

1 300 ~ 1 000 cm^{-1} 存在一个大的宽高吸收, 30% 乙醇洗脱物在此吸收峰形和吸收强度与其他 3 个洗脱物有明显不同, 后 3 个乙醇洗脱物吸收峰形和吸收强度基本相同。在 1 000 ~ 400 cm^{-1} , 仍然是 30% 乙醇洗脱物在此吸收峰形和波数上有明显的不同之处, 后面 3 个乙醇洗脱物吸收峰形上近乎相同。以上分析多处表明, 30% 乙醇洗脱物无论在官能区还是在指纹区其吸收有明显不同之处, 表明其成分与 3 个乙醇洗脱物成分上有大的区别。同时 3 个乙醇洗脱物的整体峰形、吸收峰波数及强度上都近乎相同, 说明在成分及其各成分上没有大的区别, 只是在颜色上逐渐变深但是差别不大。由此采用 50% 乙醇作为洗脱剂较好。由此表明, 通过用不同体积分数乙醇所得提取物红外谱图的官能区和指纹区以及整体分析, 洗脱剂体积分数对提取物有影响, 其能在红外谱图上能够得到相应的体现。

3 结论

不同提取和精制方法提取物中薯蓣皂苷元的量比较, 表明采用乙醇回流法提取, D-101 大孔吸附树脂精制产物中薯蓣皂苷元的量最高, 能够达到很好的效果。

采用不同体积分数乙醇洗脱, 50% 乙醇洗脱物中薯蓣皂苷元的量高、色素少, 洗脱效果好。

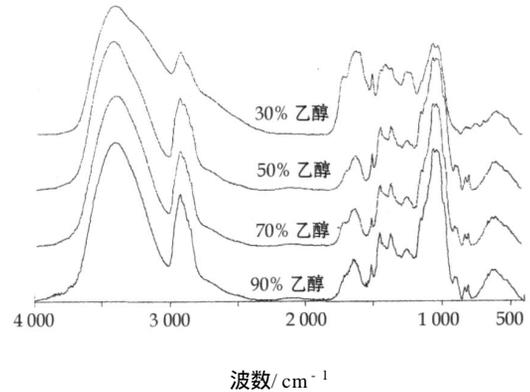


图 3 不同洗脱物红外谱图

Fig 3 Infrared spectrum of different eluting substance

通过 FTIR 对不同提取方法、精制方法和不同体积分数乙醇洗脱所得提取物红外图谱分析, 说明不同工艺所得产物的差异能够在红外图谱上得到很好的呈现。

参考文献:

- [1] 潘艳丽, 张贵君, 孙素琴. 黄金菊粉针药效组分红外指纹表征分析[J]. 中成药, 2006, 28(2): 172-175.
- [2] 孙素琴, 周群, 秦竹, 等. FT-IR 和 FT-Raman 与中药的质量控制[J]. 光散射学报, 2003, 15(3): 203-207.
- [3] 赵琳, 郭志刚, 刘瑞芝, 等. 肉苁蓉药材与盐生肉苁蓉培养细胞的主要成分对比研究[J]. 中草药, 2004, 35(7): 814-817.
- [4] 肖璞, 孙素琴, 周群, 等. 不同厂家葡萄酒的红外光谱无损快速分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(11): 1352-1354.
- [5] 王俊, 杨克迪, 陈钧. 分光光度法测定薯蓣皂苷元[J]. 分析试验室, 2004, 23(1): 73-75.

HPLC 法测定降酶片中白藜芦醇和虎杖苷

刘德茂¹, 史德胜^{2*}

(1. 大连公安医院, 辽宁 大连 116011; 2. 天津丹溪国药研究所, 天津 300061)

降酶片由虎杖、白花舌蛇草等中药组成。虎杖为蓼科属多年生草本植物, 药用部位为根及根茎。虎杖始载于《名医别录》, 列为中品, 具有祛风利湿、散瘀定痛、止咳化痰等功效; 用于关节痹痛, 湿热黄疸, 经闭, 微瘕, 水火烫伤, 跌扑损伤, 痈肿疮毒, 咳嗽痰多。虎杖中主要含蒽醌类、二苯乙烯苷类、黄酮类等多酚性化合物。本实验采用 HPLC 法测定其中的白藜芦醇和虎杖苷, 方法专属性强, 操作简便, 精密度高, 重现性好, 能更好地控制降酶片的质量, 为降酶片的质量标准的制定提供依据。

1 仪器与试剂

UV2000 高效液相色谱仪; SP8800ternary

HPLC Pump (Spectra-Physics); 虎杖苷 (批号 11575-200301)、白藜芦醇对照品 (批号 111535-200301) 由中国药品生物制品检定所提供。降酶片由大连公安医院制剂室提供, 批号 060820、060821、060822。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Irregular C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (25 : 75); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 35 ; 检测波长: 306 nm; 进样量: 20 μL。理论塔板数以虎杖苷峰计不低于 3 000, 以白藜芦醇峰计不低于 3 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备:精密称取虎杖苷对照品 8.04 mg 置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 80.4 μg/mL 虎杖苷对照品溶液。精密称取白藜芦醇对照品 6.12 mg 置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 61.2 μg/mL 白藜芦醇对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备:取降酶片 20 片,研匀,取 50 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声 30 min,加甲醇稀释至刻度,摇匀。精密量取 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,备用。

2.3 标准曲线的制备:精密量取 80.4 μg/mL 虎杖苷对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按上述色谱条件测定峰面积。以虎杖苷的质量浓度为横坐标,其峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算得其回归方程 $Y = 38\ 364\ 300\ X - 5\ 194.1$, $r = 0.999\ 9$ 。结果表明虎杖苷在 8.05 ~ 40.20 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

精密量取 61.2 μg/mL 白藜芦醇对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按上述色谱条件测定峰面积。以白藜芦醇的质量浓度为横坐标,其峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。计算得其回归方程 $Y = 85\ 777\ 166\ X - 2\ 272.48$, $r = 0.999\ 9$ 。结果表明白藜芦醇在 6.12 ~ 30.60 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.4 干扰试验:精密称取按制备工艺制备的缺虎杖的阴性样品 16.7 mg,制备供试品溶液,进样测定,结果阴性样品的色谱中,在虎杖苷、白藜芦醇峰处无峰,表明阴性样品不干扰测定。见图 1。

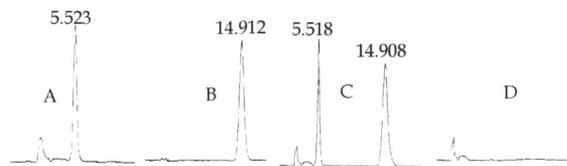


图 1 虎杖苷对照品(A)、白藜芦醇对照品(B)、降酶片(C)和阴性对照(D)的色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of peceid reference substance (A), resveratrol reference substance (B), Jiangmei Tablets (C), and negative sample (D)

2.5 精密度试验:取 24.12 μg/mL 虎杖苷对照品溶液,按上述色谱条件,重复进样 6 次,测定峰面积

值,计算得其 RSD 为 0.36%。取 18.36 μg/mL 白藜芦醇对照品溶液,按上述色谱条件,重复进样 6 次,测定峰面积值,计算得其 RSD 为 0.87%。

2.6 稳定性试验:取批号为 060820 样品,制备供试品溶液,按上述色谱条件分别于 0、2、4、6、8 h 进样,测定,结果虎杖苷峰面积的 RSD 为 0.07%,白藜芦醇峰面积的 RSD 为 0.56%,表明本品在 8 h 内测得的结果是稳定的。

2.7 重现性试验:取批号为 060820 样品,制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,计算虎杖苷、白藜芦醇的质量分数,计算得虎杖苷质量分数的 RSD 为 1.05%,白藜芦醇质量分数的 RSD 为 1.42%。

2.8 回收率试验:取批号为 060821 样品,精密称取 25 mg,重复 5 份,分别加虎杖苷对照品 6.05 mg,白藜芦醇对照品 4.65 mg,制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,计算回收率。结果虎杖苷的平均回收率为 100.44%,RSD 为 1.67%;白藜芦醇的平均回收率为 101.02%,RSD 为 1.86%。

2.9 样品测定:取 3 批样品,每批平行 3 份,制备供试品溶液,按上述色谱条件测定。外标法计算,结果见表 1。

表 1 降酶片中虎杖苷和白藜芦醇的测定结果(n=3)

Table 1 Determination of peceid and resveratol in Jiangmei Tablets (n=3)

批号	虎杖苷		白藜芦醇	
	质量分数/ (mg·g ⁻¹)	RSD/%	质量分数/ (mg·g ⁻¹)	RSD/%
060820	24.25	0.49	18.62	1.18
060821	24.48	0.32	18.57	0.54
060822	24.23	0.30	19.08	0.36

3 讨论

一般白藜芦醇和虎杖苷都能同时存在于植物中,两者在一定外界条件下会相互转化。目前的研究表明反式异构体是其活性成分,现一般测定反式白藜芦醇和虎杖苷的总量作为评价标准。在葡萄及葡萄酒中同时发现了 4 种异构体,而目前虎杖中的顺式白藜芦醇及其苷鲜见报道。因此用反式白藜芦醇及虎杖苷为指标性成分评价虎杖质量是很有必要且合理的。

本实验选用甲醇超声提取 30 min 为最佳提取方式,流动相为乙腈-水(25/75),检测波长 306 nm,体积流量为 1.0 mL/min,柱温 35℃,同时测定虎杖中白藜芦醇和虎杖苷,分离度好,杂质峰干扰少,完全出峰时间在 25 min 内。该方法快速、准确、可靠。