

2.2.2 提取:取淫羊藿干燥原料(地上部分,包括茎叶)4 kg,20倍量的水煎煮 4次,每次为 1 h 合并提取液,放凉沉降 12 h,取上清液减压浓缩至液重与原料重相同,放凉后备用。

2.3 分离精制

工艺路线:提取液→ DM 130大孔吸附树脂吸附→ 蒸馏水洗脱杂质→ 低醇洗脱杂质→ 高醇洗脱有效成分→ 树脂再生。

2.3.1 洗脱剂醇度的筛选:在试验大孔树脂吸附乙醇洗脱过程中,采用了不同浓度的乙醇进行梯度洗脱。洗脱液分别浓缩烘干,对干物质进行 HPLC 检测。结果见表 2

表 2 不同浓度乙醇洗脱液的干物质及其中淫羊藿苷的测定(%)

乙醇浓度	干物质得率	淫羊藿苷含量
0(水)	7.0	0.12
20	2.2	2.12
35	1.5	8.18
45	0.8	40.03
55	1.2	59.71
60	0.9	47.79
70	0.6	2.10
80	0	0

结果表明:应用 DM 130大孔吸附树脂吸附,乙醇洗脱是可行的。综合 45%、55%、60% 乙醇度洗脱,有效成分回收率为 87.4%。

2.3.2 生产实验结果:根据表 2中的实验结果,我们对生产工艺稍作调整,得到的洗脱液的干物质得率及其中淫羊藿苷含量见表 3

表 3 生产试验工艺结果(%)

乙醇浓度	干物质得率	淫羊藿苷含量
0(水)	8.0	0.11
40	2.5	8.32
60	2.2	52.30
80	2.0	2.5

结果表明:60%乙醇洗脱液部分占到总有效成分的 76.7%。该部分烘干粉碎,乙酸乙酯热溶后析晶,用 60%乙醇反复结晶,得淫羊藿苷精制品

3 结论

大孔吸附树脂已广泛应用于中药、食品、饮料等行业,工业应用技术已很成熟。本研究应用了 DM 130大孔吸附树脂进行淫羊藿提取物生产工艺的开发研究,取得了操作性强、过程易控制的生产工艺。该工艺已应用到实际生产中,已得到合格的淫羊藿提取物产品。

参考文献:

[1] 李文奎,林新,等.近年来国内淫羊藿甙研究概况[J].西北药学杂志,1995,10(3):138-141.
[2] 李文奎,张如意,肖培根.淫羊藿属药用植物研究进展[J].国外医药·植物药分册,1999,8(4):147-152.
[3] 郭宝林,肖培根.淫羊藿属药用植物的质量评价和资源开发前景[J].天然产物研究与开发,1996,8(1):74-78.
[4] 刘信顺,杨滨.淫羊藿属植物的化学成分[J].中草药,1990,21(9):36-40.
[5] 阎文玫,符颖.心叶淫羊藿黄酮类化学成分研究[J].中国中药杂志,1998,23(12):735-736.
[6] 王玉萍,郭宝林.仙灵骨葆胶囊中总黄酮及淫羊藿苷的含量测定[J].中草药,2000,31(10):741-742.
[7] 赵小寻,聂其霞.不同方法精制淫羊藿水提液对淫羊藿苷含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2000,6(6):3-5.
[8] 徐根旺,许保军.淫羊藿黄酮甙的分离[J].中草药,1986,17(8):10.

HPLC法测定病毒清液中绿原酸的含量

刘晓松¹,李丽华¹,姜平川²,韦洪^{2*}

(1. 广西出入境检验检疫局技术中心,广西南宁 530021; 2. 广西中医药研究所,广西南宁 530022)

病毒清液由金银花、连翘、柴胡等药味经适宜加工、提取制成的中成药口服制剂,具有辛凉解表、清热解毒的功效,主治风热感冒、咽喉疼痛、咳嗽黄痰等症。金银花是该药组方中的君药,其主要有效成分为绿原酸。近年来该药品有一定数量出口到东南亚等地,通过检测该药品中的绿原酸含量,对出口产品的质量控制和真伪鉴别具有很现实的意义。目前,绿原酸已广泛作为金银花及其制剂的质控指标,测定

的方法有分光光度法^[1],薄层扫描法^[2],HPLC法^[3]等。对于病毒清液,其成品中含有琼脂和大量蔗糖,化学成分复杂,测定的前处理要求较高。本实验建立了将其先加酸处理,再用醋酸乙酯提取制备溶液的HPLC法。经实验证明,该方法准确、简便快速,是较理想的测定方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器:Agilent 1100型高效液相色谱仪,配自

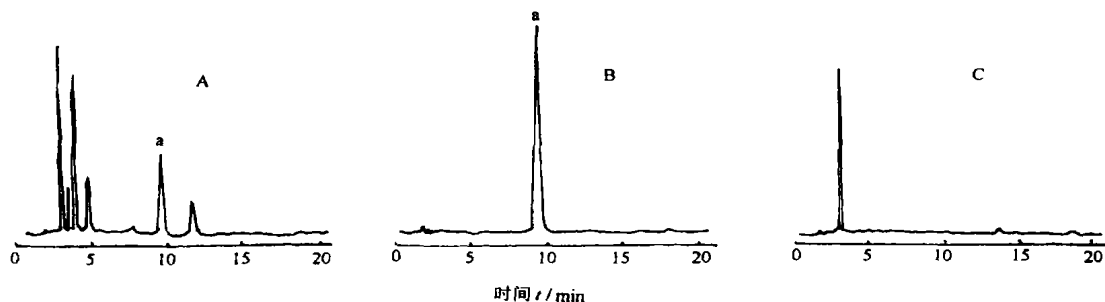
* 收稿日期:2001-09-28

动进样器、二极管阵列 DAD检测器、惠普化学工作站; Millipore溶剂过滤系统

1.2 试药: 绿原酸对照品(购自中国药品生物制品检定所, 含量测定用, 批号为 0753-9910), 病毒清液由广西源安堂制药厂提供。甲醇为色谱纯, 其余均为分析纯, 水为超纯水

1.3 色谱条件: 色谱柱: Kromasil C₁₈不锈钢柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m)(天津三维色谱科技公司); 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(83:15:2); 检测波长: 327 nm; 柱温: 室温; 流速: 1.5 mL/min。理论塔板数按绿原酸峰计算应不低于 3 500。外标法定量, 此条件下绿原酸峰与其它组分达到基线分离(图 1)。

2 方法与结果



A 样品 B 绿原酸对照品 C 空白 a-绿原酸

图 1 HPLC图谱

2.3 线性关系的考察: 精密称定绿原酸对照品适量, 用甲醇配制成 77.2 mg/mL 的溶液, 设置自动进样器自动吸取对照品溶液 2, 6, 10, 14, 18, 22 mL 依次进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 以绿原酸量 X (μ g) 为横坐标, 峰面积值 Y 为纵坐标绘制工作曲线, 得回归方程为 $Y = 1\,218.01X + 10.49$, $r = 0.9999$ 。表明绿原酸在 0.15~1.70 μ g 时进样量与峰面积之间呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验: 取同一供试品溶液(批号为 20000615), 每次 10 μ L, 连续进样 5 次, 测定样品中绿原酸的量, 结果 RSD 为 0.51%, 表明精密度良好。

2.5 稳定性试验: 分别取 1 份供试品溶液及 1 份对照品溶液(在 10 $^{\circ}$ C 下保存), 在 0, 1, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 h 测定峰面积。结果样品中绿原酸含量的 $RSD = 0.41\%$, 对照品中的绿原酸含量的 $RSD = 0.28\%$ ($n = 9$), 表明供试品溶液及对照品溶液在 72 h 内是稳定的。

2.6 重现性试验: 取同一批样品(批号为 20000809) 5 份, 分别按样品测试条件测定, 结果 RSD 为 1.92%, 表明本法重现性良好。

2.7 加样回收率试验: 精密量取已知绿原酸含量的

2.1 测定波长的选择: 以甲醇为溶剂对绿原酸进行紫外扫描, 在 326.4 nm 处有最大吸收, 因此我们选择 327 nm 作为测定波长。

2.2 提取条件的选择: 取病毒清液 10 mL, 加水 10 mL 后在水浴上浓缩至稠膏状, 用 25 mL 水分次溶解稠膏并定量移至分液漏斗中, 加入氯化钠 4 g, 用 6 mol/L 盐酸调 pH 至 1。用醋酸乙酯萃取 8 次, 每次 40 mL。合并前 5 次提取液, 蒸干, 用 60% 甲醇溶解制成 50 mL 溶液作为供试品溶液。第 6, 7, 8 次提取液单独蒸干, 分别用 60% 甲醇配制成 50 mL 溶液作为供试品溶液。将以上 4 种供试品按上述实验条件进样 10 μ L, 测定绿原酸峰面积, 计算每次提取绿原酸的百分率, 结果表明, 提取 6 次后绿原酸即可提尽。

病毒清液(批号为 20000809) 10 mL, 平行 5 份, 分别精密添加绿原酸对照品适量。按 2.2 项下方法制备供试品, 测定回收率, 结果平均回收率为 99.39%, RSD 为 2.63%。

2.8 样品测定: 精密吸取不同批号的病毒清液, 按 2.2 项下操作制备, 提取 6 次, 溶液定容至 50 mL 备用。分别吸取对照品溶液和供试品溶液, 微孔滤膜(0.22 μ m) 过滤后进样 10 μ L, 按上述色谱条件测定, 外标法定量。结果见表 1。

表 1 病毒清液中绿原酸含量测定结果 ($n = 3$)

批号	绿原酸含量 (mg/mL)	RSD (%)
990506	0.316 6	0.53
990509	0.434 4	1.58
990513	0.383 8	1.90
20000808	0.416 7	3.10
20000809	0.399 0	1.92
20000810	0.402 7	3.32

3 讨论

3.1 在实验中, 我们曾探索了用不同方法处理病毒清液制备供试品溶液, 包括用 60% 甲醇稀释后直接进样, 用无水乙醇溶解后进样, 采用聚酰胺柱层析处

(下转第 928 页)

皮细胞,随着动脉管腔内血栓逐渐形成,血流逐渐被阻断,温度突降,仪器报警,记录堵塞形成时间。结果地龙活性提取物具有显著的延长动物体内血栓时间,见表 5

表 4 对大鼠血小板粘附率及血小板数目的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 (g/kg)	粘附率 (%)	血小板数 ($\times 10^9$)
对照	-	32.4 $\pm$ 4.0	280 $\pm$ 24
地龙	0.15	27.8 $\pm$ 3.2*	275 $\pm$ 28
	0.30	25.0 $\pm$ 2.5*	283 $\pm$ 27
	0.45	21.6 $\pm$ 3.3*	271 $\pm$ 22
维脑路通	0.30	27.9 $\pm$ 4.2*	278 $\pm$ 21

与对照组比: ** $P < 0.01$

表 5 对大鼠体内血栓形成时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 (g/kg)	堵塞形成时间 (min)
对照	-	11.3 $\pm$ 3.7
地龙	0.15	15.7 $\pm$ 4.3
	0.30	18.0 $\pm$ 5.7*
	0.45	20.2 $\pm$ 6.9*
维脑路通	0.30	14.2 $\pm$ 5.6
肝素	1.250	24.1 $\pm$ 4.6*

与对照组比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

2.4.2 对抗兔肺动脉血栓作用: 参考文献^[4]将家兔用戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉,固定,分离一侧颈静脉及另一侧颈动脉,将颈静脉的各分支结扎,从颈动脉取血 1 mL和预先配制的 0.6 mL凝血酶 (10 U/mL) 生理盐水溶液混合后,即从颈静脉向心端向静脉内注射该混合液,每次 0.4 mL,分 2次,间隔 10 min,造成肺动脉血栓,然后进行给药。在给药后 10 h,用空气栓处死家兔,沿肺动脉向下寻找左右肺动脉的栓子(一般停留于肺动脉主干)。将血栓子取出,用滤纸吸干后称重。结果地龙活性提取物具有溶解动物体内血栓的作用,见表 6

2.5 对小鼠凝血时间的影响: ig 60只小鼠随机分成 6组,每组 10只: 空白对照组、地龙 3个剂量组 (0.25, 0.5, 0.75 g/kg)、维脑路通组 (0.5 g/kg) 和肝素组 (2 000 μ g/kg);地龙组及维脑路通组连续 ig 4

d,肝素组只进行 1次 iv 给药,所有动物在末次给药后 1 h 即用玻片法测定小鼠的凝血时间。结果地龙活性提取物对正常动物的凝血功能无明显影响,见表 7

表 6 对家兔实验性肺栓塞的溶栓作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 (g/kg)	血栓湿重 (mg)
对照	-	85.2 $\pm$ 24.3
地龙	0.1	61.7 $\pm$ 18.5
	0.4	47.6 $\pm$ 17.4*
维脑路通	0.2	69.3 $\pm$ 18.1
肝素	1.250	24.1 $\pm$ 4.6*

与对照组比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

表 7 对小鼠凝血时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	凝血时间 (min)
对照	-	1.03 $\pm$ 0.18
地龙	0.25	0.90 $\pm$ 0.13
	0.5	0.95 $\pm$ 0.14
	0.75	1.01 $\pm$ 0.19
维脑路通	0.5	0.98 $\pm$ 0.17
肝素	2.000	2.35 $\pm$ 0.54*

与对照组比: ** $P < 0.01$

3 讨论

地龙活性提取物通过对实验性大鼠脑梗死引起损伤的影响,对麻醉犬脑血流量及脑血管阻力的影响及对大鼠血小板功能的影响等 5个方面的研究,证明了其具有减少或修复因脑缺血引起的组织损伤和增加脑血流量、减少脑血管阻力、降低血小板黏附和延长动物体内血栓形成等方面作用。上述实验结果与地龙能用于治疗关节痹痛、半身不遂等症状的传统中医理论相吻合^[5]。本实验结果为地龙的活血化痰作用提供了理论依据。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 2000年版. 一部.
[2] 徐叔云. 药理实验方法学(第二版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990.
[3] 阮长耿. 血小板—基础与临床[M]. 上海: 上海科技出版社, 1987.
[4] 陈奇. 中药药理研究方法论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
[5] 李时珍. 本草纲目(校点本)第四册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1981.

(上接第 908页)

理等方法,但效果不佳。而选择病毒清液加酸后,用醋酸乙酯提取制备供试品溶液,则可获得满意的效果。

3.2 由于本品中含有皂苷类成分,在提取时易发生乳化现象,故在提取过程中加入少量氯化钠可使乳化减少;与此同时,利用氯化钠的盐析作用,在提取过程中去除部分杂质,使绿原酸更易于提取。

3.3 从病毒清液测定结果可以看出,绿原酸含量最高的为 0.434 4 mg/mL,最低为 0.316 6 mg/mL。因

此,考虑到工业生产过程中有一定的波动,我们建议病毒清液中绿原酸含量每毫升应不低于 0.30 mg。

参考文献:

[1] 张广强,梁生旺,姜玉凤,等. 三波长分光光度法测定清热解毒注射剂中绿原酸的含量[J]. 中国中药杂志, 1990, 15(8): 33-35.
[2] 刘伟,杜天信,郑松波,等. 小儿清热解毒口服液中绿原酸的薄层扫描测定[J]. 中成药, 1989, 11(8): 14-15.
[3] 李宗,陈在敏,廖雷生,等. 菊花中绿原酸的含量测定[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(6): 329-330.