

98.75%, RSD为1.81%。

2.9 样品测定:分别精密称取5批样品,各3份,依法测定4-羟基异亮氨酸的峰面积,代入标准曲线计算其质量浓度,计算胡芦巴提取物中4-羟基异亮氨酸的质量分数,结果见表1。

表1 胡芦巴提取物中4-羟基异亮氨酸的测定结果($n=3$)

Table 1 Determination of 4-hydroxyisoleucine in *T. foenum-graecum* extract ($n=3$)

批号	4-羟基异亮氨酸/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%
20051102	405.7	0.68
20051126	410.1	0.90
20051203	406.5	0.38
20051211	407.4	0.63
20051229	406.0	0.31

3 讨论

由于4-羟基异亮氨酸在紫外条件下没有特征吸收,故选用HPLC-ESLD法测定。在ESLD检测条件的选择上,由于在流动相配比中水相的比例较高,所以设定漂移管的温度为115℃,在该温度条件

下流动相能充分汽化,出峰效果好。由于三氟乙酸比其他酸更易挥发,在检测过程基线噪音影响较小,而且样品分离效果也很好。

在流动相的选择上,开始选用0.1%冰醋酸水溶液-乙腈(90:10)作为流动相^[1],但在试验中发现在该流动相下,检测器基线噪音较大,保留时间也不重复,影响4-羟基异亮氨酸的检测。经多次试验选择0.1%三氟乙酸水溶液作为流动相,不仅峰形对称,保留时间重复稳定,而且4-羟基异亮氨酸与杂质的分离度效果好。

该方法准确性、稳定性及重现性能够符合测定要求,可作为胡芦巴提取物中4-羟基异亮氨酸的测定方法。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 2004.
- [2] Fang J, Liu Z Y, Xiong Z T. Determination of 4-hydroxyisoleucine contents in *Trigonella foenum-graecum* by HPLC-ELSD [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2004, 19 (5):355-356.

川芎提取物中阿魏酸大鼠在体肠吸收动力学的研究

杨星钢¹, 李 丁¹, 郭 宏^{1,2}, 张国华³, 张立波¹, 潘卫三^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 佳木斯大学化学与药学院, 黑龙江 佳木斯 154007

3. 沈阳药科大学成人教育学院, 辽宁 沈阳 110016)

阿魏酸是当归、川芎、阿魏等的有效成分之一,具有抗氧化、清除自由基、抗血栓、降血脂、防治冠心病、抗菌、抗病毒、抗突变、防癌、增加免疫功能、清除亚硝酸盐等作用^[1]。本实验从伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎中提取精制了川芎提取物(主要成分为阿魏酸),采用大鼠在体肠吸收实验方法,对川芎提取物中阿魏酸的吸收动力学进行研究,为川芎或其他含有阿魏酸的中药开发成缓释制剂提供生物学依据。

1 仪器、药品、试剂和动物

LC-10ATVP 型高效液相色谱仪、SPD-10AVP 型检测器(日本岛津公司);KQ-100DB 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司);UV-9100 紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);

HH-S 型恒温水浴锅(巩义市英峪予华仪器厂);HL-2 恒流泵(上海精科实业有限公司)。

川芎对照药材(中国药品生物制品检定所,批号:120918-200406);阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号:0773-9910);乌拉坦(进口分装);酚红(沈阳市试剂三厂);川芎药材(由辽宁泰伦有限公司)提供,按照《中国药典》2005年版鉴定,符合药典标准;D-101 大孔树脂(天津海光化工有限公司)。

甲醇(色谱纯);冰醋酸(分析纯);水为重蒸水;其他试剂为分析纯。

雄性 Wistar 大鼠,(200±20)g,沈阳药科大学动物实验中心提供。

2 方法与结果

2.1 川芎提取物的制备^[2]:将川芎饮片粉碎成粗

收稿日期:2006-04-28

作者简介:杨星钢(1974—),男,黑龙江省双鸭山市人,博士,主要从事缓释制剂与中药制剂现代化研究。

E-mail:yangxg123@163.com

* 通讯作者 潘卫三 Tel: (024)23986313 Fax: (024)23953241 E-mail:ppwwss@163.com

粉,称取 500 g 药粉置于圆底烧瓶中,加入 10 倍量 80% 乙醇回流提取 3 次,每次 1.5 h。将 3 次回流提取液合并,减压回收至无醇味。加适量水,加热溶解,抽滤,滤液加到一预先装填好的大孔吸附树脂柱上,先用水洗脱至糖的反应呈阴性,弃去水洗液,然后用 30% 乙醇洗脱,至洗脱液中检测不到阿魏酸时停止洗脱,将洗脱液合并,减压回收至无醇味,回收液冷冻干燥得黄色粉末即为川芎提取物,提取物回收率约为 0.6%,其中阿魏酸约占提取物总量的 20%。

2.2 紫外吸收光谱的测定:精密量取阿魏酸对照品、川芎提取物、酚红和小肠液适量,以 K 氏液为溶剂配制适宜浓度的溶液,在 200~600 nm 波长扫描。结果阿魏酸在 286 nm 和 310 nm 处有最大吸收,因为川芎提取物为混合物,有很多物质在此处有吸收,同时小肠液和酚红在此处也有吸收,干扰阿魏酸的测定。基于上述原因,考虑采用 HPLC 法测定小肠液中的阿魏酸,选择 286 nm 作为阿魏酸的检测波长。酚红在 558 nm 处有最大吸收,其他成分在此处无吸收,对酚红的检测无干扰,所以选择 558 nm 作为酚红的检测波长。

2.3 阿魏酸的 HPLC 测定

2.3.1 色谱条件:色谱柱:Diamonsil C₁₈ × (200 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:冰醋酸-甲醇-水 (0.3:50:50);柱温:30℃;检测波长:286 nm;体积流量:1.0 mL/min。取阿魏酸对照品溶液和供试品溶液分别过 0.45 μm 滤膜,弃去初滤液,取续滤液 20 μL 进样,色谱图见图 1。

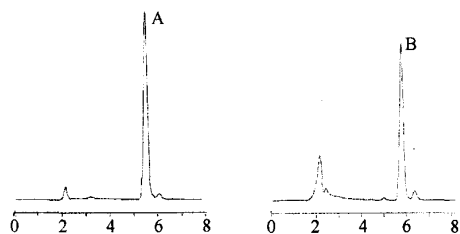


图 1 阿魏酸对照品(A)和川芎提取物(B)色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of ferulic acid reference substance (A) and Rhizoma Chuanxiong extract (B)

2.3.2 溶液制备:精密称取阿魏酸对照品 9.8 mg,置于 100 mL 量瓶中,以 K 氏液和空白小肠液定容配成 98.0 mg/L 阿魏酸对照品准备液(以下操作均在避光条件下进行),分别移取 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、12.0、16.0、20.0 mL 于 100 mL 量瓶中加入酚红 2.0 mg,以 K 氏液和空白小肠液稀释配成 0.49、0.98、1.96、3.92、7.84、11.76、15.68、19.60 mg/L

阿魏酸对照品溶液。称取一定量川芎提取物,按照上述方法配制含阿魏酸质量浓度为 2.0、10.0、20.0 mg/L 供试品溶液。

2.3.3 标准曲线的绘制:分别取上述阿魏酸对照品溶液过 0.45 μm 滤膜,弃去初滤液,取续滤液 20 μL 进样,记录色谱图和峰面积。以峰面积对质量浓度进行线性回归,得标准曲线方程为: $C = 5 \times 10^{-6} A + 0.3019$, $r = 0.9998$,线性范围为 0.5~20.0 mg/L。

2.4 酚红的测定

2.4.1 溶液的制备:精密称酚红 50.0 mg 置于 250 mL 量瓶中,以 K 氏液和空白小肠液定容配成 200.0 mg/L 酚红标准储备液,分别移取 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 mL 于 100 mL 量瓶中,加入阿魏酸 1.0 mg,以 K 氏液和空白小肠液定容配成 10.0、20.9、30.0、40.0、50.0 mg/L 酚红标准溶液。

2.4.2 标准曲线的绘制:分别取上述酚红标准溶液 0.5 mL,加入 1 mol/L NaOH 溶液 5.0 mL 摇匀,用 UV 法在 558 nm 处测定吸光度,以吸光度对质量浓度进行线性回归,得标准曲线方程为: $C = 61.861 A - 0.175$, $r = 0.9999$,线性范围为 10.0~50.0 mg/L。

2.5 阿魏酸与酚红溶液的稳定性试验:取阿魏酸与酚红供试品溶液,置(37±0.5℃)恒温水浴中保温 4.0 h,分别于 1、2、3、4 h 取样,测定阿魏酸的峰面积与酚红的吸光度,代入标准曲线方程计算质量浓度。结果显示在 4 h 内溶液稳定性良好,两个指标的 RSD 分别为 0.70% 和 0.52%。

2.6 回收率与精密度试验:配制高、中、低 3 个质量浓度的阿魏酸与酚红供试品,分别在上述溶液中加入阿魏酸与酚红对照品,重复测定 3 次,计算回收率,结果见表 1。配制高、中、低 3 个质量浓度的阿魏酸与酚红溶液,每个水平取 3 个样品,于 1 d 内重复测定 5 次,计算日内精密度;每个水平取 3 个样品,每日测定 1 次,连续测定 5 d,计算日间精密度,结果见表 2。

2.7 大鼠在体肠吸收实验^[3,4]:配制含阿魏酸分别为 2.0、10.0、20.0 mg/L,酚红 20.0 mg/L 的供试品溶液。取自由饮水条件下禁食 12 h 大鼠,ip 20% 乌拉坦溶液麻醉(0.13 g/100 g),背位固定于操作台上,保持 37℃ 体温,沿腹中线切开腹部约 3 cm,对各肠段结扎:十二指肠段自幽门 1 cm 处开始,空肠段自幽门 15 cm 处开始,回肠段为盲肠上行 20 cm 处开始,结肠段为紧邻盲肠至直肠,各段均取 10 cm 左右。全肠为自十二指肠上部至回肠下部。将各段上下部各插入直径约 0.5 cm 的玻璃管,用线结

表 1 阿魏酸与酚红的回收率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Recoveries of ferulic acid and phenol red ($\bar{x} \pm s, n=3$)

试药	原药量/ (mg · L ⁻¹)	加入量/ (mg · L ⁻¹)	测得量/ (mg · L ⁻¹)	回收率/ %
阿魏酸	10.00	4.96	5.01±0.03	100.6±0.6
		10.12	10.08±0.05	99.6±0.5
		15.03	15.01±0.06	99.9±0.4
酚红	20.02	10.05	10.01±0.05	99.6±0.5
		19.98	20.02±0.04	100.2±0.2
		30.12	30.09±0.09	99.9±0.3

表 2 阿魏酸与酚红的日内精密性与日间精密性 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Intra-day and inter-day precision of ferulic acid and phenol red ($\bar{x} \pm s, n=5$)

试药	日内		日间	
	测得浓度/ (mg · L ⁻¹)	RSD/%	测得浓度/ (mg · L ⁻¹)	RSD/%
阿魏酸	2.08±0.07	1.4	2.04±0.06	1.2
	9.98±0.12	1.3	10.01±0.09	0.9
	19.86±0.09	0.7	19.91±0.14	1.0
	9.97±0.08	0.9	10.00±0.05	0.5
酚红	19.89±0.13	0.7	19.93±0.09	0.5
	30.12±0.15	0.5	30.07±0.10	0.4

扎。然后用适量 37℃ 生理盐水将小肠内容物冲洗干净后,换成 37℃ 氏液循环 10 min,接着用 100 mL 供试品溶液以 5 mg/min 的流速循环,10 min 后将流速调节为 2.5 mL/min,分别于 0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3、3.5、4 h 从供试品溶液烧杯中取样 3 mL,随即补充同浓度酚红溶液 3 mL,

表 4 小肠不同区段的吸收量和 k_a ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Uptake and k_a of ferulic acid at various intestine segments ($\bar{x} \pm s, n=5$)

序号	十二指肠		空 肠		回 肠		结 肠	
	吸收量/($\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$)	$k_a \times 10^3/\text{h}^{-1}$	吸收量/($\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$)	$k_a \times 10^3/\text{h}^{-1}$	吸收量/($\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$)	$k_a \times 10^3/\text{h}^{-1}$	吸收量/($\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$)	$k_a \times 10^3/\text{h}^{-1}$
1	81.90	20.71	85.48	22.32	80.2	20.24	58.07	13.91
2	72.93	16.68	78.93	19.46	75.61	17.45	80.21	18.76
3	78.56	20.27	70.36	16.47	74.86	18.88	67.32	15.88
4	70.38	18.75	81.57	21.73	81.81	19.80	74.28	18.93
5	73.77	19.84	78.24	18.69	74.75	18.73	70.39	17.84
x	75.51	19.25	78.92	19.73	77.45	19.02	70.05	17.06
s	4.64	1.61	5.56	2.37	3.31	1.08	8.25	2.14

3 讨论

由于川芎提取物中成分复杂,很多成分都对阿魏酸的检测有干扰,又有大鼠肠分泌液和酚红的干扰,所以不能用紫外方法测定阿魏酸。本实验采用 HPLC 法,消除了川芎提取物中其他成分、酚红和肠液的干扰,色谱系统实验表明该方法可以快速准确的测定药物的量,可以满足测定需要。

实验结果表明阿魏酸在肠道内无特定吸收部

所取样品用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液测定阿魏酸与酚红,代入标准曲线计算质量浓度。

分别考察含阿魏酸质量浓度为 2.0、10.0、20.0 mg/L,酚红质量浓度为 20.0 mg/L 的供试品溶液在大鼠小肠吸收情况;考察含阿魏酸质量浓度为 10.0 mg/L,酚红质量浓度为 20.0 mg/L 的供试品溶液在大鼠肠道各区段吸收情况。以阿魏酸剩余药量的对数值对取样时间进行线性回归,由斜率求得吸收速度常数(k_a),由剩余药量求得药物吸收量。结果见表 3 和 4。

表 3 阿魏酸在小肠的吸收量和 k_a ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Uptake and k_a of ferulic acid in intestine ($\bar{x} \pm s, n=5$)

质量浓度/(mg · L ⁻¹)	吸收量/($\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$)	$k_a \times 10^3/\text{h}^{-1}$
2.0	40.98±13.69	57.70±5.17
10.0	206.52±61.70	52.22±4.78
20.0	390.59±113.34	54.90±3.98

结果表明:在 2.0~20.0 mg/L 内阿魏酸的吸收量与质量浓度成线性关系, K_a 值基本保持不变,提示药物以被动扩散方式吸收。由表 4 可知,吸收速率为空肠>十二指肠>回肠>结肠,并且各回归直线的 r 值均大于 0.9,表明在肠道的不同部位,药物浓度的下降与循环时间成线性关系,故吸收动力学为一级吸收。对表 4 数据进行方差分析及两两多重比较的 t 方法检验,各肠段的吸收速率无显著性差异。

位,各肠段的吸收率无显著性差异。药物浓度在肠道各部位的下降与循环时间呈线性关系,表明吸收动力学为一级吸收。药物吸收量随药物浓度的增加而增加,而 k_a 基本不变,提示吸收为被动扩散机制。

药物胃肠道吸收动力学研究是处方前研究的重要部分,它能够指导人们针对药物的吸收机制和吸收部位而选用相应的剂型。口服后吸收不好或吸收无规律的药物制成理想的缓、控释制剂比较困难。一

一般而言,在胃肠道整段或较长部分都能吸收的药物是制备、控释制剂的良好候选药物,而有特定吸收部位的药物通常成胃肠道滞留型定位释药系统,需通过延长药物的吸收时间来保证药物的吸收量。研究结果显示:阿魏酸或含有阿魏酸的中药可以制成缓、控释制剂。

References:

[1] Ou S Y, Bao H Y, Lan Z D. The evolvement of

pharmacological effect of ferulic acid and its ramification [J]. *Chin Tradit Med* (中草药), 2001, 24(3):220-221.

[2] Deng S W, Ma S C. The separation of chuanxiong s extraction with resin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(1):23-24.

[3] Zhang L, Chen D W, Li J F, et al. Studies on the absorption kinetics of famotidine in rat's intestines [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2001, 18(3):170-172.

[4] Ding J S, Zhang J S. Absorption of breviscapine in small intestine of rat [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2003, 34(1):65-69.

GC-ECD 法测定胃肠安丸中有机氯农药残留量

凌宁生^{1,2}, 李 林¹, 白 伟¹, 陈志敏¹, 高文远^{2*}

(1. 天津中新药业股份有限公司乐仁堂制药厂, 天津 300380; 2. 天津大学药学院, 天津 300072)

胃肠安丸由木香、沉香、枳壳(麸炒)、檀香、大黄、厚朴(姜制)、麝香、川芎等药味组成,具有芳香化浊、理气止痛、健胃导滞之功效,用于消化不良引起的腹泻、肠炎、菌痢、脘腹胀满、腹痛、食积乳积的治疗。由于中药资源的复杂化,来自于一些土壤被污染地区的药材和不规范种植的药材,其农药残留都可能超限。目前,欧洲、日本等发达国家对食品和药品的农药残留都制定了严格的控制标准,而我国在这方面的的工作还刚开始,如《中国药典》2005年版只规定了黄芪、甘草药材中3种有机氯农药残留的限量标准,成药则没有规定。为了面向未来的国内外市场,本实验建立气相色谱-电子捕获检测(ECD)法测定胃肠安丸中六六六(BHC)、滴滴涕(DDT)和五氯硝基苯(PCNB)3种有机氯农药残留的方法为同类中成药中的有机氯农药残留检测提供借鉴。

1 材料与仪器

丙酮、二氯甲烷、石油醚(60~90℃)为色谱纯,其他均为分析纯,水为去离子水。六六六(BHC)包括 α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC、 δ -BHC 4种异构体(质量分数大于99.0%);滴滴涕(DDT)包括PP'-DDE、PP'-DDD、OP'-DDT、PP'-DDT 4种异构体(质量分数大于99.0%);五氯硝基苯(PCNB)(质量分数为98.1%)均购自国家标准物质研究中心。胃肠安丸由天津中新药业股份有限公司乐仁堂制药厂提供。

岛津 GC-2010 气相色谱仪, Ni⁶³-ECD 电子

捕获检测器, MODEL 0412-1 离心机(上海医疗器械有限公司手术机械厂), KuDos Sk8200LH 超声仪, 瑞士 Mettler AE-200 电子分析天平, 岛津 Shimadzu GC solution 工作站。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: DB-1 弹性石英毛细管(30 m×0.25 mm×0.25 μ m), 升温程序: 初始温度 120℃, 5℃/min 升至 220℃, 再以 20℃/min 升至 250℃, 保持 10 min; 进样口温度 280℃, 检测器温度 300℃, 采用分流进样, 分流比为 10:1, 载气为高纯氮, 总压力: 100 kPa, 总流量: 13.8 mL/min, 电流: 1 nA, 进样量: 1.0 μ L。理论塔板数按 α -BHC 峰计算不低于 3.9×10^5 , 两个相邻色谱峰的分离度大于 1.5。

2.2 混合对照品储备液的制备: 精密量取有机氯混合对照品 0.5 mL、PCNB 0.25 mL 置 25 mL 量瓶中, 加石油醚(60~90℃)至刻度, 即得质量浓度均为 1 mg/L 的混合对照品储备液。

2.3 混合对照品溶液的制备: 精密量取 1 mg/L 的混合对照品储备液适量, 加石油醚(60~90℃)制成 10 μ g/L 的混合对照品溶液。

2.4 标准曲线的绘制: 分别精密量取适量混合对照品储备液, 用石油醚稀释成 1.5、10、50、100 μ g/L 对照品溶液, 取 1.0 μ L 进样。分别以各组峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 计算标准

收稿日期: 2006-08-03

基金项目: 天津市科技攻关计划重大科技工程项目(05ZHCGGX01000)

作者简介: 凌宁生(1959—), 男, 在读博士生, 中药专业, 研究方向为中药制剂及制药新技术的开发运用。

Tel: (022)25295004 E-mail: lnsh2003@hotmail.com

* 通讯作者 高文远 Tel: (022)87401895 E-mail: pharmgao@tju.edu.cn