

3 讨论

由于药材中可能含有黏液质,粗多糖提取前药材粉碎不可过细,否则细胞壁破裂黏液质流出难以滤过。多糖在高温下容易发生裂解,因此提取和浓缩时温度不可过高,否则多糖可能被破坏,本实验采用90℃水浴浸提。

粗多糖精制中,采用H₂O₂脱色法可以脱除与蛋白质、多糖等大分子结合的色素,效果明显。H₂O₂脱色时温度为40~50℃,温度过高多糖易被破坏;温度过低达不到脱色的效果。除蛋白采用经典的Sevag法,效果较明显,Sevag法除蛋白需反复多次,直至分层处无白色凝胶状物质出现。

本实验采用DEAE-32纤维素阴离子交换柱、Sephacryl S-400 SF凝胶柱分离纯化了吴茱萸多糖主要组分,得到两个多糖组分ERPS2a、ERPS3。蒸馏水洗脱部分未见多糖组分,ERPS2a、ERPS3分别为0.2、0.5 mol/L NaCl溶液洗脱组分。推断吴茱萸多糖中基本不含中性多糖,含有酸性多糖,该结果与预试中季铵盐CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)沉淀法结果吻合。从组分单糖组成测定结果看ERPS2a、ERPS3中均含有一定量的半乳糖醛酸,也证实了组分为酸性多糖。

在单糖组成分析方法中,气相色谱法分离单糖繁琐费时,易出现色谱峰异构化裂分。HPLC法测

定单糖可用糖分析柱和氨基键合相柱,但其价格昂贵,分析成本高。同时单糖没有C=C双键和共轭结构等生色团,分离后直接进行紫外检测比较困难。本实验采用PMP衍生化方法将单糖转化成具有紫外活性的物质,然后采用反相HPLC-UV法进行单糖组成研究,同时分离测定了6种单糖和1种糖醛酸,改善了分离特性,提高了检测灵敏度。同时PMP与单糖衍生时条件温和,操作简单,该方法可推广应用到其他多糖。

参考文献:

- [1] 杨凤珍,甄攀,庞茂林,等. 中药吴茱萸中多糖的测定[J]. 张家口医学院学报, 1996, 16(1): 17-18.
- [2] 甄攀,王治宝,张万明,等. 吴茱萸多糖的提取及其抗氧化作用研究[J]. 中成药, 2005, 27(4): 491-492.
- [3] 王卫国,王继花,吴强. 灰树花多糖脱色技术研究[J]. 中国食用菌, 2003, 22(6): 49-51.
- [4] 中国科学院上海药物研究所. 中草药有效成分提取与分离[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983.
- [5] 吴梧桐. 生物制药工艺学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 第2版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [7] Honda S, Akao E, Suzuki S, et al. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultra-violet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives [J]. *Anal Biochem*, 1989, 180: 351-357.
- [8] Strydom D J. Chromatographic separation of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone-derivatized neutral, acidic and basic aldoses [J]. *J Chromatogr A*, 1994, 678: 17-23.

HPLC法测定复方紫草颗粒中咖啡酸四聚体异构体

秦冬梅¹, 买尔旦^{2*}, 李静³, 王新兵¹

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832000; 2. 新疆医科大学附属肿瘤医院, 新疆 乌鲁木齐 830011;
3. 石河子大学第一附属医院, 新疆 石河子 832000)

摘要:目的 建立HPLC法测定复方紫草颗粒剂中咖啡酸四聚体异构体的方法。方法 YMC ODS-A C-18色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.5%磷酸水(40:60); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 252 nm; 柱温: 室温; 进样量: 10 μL。结果 咖啡酸四聚体异构体在0.052~1.65 μg与峰面积值呈良好的线性关系。平均回收率为101.8%, RSD为2.46%。结论 本方法简便可靠, 结果稳定, 重复性好, 可用于测定复方紫草颗粒剂中咖啡酸四聚体异构体。

关键词: 复方紫草颗粒; 咖啡酸四聚体异构体; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2009)04-0576-03

复方紫草颗粒是由紫草、丹参、黄芪、人参组成, 具有抗病毒、增强机体免疫之功效。咖啡酸四聚体

及其旋光异构体是紫草中的活性成分。经体外抗HIV药效筛选发现: 咖啡酸四聚体及其旋光异构体

* 收稿日期: 2008-07-28

作者简介: 秦冬梅(1976—), 女, 江苏省赣榆县人, 讲师, 2007年获新疆医科大学药学院医学硕士, 主要从事药剂学教学及中药民族药研究。Tel: 13999738518 E-mail: dongmeiqinli@163.com

* 通讯作者: 买尔旦

对艾滋病毒整合酶具有较强的抑制作用,在 MT-2 细胞系,具有抗 HIV-1 体外活性^[1]。经抗 HIV-1 体外酶药效筛选,咖啡酸四聚体异构体抗 HIV-1 整合酶活性强于咖啡酸四聚体,且对 HIV-1 逆转录酶也有较好的抑制活性。因此本实验以咖啡酸四聚体异构体为指标,建立了复方紫草颗粒的高效液相色谱测定方法,取得满意结果。

1 仪器与试剂

Series2000 高效液相色谱仪(美国 PerkinElmer 公司);单盘光电分析天平(北京光学仪器厂)。

复方紫草颗粒由新疆医科大学第一附属医院药剂科提供;咖啡酸四聚体异构体对照品(自制),质量分数达 98.06%,其 ¹H-NMR、¹³C-NMR、UV、IR 和 ES/MS 数据与文献报道^[2]一致;甲醇为色谱纯,水为重蒸水,磷酸等均为分析纯试剂。

2 方法和结果

2.1 色谱条件: YMC ODS-A C-18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-0.5%磷酸水(40:60);体积流量: 1 mL/min;检测波长: 252 nm, 柱温: 室温;进样量: 10 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制: 精密称取咖啡酸四聚体异构体对照品适量,用水制成 0.100 mg/mL 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的配制: 取本品研细,精密称取约 1 g,置于棕色具塞锥形瓶中,加水 25 mL,密塞,超声提取 30 min,放冷至室温,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的配制: 按处方制备不含紫草的颗粒剂,并按供试品溶液的配制项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适应性试验: 分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液注入色谱仪,测定,结果阴性对照溶液在与咖啡酸四聚体异构体相同保留时间处未见相同色谱峰,表明阴性对照无干扰。见图 1。

2.4 标准曲线的制备: 精密吸取 0.130 0 mg/mL 咖啡酸四聚体异构体对照品溶液 0.5、2.5、8、10、14 μL,在上述色谱条件下进样,测定峰面积值。以峰面积积分值对进样质量绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 584\,827 X - 40\,072$, $r = 0.999\,5$,结果表明咖啡酸四聚体异构体在 0.052 ~ 1.65 μg 与峰面积值呈良好的线性关系。

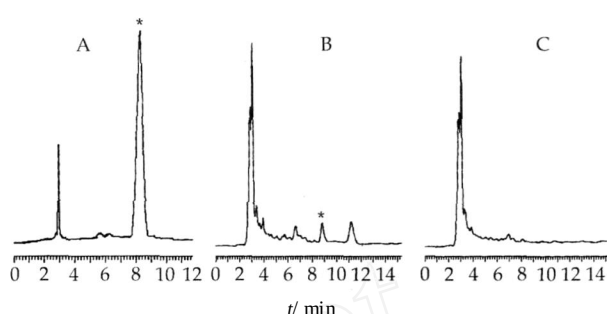


图 1 咖啡酸四聚体异构体对照品(A)、复方紫草颗粒(B)和阴性对照样品(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of isomer of caffeic acid tetramer reference substance (A), Compound Zicao Granula (B), and negative sample (C)

2.5 精密度试验: 精密吸取 0.130 0 mg/mL 咖啡酸四聚体异构体对照品溶液 10 μL,在上述色谱条件下连续进样 5 次,测定峰面积值,计算得其 RSD 为 0.87%。

2.6 稳定性试验: 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,分别在 0、2、4、6、8、10 h 进样,结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好,咖啡酸四聚体异构体峰面积值的 RSD 为 1.23%。

2.7 重现性试验: 取同一批样品,6 份,制备供试品溶液,测定峰面积,计算咖啡酸四聚体异构体的质量分数,结果咖啡酸四聚体异构体平均质量分数为 0.162 mg/g, RSD 为 0.35%。

2.8 加样回收率试验: 称取样品(批号 070201)9 份,每份 0.15 g,分别精密加入咖啡酸四聚体异构体对照品 0.2、0.4、0.6 mg,制备供试品溶液,进样测定,计算,结果咖啡酸四聚体异构体的平均回收率为 101.8%, RSD 为 2.46%。

2.9 样品测定: 取不同批号复方紫草颗粒样品,制备供试品溶液。依上述方法分别精密吸取供试品溶液和咖啡酸四聚体异构体对照品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,以外标法计算样品中咖啡酸四聚体异构体的质量分数,结果见表 1。

表 1 复方紫草颗粒中咖啡酸四聚体异构体的测定结果(n=3)

Table 1 Determination of isomer of caffeic acid tetramer in Compound Zicao Granula (n=3)

批号	咖啡酸四聚体异构体/(mg · g ⁻¹)	RSD/ %
070201	0.168	0.43
070301	0.159	0.56
070401	0.172	0.65

3 讨论

以流动相作溶剂,在200~400 nm波长测定了咖啡酸四聚体及其异构体紫外光谱图,结果均在252 nm处有最大吸收,确定252 nm为测定波长。

本实验比较了咖啡酸四聚体异构体在甲醇、水中的稳定性^[3],结果均在8 h内稳定,而因水价廉易得,故选用水为溶剂。

实验中曾用甲醇-水-甲酸(29 71 0.1)为流动相,结果主峰与邻峰分离不佳。经摸索筛选采用

甲醇-0.5%磷酸水(40 60)分离效果理想。

参考文献:

- [1] Robinson W E J, Reinecke M G. Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 61(5): 268-270.
- [2] Kashiwada Y, Nishizawa M, Yamaagishi T, et al. Anti-AIDS agents, 18. Sodium and potassium salts of caffeic acid tetramers from *Arnebia euchroma* as anti-HIV agents [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(3): 392-400.
- [3] 贺金华,买尔旦. HPLC法测定新疆软紫草中咖啡酸四聚体的含量[J]. *新疆医科大学学报*, 2005, 28(5): 429-430.

HPLC法测定裸花紫珠片中木犀草素

李伟,徐向平,关怀,张艳娜*

(海南九芝堂药业有限公司,海口 570311)

摘要:目的 建立HPLC法测定裸花紫珠片中木犀草素的方法。方法 将裸花紫珠片用酸水解。采用HPLC法测定。色谱柱为Eurosphere 100 C₁₈ (250 mm × 4 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-磷酸(50 50 0.2);柱温:室温;检测波长:350 nm;体积流量:1.0 mL/min;进样量:10 μL。结果 木犀草素在0.029 4~0.147 μg与峰面积呈良好的线性关系, $r=0.999 8$ 。平均回收率为100.4%, RSD为1.92% ($n=6$)。结论 本方法准确,重复性好,专属性高,可用于裸花紫珠片的定量控制。

关键词:裸花紫珠片;木犀草素;高效液相色谱

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2009)04-0578-03

裸花紫珠片为裸花紫珠经提取加工制成的单味药制剂,具有消炎、解毒、收敛、止血的功效,主要用于细菌感染引起的炎症,急性传染肝炎,呼吸道和消化道出血的治疗。裸花紫珠片原为糖衣片,收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中成药成方制剂第6册,缺乏定量控制项。目前有文献报道采用分光光度法测定裸花紫珠片中总黄酮^[1],但该方法干扰多,专属性差。裸花紫珠地上部分中含有木犀草素苷和木犀草素^[2]。因此本实验选择木犀草素为指标成分,对裸花紫珠片中的木犀草素的测定方法进行了研究,以控制裸花紫珠片的质量。

1 仪器与试剂

德国Knauer液相色谱仪,包括K-1001泵、K-2501紫外检测器;Cary 50紫外分光光度计;CQ-10超声波清洗器。

甲醇(色谱纯)、磷酸(分析纯)、纯化水;木犀草

素对照品由中国药品生物制品检定所提供,批号111520-200201;裸花紫珠片由海南九芝堂药业有限公司提供,规格为0.5 g/片。

2 方法与结果

2.1 方法的选择:经预试验,裸花紫珠片可见一个很小的游离木犀草素峰,而裸花紫珠片酸水解物中,与木犀草素对照品相同保留时间处有较大的游离木犀草素峰,可以用酸来水解木犀草素的苷类,采用高效液相色谱法来测定木犀草素,间接控制裸花紫珠片的质量。

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 检测波长的选择:取木犀草素甲醇溶液进行紫外扫描,其最大吸收波长在350 nm附近,选用350 nm作为本品测定的检测波长。

2.2.2 流动相的选择:以甲醇和水作流动相,磷酸调pH值,进行流动相配比试验。甲醇-水的比例依

* 收稿日期:2008-07-04

作者简介:李伟(1966—),男(彝族),云南永仁县人,制药工程师,1988年毕业于上海医科大学药学院(现复旦大学药学院)药学专业,主要从事药物制剂生产管理、质量管理和研究。Tel: (0898) 68631608-8212 E-mail: greatleo @21cn.com