

果见表 2,3和图 1

表 2 不同产地蛇足石杉总碱及 Hup A的含量 (n= 3)

产地	总碱 (%)	Hup A(%)
贵州	0.418	0.018
广东	0.587	0.021
安徽	0.576	0.020

注: 提取溶剂为氯仿

表 3 Hup A在蛇足石杉中的分布

产地	部位	Hup A(%)
广东	根	0.002 0
	茎	0.012 3
	叶	0.012 9
安徽	根	0.003 5
	茎	0.013 2
	叶	0.006 3

3 结论与讨论

3.1 HPLC法测定石杉碱甲,方法简单,线性范围广,灵敏度高,是目前测定 Hup A药源的快速灵敏的一种有效方法 测定中比较了 3种流动相: 甲醇-水 (50∶ 50,含 0.01%三乙胺)、甲醇-乙腈-水 (40∶ 10∶ 50,含 0.01%三乙胺)、乙腈-KH₂PO₄溶液 (12∶ 88),结果乙腈-KH₂PO₄溶液 (12∶ 88)为流动相分离效果最好。其中三乙胺的浓度对出峰影响较大,浓度增大,不出峰 这与周芝芳等^[5]对 Hup A胶囊的测定结果一致。

3.2 蛇足石杉总碱的几种提取方法结果表明,各提取方法之间并无显著差异。

3.3 Hup A测定结果表明,广东南昆山样品、贵州

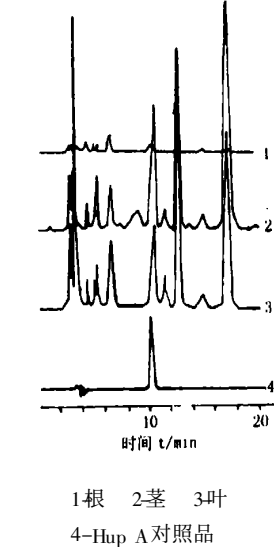


图 1 蛇足石杉不同部位中 Hup A的 HPLC图

样品和安徽样品的石杉碱甲含量之间稍有差异。

3.4 Hup A在两个产地的蛇足石杉植株中的含量分布为地上部分大于地下部分。但 Hup A在茎和叶中的分布差别较大,对此只有通过不同产地蛇足石杉植株不同部位 Hup A含量的进一步调查才能解决 同时也说明 Hup A可能在蛇足石杉的叶中合成,而后通过茎向地下部根中运输。

3.5 蛇足石杉广布于全国各地,目前药源产地主要为云南、四川、贵州,作者将进一步开展对不同产地药源含量的测定工作。

参考文献:

[1] 程源深,吕传真,应智林,等. 石杉碱甲治疗重症肌无力症 128例 [J]. 新药与临床,1986,5(4): 197-199.

[2] 徐嗣荪,高之旭,翁正,等. 石杉碱甲片对阿耳茨海默病记忆、认知和行为的疗效 [J]. 中国药理学报,1995,16(5): 391-395.

[3] 程丹华,戴克敏. 千层塔的生药学鉴定 [J]. 基层中药杂志,1992,6(4): 7-9.

[4] 肖崇厚. 中药化学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社,1997.

[5] 周芝芳,林志红. 高效液相色谱法测定石杉碱甲胶囊的含量 [J]. 药物分析杂志,1998,18(2): 104-106.

苦豆子种子生物碱离子交换分离的因素研究

王洪新,王 健*

(江南大学食品学院 天然资源研究室,江苏 无锡 214036)

苦豆子 *Sophora alopecuroides* L.又名苦甘草,嘎顺—包日其格(蒙药名),是豆科槐属植物,在我国主要分布于西北沙漠地带,其种子、根茎及全草都是我国西北地区常用的中药材,有清热解毒、祛风燥湿、止痛杀虫等作用^[1]。研究发现苦豆子富含生物碱,特别是苦豆子种子中的生物碱含量高达8.11%。苦豆子种子中生物碱以氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐定碱、槐果碱等喹诺里西定(quino-

lizidine)型生物碱为主^[2]。由于该类生物碱的极性较大,因此在水中的溶解性较好^[3]。因此可以利用离子交换树脂法,经过酸水提取、离子交换与碱化洗脱三步处理得到纯度较高的总生物碱,成本低、操作简便,适于工业生产。本研究利用静态法和动态法进行了离子交换树脂的筛选,并利用加助溶剂的方法改善了苦豆子生物碱的分离效果。并利用液质联用(HPLC-MS)仪分析了离子交换洗脱液的成分。

* 收稿日期: 2002-07-19

作者简介: 王洪新 (1964-),男,1991年于无锡轻工大学获食品工程博士学位,研究方向为天然资源,主持省部级项目 4项,发表科技论文 20余篇。 Tel (0510)5887517

1 材料和仪器

苦豆子的干燥全草(含种子)新疆产,购自新疆乌鲁木齐市中药材公司,并经生药鉴定 732, D001, HZ002树脂来源于上海亚东核极树脂有限公司;氧化苦参碱对照品(上海市药品检验所);试剂均为分析纯

722分光光度计(上海分析仪器总厂); PHS-2型酸度计(上海第二分析仪表厂); 79-1型恒温磁力搅拌器; Waters Platform ZMD4000液质联用分析仪

2 方法和结果

2.1 实验方法

2.1.1 树脂的预处理: 依次用食盐水、NaOH溶液、盐酸溶液、NaOH溶液、盐酸溶液浸泡,洗净后备用

2.1.2 静态吸附试验: 在具塞三角瓶中加入一定量的不同类型离子交换树脂和 100 mL一定浓度的生物碱提取液,放在恒温摇床上振荡,直至平衡为止,以差减法计算平衡交换容量

2.1.3 动态吸附试验: 将一定量的离子交换树脂,放在离子交换柱中,通入生物碱提取液,直至树脂饱和为止,以去离子水冲去残存液体后,再以合适的洗脱液洗脱,分析洗脱液中离子含量,换算成树脂吸附量

2.1.4 分析条件: 色谱柱: XTerra™ MS柱(2.1 mm× 150 mm),电喷雾离子化质谱检测器,流动相: 碳酸氢铵-甲醇(20∶ 80),温度: 25℃,质谱信号采集范围: 185~ 500,流速: 1 mL/min;进样量: 5μL

2.2 分析方法

2.2.1 苦豆子种子总生物碱浓度的测定: 利用酸性染料染色法测定苦豆子中总生物碱含量^[4]。以移液管吸取一定量浸出液,加入溴麝香草酚蓝 pH7.6的缓冲液 6.00 mL,氯仿 6.00 mL,密塞剧烈振动 2 min,静置 2 h,在 417 nm处测定氯仿层的吸光度值,按标准曲线得生物碱浓度

2.2.2 苦豆子种子生物总碱的 HPLC-MS分析: 分析条件: 色谱柱: XTerra™ MS柱(2.1 mm× 150 mm),检测波长: 200~ 600 nm;流动相: 碳酸氢铵-甲醇,温度: 25℃,流速: 1 mL/min,进样量: 5μL

将一定量的生物碱溶液按上述条件进行分析。分析结果由面积归一法算得不同物质的含量

2.3 不同树脂的吸附效果 利用树脂吸附生物碱的制备方法主要有静态法和动态法。静态法制备生物碱操作简单,设备要求低且可分批进行。而生产中则以动态法为主,最常用的操作方式为固定床离子交换法。苦豆子生物碱在水溶液中有较好的溶解性,尤其在酸水溶液可以形成生物碱盐正离子形式。因此本实验根据它

们溶解性质,选用强酸性阳性树脂 732 D001和 HZ002树脂作为吸附介质。根据不同温度、不同交换反应时间时的交换量以及平衡时的交换量计算出交换容量和吸附率,并加以比较。结果见表 1, 2

表 1 树脂对苦豆子生物碱的静态交换效果

树脂	类型	树脂体积 (mL)	料液体积 (mL)	体积交换容 量 (mg/mL)	质量交换容 量 (mg/g)
732	凝胶	10	100	26.07	64.41
HZ002	凝胶	10	100	10.53	27.04
D001	大孔	10	100	25.58	60.18

表 2 树脂对苦豆子生物碱的动态交换结果

树脂	吸附率 (%)	解吸率 (%)
732	84.23	67.4
D001	78.13	84.56
HZ002	38.67	-

注: 树脂 提取液 = 1∶ 10,提取液流速: 1.5 BV/h,洗脱液浓度: 0.5 mol/L,洗脱液流速: 1.0 BV/h

由表 1, 2可知,吸附效果以 732型树脂最佳,但是其解吸率仅有 67.4%,并不适于作为苦豆子种子生物碱的离子交换剂。虽然 D001树脂的吸附效果稍逊于 732型凝胶树脂,但是其解吸率较高,因此综合考虑选择该型树脂作为苦豆子生物碱的离子交换树脂。

2.4 pH值对固定床离子交换效果的影响: 提取液 pH是决定离子交换平衡关系的一个重要因素^[5]。提取液中游离生物碱浓度与生物碱盐浓度处于相对平衡之中,溶液 pH值直接决定了二者的浓度大小,从而影响了生物碱与树脂交换的效果。分别采用不同 pH值的提取液上柱交换,收集流出液,绘制流出曲线,见图 1

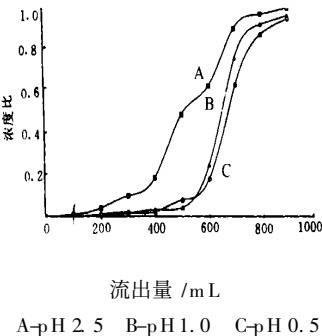


图 1 pH值对离子交换过程的影响

从图 1中可以看出,随着 pH值的降低,流出曲线变陡。pH 1.0与 pH 0.5时流出曲线的形状以及有效交换容量比较接近,这是由于 pH< 1.0时,溶液中生物碱主要以正离子的状态存在,与树脂之间的交换属优惠平衡,树脂相生物碱浓度沿柱高扩散较慢,交换区高度较短,因此流出曲线波形陡峭,树

脂利用率高。而 pH为 2.5时,树脂柱的交换容量明显下降,穿透时间缩短。这说明,此时溶液中生物碱正离子的比率减少,选择吸附性下降,导致了其他杂质离子的吸附,从而使交换容量下降。

2.5 洗脱剂的选择: 早期在进行苦参碱型生物碱的离子交换纯化时,由于该型生物碱与树脂上磺酸基结合较紧密,而且该型生物碱的分子半径较大,不易被洗脱下来,因此洗脱效率较差^[6]。传统的洗脱方法为先干燥已吸附生物碱的离子交换树脂,然后用氨水碱化,最后再以有机溶剂反复洗脱。该方法费时费力,在实际生产中应用不便。因此本实验在选择树脂的开始阶段,就将洗脱效果的优劣作为筛选树脂的关键指标。在此基础上,本实验选用碱性物质作为洗脱剂。洗脱剂的浓度与洗脱环境的 pH值直接相关,在保持较高的 pH值条件下,结合在离子交换树脂上的生物碱会转化为游离生物碱,由树脂上脱落下来,从而被洗脱下来。为了提高洗脱得率,就要选定合适的洗脱剂浓度。结果见图 2。

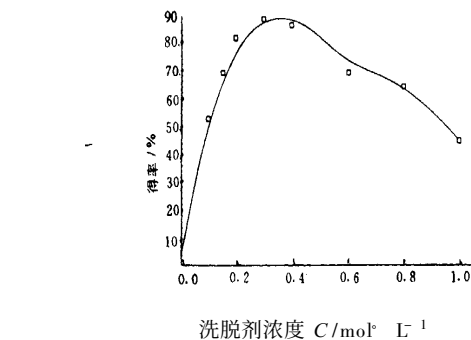


图 2 洗脱剂浓度对洗脱效果的影响

由图 2可知,洗脱剂的浓度并不是越高越好,在超过 0.3 mol/L后,随着洗脱剂的浓度提高,得率持续下降。因此使用得率较高的洗脱剂浓度为 0.3 mol/L。

另外,苦豆子种子生物碱在洗脱剂中的溶解度,也会影响到洗脱效果。为了提高解离效果,可以加入合适的有机溶剂作为助溶剂。本实验从价格因素和毒性来考虑,以乙醇作为助溶剂较为适合,且其浓度在 20%左右时最佳。见表 3,图 3。

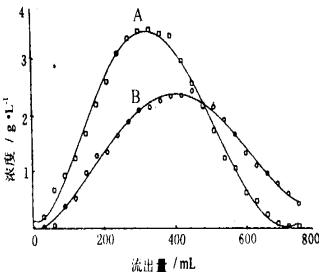
2.6 洗脱液中生物碱分析: 见图 4,5

由图 4氧化苦参碱的保留时间可知,图 5中 6.602 min出峰的成分应该是氧化苦参碱;由图 5中电喷雾质谱数据可知 8.883 min出峰的成分相对分子质量为 262。迄今为止见诸报道的苦豆子生物碱中,只有氧化槐果碱,因此可以初步判断出该成分应该是氧化槐果碱。根据不同成分的质谱出峰面积,

可以知道苦豆子种子生物碱离子交换洗脱液中以氧化苦参碱和氧化槐果碱为主,两者的相对百分含量为 74.44%。

表 3 助溶剂浓度对洗脱效果的影响

乙醇含量 (%)	洗脱液浓度 (g/L)
0	1.565
5	1.721
10	1.835
15	1.873
20	2.018
25	1.950
30	1.912
35	1.796
40	1.758
50	2.240



A-加 20%乙醇助溶剂 B-不加助溶剂
图 3 助溶剂对洗脱曲线的影响

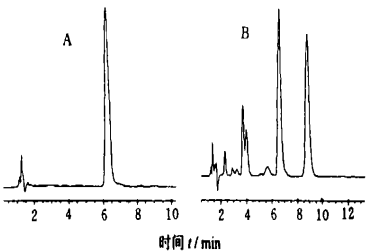


图 4 氧化苦参碱 (A)及苦豆子生物碱洗脱液 (B)的 HPLC图谱

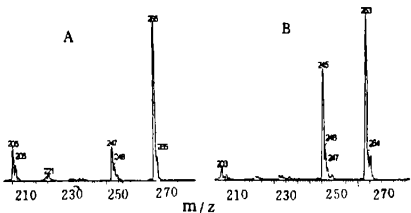


图 5 洗出液在 6.602 min (A)和 8.833 min (B)时的 HPLC-MS图谱

3 讨论

3.1 离子交换过程要求互相交换的两种离子都能够在树脂颗粒内部自由迁移扩散进出。树脂颗粒内部孔道的大小决定了离子交换树脂的交换速度和选择性等性能^[6]。由于生物碱的分子大小远远大于普通无机离子,所以在进行交换生物碱时,树脂的孔道

对于交换效果的好坏起着决定性的作用。普通的凝胶离子交换树脂缺点较多,尤其是在交换较大离子或分子时,如果上柱和洗脱条件相差较大时,其孔道结构发生改变,使较大的物质卡在结构内;而大孔树脂具有微孔永存,表面积大,交换速度快等优点。因此,D001型磺酸型大孔阳离子交换树脂更有利于生物碱由树脂上被洗脱下来

3.2 pH值是影响苦豆子生物碱在离子交换树脂上吸附效果的关键因素,pH < 1.0时,上柱液中的生物碱多以正离子态存在,容易与树脂上的磺酸基团结合,从而提高了生物碱吸附率

3.3 由于使用碱性洗脱剂洗脱树脂上的生物碱,而在碱性环境下,生物碱多以游离态的形式存在,降低

了生物碱在水溶液中的溶解性,最终影响了离子交换树脂的洗脱效果。因此本实验将乙醇作为助溶剂,以提高生物碱的在洗脱剂中的溶解度,使洗脱效果得到很大的改善。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.
- [2] 张兰珍, 李家实, 皮特·豪佛顿, 等. 苦豆子种子生物碱成分研究 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(12): 740-743.
- [3] 肖崇厚. 中药化学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.
- [4] 张建华, 乌云. 苦豆子中生物碱含量测定方法新探 [J]. 中草药, 1997, 28(8): 465-467.
- [5] 钱廷宝. 离子交换剂应用技术 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1984.
- [6] Swarbrick J, Boylan J C. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology [M]. Vol 8. New York & Basel: Marcel Dekker, INC, 1993.

水飞蓟宾葡甲胺质量标准研究

陈黎, 周继勇*

(镇江市药品检验所, 江苏 镇江 212003)

水飞蓟宾葡甲胺为水飞蓟与葡甲胺的加合物。水飞蓟是从菊科植物水飞蓟 *Silybum marianum* Gaertn. 果实中提取分离而得到的羟苯基色满酮体。水飞蓟宾葡甲胺属水飞蓟的水溶性衍生物, 具有保护及稳定肝细胞膜的作用, 并能促进肝细胞再生, 主要用于治疗各种急慢性肝炎、初期肝硬化和肝中毒等症。为了全面控制水飞蓟宾葡甲胺的质量, 本实验以水飞蓟宾为定性指标进行紫外特征吸收的鉴别, 以葡甲胺为定性指标进行理化鉴别, 同时以水飞蓟宾葡甲胺为定量指标用 HPLC 法进行含量测定。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪: 岛津 LC-6A 泵, SPD-6AV 紫外-可见检测器, C-R6A 数据处理器; 日本岛津 UV-265FW 紫外-可见分光光度计; 日本岛津 UV-2401PC 紫外-可见分光光度计; KQ-250E 医用超声波处理器 (江苏昆山市超声波仪器厂)。

水飞蓟宾葡甲胺由镇江第三制药厂提供; 水飞蓟宾对照品由中国药品生物制品检定所提供, 批号: 0856-9601; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 鉴别试验

2.1 葡甲胺的鉴别: 取本品 0.2 g, 加水 20 mL, 超

声处理 10 min, 加稀盐酸 5 滴, 振摇 2 min, 滤过, 取滤液 1 mL, 加 FeCl₃ 试液 0.5 mL, 滴加 20% NaOH 溶液 2 mL, 初显棕红色沉淀, 随即溶解成棕红色溶液。同时进行背景试验, 即取水 1 mL 为空白, 同法操作。所显棕红色沉淀, 继续滴加 20% NaOH 溶液, 沉淀不溶解。故可借此鉴别葡甲胺的存在。

2.2 水飞蓟宾的紫外特征吸收鉴别: 取本品适量, 加无水乙醇制成 15 μg/mL 的溶液, 照分光光度法 (《中华人民共和国药典》2000 年版二部附录 IV A) 测定, 在 288 nm 波长处有最大吸收, 252 nm 波长处有最小吸收, 与文献相同^[1], 故以此为特征吸收鉴别 (图 1)。

3 含量测定

3.1 色谱条件: 色谱柱: Shim-pack CLC-ODS 柱 (6 mm × 150 mm); 流动相: 甲醇-水 (0.5 mol/L KH₂PO₄ (10: 10: 1, 用 0.2 mol/L H₃PO₄ 调 pH 值至 4.0); 流速: 1.5 mL/min; 柱温: 室温; 检测波长: 288 nm。理论板数以水飞蓟宾计为 5641, 相邻峰分离度为 1.74。见图 2。

3.2 供试品溶液的制备: 取本品 15 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声处理 20 min, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL, 置 25