

3 讨论

液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)在近 10 年中发展很快,由于它可分析难以挥发的化合物、热不稳定化合物和大分子化合物(如多肽、蛋白、多糖和多聚物),分析范围广,因而极受分析工作者重视。液相色谱-质谱-质谱联用技术(LC-MS/MS)具有比 LC-MS 更优越的性能,通过 LC 分离,应用 MS/MS 可分析在大量杂质的混合物中分析待测物质,提高分析的特异性和灵敏性,可以获得更多的化学结构信息。

在研究者关注的 LC-MS/MS 的发展中,接口技术的发展为研究应用提供了更广泛应用的可能性,其中 APCI、SSI 和 ESI 离子化技术为我们提供

了多种离子化方式,可满足多种分析的需要^[2~4]。ESI 对不同极性和稳定性的化合物的使用范围能完全被 SSI 所覆盖,同时还能覆盖部分 APCI 的使用范围。

参考文献

- 1 江纪武,肖庆祥. 植物药有效成分手册. 北京:人民卫生出版社, 1986: 888
- 2 Hirabayashi A, Sanokairi M and Koizumi H. Anal Chem, 1994, 65 (2): 4557
- 3 Hirabayashi A, Hirabayashi Y, Sanokairi M, *et al.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1996, 10: 1703
- 4 Hirabayashi Y, Hirabayashi A, Takada Y, Sanokairi M and Koizumi H. Anal Chem, 1995, 67(17): 2878

(2000-04-05 收稿)

黄芩素的化学发光测定

汕头大学医学院化学教研室(515031) 方冶* 张鲁勉 何小英 梁友竹

摘要 以黄芩素进行试验,建立了黄芩素的化学发光测定法,并应用于市售制剂中有效成分的检测, $RSD = 0.65\%$ ($n = 10$),回收率为 $(98 \pm 3)\%$ ($n = 6$);本法可用于其它多羟基黄酮化合物的检测,检测结果从本质上反映多羟基黄酮化合物生物活性和药理作用的强弱。

关键词 多羟基黄酮 黄芩素 化学发光法

Detection of Scutellarein Derivative by Chemiluminescent Analysis

Department of Chemistry, Medical College of Shantou University (Shantou 515031) Fang Ye, Zhang Lumian, He Xiaoying and Liang Youzhu

Abstract A chemiluminescent analysis (CLA) for the detection of scutellarein derivatives was established. Results showed that the $RSD = 0.65\%$ ($n = 10$), the average rate of recovery was $(98 \pm 3)\%$ ($n = 6$). The CLA method may be applicable to other poly-hydroxy flavones, and to predict their biological and pharmacological potentials.

Key words poly-hydroxy flavone scutellarein chemiluminescent analysis

多羟基黄酮化合物是植物界分布最广泛的黄酮类化合物,具有多种生物活性和药理作用;如槲皮素是抗癌成分之一^[1]。传统上多羟基黄酮化合物用比色法检测^[2];该法基于酚羟基的颜色反应,特异性差,干扰因素多,且多羟基黄酮化合物的多种生物活性和药理作用与其抗自由基氧化的作用密切相关^[1,3,4],比色法根本无法揭示这一作用的强弱。化学发光法因其灵敏度高,准确性好,重现性强,操作简便,近年来已在生物样品的检测中有较广泛的应用。本文以黄芩素进行试验,提出多羟基黄酮化合物

的化学发光检测法,测定样品抗自由基氧化作用的能力,测定结果在本质上反映样品的生物活性和药理作用的强弱。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂: HF-1 化学发光仪;黄嘌呤氧化酶(XOD,东风公司,1.938 U/mL,0.313 U/mL),超氧化物歧化酶(SOD,华东理工大学,6000 U/mg),次黄嘌呤(HX,Fluka),鲁米诺(Luminol,Merck-Schuchardt),黄芩素(SD,从市售黄芩中提取,重结晶法纯化后为黄褐色粉末),其它试剂均为

* Address Fang Ye, Medical College of Shantou University, Shantou

AR级。

XOD HX和 Luminol分别用 pH 10.2含 0.1 mmol/L EDTA的 0.05 mol/L碳酸盐缓冲液稀释; SOD和 SD分别以 pH 7.8含 0.1 mmol/L EDTA的 0.05 mol/L磷酸盐缓冲液稀释。

1.2 实验方法: 采用 XOD-HX-Luminol化学发光体系^[5],用化学发光法进行检测。步骤: 于 HF-1化学发光仪的发光腔内,先加入 0.1 mL XOD (0.1 g/L),再加入 HX与 Luminol的混合液 (10^{-4} mol/L, 9:1混合) 1.90 mL启动反应,最终反应体积为 2.00 mL。测量发光峰值进行计算。

2 结果与讨论

2.1 SD活力的测定: SOD是生物体内清除 O_2^- 的特异酶, O_2^- 其它清除剂的活力,可折算为 SOD的活力单位来表示。

2.1.1 SOD的活力测定: 先加入一定的 SOD溶液 (0.01 g/L),按 1.2所述步骤和用量加入各试剂,测量发光峰值 (H, 3次取平均),以不加 SOD时的发光值为 100% 发光值计算 SOD的抑制率: $E\% = [H(100\%) - H(\text{样品})] / H(100\%)$ 。结果见图 1。从图 1得出 C_{50} 为 $21.5 \mu\text{g/L}$ 。

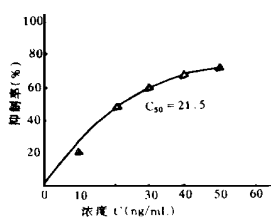


图 1 SOD对超氧阴离子自由基的抑制曲线

2.1.2 SD活力的测定: 以一定量的 SD溶液 (0.1 g/L)代替上述的 SOD,按同法测定发光峰值并计算相应的抑制率。结果见图 2。从图 2得出 C_{50} 为 0.31 mg/L。

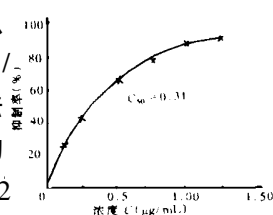


图 2 黄芩素诱导对超氧阴离子自由基抑制曲线

2.1.3 SD活力的表示: 根据上述测得的 $C_{50, \text{SOD}}$ 、 $C_{50, \text{SD}}$ 和 SOD对照品的活力,可算出相应实验条件下,被测样品用 SOD活力单位表示的活力大小。本文实验条件下 $C_{50, \text{SOD}} = 0.0215 \text{ mg/L}$, $C_{50, \text{SD}} = 0.31 \text{ mg/L}$,已知 SOD对照品的活力为 6 000 U/mg,因此,SD的活力为: $(C_{50, \text{SOD}} / C_{50, \text{SD}}) \times 6 000 = 416 \text{ U/mg}$ (U为 SOD活力单位)。

以其它多羟基黄酮化合物的溶液代替 SD溶液进行测定,即可得出该化合物以 SOD活力单位表示的活力大小。

2.2 化学发光法测定 SD的动力学公式: 用 HX-XOD-Luminol化学发光体系测定 SOD的动力学公

式为^[6]: $V/V_L = 1 - k(\text{SOD})$,其中 V_L 为 O_2^- 与 Luminol反应的速度, V 为 O_2^- 的总反应速度, k 为比例常数, $V/V_L = 100 / (100 - \text{抑制百分数})$ 。该式表明, V/V_L 与 SOD线性相关。由于 SD与 SOD有类似的清除 O_2^- 的性能,故推断以 HX-XOD-Luminol化学发光体系测定 SD的动力学公式为: $V/V_L = 1 - k(\text{SD})$,即 V/V_L 与 SD成线性关系。实验结果(表 1,图 3)证实了上述推断。

表 1 V/V_L 与黄芩素的浓度 (SD) 的关系

SD(mg/L)	抑制率(%)	(V/V_L)
0	0	1
0.125	27.5	1.40
0.25	42.7	1.40
0.50	66.3	2.97
0.75	78.0	4.20

2.3 化学发光法测定样品

中 SD的浓度: 依 2.1中所述方法,测得不同浓度 SD对发光的抑制百分数,按公式 $V/V_L = 100 / (100 - \text{抑制百分数})$ 算出 V/V_L ,以 V/V_L 对 SD作图,可得线性关系的工作曲线,测出样品的 V/V_L 即可从工作曲线得出样品中有效成分的浓度。

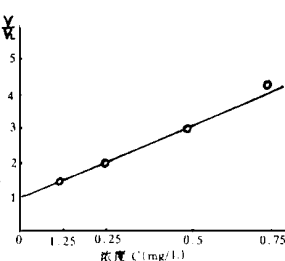


图 3 V/V_L 和 SD浓度的关系

我们用上述方法对市售含 SD的制剂中的有效成分进行了测定,结果如表 2所示。其它试样中有效成分的浓度可参照上述方法进行测定。

表 2 市售制剂中 SD的测定

制剂名称	厂家名称	SD含量 (mg/mL, $n = 3$)
茵栀黄注射液	山西太行制药	18.15 ± 0.12
茵栀黄注射液	江苏武进制药厂	16.32 ± 0.11

2.4 可靠性和回收率试验: 本法所测得的数据稳定,批内 $RSD = 0.6\%$ ($n = 10$),批间 RSD 也只有 2.1% ($n = 8$),测验的回收率为 $(98 \pm 3)\%$ ($n = 6$)。

3 小结

综上所述,化学发光法不仅可对多羟基黄酮化合物进行抗自由基氧化的活力测定,而且能够进行对样品中有效成分的浓度测定。用本法对多羟基黄酮的检测,不仅秉承了化学发光法快、准、灵的优点,而且提供了能在本质上对多羟基黄酮化合物生物活性和药理作用的强弱进行评价的数据。

致谢: 在试验过程中得到沈文英教授的大力支持。

参考文献

- 1 刘诗平,陈尚猛,朱卫东. 中草药, 1991, 22(4): 182
- 2 中国医科院药物研究所编. 中草药有效成分的研究. 北京: 人民卫生出版社, 1972 330
- 3 丁维功编. 中国医学化学进展. 上海: 百家出版社, 1996 72

- 4 方 治. 中草药, 1999, 30(7): 526
- 5 李益新, 方允中. 生物化学与生物物理进展, 1983(2): 59
- 6 方允中, 刘智峰, 李益新, 等. 科学通报, 1986, 31(5): 356

(2000-01-18收稿)

HPLC-ELSD法在注射用七叶皂苷钠质量控制中的应用

浙江省医药管理局 (杭州 310012) 李 菁*
中国药科大学 叶文才

摘 要 HPLC测定七叶皂苷钠,并用蒸发光检测器 (ELSD) 检测,得到 HPLC-ELSD指纹图谱. 对不同注射用七叶皂苷钠样品的比较研究表明, HPLC-ELSD指纹图谱准确的显示了样品的质量,结果直观,可靠.

关键词 高效液相色谱 蒸发光检测 指纹图谱 七叶皂苷钠

Application of HPLC-ELSD on Quality Control of Aescin for Injection

Pharmaceutical Administration of Zhejiang (Hangzhou 310012) Li Jing

China Pharmaceutical University Ye Wencai

Abstract A finger print of HPLC based on evaporation light-scattering detection (ELSD) for Aescin has been described. The HPLC-ELSD finger print can intuitively suggest the quality information of Aescin and may be of practical value for the quality control of samples of sodium aescinate for injection.

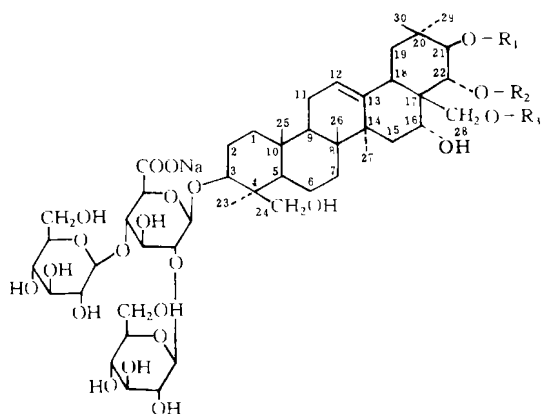
Key words HPLC evaporation light-scattering detection (ELSD) finger print sodium aescinate

七叶皂苷钠是从中国药典收载的娑罗子中药中提取所得的总皂苷,主要有效成分为七叶皂苷 A、B、C和 D(见图 1),根据德国 DAC的定义七叶皂苷 A、B称为 β -七叶皂苷,七叶皂苷 C和 D称为 α -七叶皂苷.

目前测定七叶皂苷钠总皂苷的方法主要有三氯化铁比色法^[1]和酸碱滴定法^[2],用于注射用七叶皂苷钠的含量测定. 研究表明,目前上市的注射用产品除主要含有七叶皂苷钠 A、B、C和 D外,还含有少量的糖元、苷元、脱乙酰基的降解产物和其它杂质. 由于比色法和滴定法专属性差,因而测定结果偏高,不能反映产品的真实质量. 本文提出了用 HPLC分离、蒸发光检测器 (ELSD) 检测注射用七叶皂苷钠,并将得到的色谱图定义为七叶皂苷钠 HPLC-ELSD指纹图谱. 指纹图谱简单明了,在质量标准中引入指纹图谱可以提高制剂的质量控制水平. 方法可靠,实用.

1 仪器与材料

美国 Tsp 的 Specta System P1000泵,进样器, Alltech 500型蒸发光检测器 (ELSD) 和 Anastar 色谱工作站;乙腈: 色谱纯 (天津四友生物医学技术有限公司),三氟乙酸为 Acros 试剂,注射用七叶皂苷钠样品 1~ 7分别来自武汉爱民 (971210)、烟台绿叶制药有限公司 (990528)、德国 MADAUS (806974)、武汉生化 (990523)、南京大学 (9904204)、长春天诚 (990601)、无锡生化 (980513)



	R ₁	R ₂	R ₃
七叶皂苷钠 A(β)	巴豆酰基	-COCH ₃	-4H
七叶皂苷钠 B(β)	当归酰基	-COCH ₃	-4H
七叶皂苷钠 C(α)	巴豆酰基	-H	-COCH ₃
七叶皂苷钠 D(α)	当归酰基	-H	-COCH ₃

图 1 七叶皂苷钠结构示意图

* Address Li Jin, Zhejiang Pharmaceutical Administration, Hangzhou