

- 和 MDA 的影响[J]. 中成药, 2003, 25(2): 161.
- [3] Fishbein MC. Experimental Myocardial Infarction in the Rat. *Am J Pathol*, 1978, 90(1): 57.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 主编. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 1042-1043.
- [5] 苏静怡. 心肌缺血-再灌注损伤机制及防治[J]. 中华心血管病杂志, 1992, 20(2): 83.
- [6] Hess ML. Molecular oxygen: Friend and Foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 1984, 16: 969.
- [7] Ytrehus K. Influence of oxygen radicals generated by xanthine oxidase in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc Res*, 1986, 20: 597.
- [8] Zweier JE, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 1404.
- [9] 吴其夏, 主编. 体液因素和血液循环病理生理学[M]. 第 1 版. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1991: 162.
- [10] Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation*, 1989; 8(4): 1049.
- [11] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 主编. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 838, 1043.
- [12] 丁长海. 抗氧自由基药物研究进展[J]. 中国药理学通报, 1992, 8(5): 321.

壳聚糖絮凝法处理明黄膏提取液的研究

刘志红¹, 张建林², 朱旭江², 朱瑞龙³

(1. 厦门大学化学化工学院, 厦门 361005; 2. 兰州市药检所, 兰州 730030; 3. 兰州佛慈制药有限公司, 兰州 730046)

关键词: 壳聚糖; 明黄膏; 提取工艺

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1004-1528(2004)07-附4-02

明黄膏方药是由黄连, 徐长卿, 白芷等组成, 在生产中, 常用水提醇沉法去除杂质, 会造成有效成分的损失^[1], 本文采用壳聚糖絮凝法处理去除提取液中的杂质, 并以高效液相色谱法测定提取液中盐酸小檗碱的量为考察指标, 与水提醇沉法进行比较, 探索分离纯化工艺流程, 确定了最佳工艺条件。

1 仪器与试剂

日本岛津 LG-10AT VP 高效液相色谱仪; SIL-10ADVP 自动进样器; SPD-M10AVP 二极管阵列检测器; ZRS-8C 智能溶出试验仪(天津大学无线电厂); 壳聚糖(上海华凯科技贸易公司); 盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所); 乙腈、甲醇(色谱纯); 其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 提取液的制备 将处方中的药材黄连, 白芷, 徐长卿加水煎煮 3 次(加水量分别为药材量的 6 倍, 4 倍, 3 倍, 浸 1h, 然后分别煎煮 1h, 1h, 0.5h), 提取液用 4 层纱布滤过, 滤液浓缩至每毫升相当于原药材 0.5g。

2.2 絮凝剂的制备 取壳聚糖 1g, 加 1% 醋酸 100mL 静置 24h, 搅拌均匀, 配制成 1% 的溶液。

2.3 壳聚糖絮凝处理提取液 取上述提取液 50mL 于锥形瓶中, 在一定温度, pH 值, 加入一定量的壳聚糖絮凝剂, 放置

12h, 取上清液一定量, 稀释至一定体积, 测定盐酸小檗碱的含量。

2.4 醇沉提取液 取提取液 50mL, 加入乙醇至乙醇含量达 75%, 边加边搅拌, 放置 12h, 倾取上清液, 蒸去乙醇, 定容, 测定盐酸小檗碱的含量。

2.5 盐酸小檗碱的含量测定

2.5.1 色谱条件 Tosoh TSK-GEL C₁₈柱(5 μ m, 150mm \times 4.6mm); 流动相: 0.025mol \cdot L⁻¹磷酸二氢钾: 0.5% 癸烷磺酸钠: 乙腈(55: 10: 35); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 检测波长: 284nm; 流量: 0.8mL \cdot min⁻¹。

2.5.2 标准溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品 4.27mg(98.14%), 加甲醇溶解并稀释至 25mL, 精密吸取 2mL 稀释至 25mL 配制成 13.4 μ g \cdot mL⁻¹(按纯品计算)的溶液, 作为对照品溶液。

2.5.3 线性关系考察 精密吸取上述对照品溶液 5, 10, 15, 20, 25 μ L 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件进行测定峰面积积分值, 以盐酸小檗碱量为横坐标(X), 峰面积积分值为纵坐标(Y), 线性回归方程为 $Y = 4825358.93X - 16753.48$, $r = 0.9999$, 表明盐酸小檗碱在 0.067~ 0.335 μ g 范围呈良好线性关系。

2.5.4 稳定性实验 取对照品溶液 10 μ L, 按上述色谱条件

收稿日期: 2003-12-18

基金项目: 甘肃省自然科学基金暨中青年科技基金项目(项目编号 YS-011-A23-015)

作者简介: 刘志红(1964~), 大学, 副教授, 研究方向: 天然药物质量控制; 新药研究。E-mail: zhihlqq@126.com

在不同时间内测定5次,结果盐酸小檗碱峰面积积分值在48h内稳定,见表1。

表1 稳定性试验

| 测定时间(h) | 峰面积 | RSD (%) |
|---------|---------|---------|
| 0 | 1642881 | |
| 4 | 1617064 | |
| 8 | 1627118 | 1.00 |
| 24 | 1601309 | |
| 48 | 1635000 | |

2.5.5 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液10 μ L,重复进样6次,按上述色谱条件测定,盐酸小檗碱峰面积积分值的RSD为0.77%。结果表明精密度良好,见表2。

表2 精密度试验

| 实验次数 | 峰面积 | RSD (%) |
|------|---------|---------|
| 1 | 1790024 | |
| 2 | 1810918 | |
| 3 | 1801281 | 0.77 |
| 4 | 1918552 | |
| 5 | 1781213 | |
| 6 | 1795958 | |

2.5.6 回收率试验 精密吸取已知含量的提取液适量6份,分别精密加入盐酸小檗碱对照品溶液(0.1668mg \cdot mL $^{-1}$)3,4,5mL,按样品测定方法操作测定盐酸小檗碱含量,计算回收率,见表3。

表3 回收率试验

| 样品量 (mg) | 加入量 (mg) | 测得量 (mg) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|----------|----------|----------|---------|-----------|---------|
| 0.9075 | 0.6672 | 1.5243 | 96.8 | | |
| 0.8775 | 0.6672 | 1.5323 | 99.2 | | |
| 0.7260 | 0.8340 | 1.4960 | 95.9 | | |
| 0.8075 | 0.8340 | 1.6596 | 101.1 | 97.9 | 2.0 |
| 0.9075 | 0.5004 | 3.572 | 96.4 | | |
| 1.0890 | 0.5004 | 1.5608 | 98.2 | | |

2.5.7 样品含量测定 分别精密吸取水煎液,水提醇沉液,絮凝剂处理样品溶液1mL,置50mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用0.45 μ m微孔滤膜滤过,得供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μ L,注入液相色谱仪按上述色谱条件测定。

3 试验结果

3.1 絮凝剂加入量对絮凝效果的影响

取上述水煎液50mL,测定pH值为4.78,在30 $^{\circ}$ C,分别加入上述壳聚糖絮凝剂不同量,以100r \cdot min $^{-1}$ 的搅拌速度搅拌15min,静置12h,按上述样品含量测定方法测定盐酸小檗碱的含量,结果见表4。

表4 絮凝剂加入量对絮凝效果的影响

| 编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| 药液体积(mL) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 絮凝剂加入量(mL) | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 | 3.5 |
| 盐酸小檗碱的含量(mg \cdot g $^{-1}$) | 3.60 | 3.61 | 3.63 | 3.40 | 3.28 | 3.14 |

3.2 转速对絮凝结果的影响

取上述水煎液50mL,在pH值为4.78,温度30 $^{\circ}$ C,分别加入1.5mL絮凝剂,以不同的搅拌速度搅拌15min,静置12h,按上述样品含量测定方法测定盐酸小檗碱的含量,结果见表5。

表5 转速对絮凝效果的影响

| 编号 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------------------------|------|------|------|------|
| 药液体积(mL) | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 絮凝剂加入量(mL) | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| 搅拌速度(r \cdot min $^{-1}$) | 50 | 100 | 150 | 200 |
| 盐酸小檗碱的含量(mg \cdot g $^{-1}$) | 3.29 | 3.22 | 3.17 | 3.13 |

3.3 pH值对絮凝效果的影响

取上述水煎液50mL,分别用稀盐酸(或1%NaOH)调节pH值,分别加入1.5mL絮凝剂,在30 $^{\circ}$ C,以100r \cdot min $^{-1}$ 的搅拌速度搅拌15min,静置12h,按上述样品含量测定方法测定盐酸小檗碱的含量,结果见表6。

表6 pH值对絮凝效果的影响

| 编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| 药液体积(mL) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| pH值 | 3.0 | 3.5 | 4.0 | 4.8 | 5.5 | 6.0 |
| 盐酸小檗碱的含量(mg \cdot g $^{-1}$) | 3.42 | 3.51 | 3.50 | 3.40 | 3.38 | 3.33 |

3.4 温度对絮凝效果的影响

取上述水煎液50mL,pH值4.78,分别加入3.5mL絮凝剂,在不同温度下,以100r \cdot min $^{-1}$ 的搅拌速度搅拌15min,静置12h,按上述样品含量测定方法测定盐酸小檗碱的含量,结果见表7。

表7 温度对絮凝效果的影响

| 编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------------------------------|------|------|------|------|------|
| 药液体积(mL) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 温度($^{\circ}$ C) | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 盐酸小檗碱的含量(mg \cdot g $^{-1}$) | 3.02 | 3.13 | 3.18 | 3.19 | 3.19 |

表8 两种工艺比较(n=3)

| | 盐酸小檗碱的含量(mg \cdot g $^{-1}$) | RSD (%) | 盐酸小檗碱保留率(%) |
|--------|---------------------------------|---------|-------------|
| 水煎液 | 3.77 | 0.90 | |
| 水提醇沉液 | 2.74 | 2.63 | 72 |
| 壳聚糖澄清液 | 3.63 | 1.38 | 96 |

3.5 两种工艺比较

按上述样品含量测定方法,对水煎液,水提醇沉淀,絮凝剂按最佳絮凝条件处理样品中的盐酸小檗碱的含量进行了比较,结果见表8。

4 讨论

4.1 本实验曾选用多种流动相(1)0.05mol \cdot L $^{-1}$ 磷酸二氢钠缓冲液(用磷酸调节pH至3)-乙腈(60:40)等多种比例;(2)0.05mol \cdot L $^{-1}$ 醋酸钠缓冲液(pH=3.5)-乙腈-醋酸乙酯-三乙胺(取三乙胺14mL,加冰醋酸5.7mL,再加水至100mL)(800:140:44:16)等流动相分离不理想。盐酸小檗碱为季铵生物碱,可离解为有机正离子(A $^{+}$),在流动相中加入含有对

离子(B⁻)的癸烷磺酸钠的离子对试剂,形成稳定的疏水离子对(AB),从而增加了分离效率。经筛选以0.025mol·L⁻¹磷酸二氢钾-0.5%癸烷磺酸钠-乙腈(55:10:35)为流动相,在此条件下盐酸小檗碱与其它成分达到基线分离,有利于定量分析。

4.2 据报道^[4,5],传统工艺中水提醇沉法是中药制剂精制最常用的方法,当含醇量达60%~70%乙醇提取的有效成分占总提取物中比例较大,当含醇量75%可除去蛋白质,但达85%~95%虽可除去全部蛋白质和多糖,但鞣质,水溶性色素等不易完全除尽,为保留更多的有效成分,同时除去更多的杂质,故在本实验中加乙醇至75%进行精制。

4.3 从表4中可看出,随絮凝剂加入量的增加使药液中的有效成分增加,但加入量过大,使有效成分也随蛋白质,鞣质等大分子物质一起沉降,而使盐酸小檗碱的含量降低,但加入量过少时,絮体的量较少,而使絮体的体积小,滤过速度慢,从而以0.4g/L絮凝剂的加入量为最佳加入量。

从表5中可看出,搅拌速度不宜过快,以50·min⁻¹为宜,可保留更多的成分。搅拌的目的是增加微粒与絮凝剂的接触碰撞机会,速度过快,不仅使絮凝剂与杂质形成絮团沉

降,而且使有效成分(盐酸小檗碱)颗粒与絮凝剂形成絮团沉降,从而使有效成分(盐酸小檗碱)含量下降。

从表6,表7中可看出,pH值,温度均对絮凝效果有影响,经试验,以pH值4.0,温度40°C,保留更多的有效成分,且样品易于过滤。

从表8中可看出,壳聚糖絮凝效果比醇沉工艺保留更多的盐酸小檗碱有效成分,壳聚糖絮凝法用于中药提取液的纯化具有一定的实用价值,壳聚糖加入量少,成本低,安全无毒。为传统中药的现代化改造开辟了一条有效途径。

参考文献:

- [1] 董方言主编.现代实用中药新剂型新技术[M].北京:人民卫生出版社,2001.467.
- [2] 朱彭龄,云自厚,谢光华.现代液相色谱[M].第1版,兰州:兰州大学出版社,1994.164.
- [3] 中华人民共和国药典.一部[S].化学工业出版社,2000:615.
- [4] 董方言主编.现代实用中药新剂型新技术[M].北京:人民卫生出版社,2001.10.
- [5] 潘莹,江海燕.浅析中药提取液质量的影响因素[J].时珍国医国药,2002:13(9):529.

HPLC测定血脂灵片中2、3、5、4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷含量

盛静

(嘉兴学院医学院,浙江嘉兴314000)

关键词:血脂灵片;制何首乌;2、3、5、4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷

中图分类号:R927.2

文献标识码:B

文章编号:1001-1528(2004)07-附6-02

本品由制何首乌、山楂、决明子等药味制成,具有活血降浊、润肠通便作用,其中制何首乌为君药,由于制何首乌和决明子中均含蒽醌类成分,而且是本处方的有效成分,同时为了含量测定的专属性,故在测定本品大黄素含量的基础上又制订了2、3、5、4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷HPLC含量测定方法,以便更好地控制制何首乌的质量。按中国药典对含量测定方法验证要求进行了方法学验证,结果表明本法简便、准确、专属性强^[1,2]。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 HPLC(G1322A脱气机、G1311A四元泵、G1313A自动进样仪、G1316A柱温箱、G1314A VWD检测器,Agilent Chemstation色谱工作站);Bolong超声清洗器。

乙醇和甲醇为分析纯,乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水。

2、3、5、4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品(0844-200003,供含量测定用),购于中国药品生物制品检定所。血脂灵片3批(批号:030425、030422、021103)由某药厂提供。

2 供试品溶液制备

取本品10片,精密称定,研细,取粉末约0.2g,精密称定,置于具塞的锥形瓶中,精密加入稀乙醇25mL,称定重量,超声处理30min,放冷,称重,用稀乙醇补足减失重量,摇匀,滤过,即得。

3 测定条件

流动相:乙腈-水(22:78),色谱柱:Alltima C₁₈(250mm×4.6mm,5μm),柱温:25°C,流量:1mL·min⁻¹;检测波长:320nm,结果2、3、5、4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷峰在该条件下能与杂质达到基线分离。见图1~图3。

收稿日期:2004-01-19

作者简介:盛静(1967~),女,浙江绍兴人,讲师,从事药物分析实验与教学工作,电话:0573-3644348。