

HPLC 法测定卫矛醇及检测复方中药 制剂通痹灵中的卫矛醇

沈阳药科大学中药系(110015) 沈 嘉* 李 锐

岛根医科大学(日本)

李颂华 小林裕太 奥西秀树

摘 要 用 HPLC 测定复方中药制剂通痹灵中的卫矛醇。以衍生物制备法将卫矛醇和内标制成具有紫外吸收的异氰酸苯酯衍生物,用 TSK-gel ODS-80TM 柱,乙腈-乙醇-水(5:2:3)为流动相,检测波长 240nm,内标法定量。

关键词 高效液相色谱法 通痹灵片 南蛇藤 卫矛醇

“通痹灵”为临床上对类风湿关节炎及强直性脊柱炎显示出显著疗效的中药复方,由 15 种传统中药组成,其主要药用植物之一为南蛇藤^[1~5]。从南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* Thunb. 中可分离出卫矛醇,已在临床上用于炎症及类风湿关节炎的治疗^[6,7]。以标准 DBA/1J 鼠制备 CIA (Collagen-Induced Arthritis 胶原引起关节炎)模型的动物试验已证明卫矛醇可改善 CIA 病鼠的临床关节炎发病率,减轻其骨破坏程度。FACS(Fluorescence-activated cell sorting)结果证明卫矛醇可上调 CIA 病鼠的 CD₄ 和 CD₈ 使其接近正常鼠水平,与病理组有显著性差别。上述大量试验结果证明卫矛醇有抗炎及免疫调节作用。本试验研究以 HPLC 测定出通痹灵中含有卫矛醇,证明卫矛醇为通痹灵中的有效成分之一。此方法可将无紫外吸收的卫矛醇等糖醇制备成可用紫外吸收定量的异氰酸苯酯衍生物,所测含量可精确到毫摩尔,精确度高,简便,省时。

1 仪器和试剂

干燥的南蛇藤根及通痹灵片剂由广州中医药大学提供。对照品卫矛醇购自东京 (Nacalaitesque, INC. KYOTO, JAPAN);内标 D-葡萄糖二乙基缩硫醛(D-glucose diethyl mercaptal, GDM)色谱纯(SGM 公司),其余试剂为分析纯,水为重蒸馏水,流动相为色谱纯。

Water 486 型高效液相色谱仪,连接紫外检测器及数据处理仪。

2 色谱条件

色谱柱:TSK-gel ODS-80TM 色谱柱(15 cm×4.6 mm, 5 μm)(Toyo Soda, Tokyo, Japan),流动相:乙腈-乙醇-水(5:2:3),检测波长:240 nm,流速 1 mL/min,进样量 10 μL。

3 方法与结果

HPLC 分析方法基于下述原理:多元醇如卫矛醇与异氰酸苯酯反应可生成具有紫外吸收的衍生物,以平行条件下制备的 D-葡萄糖二乙基缩硫醛-异氰酸苯酯衍生物作内标。本试验在文献^[8]报道基础上做少量改动。

* Address: Shen Jia, Department of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang

沈 嘉,1982 年毕业于沈阳药学院药理学系,学士、高级工程师。从事药用植物有效成分富集提取及活性测定工作。1991~1993 年在瑞典 Uppsala 大学生物医学中心进行药用植物中血小板活性因子(PAF)拮抗剂、5-脂氧合酶(5-LO)、环氧合酶(COX)抑制剂的体外筛选工作。1996-08~1997-03 在日本岛根医大参加文部省课题进行复方中药之中抗炎及免疫调节成分的研究。

3.1 标准曲线的制备

3.1.1 配制标准溶液:分别精确称定标准卫矛醇及内标 GDM 1mmol,用双蒸馏水配成 1 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准储备液,分别精确吸取适当量进行衍生物制备,使其最后反应生成的衍生物溶液每 10 μL 中分别含有 0.3、0.5、1、2、3、4、5、10 nmol 卫矛醇,而每一衍生物样品 10 μL 中的内标量则固定为 5 nmol。

3.1.2 衍生物的制备:分别精确吸取上述相同体积的内标标准液及系列体积的卫矛醇标准液转移进 10 mL 的螺旋盖试管之中,同时以蒸馏水及同量内标标准液制备试剂空白及内标标准品样品,将上述所有样品冷冻干燥。向每一冷冻干燥的样品中加入 140 μL 吡啶(储存时吡啶中放少量 NaOH),加入 40 μL 异氰酸苯酯,盖上试管旋紧,55℃加热 1 h 之后放置冰浴上 1 min,向每一样品之中加入 40 μL 甲醇,在 55℃继续加热 5 min(以甲醇将剩余的异氰酸苯酯反应完全),加入 180 μL 吡啶稀释所得的反应混合液,得到总体积 400 μL 的样品。进样前以滤器过滤,进样量为 10 μL 。

3.1.3 标准曲线:以浓度为横座标,峰面积比(卫矛醇/内标)为纵座标绘图得标准曲线。回归方程为 $Y=0.054368+0.21879X$, $r=0.9988$ 。

卫矛醇在 0.3~10 nmol 浓度范围内线性关系良好。精密吸取卫矛醇标准溶液制备的衍生物样品 10 μL (含标准卫矛醇 5 nmol,内标 5 nmol)连续 6 次进样,测得峰面积比,得变异系数 0.3%。

3.2 生药南蛇藤及通痹灵片剂中的卫矛醇的分离及 HPLC 鉴定

3.2.1 从南蛇藤中分离卫矛醇:干燥的南蛇藤根(500g)粉碎,用蒸馏水冷浸提取(500 mL $\times$ 2)2h,过滤。滤液水浴加热挥发浓缩至 250mL,浓缩液进行大孔树脂柱层析(天津 D101,725g),以蒸馏水洗脱,洗脱速度 2mL/min,每一洗脱体积 200mL。收集第二洗脱体积,水浴挥发浓缩至 20mL,加冷乙醇,使最

后乙醇浓度为 70%,过滤除去沉淀,回收乙醇,剩余的水溶液 4℃冰箱保存约 3d,出现大量无色结晶,重结晶得 1.2g 卫矛醇,mp187℃~189℃,IR 光谱与标准卫矛醇一致。

3.2.2 通痹灵制剂的分离:10 片(2.508g)随机选择的通痹灵片剂粉碎混合均匀,用蒸馏水冷浸提取(6.5 mL $\times$ 3),离心(3000 rpm;20℃5 min)除去固体物质,合并上清液,冷冻干燥,溶解冷冻干燥粉末(1.005g)于 10 mL 蒸馏水中,用分液漏斗以乙酸乙酯萃取(10 mL $\times$ 5)。合并水相,冷冻干燥得水溶部分(0.938g),将水溶解部分溶于 10 mL 蒸馏水中,加入 24 mL 冷乙醇,离心(10 000g,4℃5 min)除去沉淀,蒸发挥发上清液得固体粉末 0.511g,将其溶于 2 mL 蒸馏水之中,取 0.2 mL 进行柱层析分离(SEP-PAK C_{18} CARTRIDGE Waters Associates),以蒸馏水洗脱,0.5 mL 为一洗脱体积,取第一洗脱体积为通痹灵样品测定液,制备 HPLC 样品,用于分析卫矛醇。

3.2.3 样品测定:精确称定从南蛇藤中分离出的卫矛醇配制成 1 $\mu\text{mol/mL}$ 的样品储备液。分别精确吸取样品储备液及上述通痹灵样品测定液转移进 10mL 螺旋盖试管中,其余操作同 3.1.2 衍生物的制备。HPLC 分析结果见图 1、2。

4 讨论

4.1 试验目的是定性检测生药南蛇藤及中药复方通痹灵中存在的卫矛醇,试验结果证明:HPLC 测定卫矛醇含量方法简便快速准确,可测定复杂复方中含量较低的卫矛醇。

4.2 通痹灵之中含有一定量的卫矛醇,结合药理试验结果可认为卫矛醇是南蛇藤及通痹灵抗炎风湿的有效成分之一。

4.3 所制备的衍生物样品室温放置 1 周后测定重复性良好,说明其衍生物性质稳定。

4.4 标准曲线没有通过原点,原因是参加反应的试剂之中存在着与卫矛醇具有相同保留时间的痕量未知化合物,其他研究者在试验

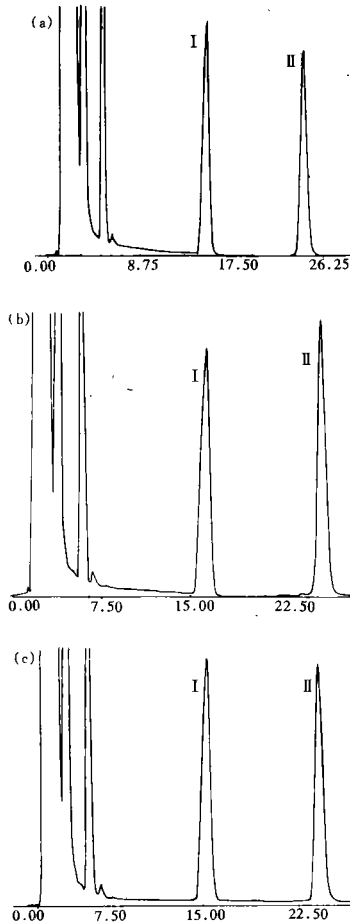


图1 卫矛醇 HPLC 谱

a-卫矛醇标准品(样品-1, 10 μ l) b-南蛇藤中分出的卫矛醇(样品-2, 10 μ l) c-样品-1(5 μ l)加样品-2(5 μ l)混合。I-卫矛醇 II-内标

之中也发现相同问题,并指出只要内标量适当就可得到精确满意的卫矛醇定量结果^[8,9]。
4.5 文献报道用此方法可精确测定动物组织(如晶状体或坐骨神经)中微量的多元醇,其精确度可达到 0.5nmol^[8],本试验结果说明可扩大此方法的应用范围。

致谢:本工作由日本文部省资助;沈阳药科大学 59 期药学系钟敬波、中药系金岩分离南蛇藤中卫矛醇,在此表示谢意。

参考文献

图2 HPLC 测定通痹灵中卫矛醇

a-卫矛醇标准品(样品-1, 10 μ l) b-卫矛醇与通痹灵混合(样品-1, 1 μ l+通痹灵样-2, 9 μ l) c-通痹灵(样品-2, 10 μ l)

- 1 陈纪藩,等.新中医,1993,(1):53
- 2 陈纪藩,等.中国中西医结合杂志,1994,(增刊):163
- 3 陈纪藩,等.新中医,1994,(7):22
- 4 Li Songhua, et al. Clin Experim Pharm Physiol, 1996, (23):236
- 5 李颂华,等.日本临床风湿杂志,1993,(5):123
- 6 刘肇清,等.药学通报,1981,16(8):58
- 7 周自永,等编.新编常用药物手册.北京:金盾出版社, 1992.110
- 8 Miwa I, et al. Analyt Biochem, 1988, 173:39
- 9 Dethy JM, et al. Analyt Biochem, 1984, 143:119

(1997-05-26 收稿)

Dulcitol in traditional Chinese compound prescription "Tongbilin" was determined by HPLC. This method is based on the fact that polyols like dulcitol and glucose diethyl mercaptol (internal standard) can react with phenylisocyanate to yield UV-absorbing derivatives which can be detected at 240 nm by HPLC. A TSK-gel ODS-80TM column and mobile phase acetonitrile-ethanol-H₂O (5 : 2 : 3) were employed.

灵芝破壁孢子与不破壁孢子的显微镜 观察与生化测定比较研究[△]

北京理工大学材料科学研究中心(100081) 杨新林* 朱鹤孙 赵东旭

中国无锡三联高科技开发公司

徐建兰 匡 群

摘 要 首次对灵芝破壁孢子与不破壁孢子进行了初步的比较研究。显微镜下观察,破壁孢子粉与不破壁孢子粉的形态明显不同,采取水提、酸提、水煮三种不同的提取方式,破壁孢子粉提取液中还原糖与多肽含量都明显高于不破壁孢子粉,结果提示经过破壁处理后,灵芝孢子中的化学成分更容易被提取出来。

关键词 灵芝孢子 破壁 还原糖 多肽

近年来,随着灵芝人工栽培技术的发展,规模收集其生殖细胞——灵芝孢子的难题得到解决,逐步开展了对灵芝孢子的研究。有报道灵芝孢子具有降血糖作用^[1],能够调节机体免疫功能^[2],对磷酸肌酸激酶(CPK)含量在免疫性肌炎大鼠肌肉中的下降及血清中的上升亦有拮抗作用^[3]。临床试用治疗萎缩性肌强直等疑难疾病有较满意效果^[4]。灵芝孢子的化学成分也有报道^[5~7]。但以往研究采用原料均为不破壁孢子粉,本文首次对破壁孢子与不破壁孢子进行初步的比较研究。

1 材料与方法

1.1 灵芝孢子的显微镜观察:灵芝孢子用适量蒸馏水配成悬浮液,涂片后直接在 Ax-

iovert 405M 型荧光倒置显微镜(德国 OPTON 精密仪器有限公司)上观察,进行显微摄影。

1.2 灵芝破壁孢子粉与不破壁孢子粉提取液的制备

1.2.1 酸提和水提:称取破壁与不破壁灵芝孢子粉(由中国无锡三联高科技公司生产并提供)各 2 g,分别置于一 20 mL 试管中,加入 20 mL 2%盐酸溶液(酸提)或蒸馏水(水提),在沸水浴中加热 2 h,冷却后离心 2 次,每次 1500 mL、10 min,收集得上清液约 5 mL,分装冻干-20℃保存。

1.2.2 水煮:称取破壁与不破壁灵芝孢子粉各 2g,分别置于一 500 mL 平底烧杯中,加入

* Address: Yang Xinlin, Research Center of Materials Science, Beijing University of Technology, Beijing
杨新林,男,30岁,博士,副研究员,1992-07毕业于北京师范大学生物系,获理学博士学位。1992-09~1994-09在中国科学院动物研究所从事博士后研究;人早期滋养层组织和绒毛膜上皮瘤细胞系中的激活素和抑制素的研究。1994-09到北京理工大学材料科学研究中心工作,受聘为生物技术与生物材料研究室副研究员,现担任该室领导工作,研究的主要方向:(1)灵芝孢子抗癌成分的分离鉴定与作用机理研究,(2)C₆₀的生物学效应的研究,(3)复合生物驻极体材料的制备与应用研究。正主持国家重点科技项目(攻关)计划1项,参加的自然科学基金项目2项,自然科学基金重大项目1项,负责校优秀中青年教师基金1项,共发表各类文章30篇。

[△] 国家科委主任基金资助项目