

麻黄、杏仁两药合煎差异最小。

3药合煎时甘草酸的量变化最大,苦杏仁苷的量变化最小;麻黄、甘草两药合煎时麻黄碱的量比甘草酸的量变化小;麻黄、杏仁两药合煎时麻黄碱的量比苦杏仁苷的量变化大;甘草、杏仁两药合煎时甘草酸的量比苦杏仁苷的量变化小。

3 讨论

三拗汤不同配伍煎液中,盐酸麻黄碱的量合煎液均大于分煎液,说明3味药材在煎煮过程中各药材可能共同发生反应或两两之间发生化学反应,都能促进麻黄碱盐的生成。盐酸麻黄碱的量麻黄、杏仁两药合煎差异最大,麻黄、甘草两药合煎差异最小,反应均能促进麻黄碱的生成。生物碱与甘草皂苷配伍能产生沉淀^[9],有可能麻黄中的麻黄碱与甘草中的甘草酸发生部分沉淀反应,导致麻黄碱的量略有降低。

三拗汤不同配伍煎液中,甘草酸的量3药合煎时,合煎液大于分煎液,两药合煎时合煎液小于分煎液,说明3味药材在煎煮过程中各药材共同发生反应,其反应结果能增加甘草酸在汤剂中的量,但两两之间发生化学反应,其反应结果却能降低甘草酸在汤剂中的量。麻黄、甘草两药合煎与杏仁、甘草两药

合煎甘草酸的量降低较多,进一步说明了麻黄中的麻黄碱与甘草中的甘草酸可能发生部分沉淀反应导致甘草酸的量降低更多。

三拗汤不同配伍煎液中,苦杏仁苷的量合煎液均小于分煎液,说明3味药材在煎煮过程中各药材共同发生反应、两两之间发生化学反应,苦杏仁苷水解,其反应结果都能降低苦杏仁苷在汤剂中的量。苦杏仁苷的量甘草、杏仁两药合煎差异最大,麻黄、杏仁两药合煎差异最小,说明在煎煮过程中甘草中甘草酸的酸性可能促进杏仁中苦杏仁苷的水解。

参考文献:

- [1] 段富津. 方剂学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993.
- [2] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [3] 林朝展, 祝晨, 杨金燕, 等. 麻黄药材的质量分析研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(1): 56-58.
- [4] 姜舜尧, 田颂九, 刘琼. 用2种高效液相色谱分离模式分析测定半夏露糖浆中麻黄碱、伪麻黄碱成分 [J]. 药物分析杂志, 2003, 23(5): 341-343.
- [5] 白丽, 陈晓辉, 徐新盛, 等. HPLC测定草分清丸中甘草酸的含量 [J]. 中成药, 2005, 27(8): 981-982.
- [6] 祁大庆, 胡秀波. HPLC法测定痰咳净片中甘草酸的含量 [J]. 浙江化工, 2005, 36(7): 33-34.
- [7] 王友兰, 李红兵, 华玉琴. HPLC法测定桃仁中苦杏仁苷的含量 [J]. 中国药师, 2002, 5(9): 550-556.
- [8] 野口卫. 汉方制剂分析技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.

毛细管电泳法测定半枝莲药材及灯盏花素片中野黄芩苷

王峻梅^{1,2}, 王建伟^{3,4}, 李全文², 陈纘光^{2X}, 蔡沛祥⁴, 莫金垣⁴

(1. 暨南大学 分子生物研究中心, 广东 广州 510632; 2. 中山大学药学院, 广东 广州 510080; 3. 佛山市质量计量监督检测中心, 广东 佛山 528000; 4. 中山大学化学与化工学院, 广东 广州 510275)

摘要: 目的 建立半枝莲药材及其制剂灯盏花素片中黄酮类化合物野黄芩苷测定的毛细管电泳高频电导法。方法 探讨了缓冲液的种类、浓度、添加剂、分离电压和进样量对分离和检测的影响, 以石英毛细管为分离柱, 1.0 mmol/L HAc-15.0 mmol/L 三乙醇胺 (pH 8.6) 缓冲液为电泳介质, 分离电压20.0 kV, 用非接触式高频电导法检测。结果 野黄芩苷的峰形良好, 出峰较快, 线性范围为0.001~10.0 Lg/mL, 检出限为0.5 Lg/mL, 回收率达99.4%以上。结论 为药材及制剂中野黄芩苷的测定提供了一种快速和简便的新方法。

关键词: 半枝莲; 灯盏花素片; 野黄芩苷; 毛细管电泳高频电导法

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)03-0375-04

半枝莲为唇形科植物半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 的干燥全草, 别名通经草、紫连草、并头草、牙刷草、小韩信草等, 具有清热解毒、化瘀利尿的功

效, 用于治疗疔疮肿毒、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、跌扑肿痛、水肿、黄疸等^[1]。半枝莲中主要的有效成分是黄酮类化合物, 含野黄芩苷(灯盏花乙素)最多, 具有抗

X 收稿日期: 2007-06-23

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目(021808); 广东省教育厅科学基金资助项目(Z03055)

作者简介: 王峻梅(1978—), 女, 江苏宜兴人, 研究实习员, 硕士, 主要从事毛细管电泳、药物分析和功能基因组单核苷酸多态性研究。

Tel: (020) 85560925-808 E-mail: meiger@163.com

* 通讯作者 陈纘光 Tel: (020) 88364586 Fax: (020) 87330558 E-mail: chen zg@gzsums.edu.cn

病毒、抗突变等活性^[2]。灯盏花素片为灯盏花素制成的片剂,其中灯盏花素中主要药效成分为灯盏花乙素,即野黄芩苷。半枝莲中黄酮类成分测定的方法有薄层色谱法^[2]、紫外-分光光度法^[3,4]、高效液相色谱法^[5],但这些方法分析中,分析时间长、成本高、样品处理较繁琐;灯盏花素片中野黄芩苷的测定虽已有毛细管电泳法报道^[6],但本课题组研制开发的非接触式毛细管电泳高频电导检测装置^[7],避免了电化学检测中常见的电极与溶液直接接触,不仅电极寿命长,而且灵敏度高、成本低、使用非常方便。本实验采用毛细管电泳-高频电导检测法对半枝莲药材及其制剂中的黄酮类化合物野黄芩苷进行直接测定,方法可靠、简便。

1 仪器、试剂与材料

高压电源(自制^[8]);高频电导检测器(自制^[9]);石英毛细管(60 cm×150 Lm,河北永年锐沅色谱器件有限公司);数据工作站(中山大学化学与化工学院提供);数据记录与处理在普通P4微机和PCL-711B型A/D卡(台湾EVOC)上完成。中草药粉碎机。超声波提取器。

野黄芩苷对照品购自中国药品生物制品检定所,批号110842-200403;半枝莲药材产地为广东,购自广州宝芝林药店,经笔者鉴别为半枝莲*S. barбата D. Den*的干燥全草;灯盏花素片剂,广东环球制药有限公司生产。三(羟甲基)氨基甲烷(Tris, GR, 香港分装),其他试剂均为国产AR级,实验用水为二次重蒸水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备:精密称取野黄芩苷10.0 mg,用1.0 mmol/L HAc-15.0 mmol/L 三乙醇胺(pH 8.6)缓冲溶液溶解并定容于10 mL量瓶中,得质量浓度为1.00 mg/mL的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备:将半枝莲药材粉碎,过40目筛,精密称取粉末0.2035 g,置于具塞锥形瓶中,加1.0 mmol/L HAc-15.0 mmol/L 三乙醇胺(pH 8.6)缓冲溶液5 mL,浸泡30 min,超声提取4 h,静置10 min,滤过;残渣加入5 mL上述缓冲溶液,重复提取30 min,滤过,合并两次滤液,定容于10 mL量瓶中,即得半枝莲药材供试品溶液。

取灯盏花素片20片,研细,精密称取0.2037 g,置于具塞锥形瓶中,加1 mmol/L HAc-15 mmol/L 三乙醇胺(pH 8.6)缓冲溶液5 mL,超声提取30 min,滤过;取残渣加入5 mL上述缓冲溶液,再次超声提取30 min,滤过,合并两次滤液,定容于10 mL

量瓶中,得灯盏花素片供试品溶液。

2.3 实验方法的选择:毛细管在使用前,分别用0.1 mol/L NaOH、H₂O、缓冲溶液1.0 mmol/L HAc-15.0 mmol/L 三乙醇胺(pH 8.6)洗10、5、5 min。每次测定后,用上述溶液洗2 min。电泳条件:缓冲液分离电压20.0 kV,长虹吸位差进样高度20.0 cm,进样时间15.0 s,融硅毛细管内径150 Lm,长度60.0 cm。检测器的输出信号经A/D卡转换,由数据工作站采集到微机中进行实时数据处理、图形显示和数据文件存储。实验在恒温(25℃)、恒湿(65%)条件下进行。

2.3.1 缓冲溶液的选择:考察了Tris-H₃BO₃、H₃BO₃-NaOH、NaAc-NaOH、HAc-二乙胺、H₃BO₃-二乙胺、HAc-三乙醇胺分离介质对分离的影响。在Tris-H₃BO₃、H₃BO₃-NaOH和H₃BO₃-二乙胺缓冲体系中,峰形较差,且出峰顺序混乱,可能是H₃BO₃与野黄芩苷之间发生相互作用;在HAc-二乙胺体系中,出现平台峰或双峰;在NaAc-NaOH体系中,野黄芩苷峰形较好,但随着质量浓度的减小,峰形越来越差,甚至出现倒峰;而在HAc-三乙醇胺体系中,基线平稳,灵敏度高,且峰形也较好。实验证明,HAc-三乙醇胺缓冲体系是较理想的分离介质。

2.3.2 缓冲溶液浓度的影响:在毛细管电泳中,缓冲溶液的浓度是一个很重要的指标。增加缓冲溶液浓度,离子强度增大,明显改变溶液的缓冲容量,减少溶质和管壁之间、被分离的粒子和粒子之间的相互作用,从而改善分离。但浓度过大,将产生大量的焦耳热,致使峰形变差。此外,在电导检测中,输出响应信号基于待测组分与背景电导之间的差值,因此需选择合适的缓冲溶液浓度以获得较高的灵敏度和分离度。实验分别考察了HAc(1.0~3.0 mmol/L)和三乙醇胺(5.0~25.0 mmol/L)的浓度,发现改变HAc浓度对分离的影响并不明显,但随着HAc浓度的增加,由于离子浓度的增加使得焦耳热增加更明显,噪音越来越大,降低了信噪比;随着三乙醇胺浓度的增加,对基线噪音的影响并不明显,而灵敏度却越来越高,但当三乙醇胺浓度超过15.0 mmol/L时,噪音开始增大。综合考虑,选择HAc和三乙醇胺的浓度分别为1.0 mmol/L和15.0 mmol/L。

2.3.3 添加剂的影响:添加剂是影响毛细管电泳的因素之一。理论上,在缓冲溶液中加入有机溶剂可以减少电导率,降低电渗流的速度,从而减少焦耳热的产生,提高信噪比,改善峰形。实验考察了甲醇、乙醇、乙腈等有机溶剂对分离检测的影响。实验发现

随着缓冲溶液中有有机溶剂体积的增加,基线噪音降低并不明显,但灵敏度却大幅下降,且出峰时间逐渐延长,而峰形改善也不明显,因此本次实验未使用任何添加剂,仅以1.0 mmol/L HAc-15.0 mmol/L 三乙醇胺为缓冲体系。

2.3.4 分离电压的选择、进样时间和进样高度的影响:在毛细管柱长确定时,随着操作电压的增加,电渗流和电泳流速的绝对值都增加,迁移时间缩短。但在升高电压的同时,将使柱内焦耳热增加,缓冲溶液的黏度减小,若不能有效驱散所产生的焦耳热,柱效和分离度反而会下降。实验考察了分离电压在10.0~25.0 kV 的分离效果,发现提高电压可以明显缩短分析时间(图1-A),但在电压升高的同时,焦

耳热增加,基线噪音增大明显,且时间与电压的线性关系开始偏离,故选择20.0 kV 为优化分离电压。

采用位差虹吸进样,在一定的进样高度下,进样时间决定了进样量的大小,而在一定的进样时间下,进样高度决定进样量的大小。进样量太小,达不到检测器的灵敏度,进样量太大,样品塞长度超过扩散引起的区带增宽,分离效率和分离度都变差。分别固定进样高度和进样时间,考察了进样时间(7.0~21.0 s)和进样高度(10.0~35.0 cm)对分离检测的影响。结果发现,当进样时间超过15.0 s,进样高度超过20.0 cm 时,峰面积变化均开始偏离直线(图1-B、C),故选择15.0 s 为最佳进样时间,20.0 cm 为最佳进样高度。

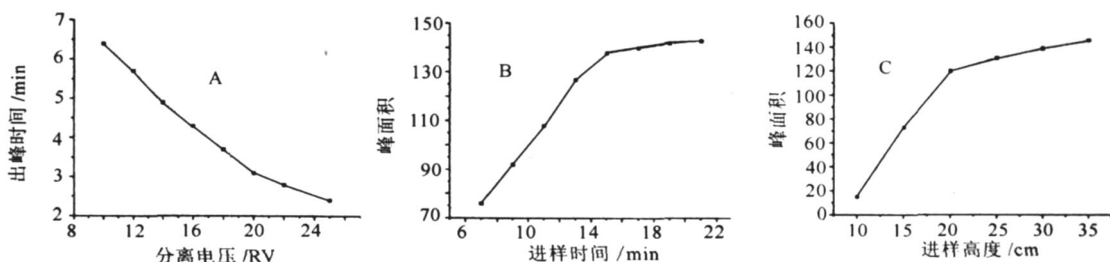


图1 分离电压(A)、进样时间(B)和进样高度(C)的影响

Fig. 1 Effect of separation voltage (A), injection time (B), and injection height (C)

2.3.5 提取方法的选择:半枝莲中黄酮类成分的提取法有回流法、水煎法、温浸法和超声提取法^[6]。由于超声波具有强烈的振动和击碎作用,可以把物体打成极细小的微粒,因此可以使固体样品均匀地分散于溶剂中,从而提高提取效率。故本实验选择超声提取法提取半枝莲药材中的野黄芩苷。实验考察了,不同提取时间(1.0~6.0 h)对野黄芩苷提取率的影响,结果发现,随着提取时间的延长,样品中野黄芩苷的量逐渐增加,当提取时间超过4.0 h 时,优化条件下所测样品中野黄芩苷的量不再增加,故实验以4.0 h 作为最佳提取时间。

2.4 线性范围和检出限:精密量取野黄芩苷对照品溶液配成0.250~0.001 5 Ig/mL 系列对照品溶液。在优化的实验条件下进样测定,结果野黄芩苷的峰面积与质量浓度呈良好的线性关系,线性方程为 $Y = 0.323 X + 37.0$, $r = 0.999$,线性范围为0.001~10.0 Ig/mL,检出限为0.5 Ig/mL ($S/N = 3$)。

2.5 精密度试验:取半枝莲药材和灯盏花素片剂的供试品溶液,重复6次进样,测定其野黄芩苷的峰面积,计算得半枝莲药材的RSD为2.3%,灯盏花素片的RSD为2.1%。

2.6 重现性试验:取同一批半枝莲药材粉末和同一

批灯盏花素片剂粉末各6份,制备供试品溶液,进样测定,计算野黄芩苷的质量分数,分别得RSD为3.0%和2.6%。

2.7 稳定性试验:分别取半枝莲药材和灯盏花素片剂供试品溶液在0、2、4、6、8、12 h 测定野黄芩苷峰面积,得RSD分别为1.6%和1.5%,表明供试品溶液在12 h 内稳定。

2.8 回收率试验:各取半枝莲药材粉末和灯盏花素片剂粉末0.200 0 g,加入适量高、中、低水平野黄芩苷对照品,制备供试品溶液,进样测定,计算加样回收率,得半枝莲药材和灯盏花素片剂的回收率,RSD分别为103%、1.6%,99.4%、1.2% ($n = 6$)。

2.9 样品测定:在选定的实验条件下,取不同批次半枝莲药材和不同批次灯盏花素片剂的样品溶液适当稀释,进样测定峰面积,根据线性回归方程计算出样品溶液中野黄芩苷的量,结果见表2,色谱图见图2。

3 讨论

在最佳条件下,半枝莲药材和灯盏花素片中的野黄芩苷可在4 min 内得到很好的分离检测。采用缓冲溶液做溶剂提取野黄芩苷,可有效消除拖峰现象,更有利于样品测定;该高频电导检测器操作极为简便,只需将毛细管轻轻穿过检测器,检测电极不与

表2 半枝莲药材和灯盏花素片中野黄芩苷的测定(n= 6)

Table 2 Determination of scutellarin in Herba Scutellariae Barbatae and Dengzhanhuasu Tablets (n= 6)

样 品		野黄芩苷/%	RSD/%
半枝莲	1	12. 1	2. 3
	2	12. 3	2. 0
	3	11. 8	3. 1
灯盏花素片	1	13. 5	2. 1
	2	13. 2	2. 1
	3	13. 1	2. 6

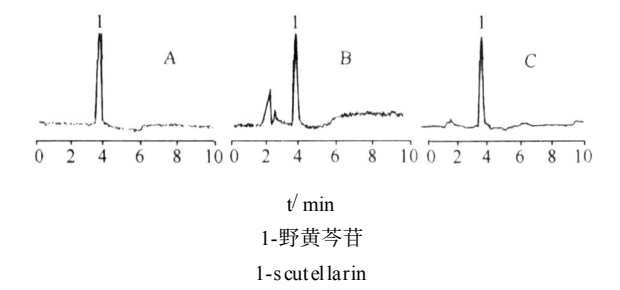


图2 野黄芩苷对照品(A)、半枝莲药材(B)和灯盏花素片(C)的毛细管电泳图

Fig.2 Electrophorogram of scutellarin reference substance (A), Herba Scutellariae Barbatae (B), and Dengzhanhuasu Tablets (C)

溶液接触,既消除了分离电场对检测的影响,又不存在电极中毒的问题;用毛细管电泳-高频电导检测法测定,样品前处理简便易行,检测方法简便、快速、灵敏、廉价,符合药品检测的需要,是一种较好的、值得推广的检测中药有效成分的新方法。

参考文献:

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2005.

[2] 边才苗,李钧敏. 中药半枝莲黄酮类化合物含量测定及初步分析[J]. 浙江中医学院学报, 2001, 25(6): 60.

[3] 李守拙,潘海峰,康少文. 半枝莲药材中总黄酮含量测定[J]. 承德医学院学报, 2001, 18(1): 33-35.

[4] 席荣英,孙祥德. 半枝莲中总黄酮含量测定 [J]. 新乡医学院学报, 2003, 20(1): 29-30.

[5] 邱多隆,刘丽春,刘晔玮,等. 半枝莲提取工艺的研究[J]. 中成药, 2003, 25(7): 530-532.

[6] 饶毅,魏惠珍,王义明,等. 高效毛细管电泳法测定灯盏花素系列制剂的含量 [J]. 中成药, 2002, 24(8): 584-586.

[7] 袁崇均,王 筋,杨 红,等. 正交试验法优选半枝莲提取工艺的研究 [J]. 华西药学杂志, 2002, 17(2): 112-113.

[8] Chen Z G, Mo J Y, Yang X Y, et al. A new capillary electrophoresis apparatus with piezoelectric ceramics high voltage and amperometric detector [J]. Chin Chem Lett, 1999, 10(3): 231.

[9] 陈缙光,莫金垣. 毛细管电泳高频电导检测器的研制 [J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(5): 801.

RP-HPLC 法测定杭白芍及其饮片中芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷

葛志伟, 贺 庆, 林云径, 程翼宇^X
(浙江大学药学院 中药科学与工程学系, 浙江 杭州 310027)

摘要: 目的 采用HPLC法测定杭白芍药材与饮片中芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷3种成分的量。方法 色谱柱为Zorbax SB-C₁₈柱;流动相为0.05%磷酸水溶液-0.05%磷酸乙腈溶液;梯度洗脱;体积流量1 mL/min;柱温30℃;检测波长230 nm。结果 芍药内酯苷在0.131~1.31 Ig, 芍药苷在0.425~4.25 Ig, 苯甲酰芍药苷在0.086~0.576 Ig与峰面积呈良好的线性关系。加样回收率分别为芍药内酯苷96.6%(RSD为1.2%), 芍药苷98.7%(RSD为2.3%), 苯甲酰芍药苷97.4%(RSD为1.7%)。结论 所建立的方法适合杭白芍中有效成分的测定,并且杭白芍药材中芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷的量高于饮片。

关键词: 杭白芍;芍药内酯苷;芍药苷;苯甲酰芍药苷;高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2008)03- 0378- 03

杭白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,具有平肝止痛、养血调经、敛阴收汗的功效。白芍总苷具有调节免疫、改善学习记忆行为、镇痛、镇静、解痉等作用^[1],其主要活性成分为芍

药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷等单萜苷类化合物^[2]。本实验比较了杭白芍药材与饮片中芍药苷、芍药内酯苷和苯甲酰芍药苷的量,为更全面评价白芍的质量并制定合理加工工艺提供了依据。

X 收稿日期: 2007-06-01
基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2005CB523402);浙江省中医药管理局科技计划重点项目(2006Z14)
* 通讯作者 程翼宇