

表 2 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	乌药醚内酯 提取率/%	浸膏得 率/%	综合评 分/%
1	1	1	1	1	41.44	7.02	65.16
2	1	2	2	2	57.44	7.95	84.29
3	1	3	3	3	37.34	6.31	58.67
4	2	1	2	3	64.14	9.63	96.67
5	2	2	3	1	65.13	10.32	100.00
6	2	3	1	2	58.37	9.31	89.83
7	3	1	3	2	61.90	7.86	88.44
8	3	2	1	3	62.59	8.83	92.41
9	3	3	2	1	61.53	8.12	88.95
$K_1$	208.11	250.27	247.40	254.11			
$K_2$	286.50	276.69	269.90	262.55			
$K_3$	269.79	237.44	247.10	247.74			
R	26.13	13.08	7.60	4.94			

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	1136.38	2	568.19	30.89	$P < 0.05$
B	267.07	2	133.54	7.26	
C	114.05	2	57.03	3.10	
D(误差)	36.78	2	18.39		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

### 3 讨论

乌药醚内酯测定方法探索时,进行了确定流动相的试验,发现甲醇与水组合基线波动大于乙腈与水的组合,随着乙腈比例的增加,乌药醚内酯的出峰时间逐渐提前,但与其他成分分离度不理想,最后确定以乙腈-水(57:43)为流动相可使出峰时间与分离度达到比较理想的状况。

在提取工艺的试验中曾比较过回流提取法与超声提取法,发现超声提取法得到的浸膏量较少,不利于进一步试验,于是选用回流提取。本实验按最佳提取工艺放大试验后得到的药材中平均乌药醚内酯总提取量为 118.23 mg/100 g,与梁汉明等<sup>[3]</sup>报道的 CO<sub>2</sub> 超临界提取工艺中最大总萃取量 128.35 mg/100 g 相差不大,但本实验的浸膏得率远大于其萃取的油状物得率,这估计与提取溶剂有很大关系。

参考文献:

[1] 王军伟,阮冰. 乌药的植化及药理研究概况[J]. 浙江中医杂志, 2006, 41(11): 675.  
 [2] 余翠琴,陈方亮. 高效液相色谱法测定乌药中乌药醚内酯[J]. 中草药, 2009, 40(6): 983-984.  
 [3] 梁汉明,郭晓玲,冯毅凡,等. 乌药超临界二氧化碳萃取工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 643-644.

## 共振瑞利散射法测定粉防己中粉防己碱

孙艳,王驰\*

(重庆医科大学药学院,重庆 400016)

摘要:目的 研究刚果红和粉防己碱的结合反应,建立测定粉防己碱的新方法。方法 pH 4.0 BR 缓冲液中,刚果红与粉防己碱通过分子间作用力形成离子缔合物,使  $\lambda_{ex} = \lambda_{em} = 380 \text{ nm}$  波长的共振瑞利散射信号加强。结果该方法在 0.06~0.1 mg/mL 呈线性关系,检测限为 0.3  $\mu\text{g/mL}$ 。对 6 批粉防己中粉防己碱测定的结果与高效液相色谱法基本一致。平均回收率为 98.9%,RSD 为 1.71% ( $n = 6$ )。结论 此方法灵敏度高,稳定性好,可用于粉防己中粉防己碱的测定。

关键词:粉防己;粉防己碱;共振瑞利散射

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2009)07-1081-03

粉防己碱又名汉防己甲素,是千金藤属防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 根中主要生物活性成分,化学结构属双苄基异喹啉化合物,有抗心肌、肾缺血、抗高血压、抗肝纤维化、抗肿瘤多药耐药性、抗缺氧性肺动脉高压等多种药理作用,特

别是作为一种天然的肿瘤细胞多药耐药逆转剂在肿瘤防治方面有其良好的应用前景。目前分析粉防己碱的方法主要是高效液相色谱法<sup>[1]</sup>,薄层扫描法<sup>[2]</sup>和紫外分光光度法<sup>[3]</sup>,但这些方法操作烦琐,且灵敏度较低。弹性光散射是指辐射光波长与入射光波长

\* 收稿日期:2008-09-28

作者简介:孙艳(1980-),女,陕西丹凤人,重庆医科大学药学院硕士研究生,2003年毕业于重庆医科大学药学院,2003-2005年工于丽珠集团苏州新宝制药厂技术部,研究课题:靶向 LH-RH 多肽复合物的制备及效果评价。  
Tel: (023)68485578 E-mail: yanzyanzi710@126.com

相同的一类光散射<sup>[4]</sup>。当散射微粒的尺度远远小于入射光波长时被称为瑞利散射,如果这种瑞利散射位于吸收带附近,则有可能引起散射强度的急剧增加,此种现象被称为瑞利共振散射或共振光散射(resonance light scattering, RLS)。Pasternack 等<sup>[5]</sup>提出了 RLS 技术用于核酸的测定。近年来,运用该技术对核酸<sup>[6,7]</sup>、蛋白质<sup>[8,9]</sup>及无机离子<sup>[10]</sup>等生物大分子进行测定已有许多报道。本实验研究了刚果红与粉防己碱的结合反应,发现刚果红与粉防己碱在 pH 4.0 的 BR 缓冲液中缔合,缔合物的光散射信号明显增强。实验确定了该反应体系的最佳条件,并建立了粉防己中粉防己碱测定的新方法。此方法反应快速、灵敏,操作简单,结果准确。

### 1 仪器与试剂

RF-5301 荧光分光光度计(日本岛津); pH S-3C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂); 美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪, Agilent 1100 UV 检测器及色谱数据处理系统。

粉防己碱(自提,经熔点、TLC、HPLC 法鉴定,质量分数为 98%); 粉防己碱对照品,重庆市药品检验所馈赠(批号: 0711+200005); 粉防己药材购至重庆储奇门中药材市场。实验所用试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。

### 2 方法与结果

2.1 刚果红溶液的配制: 取刚果红适量,加水配制成  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 水溶液,作为染料 CR 溶液。

2.2 BR 缓冲溶液的配制: 用 0.04 mol/L  $H_3PO_4$ 、 $H_3BO_3$ 、 $CH_3COOH$  与 0.2 mol/L NaOH 溶液按一定比例混合,配成 pH 4.0~5.0 的缓冲溶液,并用酸度计校正其 pH 值。

2.3 实验方法: 于 10 mL 比色管中依次加入 1.0 mL BR 缓冲溶液,适量粉防己碱对照品溶液和 1.0 mL CR 溶液,用水稀释至刻度并摇匀,放置 15 min,于荧光分光光度计以  $\lambda_{ex} = \lambda_{em} = 380$  nm 上进行同步扫描,狭缝宽度为 3 nm。记录共振瑞利散射光谱,再分别于最大 RLS 波长处测定体系的散射光强度  $I$  和试剂空白溶液的散射光强度  $I_0$ ,计算  $\Delta I = I - I_0$ 。

2.4 体系共振散射光谱的比较:  $\lambda_{ex} = \lambda_{em}$  条件下,粉防己碱-BR 体系的 RLS 光谱见图 1。可以看出粉防己碱-CR 本身的 RLS 强度都很弱。

粉防己碱带正电荷,可以和带负电荷的 BR 通过静电引力形成离子缔合物,分子截面和折光指数发生变化,使体系的 RLS 强度显著增强,其最大 RLS 波长均位于 380 nm 附近,并且散射强度 ( $\Delta I$ )

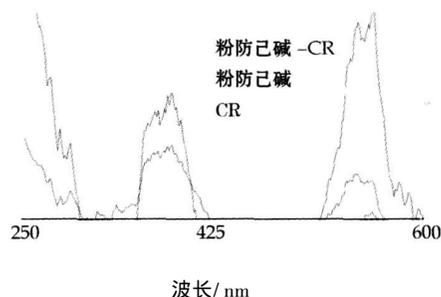


图 1 粉防己碱、CR 及其体系的 RLS 光谱  
Fig. 1 RLS Spectra of tetrandrine, CR, and tetrandrine-CR

随药物浓度增大而增强, 0.0、0.2、0.4、0.6 mg/mL 粉防己碱与  $1 \times 10^{-4}$  mol/L BR 的 RLS 光谱见图 2。可见方法有高灵敏度,因此可用于粉防己碱的测定。

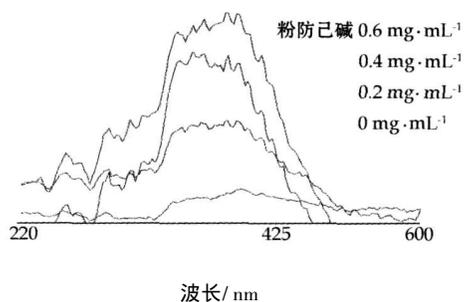


图 2 不同质量浓度粉防己碱与 CR 组成体系的 RLS 光谱

Fig. 2 RLS Spectra of tetrandrine with different concentration and tetrandrine-CR

### 2.5 适宜反应条件

2.5.1 酸度的选择: 当溶液 pH 值在 4.0~5.0,  $1 \times 10^{-4}$  mol/L BR 缓冲液的  $\Delta I$  基本不变,而粉防己碱-CR 缔合物在 pH 4.0~5.0,  $\Delta I$  最大且基本不变。本实验选 pH 4.0 的 BR 缓冲液控制反应酸度。实验表明: 其用量大于 1.0 mL 时, 缔合物的  $\Delta I$  基本不变。因此实验选择缓冲溶液用量为 1.0 mL。

2.5.2 配体的选择: 分别考察了甲基橙、曙红 Y、刚果红与粉防己碱结合反应的 RLS 光谱,结果只有刚果红-粉防己碱体系的 RLS 强度明显增强。本实验选用刚果红作为配体,发现刚果红浓度较小时,不能与粉防己碱充分结合,  $\Delta I$  值较小,当浓度为  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 时,  $\Delta I$  值达到最大且稳定,因此实验选择其浓度为  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L。

2.5.3 试剂的加入顺序: 结果表明,加入顺序为缓冲溶液、粉防己碱溶液、刚果红溶液时,体系的  $\Delta I$  最大且稳定。

2.5.4 反应温度及稳定性: 试剂空白的 RLS 强度不随时间的变化而变化,而 CR 与粉防己碱结合物的 RLS 强度在 15 min 之后达到最大,在室温下能

稳定 12 h, 然后缓慢下降。在 40 °C 水浴中温育 5 h 后发现强度下降, 温育 12 h 后出现蓝色沉淀, 强度进一步下降。因此实验反应时间为 30 min。

2.5.5 共存物质的影响: 在粉防己碱质量浓度为 100 μg/mL 时, 研究多种常见金属离子对反应的干扰作用, 结果见表 1。结果表明多种常见金属离子对测定的干扰很小。

表 1 共存物质对测定结果的影响

Table 1 Effects of coexist substances on results

共存物质	质量浓度/(mg · L <sup>-1</sup> )	RLS 强度变化/%
Cl <sup>-</sup>	1.50	3.9
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.90	5.0
Mg(⊖)	0.90	-2.0
Cu(⊖)	0.90	2.3
Zn(⊖)	0.90	-2.3
K(iv)	1.50	6.9
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.45	2.4

2.6 标准曲线的绘制: 在选择的最佳试验条件下, 以不同质量浓度的粉防己碱按实验方法操作, 并以 Δ 对粉防己碱的质量浓度作图, 绘制标准曲线, 结果粉防己碱在 0.06~0.1 mg/mL 时散射光强度与质量浓度呈线性关系, 其回归方程为  $I = 0.1739C - 0.0282$ ,  $r = 0.9997$ 。

2.7 方法的灵敏度: 实验中采用 RLS 法检出限为 0.3 μg/mL。可见 RLS 法具有较高的灵敏度。

2.8 精密度试验: 取 0.1 mg/mL 的粉防己碱对照品溶液, 连续测定 5 次峰面积值, 计算, 结果 RSD 为 1.67%。

2.9 重现性试验: 取粉碎后混合均匀的粉防己样品 5 份, 制备供试品溶液, 依法测定, 计算粉防己碱的质量分数, 结果 RSD 为 2.07%。

2.10 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 室温放置, 在 0、2、4、6、8 h 后进样测定, 计算粉防己碱的峰面积, 结果 RSD 为 4.57%。

2.11 测定结果: 取防己药材约 1.0 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 测定, 6 批防己药材中粉防己碱测定结果见表 2。可见 RLS 法的测定结果与高效液相色谱法<sup>[1]</sup>基本一致, 因此可以用此方法对粉防己碱进行测定。

### 3 讨论

实验中发现, 影响实验结果的因素较多, 其中 pH 值是一个关键因素。在 pH 4.00 时, 粉防己碱能被充分质子化形成大阳离子, 与染料 CR 结合后

表 2 粉防己中粉防己碱的测定结果

Table 2 Determination of tetrandrine

批号	粉防己碱/%	
	HPLC 法	RLS 法
1	1.12	1.11
2	1.23	1.20
3	1.15	1.17
4	1.25	1.19
5	1.22	1.18
6	1.19	1.22

使 RLS 信号增强且稳定。另外, 加入顺序对散射强度也有明显的影响。原因可能是, 与其他加入顺序相比, 粉防己碱能被更充分的质子化形成大阳离子。CR 与粉防己碱缔合物的 RLS 强度在 15 min 之后达到最大, 在室温下能稳定 12 h, 然后缓慢下降。在 40 °C 水浴中温育 5 h 后发现强度下降, 温育 12 h 后出现蓝色沉淀, 强度进一步下降。说明温度对反应也有明显的影响, 本实验适宜在室温条件下反应 30 min 进行测定。

由于共振瑞利散射是瑞利散射位于或接近于散射分子吸收带时所产生的的一种特殊的散射, 其散射强度比单纯的瑞利散射提高了几个数量级, 并且不再遵循  $I \propto 1/\lambda^4$  的瑞利定律, 因此它是一种共振瑞利散射, 这是散射增强的一个重要原因。

#### 参考文献:

- [1] 冯碧敏, 叶云, 张昊. 高效液相色谱法测定防己中粉防己碱含量[J]. 药物鉴定, 2005, 14(11): 36-37.
- [2] 陈鹏英, 罗毅, 方达仁. 薄层扫描法测定祛风痛合剂中粉防己碱的含量[J]. 实验简报, 2002, 5(8): 478-479.
- [3] 王辉, 罗顺德. 粉防己碱的药理学研究进展[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(12): 800-802.
- [4] Bohren C F, Hufmann D R. *Absorption and Scattering Light by Small Particles* [J]. New York: John Wiley and Sons, 1983.
- [5] Pasternack R F, Bustamante C, Collings P J, et al. Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light scattering technique [J]. *J Am Chem Soc*, 1993, 115(13): 5393.
- [6] Pasternack P F, Collings P F, Giannetta A, et al. Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light scattering technique [J]. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 5393.
- [7] 李珊, 刘忠芳, 刘绍璞. 胰蛋白酶与 DNA 相互作用的共振瑞利散射光谱及其分析应用研究[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(3): 432.
- [8] 刘绍璞, 范莉, 胡小莉, 等. 某些羧基络合型染料与蛋白质相互作用的共振瑞利散射研究[J]. 化学学报, 2004, 62(17): 1635.
- [9] 张爱梅, 刘妮娜. 靛蓝胭脂红共振瑞利散射法测定蛋白质[J]. 分析科学报, 2006, 22(3): 327-329.
- [10] 白燕, 李维嘉, 吴雅琴. 共振瑞利散射法测定微量硒[J]. 分析试验室, 2005, 24(8): 8-11.