

2.5.2 线性关系考察: 取对照品溶液, 依次进样 2、4、6、8、10、15 μL 。按上述色谱条件进行 HPLC 分析, 以峰面积对进样量进行回归, 得儿茶素、表儿茶素和没食子酸线性回归方程及线性范围分别为 $Y=192\,718X-98\,059$ ($r^2=0.9913$), $0.52\sim 3.9\,\mu\text{g}$; $Y=14\,534X-2\,149.1$ ($r^2=0.9962$), $0.48\sim 3.6\,\mu\text{g}$; $Y=349\,708X-23\,043$ ($r^2=0.9981$), $0.4\sim 3\,\mu\text{g}$ 。

2.5.3 精密密度试验: 取对照品溶液各 10 μL , 按给定色谱条件重复进样 6 次, 儿茶素、表儿茶素和没食子酸的峰面积 RSD 分别为 1.6%、1.8%、1.4%。

2.5.4 重现性试验: 取同一批次的样品 (批号 20090316) 6 份, 按供试品溶液的制备方法制备, 在所选色谱条件下测定, 结果儿茶素、表儿茶素和没食子酸质量分数的 RSD 分别为 2.3%、1.7%、2.2%。

2.5.5 稳定性试验: 将批号 20090316 同一份样品制备供试品溶液, 分别在 1、2、4、8、12、16 h 进样 10 μL , 测定其峰面积, 结果儿茶素、表儿茶素和没食子酸的 RSD 值分别为 1.6%、2.0%、2.2%。

2.5.6 加样回收率试验: 精密称取批号 20090316 复方儿茶止泻膜剂约 0.12 g, 共 6 份, 精密称定, 分别加入儿茶素、表儿茶素和没食子酸对照品 1.57、1.54、1.24 mg, 按供试品溶液制备方法处理并测定, 计算回收率, 结果儿茶素平均回收率为 97.5%, RSD 为 1.5%; 表儿茶素平均回收率为 98.4%, RSD 为 1.3%; 没食子酸平均回收率为 102.3%, RSD 为 0.7%。

2.6 样品测定: 取 3 批复方儿茶止泻膜剂, 按供试品溶液的制备方法制备, 每批取 3 份, 依给定色谱条件测定, 外标法计算, 结果见表 1。

3 讨论

儿茶素、表儿茶素易溶于水和醇, 根据其溶解性分别以水、甲醇-水 (1:1)、甲醇为提取溶剂进行试

表 1 复方儿茶止泻膜剂中儿茶素、表儿茶素和没食子酸的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of catechin, epicatechin, and gallic acid in Compound Ercha Antidiarrheal Membranes ($n=3$)

批 号	儿茶素		表儿茶素		没食子酸	
	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/ %
20090316	12.3	2.4	12.2	2.6	9.6	2.5
20090401	11.6	1.9	11.8	2.2	9.4	2.0
20090412	12.0	2.1	11.6	1.6	9.3	2.8

验, 测得质量分数在甲醇-水 (1:1) 中最高, 而且以水为提取溶剂很难滤过, 以甲醇为溶剂提取率较低, 因此选择甲醇-水 (1:1) 为提取溶剂。又考察了超声提取 15、30、45 min 对提取率的影响, 结果表明, 超声提取 30 min 质量分数达最高, 超声提取 30 min 以上, 儿茶素和表儿茶素质量分数反而降低, 可能因为儿茶素和表儿茶素属于可缩合鞣质, 长期高温状态下在方中不稳定, 可能脱水缩合形成大分子化合物鞣红。

色谱系统曾考察以不同比例甲醇-磷酸盐为流动相, 但儿茶素和表儿茶素峰形不对称, 且与邻近峰分离不好。后尝试多种溶剂系统, 最终确定以乙腈-50 mmol/L 磷酸二氢钾为流动相得到满意分离结果。

参考文献:

- [1] 谢世荣, 高明, 孙长滨, 等. 复方儿茶水提液的毒理学研究[J]. 大连医科大学学报, 2006, 28(4): 282-283.
- [2] 谢世荣, 高明, 韩再虹, 等. 复方儿茶水提液的抗腹泻和抗炎效应[J]. 中国临床康复, 2006, 10(35): 69-71.
- [3] 王夏青, 於洪建, 赵余庆. 干红葡萄酒中儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇和原花青素的测定[J]. 中草药, 2009, 40(5): 745-747.
- [4] 袁伟斌, 李向军. 毛细管电泳-安培检测法测定儿茶中的儿茶素、表儿茶素[J]. 分析试验室, 2003, 22(增刊): 109-111.
- [5] 顿珠, 刘青, 索朗其美, 等. HPLC 法测定余甘子膏中没食子酸[J]. 中草药, 2010, 41(9): 1477-1478.
- [6] 刘起中, 张可可. HPLC 法测定五倍子中没食子酸的含量[J]. 中草药, 2002, 33(5): 427.

HPLC 法测定地黄及含地黄成药中寡糖

邱建国, 张汝学, 贾正平*, 李茂星, 王娅娣, 樊鹏程

(兰州军区兰州总医院 药材科, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 目的 考察不同产地、不同中成药中生地黄、熟地黄所含地黄寡糖。方法 采用 NH_4F -硅胶色谱柱分离, 示差折光检测器检测, 高效液相色谱法测定地黄寡糖。结果 产地不同, 生地黄、熟地黄中的地黄寡糖成分、量不同;

收稿日期: 2010-02-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30672643, 30472186, 30772773)

* 通讯作者 贾正平 Tel: (0931) 8994652 E-mail: jiazp166@sina.com

不同中成药中含有的地黄寡糖成分、量也不同。结论 本方法操作简便、准确、快速、干扰少,适用于生地黄、熟地黄及不同中成药中地黄寡糖的测定。

关键词: 生地黄; 熟地黄; 中成药; 寡糖; 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(2010)12-1997-04

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根。本课题组多年来对地黄的降血糖机制进行了研究,发现其调节血糖的主要成分是地黄寡糖。地黄寡糖含有楝二糖、蔗糖、棉子糖、水苏糖、甘露三糖、毛蕊四糖、毛蕊糖等,其中生地黄中水苏糖的量最高,熟地黄中甘露三糖的量最高。《中国药典》2010 年版一部收载的含有地黄、熟地黄的不同剂型中成药(浓缩丸、蜜丸、胶囊、膏剂、片剂)有 90 多个,但是都没有对其中寡糖进行测定。本课题组对不同剂型,且以六味地黄丸为主,对不同厂家、批次进行了考察;地黄的产地很多,其中河南是其道地药材产地,产地不同,生地黄中寡糖成分、量不同;熟地黄炮制程度对地黄寡糖成分、量影响很大。所以本课题组对不同产地地黄及含有地黄成药中寡糖进行研究,为进一步研究影响地黄寡糖成分、量的因素奠定一定的基础。

1 仪器与材料

SCL-6A 高效液相色谱仪、Shimadzu RID-6A 示差折光检测器(日本),分析之星色谱工作站, METTLER AE240 电子分析天平(瑞典)。

地黄对照药材(中国药品生物制品检定所,批号 1180-200001),生地黄来自河南新乡、西峡、三门峡、温县、淮阳以及甘肃庆阳、清水、金崖、大康营,熟地黄为相应生地黄经过本课题组炮制。

棉子糖(西安舟鼎国生物技术有限公司,批号 X08D10MZT),甘露三糖(Product of Sigma Aldrich,批号 1450717),水苏糖(United Kingdom 批号 065K3775GAS10094-583)。龙胆泻肝丸(水丸,北京同仁堂制药有限公司,批号 9083006),六味地黄丸(浓缩丸,九芝堂股份有限公司,批号 200903018),六味地黄丸(大蜜丸,兰州佛慈制药有限公司,批号 20082),六味地黄胶囊(北京云大药业有限公司,批号 080501),妇科十味片(山西亚宝药业集团股份有限公司,批号 081101),其他试剂均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[1-2]: 色谱柱为 Phenomenex NH₂ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)(美国),检测器为 Shimadzu RID-6A 示差折光检测器,流动相为乙腈-水(72:28),体积流量:1.0 mL/min,柱温为室温。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取棉子糖、甘露三糖、水苏糖对照品适量,分别配制成质量浓度为 17.2、17.6、17.1 mg/mL 混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:分别称取不同产地熟地黄 0.5 g,精密称定,加水 9 mL,超声提取 30 min,放冷,用水定容至 10 mL,取 1 mL,8 000 r/min 离心 15 min,上清液 0.45 μm 滤过,得滤液,即得,备用。

2.4 线性关系考察:取适量对照品溶液,分别进样 3、5、10、15、20、25、30 μL,由峰面积对质量浓度求得工作曲线,得回归方程。棉子糖: $A = 5.60 \times 10^5 C + 1.15 \times 10^6$, $R^2 = 0.9953$,线性范围: 51.6~516 mg/mL;甘露三糖: $A = 5.58 \times 10^5 C + 1.22 \times 10^6$, $R^2 = 0.9914$,线性范围: 52.8~528 mg/mL;水苏糖: $A = 3.05 \times 10^7 C + 7.99 \times 10^5$, $R^2 = 0.9979$,线性范围: 51.3~513 mg/mL。

2.5 精密度试验:取熟地黄(河南新乡)同一供试品溶液,分别连续进样 6 次,测定峰面积,计算得棉子糖、甘露三糖、水苏糖峰面积的 RSD 分别为 1.94%、0.83%、0.91%。

2.6 稳定性试验:取同一熟地黄(河南新乡)供试品溶液,放置室温,在同 1 d 内每隔 2 h 测定,连续考察 8 h,测定峰面积,计算得棉子糖峰、甘露三糖峰、水苏糖峰面积的 RSD 分别为 0.99%、1.12%、1.66%。

2.7 重现性试验:取同一批熟地黄(河南新乡)6 份,制备供试品溶液,分别进样测定并计算,结果熟地黄中棉子糖平均质量分数为 7.6 mg/g, RSD 为 2.58%;甘露三糖平均质量分数为 119.1 mg/g, RSD 为 2.61%;水苏糖平均质量分数为 87.5 mg/g, RSD 为 2.65%。

2.8 加样回收率试验:取同一批熟地黄(河南新乡)样品 6 份,分别精密称取 0.15 g(约相当于棉子糖 1.14 mg,甘露三糖 17.87 mg,水苏糖 12.12 mg),分别精密加入对照品溶液(棉子糖、甘露三糖、水苏糖质量浓度分别为 6、5、30 mg/mL)1 mL,制备供试品溶液,进样测定,结果棉子糖、甘露三糖、水苏糖平均回收率分别为 99.86%、99.35%、100.32%, RSD 分别为 2.32%、2.86%、3.16%。

2.9 寡糖的测定^[3]

2.9.1 不同产地生地黄、熟地黄供试品溶液的制备

及测定: 分别称取不同产地生地黄、熟地黄各 0.5 g, 精密称定, 加水 9 mL, 超声提取 30 min, 放冷, 用水定容至 10 mL, 取 1 mL, 8 000 r/min 离心 15 min, 上清液 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。按照色谱条件进行测定, 结果见图 1、表 1。可以看出熟地黄中甘露三糖相对较高, 但是差异较大; 水苏糖量相对较低, 差异也较大; 棉子糖量较低, 有的熟地黄不

含。生地黄中水苏糖量最高, 产地不同, 有所差异, 河南产的生地黄普遍较高, 甘肃产的生地黄中水苏糖量差异较大; 河南新乡、河南三门峡、河南淮阳、河南西峡、对照药材中没有检测到甘露三糖, 其他产地的甘露三糖量也较低; 所有产地均含有棉子糖, 量相对较高, 水苏糖量较高的生地黄, 棉子糖量也较高, 水苏糖量较低的生地黄, 棉子糖量也较低。

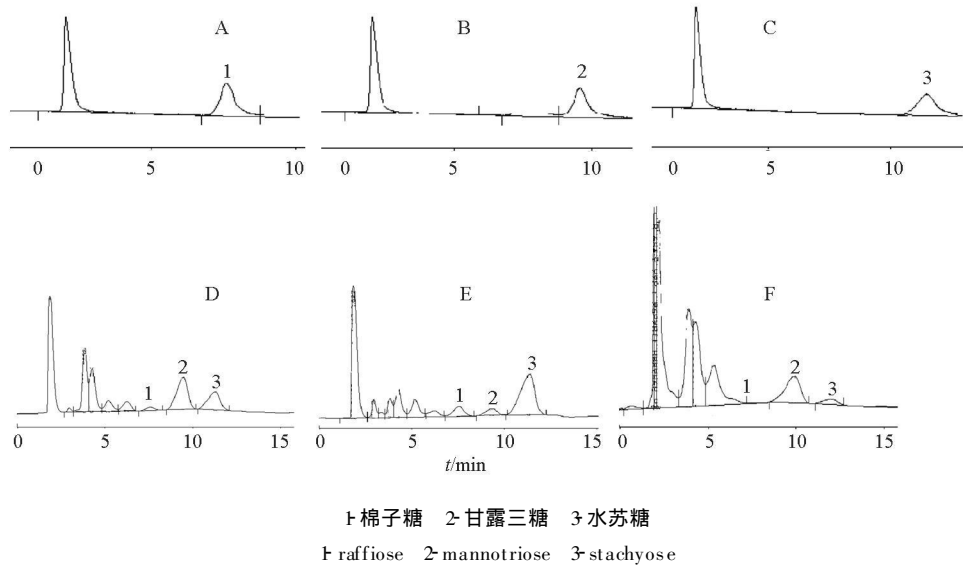


图 1 棉子糖对照品(A)、甘露三糖对照品(B)、水苏糖对照品(C)、熟地黄(D)、生地黄(E)和六味地黄胶囊(F)的 HPLC 图
Fig 1 HPLC Chromatograms of raffinose reference substance (A), mannotriose reference substance (B), stachyose reference substance (C), *Rehmanniae Praeparata Radix* (D), *Rehmanniae Radix* (E) and *Liuwei Dihuang Capsula* (F)

表 1 熟地黄、生地黄中地黄寡糖的测定结果
Table 1 Oligosaccharide of *Rehmanniae Praeparata Radix* and *Rehmanniae Radix*

名称	产地	采集时间	棉子糖	甘露三	水苏糖
			/ %	糖 / %	/ %
熟地黄	河南新乡	2008 年	0.76	11.91	3.69
熟地黄	河南西峡	2008 年	—	17.23	0.61
熟地黄	河南温县	2007 年	0.54	10.99	6.84
熟地黄	河南三门峡	2008 年	5.67	—	34.32
熟地黄	河南淮阳	2008 年	—	2.65	2.02
熟地黄	甘肃庆阳	2008 年	9.15	—	43.63
熟地黄	甘肃清水	2008 年	12.64	10.81	12.64
熟地黄	甘肃金崖	2008 年	0.86	12.74	10.79
熟地黄	甘肃大康营	2008 年	8.48	—	39.17
生地黄	河南新乡	2008 年	7.49	—	37.69
生地黄	河南西峡	2008 年	8.96	—	45.83
生地黄	河南温县	2007 年	6.63	2.05	33.79
生地黄	河南三门峡	2008 年	7.75	—	36.26
生地黄	河南淮阳	2008 年	8.57	—	45.46
生地黄	甘肃庆阳	2008 年	11.08	0.44	47.42
生地黄	甘肃清水	2008 年	2.11	2.25	19.05
生地黄	甘肃金崖	2008 年	4.51	1.64	44.19
生地黄	甘肃大康营	2008 年	8.17	0.97	41.70
对照药材		1180200001	8.48	—	36.89

2.9.2 不同中成药供试品溶液的制备及测定: 取龙胆泻肝丸 100 粒, 研匀, 称取 3.48 g, 精密称定, 置具

塞烧杯中, 加水约 10 mL, 超声提取 30 min, 棉花滤过, 滤液置 10 mL 量瓶中, 用水定容至刻度, 摇匀, 取 1 mL, 8 000 r/min 离心 15 min, 上清液 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液, 按照色谱条件进行测定, 结果见表 2。

取六味地黄丸(浓缩丸) 20 粒, 研匀, 称取 0.5 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加水 9 mL, 超声提取 30 min, 用水定容至刻度, 摇匀, 取 1 mL, 8 000 r/min 离心 15 min, 上清液 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液, 按照色谱条件进行测定, 结果见表 2。

取六味地黄丸(蜜丸), 切碎, 称取 0.5 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加水 9 mL, 超声提取 30 min, 用水定容至刻度, 摇匀, 取 1 mL, 8 000 r/min 离心 15 min, 上清液 0.45 μm 滤过, 滤液作为供试品溶液, 按照色谱条件进行测定, 结果见表 2。

取六味地黄胶囊 10 粒, 倾出内容物, 研匀, 称取 0.9 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加水 9 mL, 超声提取 30 min, 用水定容至刻度, 摇匀, 取 1 mL, 8 000 r/min 离心 15 min, 上清液 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液, 按照色谱条件进行测定, 结果见

表 2, 图 1。

取妇科十味片 30 片, 去膜衣, 研匀, 称取 7.5 g, 精密称定, 置具塞烧杯中, 加水约 20 mL, 超声提取 30 min, 棉花滤过, 滤液置 10 mL 量瓶中, 用水定容至刻度, 摇匀, 取 1 mL, 8 000 r/min 离心 15 min, 上清液 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液, 按照色谱条件进行测定, 结果见表 2。

表 2 不同中成药中寡糖测定结果

Table 2 Determination of oligosaccharide in different Chinese patent drugs

名称	批号	说明	棉子糖	甘露三	水苏糖
			/ %	糖 %	/ %
龙胆泻肝丸	9083006	水丸, 使用地黄	0.58	—	1.96
六味地黄丸	200903018	浓缩丸, 使用熟地黄	—	6.71	0.84
六味地黄丸	20082	大蜜丸, 使用熟地黄	—	2.68	0.86
六味地黄胶囊	080501	使用熟地黄	—	5.63	0.97
妇科十味片	081101	使用熟地黄	0.09	0.16	—

由不同中成药中生地黄或熟地黄中地黄寡糖测定结果可知, 中国药典规定的处方中的地黄药材、熟地黄药材测定结果均与生地黄药材、熟地黄药材测定结果有很大相关性。

3 讨论

由熟地黄测定结果可以看出, 产地不同其所含寡糖成分、量均不一样, 甘露三糖量低的或未检测到的熟地黄考察外观性状, 饮片中心不同程度的有黄心, 没有达到《中国药典》2010 年版一部熟地黄“性状”项目的要求, 所以熟地黄中寡糖成分的差异及量

差异可能主要由于炮制程度有关。

由生地黄测定结果可以看出, 产地不同其所含寡糖成分、量均不一样, 有的产地没有检测到甘露三糖。究竟什么导致了寡糖成分的差异, 鲜地黄炮制成生地黄时造成的, 还是生长环境造成的? 因此本课题组对超声提取和煎煮提取做了对比, 并对干燥条件做了考察, 发现在较高的温度和较长时间下, 水苏糖不稳定, 分解成甘露三糖和果糖; 所以亟待进一步深入研究造成不同产地生地黄所含寡糖成分的差异及量差异的真正原因。

《中国药典》2010 年版一部收载的大部分中药材测定项中供试品的制备采用甲醇等有机溶剂提取、纯化制备, 但是在中成药的制备中多采用水煎提取, 所以对此方法制备的中成药, 控制量有一定的难度。本课题组对含有生地黄药材、熟地黄药材的不同工艺制备的中成药及不同剂型进行了初步考察, 测定结果显示, 此检测方法简便、易行, 供试品的制备也较简单, 可以从药材、中间体、成品采用一套方法进行检测、控制。

参考文献:

[1] 邱建国, 张汝学, 贾正平, 等. 地黄中寡糖含量 HPLC 法测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 8-9
[2] 邱建国, 贾正平, 张汝学, 等. 生地与熟地中糖类和梓醇的比较研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1117-1119
[3] 张汝学, 樊俊杰, 贾正平, 等. 地黄中寡糖的提取分离工艺研究 [J]. 解放军药学学报, 2005, 21(1): 34-36

复方泽泻胶囊中葛根素和总黄酮的测定

林 绥*, 阙慧卿, 钱丽萍, 邓思珊

(福建省医学科学研究院, 福建 福州 350001)

摘要: 目的 采用 HPLC 法建立复方泽泻胶囊中葛根素和总黄酮的测定方法。方法 葛根素测定的色谱条件为 Lcromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(40:60); 检测波长: 254 nm; 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 20 μL, 柱温: 室温。总黄酮采用紫外可见分光光度计在 360 nm 处测定。结果 葛根素在 2.032~65 μg/mL 线性关系良好, 平均回收率为 97.9%, RSD 为 1.98%。总黄酮在 0~27.50 μg/mL 线性关系良好, 平均回收率为 97.1%, RSD 为 2.98%。结论 本方法重现性好, 灵敏度高, 可用于制剂的质量控制。

关键词: 复方泽泻胶囊; 葛根素; 总黄酮; 高效液相色谱; 紫外分光光度

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2010)12-2000-03

复方泽泻胶囊以泽泻和葛根为君药, 本课题组以之对动物脂肪肝进行治疗作用的研究, 尤其是酒

精性脂肪肝的疗效显著。葛根总黄酮用于解表^[1], 具有很强的抗酒精所致的中枢抑制作用^[2], 葛根素

收稿日期: 2010-06-13
基金项目: 福建省省属公益类基本专项(2009R10017-4)
* 通讯作者 林 绥 Tel: 13605948318 E-mail: linsui_syy@sina.com.cn