

性试验结果,也是硫唑嘌呤的分解产物,虽然在硫唑嘌呤原料中对有关物质进行了控制,但为了防止片剂在储藏、运输过程中主药分解,因此笔者认为,有必要在片剂中增订此项目。

3.2 方法和限度的确定

英国药典 2010 年版和我国进口药品注册标准 JX20010317 中均用 TLC 法同时控制 6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑的量,限度均为 1.0%,中国药典 2005 年版二部硫唑嘌呤原料中用 HPLC 控制 6-巯基嘌呤和其他杂质,限度均为 0.5%^[2]。庄建芬等用 HPLC 同时检测硫唑嘌呤原料中的 6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑^[3],色谱条件与中国药典 2005 年版基本一致,但其检测波长为 240 nm,与中国药典 2005 年版所用的 300 nm 波长不

同。为了保持标准的先进性和连贯性,中国药典 2010 年版选用 2005 年版原料药“有关物质”的色谱条件同时控制硫唑嘌呤片中 6-巯基嘌呤、5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑和其他杂质的量,限度均为 0.5%。方法简便、快速、测定结果准确、可靠,限度比国外药典标准更严。

REFERENCES

- [1] Ch.P. Drug Knowledge for Clinical Use(中华人民共和国药典临床用药须知) [S]. 2005: 802.
- [2] Ch.P(2005)Vol II (中国药典 2005 年版, 第二部) [S]. 2005: Appendix 717.
- [3] ZHUANG J F, ZENG H Q. Determination of related substance in Azathioprine by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2008, 25(5): 446-448.

收稿日期: 2012-12-18

HPLC-ELSD 测定丹参提取物中的单糖和二糖

牛涛¹, 徐波¹, 陈红¹, 高阳²(1.天津天士力现代中药资源有限公司, 天津 300402; 2.中国药科大学, 南京 210009)

摘要:目的 建立一种以高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)对丹参提取物中单糖和二糖进行测定的方法。方法 使用 PrevailTM Carbohydrate ES 色谱柱,以乙腈和水为流动相,梯度洗脱,柱温为 35 °C,流速为 0.8 mL·min⁻¹; ELSD 漂移管温度为 60 °C,载气为空气,气压为 25 psi。结果 丹参提取物中单糖和二糖组分能够得到较好的分离,葡萄糖、果糖和蔗糖的线性范围分别为 0.246~1.230, 0.236~1.182, 0.246~1.230 mg; 平均加样回收率($n=6$)分别为 101.7%(RSD=1.6%)、102.0%(RSD=1.0%)和 100.8%(RSD=0.9%)。结论 该方法快速简便、结果准确稳定,适合于丹参提取物中单糖、双糖的含量测定。

关键词: 丹参提取物; 高效液相色谱-蒸发光散射; 单糖; 二糖

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)01-0183-04

Determination of Monosaccharide and Disaccharide in Tanshinon Extract by HPLC-ELSD

NIU Tao¹, XU Bo¹, CHEN Hong¹, GAO Yang²(1.Tianjin Tasly Modern TCM Resources CO., LTD, Tianjin 300402, China; 2.China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE An HPLC-ELSD method was established for the simultaneous quantitative analysis of monosaccharide, disaccharide from Tanshinon extract. **METHODS** The chromatographic separation was achieved on PrevailTM Carbohydrate ES column using a mobile phase composed of a mixture of acetonitrile and water by gradient elution at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The ELSD drift tube temperature was set at 60 °C and the carrying gas was air. **RESULTS** Monosaccharides and disaccharides from Tanshinon extract could be well separated, and the linear ranges of fructose, glucose and sucrose were 0.246~1.230 mg, 0.236~1.182 mg and 0.246~1.230 mg. The average spiked recoveries($n=6$) of fructose, glucose and sucrose were 101.7%(RSD=1.6%), 102.0%(RSD=1.0%) and 100.8%(RSD=0.9%). **CONCLUSION** This method is accurate, rapid, simple and reproducible, and thus it is suitable for the determination of monosaccharides, disaccharides from Tanshinon extract.

KEY WORDS: Tanshinon extract; HPLC-ELSD; monosaccharide; disaccharide

作者简介: 牛涛, 男, 主管药师 Tel: (022)86342260 E-mail: nthomas@163.com

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)是著名的活血化瘀良药,临床广泛用于治疗冠心病、心绞痛、心肌梗塞和脑血管疾病,疗效确切。水溶性有效成分为酚酸类,具有抗氧化、改善心肌缺血等药理作用^[1-2]。丹参提取物由丹参加水提取、经醇沉、浓缩得到,为丹参水溶性有效成分提取物。除含有酚酸类成分外,经硫酸-苯酚法测定发现,丹参提取物中含有较高的糖类成分。采用 HPGCP 考察丹参提取物中的糖类成分分子量在 2 000 以下,属于单糖或低聚糖类。再经 TLC 和衍生化后的 GC-MS 鉴别,确定丹参提取物中含有的糖类成分主要为单糖和二糖,单糖为果糖和葡萄糖,二糖为蔗糖^[3]。为了更好的进行丹参提取物质量的综合评价,本实验建立了丹参提取物中单糖和二糖的含量测定方法,并进行了方法验证。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2424 蒸发光散射检测器, Empower 化学工作站(美国 Waters 公司); AG104 电子天平(瑞士 METTLER 公司); Milli-Q 超纯水处理系统(美国 MILLIPORE 公司); Cleanert PS-SPE 固相萃取柱[0.5 g·(6 mL)⁻¹, 博纳艾杰尔科技公司]; 丹参提取物为实验室自制。

无水葡萄糖对照品(批号: 110833200802, 含量以 100%计)、果糖对照品(批号: 100231200801, 含量为 99.6%)、蔗糖对照品(批号: 111507200701, 含量以 100%计)均购自中国药品生物制品检定所。其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 丹参提取物的制备

取丹参药材 250 g, 经水提醇沉, 减压干燥, 得到丹参提取物。

2.2 色谱条件

PrevailTM Carbohydrate ES 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 乙腈和水为流动相梯度洗脱, 梯度洗脱程序见表 1; 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C。ELSD 检测器漂移管温度为 60 °C, 气压为 25 psi。进样量为 10 μL。在此色谱条件下, 样品中果糖、葡萄糖和蔗糖的出峰时间分别为 9.56, 12.12, 16.35 min, 色谱峰均能达到基线分离, 色谱图见图 1。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取经五氧化二磷干燥过的果糖对照品、葡萄糖对照品、蔗糖对照品适量, 加水制得每毫升含上述物质各 0.5 mg 的混合对照品溶液。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Mobile phase gradient procedures

时间/min	乙腈/%	水/%
0	75	25
20	75	25
23	60	40
30	60	40
33	75	25
38	75	25

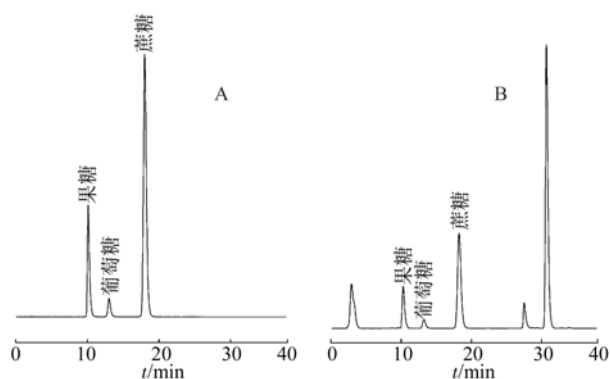


图 1 对照品(A)和丹参提取物(B)的 HPLC 图谱

Fig 1 Chromatograms of the standards (A) and Tanshinon extract (B)

2.4 供试品溶液的制备

取丹参提取物约 0.5 g, 精密称定, 加水约 20 mL, 超声溶解。上至已处理好的固相萃取柱 [Cleanert PS-SPE, 0.5 g·(6 mL)⁻¹], 再用水洗涤固相萃取柱, 收集上样液和洗涤流出液, 合并, 转移至 50 mL 量瓶中, 加水至刻度, 混匀, 即得。

2.5 上样速度的选择

分别以 0.5, 1.0, 1.5 mL·min⁻¹ 的流速上样, 再用水 25 mL 洗涤固相萃取柱, 收集上样液和洗涤流出液, 合并, 分别测定回收率, 果糖的回收率分别为 101.1%, 101.3%和 94.5%, 葡萄糖的回收率分别为 100.4%, 99.9%和 93.7%, 蔗糖的回收率分别为 100.3%, 100.4%和 95.5%, 选择上样速度为 1.0 mL·min⁻¹ 较优。

2.6 洗涤体积的选择

上样完成后, 分别用水 15, 20, 25 mL 洗涤固相萃取柱, 收集上样液和洗涤流出液, 合并, 分别测定回收率, 果糖回收率分别为 92.7%, 99.7%和 100.2%, 葡萄糖的回收率分别为 94.4%, 98.9%和 99.7%, 蔗糖回收率分别为 96.5%, 99.4%和 100.1%, 所以选择洗涤体积为 25 mL。

2.7 线性关系考察

精密称取经五氧化二磷干燥过的果糖对照品、葡萄糖对照品、蔗糖对照品适量，加水制得每毫升含上述物质各 5 mg 的混合对照溶液，再分别量取 1, 2, 3, 4, 5 mL 混合对照溶液置于 25 mL 量瓶中，加水至刻度，混匀，分别制成每毫升含有果糖、葡萄糖和蔗糖各 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg 的系列溶液，注入液相色谱仪，测定，以浓度的对数对测得的峰面积的对数进行线性回归，求得回归方程。结果见表 2。

表 2 回归方程、相关系数及线性范围

Tab 2 Regression formulations, Rs and linear ranges

成分	回归方程	r	线性范围/mg
果糖	$\ln Y = 1.5236 \ln X + 6.1522$	0.9998	0.246~1.230
葡萄糖	$\ln Y = 1.8354 \ln X + 5.7341$	0.9994	0.236~1.182
蔗糖	$\ln Y = 1.5936 \ln X + 6.1266$	0.9992	0.246~1.230

2.8 仪器精密度试验

依法制备供试品溶液，重复进样 6 次，记录果糖、葡萄糖和蔗糖的峰面积，计算得峰面积的平均值分别为 953 247, 284 451, 3 086 571, RSD 分别为 2.2%, 2.4% 和 1.9%，表明仪器精密度良好。

2.9 重复性试验

取丹参提取物样品，依法制备供试品溶液 6 份，分别测定果糖、葡萄糖和蔗糖的含量，计算得含量的平均值分别为 3.77%, 2.91% 和 8.44%，RSD 分别为 1.8%, 1.8% 和 1.6%，表明方法重复性良好。

2.10 回收率试验

精密称取 0.20, 0.25, 0.30 g 的丹参提取物，各称 3 份，置烧杯中，分别精密加入与含量相应的果糖、葡萄糖和蔗糖对照品，按“2.4”项下方法，自“加水约 20 mL”起，依法处理，作为供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件，取 10 μ L 注入色谱仪，分别计算果糖、葡萄糖和蔗糖的回收率，结果表明样品回收率良好。

2.11 样品测定

取 5 批丹参提取物样品，按“2.4”项下方法，按“2.2”项下色谱条件，依法测定，计算果糖、葡萄糖和蔗糖的含量，结果见表 4。

3 讨论

3.1 测定方法的选择

本试验采用聚合物基质的 PrevailTM Carbohydrate ES 色谱柱，梯度洗脱，采用蒸发光散射检测器，实现了丹参提取物中 3 个低聚糖类成分的良好分离。

表 3 回收率实验结果(n=9)

Tab 3 Results of recovery test(n=9)

成分	原含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/%	平均/%	RSD/%
果糖	7.40	8.87	16.48	102.36	101.7	1.6
	7.75	8.64	16.59	102.30		
	7.68	8.46	16.22	100.95		
	9.84	10.15	20.23	102.33		
	9.50	10.37	19.77	99.07		
	9.73	9.84	19.72	101.52		
	11.76	12.77	25.03	103.90		
	11.44	12.89	24.47	101.10		
	11.48	12.52	24.22	101.79		
葡萄糖	5.71	5.83	11.67	102.23	102.0	1.0
	5.98	5.86	12.05	103.58		
	5.93	5.74	11.66	99.83		
	7.60	7.33	15.11	102.46		
	7.33	7.42	14.93	102.43		
	7.51	7.28	14.83	100.55		
	9.08	8.88	18.27	103.49		
	8.83	8.53	17.52	101.88		
	8.86	8.66	17.64	101.39		
蔗糖	16.57	17.22	34.12	101.92	100.8	0.9
	17.35	17.35	34.53	99.02		
	17.19	17.07	34.41	100.88		
	22.04	21.64	43.56	99.45		
	21.26	21.39	43.04	101.82		
	21.78	21.71	43.77	101.29		
	26.33	25.88	52.61	101.55		
	25.61	25.54	51.51	101.41		
	25.69	25.87	51.63	100.27		

表 4 样品测定结果(n=5)

Tab 4 Determination of sample(n=5)

果糖/%	葡萄糖/%	蔗糖/%	合计/%
2.03	1.78	9.56	13.37
2.34	2.27	8.49	13.10
4.24	3.38	7.78	15.40
4.24	3.61	6.24	14.09
2.85	2.53	9.02	14.40

小分子糖类物质通常使用氨基色谱柱进行分离和检测。笔者采用 Hypersil GOLD Amino (2.5 mm \times 4.6 mm) 色谱柱进行分析，结果显示果糖和葡萄糖分离效果不好，分离时间长。同时传统的氨基色谱柱存在着化学降解导致的柱寿命低等问题，进样 50 针以后，噪音明显增大。

而采用 PrevailTM Carbohydrate ES 色谱柱，乙腈-水为流动相梯度洗脱，3 个低聚糖类成分的分度均达到 3.0 以上，且分离时间短，且基线都非常稳定。同时聚合物基质不存在化学降解现象，进样 300 针色谱图无明显变化。

糖类物质检测，通常使用示差折光检测器和蒸发光散射检测器。示差折光检测器灵敏度低，

与梯度脱洗不相容,平衡时间长。本实验采用蒸发光散射检测器,灵敏度高,与梯度洗脱相容性良好,平衡时间短,能充分发挥 Prevail™ Carbohydrate ES 色谱柱特点,基线非常稳定。

3.2 样品处理方法

为了分离纯化目标分析物,本实验采用了固相萃取法(SPE)对丹参提取物进行纯化,有效去除了酚酸等杂质峰的干扰,纯化效果良好。SPE 是一种集萃取、浓缩、解吸于一体的实验技术,以其高效、高选择性、高度自动化的特点广泛用于分析化学的样品分离和纯化,尤其是在中药分析领域,发展前景良好^[4]。

REFERENCES

- [1] XIAO P G. Modern Chinese Materia Medica(新编中药志) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001: 212-230
- [2] BAI Y, LI L, LEI J W, et al. Quality determination of *Salvia miltiorrhiza* in pharmaceutical industry by near-infrared spectroscopy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(3): 222-225.
- [3] WANG H, WANG Q, LUO H M, et al. Quantitative analysis of salvia polysaccharide and determination of its composition by HPCE [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2007, 25(4): 827-829
- [4] LAI Y H, CHEN H A. The prospects of applying solid phase extraction to the analysis of traditional Chinese medicine and discussing the strategy and procedure of developing a new SPE method [J]. Guangdong Pharm J(广东药学), 2002, 12(2): 12-16.

收稿日期: 2011-10-29

超高效液相色谱-串联质谱测定保健食品中马兜铃酸 A

罗金文, 吴鸳鸯, 李樱红, 周明昊(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

摘要:目的 建立测定保健食品中马兜铃酸 A 的超高效液相色谱-串联质谱法。方法 采用 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸(含 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵)(60:40); 流速: 0.2 mL·min⁻¹; 质谱条件为电喷雾电离源(ESI⁺), 以多重反应监测(MRM)方式进行检测, 用于定量分析的反应离子为 m/z 359→324。结果 马兜铃酸 A 在 2~200 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好, 方法平均回收率为 105.3%, RSD 为 0.8%, 最低检测限为 0.2 μg·kg⁻¹。结论 本法专属性强, 灵敏度和准确度高, 可用于保健食品中马兜铃酸 A 的测定。

关键词: 保健食品; 马兜铃酸 A; 超高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)01-0186-04

Determination of Aristolochic Acid A in Health Food by UHPLC-MS/MS

LUO Jinwen, WU Yuanyang, LI Yinghong, ZHOU Minghao(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a UHPLC-MS/MS method for the determination of aristolochic acid A in health food. **METHODS** The separation and analysis was performed on a Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid containing 10 mmol·L⁻¹ ammonium formate(60:40). The flow rate was 0.2 mL·min⁻¹. Electrospray ionization(ESI) source was applied and operated in the positive mode. Multiple reaction monitoring (MRM) mode with the transitions of m/z 359→324 was used to quantify aristolochic acid A. **RESULTS** The assay linearity of aristolochic acid A was confirmed over the range 2~200 ng·mL⁻¹. The average recovery of aristolochic acid A was 105.3% and RSD was 0.8%. The detection limit was 0.2 μg·kg⁻¹. **CONCLUSION** The method is proved to be specific, sensitive and accurate. Therefore, it can be used to detect aristolochic acid A in health food.

KEY WORDS: health food; aristolochic acid A; UHPLC-MS/MS

马兜铃酸(aristolochic acid)是碳环芳香族酸性化合物,基本骨架构成为蒽菲型结构,主要存在于马兜铃科植物中。早期发现该类物质具有抗肿

瘤活性、抗感染及增强吞噬细胞活性等作用。随着研究的深入,马兜铃酸类物质已被证实具有肾毒、致癌和致基因突变作用。1993—1999年,欧

作者简介: 罗金文,男,硕士,副主任药师 Tel: (0571)86458914 E-mail: luojw31@163.com