量分数达到了 99% 以上。从色谱图可以看出其分离度较好, 无杂质峰的干扰, 该方法适用于分离纯化九节龙皂苷 I 单体, 为工业化生产提供了依据。

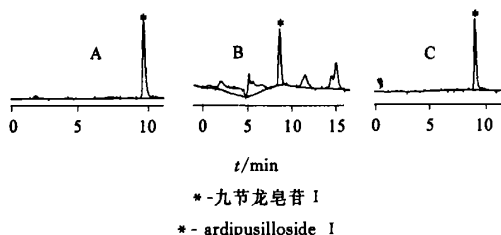


图3 九节龙皂苷 I 对照品(A)、粗品(B)和分离后产品(C)的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC Chromatograms of ardisiposilioside I reference substance (A), crude product (B), and isolated product (C)

3 讨论

本实验所用的技术是依托于制备色谱系统, 采用的是 Sinocrom ODS-BP 为填充剂, 即反向技术。

分离皂苷一般均使用阳离子柱色谱以及重结晶技术, 但是运用柱色谱以及重结晶技术进行分离的时候, 因为九节龙总皂苷中有性质相近的九节龙皂苷 I, 较难分离出来, 而且柱色谱和重结晶需反复操作, 相当麻烦, 且耗时长, 不利于工业化生产。而本法具有简便、快捷、科学、周期短、改良后自动化程度高、收集全面等优点, 而且样品质量分数高, 为工业化的生产奠定了基础。

在实验条件的摸索中发现当增大体积流量时, 九节龙皂苷 I 的保留时间会提前, 但是分离度也随之降低, 而且检测系统的压力也随之增大, 而减小体积流量后虽然分离较好, 但峰变宽且保留时间变长, 因此选择了 1.5 mL/min 的体积流量既使保留时间缩短又能达到良好的分离度。

在流动相选择方面, 在考察了多种溶剂以及化合物本身的性质后, 最终选择了甲醇和水的混合体系作为流动相, 然而在选择水-甲醇比例时发现, 当水-甲醇比例大于 20:80 时对色谱柱造成的压力相当大, 很容易堵塞柱子, 当水-甲醇溶液的比例小于 20:80 时, 样品的分离度又不好, 因此最终确定 20:80 的比例。

参考文献:

- [1] 王晓娟, 张清华. 毛茎紫金牛(九节龙)化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1990, 15(3): 38-39.
- [2] 陶小军, 龙静雯, 贺建宇, 等. 九节龙皂苷 I 的抗肿瘤作用和免疫调节作用[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(9): 1070-1073.
- [3] 张清华, 王晓娟, 缪振春, 等. 川产九节龙皂苷的化学反应[J]. 药学报, 1993, 28(9): 673-678.

牛膝不同炮制品中多糖的测定

林肖惠^{1,2}, 刘 鹏¹, 徐为人¹, 汤立达³

- (1. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193; 2. 天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300072; 3. 天津药物研究院 天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193)

摘要:目的 探讨不同炮制方法对牛膝中多糖的影响。方法 采用苯酚-硫酸法测定牛膝不同炮制品中多糖, 比较各炮制品中多糖的差异。结果 牛膝酒制品、盐制品、牛膝炭和生品中多糖分别为 9.06%、8.20%、4.88%、6.05%。以酒制品中的多糖最多, 牛膝炭中最少。结论 不同炮制方法能够影响牛膝中多糖。

关键词:牛膝; 炮制品; 多糖; 苯酚-硫酸法

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2008)08-1180-03

收稿日期: 2008-01-30

基金项目: 天津市应用基础研究计划项目(06YFJZJC02800)

作者简介: 林肖惠(1984—), 女, 硕士研究生。Tel: 13821613202 E-mail: 8214143@163.com

牛膝为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根, 味苦、酸, 性平, 归肝、肾经, 具有补肝肾, 强筋骨, 逐瘀通经, 引血下行等功效, 临床多用于腰膝酸痛, 筋骨无力, 经闭瘕瘕, 肝阳眩晕等症状^[1]。近年来在人工流产、关节炎、肿瘤化疗所致的白细胞减少等方面的治疗应用增加。牛膝含糖类、皂苷类、甾类成分^[2]。多糖是牛膝中的重要成分, 在对牛膝化学成分和药理作用的研究中占有很大的比例^[1~3]。牛膝多糖的研究多集中于对不同产地牛膝的比较, 或是针对某种炮制品的测定。临床上牛膝常以生牛膝、酒牛膝、盐牛膝、牛膝炭入药, 因此本实验研究了牛膝炮制品中多糖的差异, 为阐明牛膝临床应用提供依据。

1 材料

Spectrumlab 54 型紫外可见分光光度计(上海棱光技术有限公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); FW177 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器公司)。

牛膝药材购自泰安市永春堂中药饮片有限公司, 经泰山医学院鉴定教研室鉴定为苋科植物牛膝 *A. bidentata* Bl. 的干燥根; D-无水葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110833-200511); 绍兴黄酒(浙江萧山二星酒厂); 食盐(天津); 浓硫酸、苯酚、乙醇等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 不同炮制品的制备

酒制牛膝: 取生牛膝, 加黄酒拌匀, 闷透; 置锅内, 用文火加热, 炒干, 取出, 放凉。每 100 g 牛膝用黄酒 10 g。

盐制牛膝: 取生牛膝, 加盐水拌匀, 闷透; 置锅内, 用文火加热, 炒干, 取出, 放凉。每 100 g 牛膝用食盐 2 g。

牛膝炭: 取生牛膝, 置锅内, 用武火炒至外表黑色, 断面深棕色, 取出, 晾干。

2.2 对照品溶液的配制: 取 D-无水葡萄糖对照品约 4 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 即得。

2.3 5% 苯酚溶液的配制: 将结晶的苯酚置 55 ℃ 水浴锅中加热使其溶解, 然后常压蒸馏收集馏分 25 mL, 置 500 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 放入冰箱中备用。

2.4 供试品溶液的制备: 将牛膝样品于 50 ℃ 下干燥 4 h, 粉碎, 过 60 目筛, 取粉末 10 g, 精密称定, 置 500 mL 圆底烧瓶内, 加蒸馏水 250 mL, 加热提取 1 h, 提取液 4 000 r/min 离心 10 min, 去除残渣, 上清

液加热浓缩至 100 mL, 加 2 倍量的 95% 乙醇, 静置 12 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 分离沉淀, 干燥后用蒸馏水溶解并定容至 500 mL, 氯仿-正丁醇(4:1)与溶液按体积比 4:1 脱蛋白^[4], 分取上清液, 精密量取 1.0 mL, 加无水乙醇至乙醇体积分数达 70%, 冷藏, 5 000 r/min 离心 30 min, 取沉淀, 依次加乙醚、无水乙醇洗涤 3 次, 挥干, 沉淀加水溶解, 定容至 100 mL 备用。

2.5 最大吸收波长的选择: 精密量取葡萄糖对照品溶液 0.6 mL, 加蒸馏水至 2.0 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 混匀, 迅速加入浓硫酸 5 mL, 振摇 5 min, 置沸水浴中 15 min, 取出, 立即置冷水浴中冷却 30 min; 精密量取蒸馏水 2.0 mL, 同法制得空白溶液; 在紫外-可见分光光度计上于 200~800 nm 扫描, 确定最大吸收波长为 490 nm。

2.6 线性关系考察: 精密量取葡萄糖对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 分别加蒸馏水至 2.0 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 按照苯酚-硫酸法处理, 于 490 nm 处测定吸光度值。以吸光度为纵坐标, 质量为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 0.01281X - 0.0211$, $r = 0.998$ 。结果表明葡萄糖在 2~6 mg/mL 与吸光度呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验: 精密量取供试品溶液 0.6 mL, 加蒸馏水至 2.0 mL, 按照苯酚-硫酸法处理, 测定吸光度值, 重复操作测定 5 次, 计算, RSD 为 1.95%。

2.8 稳定性试验: 精密量取供试品溶液 0.6 mL, 加蒸馏水至 2.0 mL, 按照苯酚-硫酸法处理, 测定吸光度值, 每隔 20 min 测定 1 次, 结果在 2 h 内测定结果稳定。

2.9 重现性试验: 精密量取牛膝生品, 共 6 份, 制备供试品溶液, 每份 0.6 mL, 分别加蒸馏水至 2.0 mL, 按照苯酚-硫酸法处理, 测定吸光度值, 计算多糖的质量分数, RSD 为 1.42%。

2.10 回收率试验: 精密称取牛膝生品约 5 g 左右, 加入定量的葡萄糖对照品, 制备供试品溶液, 按照苯酚-硫酸法处理, 测定吸光度值, 计算回收率, 结果平均回收率为 99.09%, RSD 为 0.92%。

2.11 不同炮制品中多糖的测定: 分别取生牛膝、酒制牛膝、盐制牛膝和牛膝炭粉末各 10 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 按照苯酚-硫酸法处理, 测定吸光度值, 代入回归方程进行计算, 得到生牛膝、酒制牛膝、盐制牛膝和牛膝炭中多糖的质量分数, 见表 1。结果表明, 不同的炮制方法影响牛膝多糖的量, 以酒制品中的多糖最多, 牛膝炭中的最少。

表1 不同牛膝炮制品中多糖的测定结果($n=6$)Table 1 Determination of polysaccharide
in different processings of *Radix*
Achyranthis Bidentatae ($n=6$)

炮制品	多糖/%	炮制品	多糖/%
生牛膝	6.05	酒制品	9.06
盐制品	8.20	牛膝炭	4.88

3 讨论

苯酚-硫酸法较为稳定,而且不同的多糖和单糖显色反应后显示不同的最大吸收峰,是较为理想的多糖测定方法^[5]。本研究利用苯酚-硫酸法对牛膝不同炮制品中多糖进行了测定,结果表明该方法比较可靠。

本研究通过测定牛膝不同炮制品中的多糖,发现炮制后牛膝中多糖发生变化,酒制牛膝及盐制牛膝中多糖均有不同程度的升高,而牛膝炭中多糖下降,这可能是由于高温使部分糖类成分炭化损失所

致。而酒炒后的牛膝中多糖有明显升高,这可能是酒炒后使牛膝中糖类有效成分溶解度增加。牛膝多糖是牛膝中主要化学成分,而药理活性必定与化学成分相联系,故不同炮制品中多糖的量不同,必定引起药理活性的不同。故有生牛膝侧重于活血通经、利水通淋,酒牛膝补肝肾,强筋骨,活血通经的力量增强,盐牛膝增强了入肾的力量,引药入肾,长于通淋,而牛膝炭主要是止血作用。

参考文献:

- [1] 陶家麒,王九一. 牛膝多糖工艺研究[J]. 中国医药工业杂志, 1995, 26(11): 481-482.
- [2] 刘颖华,何开泽,张军峰,等. 川牛膝多糖的分离、纯化及单糖组成[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(2): 141-145.
- [3] 方积年,张志花,刘柏年. 牛膝多糖的化学研究[J]. 药学报, 1990, 25(7): 526-529.
- [4] 齐慧玲,魏绍云,王继伦,等. Sevag 法去除白及多糖中蛋白的研究[J]. 天津化工, 2000(3): 20.
- [5] 钟方晓,任海华,李岩. 多糖含量测定方法比较[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(8): 1916-1917.

丹参中总酚酸测定的前处理方法研究

魏惠珍¹, 张洁¹, 饶毅^{2*}, 吴有根¹, 方海红¹, 陈银芳¹, 朱圣生¹

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

丹参是唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根茎,其有效成分包括水溶性成分和脂溶性成分。脂溶性成分是以丹参酮为代表的醌类化合物,具有很好的抗炎作用;水溶性成分总称为总酚酸,主要有丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B^[1]。总酚酸具有明显的抗血栓形成、抗脂质过氧化和溶纤的作用,是治疗心绞痛、心肌缺血、心肌梗死等心血管病的有效成分,其中丹酚酸 B 的量最高,而且是主要的活性成分。丹参总酚酸的前处理方法多采用酸提或提取完后调 pH 值至 2 左右^[2~8],提取效率低。因此本实验对丹参中总酚酸的前处理方法进行了改进,并同时采用比色法和高效液相色谱法对丹参总酚酸进行了测定。

1 仪器与材料

日本岛津 UV2550 紫外分光光度计; Waters 2695 高效液相色谱仪, Empower 色谱工作站; 日本岛津 LC10Atp 高效液相色谱仪。

原儿茶醛、丹酚酸 B、丹参素钠对照品均购于中国药品生物制品检定所; 乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,去离子水。丹参药材产自山东,经笔者鉴定为丹参 *S. miltiorrhiza* Bunge 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 总酚酸的比色法测定: 取样品溶液 0.2 mL 于 10 mL 量瓶中, 分别加入 5% NaNO₂ 0.5 mL、10% Al(NO₃)₃ 0.5 mL、4% NaOH 溶液 4 mL, 用水补足至刻度, 立即进行紫外扫描。以缺 NaOH 溶液的样品溶液作参比, 置 1 cm 的吸收池中, 在 500 nm 处测定吸光度, 以丹酚酸 B 计, 按线性回归方程计算。

2.2 总酚酸的 HPLC 法测定

2.2.1 色谱条件: 色谱柱为伊利特 ODS₂; 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸, 梯度洗脱 (0~15 min, 5% 乙腈; 16~30 min, 25% 乙腈); 检测波长 281 nm; 进样量: 10 μ L。

2.2.2 测定: 配制适宜质量浓度的各对照品溶液,

收稿日期: 2008-02-25

作者简介: 魏惠珍 (1965—), 女, 江西南昌人, 副主任药师, 研究方向: 中药质量控制。

Tel: (0791)7119625 E-mail: weihuizhen_101@126.com

* 通讯作者 饶毅 Tel: (0791)7119609 E-mail: raoyi99@126.com

牛膝不同炮制品中多糖的测定

作者：[林肖惠](#)，[刘鹏](#)，[徐为人](#)，[汤立达](#)
作者单位：[林肖惠\(天津药物研究院天津市新药设计与发现重点实验室, 天津, 300193; 天津大学药物科学与技术学院, 天津, 300072\)](#)，[刘鹏, 徐为人\(天津药物研究院天津市新药设计与发现重点实验室, 天津, 300193\)](#)，[汤立达\(天津药物研究院天津药代动力学与药效动力学学部共建国家重点实验室, 天津, 300193\)](#)
刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2008, 39(8)
被引用次数：2次

参考文献(5条)

1. [阎家麒;王九一](#) [牛膝多糖工艺研究](#) 1995(11)
2. [刘颖华;何开泽;张军峰](#) [川牛膝多糖的分离、纯化及单糖组成](#)[期刊论文]-[应用与环境生物学报](#) 2003(02)
3. [方积年;张志花;刘柏年](#) [牛膝多糖的化学研究](#) 1990(07)
4. [齐慧玲;魏绍云;王继伦](#) [Sevag法去除白及多糖中蛋白的研究](#) 2000(03)
5. [钟方晓;任海华;李岩](#) [多糖含量测定方法比较](#)[期刊论文]-[时珍国医国药](#) 2007(08)

本文读者也读过(10条)

1. [杨朝莲. 张运杰. Yang Chao-lian. ZHANG Yun-jie](#) [牛膝及其炮制品中齐墩果酸的含量测定研究](#)[期刊论文]-[中医药导报](#)2005, 11(6)
2. [张振凌. 吴国学. 张红伟. 刘博](#) [不同种类不同浓度酒炮制对牛膝饮片主要有效成分的影响](#)[会议论文]-2008
3. [张振凌. 石延帮. 陈红. 王一硕. 吴国学](#) [不同商品等级牛膝饮片酒炙前后齐墩果酸含量的比较](#)[期刊论文]-[中药材](#) 2008, 31(5)
4. [施锁平](#) [牛膝不同炮制方法对镇痛作用的影响](#)[期刊论文]-[现代中药研究与实践](#)2003, 17(4)
5. [罗霄山. 孙冬梅. 张诚光. 吴星火](#) [正交实验优选盐炙怀牛膝的最佳炮制工艺](#)[期刊论文]-[中药新药与临床药理](#) 2008, 19(4)
6. [张振凌. 吴国学. 李君丽. ZHANG Zhen-ling. WU Guo-xue. LI Jun-li](#) [不同种类酒炮炙对牛膝饮片齐墩果酸含量的影响](#)[期刊论文]-[中国实验方剂学杂志](#)2010, 16(6)
7. [朱京祎](#) [黔产牛膝炮制工艺及饮片质量标准研究](#)[学位论文]2009
8. [黄志芳. 黄志红. 胡吉林. 周跃辉. 魏得良](#) [土牛膝中齐墩果酸、牛膝多糖的提取与鉴定](#)[期刊论文]-[中国实用医药](#) 2010, 5(17)
9. [赵婉婷. 孟大利. 李铤. 李巍. ZHAO Wan-ting. MENG Da-li. LI Xian. LI Wei](#) [牛膝的化学成分](#)[期刊论文]-[沈阳药科大学学报](#)2007, 24(4)
10. [邓乐华. 田庚元](#) [羧甲基牛膝多糖的制备、结构及生物活性研究](#)[期刊论文]-[化学学报](#)2002, 60(11)

引证文献(2条)

1. [杨国夫. 宋国胜. 张涛. 徐洪伟. 董锋](#) [牛膝提取物对去卵巢大鼠骨密度、骨转换及 I 型胶原蛋白表达的影响](#)[期刊论文]-[中国骨质疏松杂志](#) 2011(2)
2. [孙丽莎. 冯婷. 路静. 黄幼田. 杨洪艳. 董子明. 赵明耀](#) [牛膝多糖与锌对小鼠树突状细胞增殖分化和抗原提呈能力的影响](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2010(8)