

a 合煎液 b 缺当归阴性  
a mixed decoction b negative sample  
without *Angelicae Sinensis Radix*

图 4 缺当归阴性对照 HPLC 图(316 nm)

Fig. 4 HPLC Chromatograms of negative sample without *Angelicae Sinensis Radix* (316 nm)

在煎煮过程中更有利于 3 种有效成分的溶出, 实验结果从主要成分变化的角度支持了养精神玉汤配伍合煎的合理性, 并为其物质基础的阐明提供了一定的实验依据。

参考文献:

[1] 胡南, 许惠玉, 陈志伟, 等. 芍药苷的药剂学研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2007, 28(9): 1093-1095  
 [2] 崔广智. 芍药苷抗抑郁作用的实验研究[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(4): 131-133  
 [3] 潘莹, 郭小龙, 陈勇, 等. HPLC 法测定杞菊地黄丸中马钱苷、芍药苷和丹皮酚的含量[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(2): 133-135  
 [4] 胡益勇, 徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(2): 253-255  
 [5] 王太霞, 李景原, 胡正海. 地黄的形态结构与化学成分研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(5): 585-587

## 知母皂苷 B II 对照品的快速制备研究

冀旭<sup>1,2</sup>, 吴智宇<sup>1</sup>, 陈千良<sup>1\*</sup>, 孙文基<sup>1</sup>

(1 西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069;

2. 西北大学 国家微检测工程技术中心, 陕西 西安 710069)

**摘要:** 目的 从知母药材中快速分离制备知母皂苷 B II 对照品。方法 知母药材粗粉用 80% 乙醇提取, 经大孔树脂 D-101 柱吸附, 以 30% 乙醇洗脱, 得到知母总皂苷。用制备 RP-HPLC 对总皂苷进行分离纯化, 采用柱后分流, ELSD 同时检测, 收集含高质量分数知母皂苷 B II 的组分。结果 制备产品经化学方法和<sup>13</sup>C-NMR 鉴定; HPLC-ELSD 检测, 质量分数大于 99%。结论 该制备方法简单, 重复性好, 效率较高, 所得化合物质量分数高, 可用于知母皂苷 B II 对照品的制备。

**关键词:** 知母皂苷 B II; 分离; 纯化; 制备高效液相色谱

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)11-1803-04

## Rapid preparation of timosaponin B II reference substance

Ji Xu<sup>1,2</sup>, Wu Zhiyu<sup>1</sup>, Chen Qianliang<sup>1</sup>, Sun Wenji<sup>1</sup>

(1 Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, College of Life Sciences, Northwest University,

Xi'an 710069, China; 2 National Engineering Research Center for Miniaturize Detection System,

Northwest University, Xi'an 710069, China)

**Abstract: Objective** To establish a method to isolate and prepare timosaponin B II reference substance from *A nemarrhenae Rhizoma*. **Methods** Raw material of *A nemarrhenae Rhizoma* was extracted with 80% ethanol. The concentrated crude extract was separated on a D-101 macroporous resin column, by eluting the macroporous resin column with 30% ethanol, total saponins were collected. The timosaponin B II was separated by preparative reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) coupled with ELSD and collected according to the chromatography. **Results** The prepared product was identified by nuclear magnetic resonance and chemical method. The purity of timosaponin B II was > 99% assayed by analytical HPLC-ELSD. **Conclusion** The preparation method is simple and rapid, and it can be used for preparation of timosaponin B II reference substance.

**Key words:** timosaponin B II; separation; purification; preparative HPLC

①收稿日期: 2010-03-07

基金项目: 国家药典委员会 2010 版一部标准研究项目(YZ-196~198); 西北大学科研启动基金资助项目(OXYQDF159)

作者简介: 冀旭(1987-), 男, 硕士研究生, 中药学专业。

\* 通讯作者 陈千良 Tel: (029) 88304569 E-mail: cq1999@hotmail.com

知母为百合科知母属多年生草本植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的干燥根茎<sup>[1]</sup>, 其味苦、甘, 性寒, 归肺、胃、肾经, 具有清热泻火、生津润燥功能, 用于外感热病、高热烦渴、肺热燥咳、骨蒸潮热、内热消渴、肠燥便秘等症<sup>[2]</sup>。知母中的甙皂苷类具有多种生理活性, 是其最重要的一类有效成分<sup>[3-6]</sup>。知母是常用大宗药材, 主要分布于我国北方地区, 产地众多, 市场上药材来源广泛, 质量差异较大, 质量控制和评价非常重要。历版《中国药典》均以菝葜皂苷元作为知母药材测定的指标, 但该方法为间接反映知母总皂苷的方法, 并且操作过程相对繁琐。知母中皂苷类成分是以甙的形式存在, 所以直接测定药材中主要皂苷能更真实地评价药材质量。知母皂苷种类较多, 其中以知母皂苷 BII 的量最高<sup>[7]</sup>, 《中国药典》2010 年版已将其作为反映知母皂苷的指标。制备质量控制用的高质量分数知母皂苷 BII 是质量评价的基础, 因此本实验室对快速制备高质量分数知母皂苷 BII 对照品的方法进行了研究。

## 1 仪器与材料

制备高效液相色谱仪: Alltech 627 HPLC Pump, Alltech ELSD 800 蒸发光散射检测器; 分析型高效液相色谱仪: Hitachi 7100 型 HPLC, Alltech ELSD2000ES 蒸发光散射检测器, N-2000 色谱工作站; Bruker Avance DRX-500 型核磁共振仪; Millipor 超纯水仪 (Millipor)。

D-101 型大孔吸附树脂 (西安蓝晓公司); 色谱纯乙腈 (TEDIA); 分析纯乙腈和其他试剂均为西安化学试剂厂产品。

知母药材购自河北易县坡仓乡种植基地, 经西北大学生命科学学院魏胡南教授鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的干燥根茎, 凭证药材存放于西北大学陕西省生物医药重点实验室。知母皂苷 BII 对照品为军事医学科学院马百平研究员惠赠。

## 2 方法与结果

2.1 知母皂苷粗品的制备: 干燥知母根茎 1 kg, 粉碎成粉末, 80% 乙醇回流提取 3 次, 前两次 2 h, 第三次 1 h。合并提取液, 减压回收乙醇液, 水浴蒸至无醇味。浸膏依次用石油醚 (60~90 °C)、二氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇萃取分为 4 个部分。将正丁醇部分用水溶解, 滤过后上预处理好的 D-101 型大孔树脂柱, 水洗, 弃去水洗液。再用 30% 乙醇洗脱, 洗脱液以正丁醇-乙酸水 (4:1:5) 为展开剂, 薄层色谱法检查, 至目标皂苷不再流出, 收集 30% 乙醇洗脱

液, 减压蒸干, 即得知母皂苷粗品。经检测知母皂苷 BII 质量分数为 30%。

### 2.2 制备 RP-HPLC 分离纯化

2.2.1 制备色谱条件: GRACE Adsorbosphere C<sub>8</sub> 色谱柱 (250 mm × 22 mm, 10 μm); 流动相为乙腈-水 (22:78); 体积流量 15 mL/min。制备柱柱后分流, 分流比 1:5; 蒸发光散射检测器检测, 蒸发温度 40 °C, 雾化气体体积流量 3.0 L/min。

2.2.2 对照品的分离纯化: 取知母皂苷粗品 100 mg, 溶于 2 mL 超纯水中, 过 0.45 μm 滤膜, 作为制备色谱进样溶液。部分收集器参数设置为每 0.5 min 收集一管。制备色谱图见图 1。通过部分收集器参数的设置以及对制备图谱的分析, 决定对虚线之间流出部分 (保留时间在 25.0~26.5 min 的组分) 进行收集并对收集部分进行减压干燥。

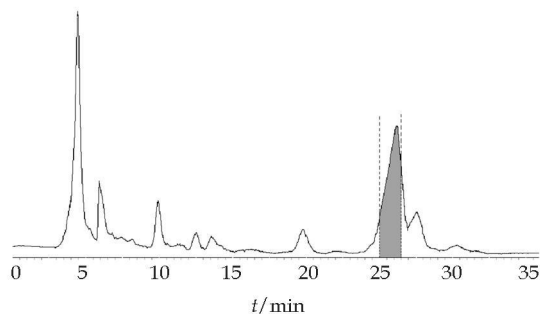


图 1 制备 HPLC 图谱

Fig. 1 Preparative HPLC chromatogram

### 2.3 知母皂苷 BII 产品的分析和鉴定

2.3.1 质量分数分析: 汉邦 C<sub>8</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (1:3); 体积流量 0.8 mL/min; 蒸发光散射检测器检测, 蒸发温度 105 °C; 气体体积流量: 2.8 L/min。取收集得到的知母皂苷 BII 粉末 10 mg, 溶解于 10 mL 30% 丙酮中, 经高效液相色谱法检测, 以面积归一化法测得其质量分数为 99.3%。见图 2。

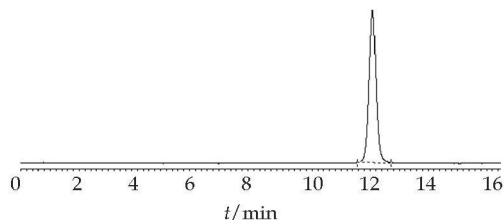


图 2 知母皂苷 BII 产品分析

Fig. 2 HPLC Chromatogram of timosaponin BII product

2.3.2 回收率的计算: 经称量, 收集得到知母皂苷 BII 粉末为 19.5 mg, 故该方法一次分离制备的回收率为:  $19.5 \text{ mg} / (100 \text{ mg} \times 30\%) = 65\%$ 。

2 3 3 产品的结构确证: 纯化后得到的物质为白色粉末, 熔点为 246~248 °C, Molish 反应呈阳性, Liebermann-Burchard 反应呈阳性, Ehrlich 反应显红色。<sup>13</sup>C-NMR(C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 30.9(C-1)、27.0(C-2)、75.2(C-3)、30.9(C-4)、37.0(C-5)、27.0(C-6)、26.8(C-7)、35.5(C-8)、40.2(C-9)、35.0(C-10)、21.2(C-11)、40.4(C-12)、41.2(C-13)、56.4(C-14)、32.5(C-15)、81.3(C-16)、64.0(C-17)、16.7(C-18)、24.0(C-19)、40.6(C-20)、16.5(C-21)、110.7(C-22)、37.2(C-23)、28.3(C-24)、34.5(C-25)、75.6(C-26)、17.5(C-27)、102.6(Gal C-1)、81.9(Gal C-2)、77.0(Gal C-3)、69.9(Gal C-4)、76.6(Gal C-5)、62.1(Gal C-6)、106.2(Glc C-1)、75.5(Glc C-2)、78.0(Glc C-3)、71.6(Glc C-4)、78.5(Glc C-5)、62.8(Glc C-6)、105.2(Glc 1'), 75.3(Glc 2'), 78.6(Glc 3'), 71.6(Glc 4'), 78.6(Glc 5'), 62.8(Glc 6')。数据与文献报道<sup>[3]</sup>基本一致。产品与马百平研究员惠赠的知母皂苷 B II 对照品共薄层色谱, 显示为同一斑点。

### 3 讨论

知母皂苷 B II 属于呋甾皂苷, 呋甾皂苷在无甲醇中加热回流时, 其 22 位碳相连的羟基会发生甲醚化使得原结构发生转变<sup>[8]</sup>, 与甲醇接触也可导致样品衍生化<sup>[9]</sup>。故流动相不能选择甲醇水。实验首先采用乙醇-水为洗脱剂, 但分离效果不好, 而且乙醇黏度较高, 导致柱压偏高。而采用乙腈-水作为流动相, 分离的效果较好, 且柱压合适, 可使用较大的体积流量, 提高了效率。

制备色谱条件优化中, 先参照分析 HPLC 条件, 流动相为乙腈水(1:3), 放大体积流量为 15 mL/min。但在该条件下, 皂苷 B II 出峰时间偏早, 无法充分分离, 不能得到高质量分数的知母皂苷 B II。故将乙腈-水比例减小为 1:4, 使出峰时间延后以达到增进分离效果。在该比例下, 虽分离和峰形均良好, 但是出峰时间在 60 min 之后, 时间过长。经调整, 最终确定洗脱条件为: 乙腈水(22:78), 体积流量为 15 mL/min。在此条件下分离较好, 保留时间合适, 在较短的时间内通过分部收集, 可以获得比较多的高质量分数知母皂苷 B II。

为了充分利用固定相, 对制备液相色谱的进样量进行了优化, 以便在较短的时间内得到尽可能多的高质量分数对照品。最初以 50 mg 粗品溶解进样开始, 逐步提高进样量。结果表明, 进样量为 50 mg 皂苷粗品时, 分离效果很好, 但制备量偏小。当进样量超过 100 mg 时, 分离变得较差, 分部收集也

达不到获得较多高纯产品的目的。因此, 最终确定其进样量为 100 mg。

本实验室以前使用常压开管反相色谱柱分离知母皂苷 B II, 采用乙醇-水作为洗脱剂, 周期较长, 整个分离过程须一周, 而且分离效果较差, 一次制备得到高质量分数的对照品比例相对较小。与之相比, 通过制备液相分离, 则可以在短时间内得到较大量的高质量分数知母皂苷 B II 对照品, 显示出本方法的高效。

与大部分皂苷类成分一样, 知母皂苷 B II 没有紫外吸收, 蒸发光散射检测器是目前最灵敏的检测知母皂苷 B II 的方式<sup>[10]</sup>。但蒸发光散射检测器对样品进行的检测是破坏性的检测。在本实验中, 通过制备柱后用分流阀分流, 使少部分经检测器检测, 大部分由部分收集器分部收集, 可以使得在制备过程中可在线即时获得制备分离的色谱图, 通过色谱图收集高纯部分。这样比离线检测后再决定收集的部分, 大大提高了效率。

本方法检测和收集同时进行, 所以分流进入检测器的这部分知母皂苷 B II 被破坏, 无法回收。并且, 为了保证质量分数, 实验中通过部分收集器, 只收集中间高质量分数部分, 对于质量分数不高的部分(即主峰前部分以及后部分)并未收集, 没有计算在回收率中。因此, 回收率显得相对略低。但是, 质量分数不高的部分样品可作为下次分离时的粗品继续使用。

本方法分离得到的知母皂苷 B II 质量分数高, 完全满足定量测定用对照品的要求。另外, 本方法简单省时, 是快速制备高纯度的知母皂苷 B II 对照品较好的方法。

致谢: 感谢西北大学科研启动基金和药典委员会项目的经费支持; 军事医学科学院马百平研究员惠赠对照品和对一些相关问题指导; 西北大学化学系代测核磁共振。

### 参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部, 2010
- [2] 徐爱娟, 韩丽萍, 蒋林兰. 知母的研究进展[J]. 中药材, 2008, 31(4): 624-624
- [3] 原源, 张汉明, 陈万生, 等. 知母防治缺血性脑中风的物质基础及品质评价[D]. 上海: 第二军医大学, 2005
- [4] 倪良红, 秦民坚. 知母资源化学及药理研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(4): 19-20
- [5] 李泽松, 李德良, 黄坚, 等. 心血管相关基因芯片的制备及其在知母皂苷作用机理研究中的应用[J]. 药学报, 2003, 38(7): 496-500
- [6] 邓云, 马百平, 徐秋萍, 等. 甾体皂苷化合物抑制血栓形成作用的研究[J]. 军事医学科学院院刊, 2004, 28(3): 215-215
- [7] 余理红, 遇存莉. HPLC-MS 法测定知母中知母皂苷 B II 的含

量[J]. 亚太传统医药, 2008, 4(11): 44  
 [8] Nagumo S, Kishi S, Inoue T, et al. Saponins of *Anemarrhena Rhizoma* [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1991, 111(6): 306-306  
 [9] 于健东, 马玲云, 马双成, 等. 知母中知母皂苷 BII 的 TLC 鉴别及 HPLC 法含量测定[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(12): 1436-1436  
 [10] 原源, 陈万生, 孙连娜, 等. 同产地知母中皂苷类成分的测定[J]. 中草药, 2006, 37(10), 1574-1576

## 龙胆泻肝丸物质组释放动力学特征研究

郭 桢<sup>1,2</sup>, 凌 映<sup>1,2</sup>, 张继稳<sup>2</sup>, 葛卫红<sup>1</sup>, 石森林<sup>1\*</sup>

(1 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 2 中国科学院上海药物研究所 药物释放系统研究中心, 上海 201203)

**摘要:**目的 研究龙胆泻肝丸的物质组释放动力学特征。方法 按《中国药典》桨法 100 r/min 测定龙胆泻肝丸的释放度, 运用紫外吸收光谱法结合 Kalman 滤波法对龙胆泻肝丸物质组进行定量, 并绘制释放曲线, 获得龙胆泻肝丸的物质组释放动力学特征和多维释放特征。结果 龙胆泻肝丸的缓释特征明显, 动力学特征符合 Weibull 和 Higuchi 释放模型。结论 龙胆泻肝丸的释放机制可能属于骨架溶蚀型, 提示传统丸剂具有明显的缓释特征。

**关键词:** 龙胆泻肝丸; 中药物质组; 释放动力学; 紫外吸收光谱法

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)11-1806-03

### Materiomic release kinetics of Longdan Xiegan Pill

GUO Zhen<sup>1,2</sup>, LING Die<sup>1,2</sup>, ZHANG Jiwen<sup>2</sup>, GE Weihong<sup>1</sup>, SHI Senlin<sup>1</sup>

(1 College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China;

2 Center for Drug Delivery System, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

**Abstract: Objective** To study materiomic release kinetics of Longdan Xiegan Pill. **Methods** The materiomics release kinetics, the release profiles, and the multidimensional release characteristic of Longdan Xiegan Pill were determined by the paddle method with a rotate speed at 100 r/min in *Chinese Pharmacopia*, and the materiome was quantified by UV-vis combined Kalman filter method. **Results** Longdan Xiegan Pill behaved typical sustained release profile which was consistent with Weibull and Higuchi release models. **Conclusion** The sustained release profile of Longdan Xiegan Pill is depicted quantitatively by materiomic release dynamics in this paper, which demonstrates the obvious sustained release characteristic of the traditional pills.

**Key words:** Longdan Xiegan Pill; materiome of Chinese materia medica; release dynamics; UV-vis

龙胆泻肝丸系由龙胆草、黄芩、栀子、泽泻、木通、车前子、生地、当归、柴胡、甘草等制成的水泛丸, 泻肝而不伤肝, 利湿而不伤阴, 除用于治疗高血压、急性胆囊炎、尿路感染等症外, 现在常用于乙型病毒性肝炎等一些慢性病的治疗。龙胆泻肝丸针对的病症多需长期服药, 因此深入研究龙胆泻肝丸多组分缓释机制具有较大的实用意义。对于龙胆泻肝丸全组分或多组分释放/溶出度研究更未见报道, 仅针对某个或少数组分进行定量分析, 如以龙胆苦苷作为

指标成分研究龙胆泻肝丸的溶出度<sup>[1]</sup>; 亦或以龙胆苦苷、黄芩苷、栀子苷作为指标性成分研究龙胆泻肝丸的溶出度<sup>[2]</sup>, 这几乎忽略了剂型因素、辅料及其他环境因素可能给制剂释放特征带来的影响, 难以对龙胆泻肝丸中多组分释放/溶出动力学进行全面监控<sup>[3-5]</sup>。中药物质组释放动力学及其同步性评价方法的基础是设定多组分中药的物质组成特征、各组分的量之间的相互关系为中药作用整体性的量化指

①收稿日期: 2010-02-09  
 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2006AA02Z336); 国家科技支撑计划项目(2006BA1098B08 08); 中国科学院上海药物研究所新药团队基础研究项目(07G603F015)  
 作者简介: 郭 桢, 男, 硕士, 2007年毕业于中国药科大学, 研究方向: 中药新剂型、制剂新技术研究与新药开发。  
 E-mail: guozhen10012002@yahoo.com.cn  
 \* 通讯作者 石森林 E-mail: pjstone@163.com.cn