

猫豆中猫豆胍制备方法的研究

黄增琼¹, 蒋伟哲², 许小林¹, 赖 术¹, 黄兴振²

(1 右江民族医学院 药理学系, 广西 百色 533000; 2 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 应用制备色谱系统从猫豆中分离纯化猫豆胍, 建立其纯化工艺技术。方法 采用盐酸渗漉法从猫豆中提取猫豆胍, 然后采用制备色谱系统从中分离出猫豆胍。结果 猫豆胍产品经 HPLC 检测, 质量分数达 99% 以上。结论 该方法可获得高质量分数猫豆胍单体, 可用于分离制备猫豆胍对照品。

关键词: 猫豆; 猫豆胍; 制备液相层析系统; 分离纯化

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2010)06-0904-03

猫豆又名猫爪豆、狗爪豆、龙爪豆、狗蹄豆, 是豆科藜豆属植物龙爪藜豆 *Stizobium cochinchinensis* (Lour). Tang et Wang 的种子^[1], 广西是最主要的产区。其主要成分为左旋多巴, 质量分数可达 6%~9%, 是国内提取左旋多巴最主要的原料药材^[2]。猫豆中除含有左旋多巴外还含有猫豆胍, 其化学名为 [3,4-二氢-5-(羟甲基)-4-甲基-3-氧-吡嗪]-胍^[3], 质量分数约为 0.35%, 化学结构式见图 1。前期研究发现, 猫豆胍可协同戊巴比妥钠的镇静催眠作用, 延长硝酸土的宁致小鼠惊厥的反应发生时间和死亡时间^[4]。为获得高质量分数的猫豆胍单体, 本研究采用 AKTA Explorer 100 制备色谱层析系统对猫豆中的猫豆胍进行分离纯化, 并运用 HPLC 和 TLC 进行质量分数测定, 结果表明, 本法可获得高质量分数的猫豆胍单体, 可作为猫豆胍对照品的分离制备方法。

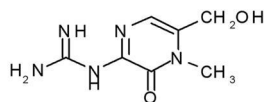


图 1 猫豆胍结构式

Fig. 1 Structure of mucunaguanide

1 材料

猫豆药材由广西邦尔植物制品有限公司提供, 经右江民族医学院附属医院刘春荣副主任中药师鉴定。甲醇(Tedia 公司, 批号 304013); 冰醋酸(成都市科龙化工试剂厂, 批号 20060521)。

AKTA Explorer 100 制备色谱系统, 安玛西亚公司; LC-9000D 高效液相色谱仪, 南宁市威玛龙色谱科技有限公司; Sartorius ME215S 电子天平, 北京赛多丽斯仪器系统有限公司。

2 方法和结果

2.1 样品溶液的制备: 将猫豆粉碎成粗粉, 称取猫豆粗粉 50 g, 用 20 倍量 0.1 mol/L 盐酸浸泡 24 h, 再用 30 倍量 0.1 mol/L 盐酸渗漉提取。渗漉液减压浓缩至 500 mL, 趁热滤过, 滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 所得溶液用于分离纯化。上样液质量浓度按生药计为 0.103 g/mL。

2.2 分离和纯化

2.2.1 色谱条件: 色谱柱(20 cm × 1.6 cm, 60 cm × 1.6 cm, 以安玛西亚的 SOURCE 30RPC 为柱填充料); 流动相为 0.1 mol/L 冰醋酸-甲醇(95:5); 体积流量为 1 mL/min, 紫外检测波长为 320、246、280 nm。进样方式: 样品泵 P-960 自动进样, 1 mL 样品环; 收集器: Prac-900 自动收集器; 上样量: 1 mL。

2.2.2 收集方式: 第一次以短柱分离, 运用 Prac-900 进行自动峰收集。方式为 0.00 Base Time, 11.90 Outlet Valve F3, 15.50 Outlet Valve Waste F1, 15.50 End_Block。将峰收集液浓缩至 500 mL, 按以上色谱条件和进样方式采用长柱进行第二次分离, 收集方式为 0.00 Base Time, 19.00 Outlet Valve F3, 32.00 Outlet Valve Waste F1, 32.00 End_Block。将第二次峰收集液减压浓缩, 干燥, 得白色粉末 16.7 mg, 即猫豆胍, 得率为 0.033%。第一次和第二次峰收集色谱图见图 2。收集液分别经 HPLC 检测, 第一次收集液仍含有少量左旋多巴, 第二次收集液质量分数较高, 几乎不含左旋多巴。

2.3 TLC 法鉴别: 取第二次峰收集液和猫豆提取液分别点于同一以 0.5% 羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 点样量约为 5 μL。以醋酸乙

①收稿日期: 2009-09-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30760309); 广西青年科学基金项目(桂科青 0991094)

作者简介: 黄增琼(1979-), 男(壮族), 广西南宁市人, 讲师, 在读博士, 研究方向为新药研究与开发、生物材料。

E-mail: huangzengqiong@163.com

* 通讯作者 蒋伟哲 Tel: 13607713097 E-mail: jiangweizhe6812@yahoo.com.cn

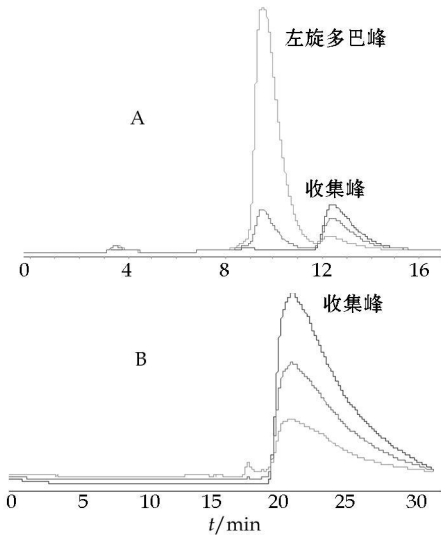


图 2 第 1 次(A)和第 2 次(B)分离图谱
Fig. 2 Chromatograms of primary (A) and second (B) separating

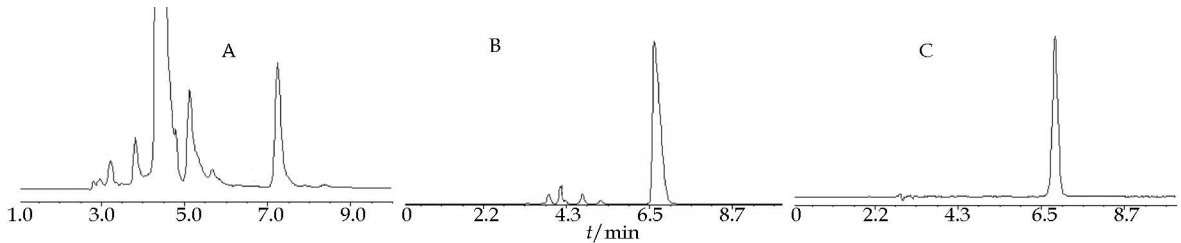


图 3 猫豆提取液(A)、第 1 次收集液(B)和第 2 次收集液(C)的高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC Chromatograms of extract solution from seed of *S. cochinchinensis* (A), primary elution sample (B), and second elution sample (C)

表 1 猫豆胍中质量分数测定结果

Table 1 Determination of mucunaguinide content

样品	波长 λ /nm	理论塔板数	质量分数/%	平均值/%
第一次收集液	246	8 811	93.45	95.28
	280	7 778	93.12	
	320	5 850	99.26	
第二次收集液	246	5 684	98.93	99.32
	280	5 282	99.27	
	320	11 323	99.76	

结果表明,运用 AKTA Explorer 100 制备色谱层析系统从猫豆中分离猫豆胍,质量分数达到了 99.0% 以上,该法适用于分离纯化猫豆胍单体。

3 讨论

洗脱时,当体积流量为 3 mL/min 的时候,猫豆胍的保留时间缩短,但分离度也随之降低;体积流量为 0.5 mL/min 时,分离度虽然较好,但是峰形变宽,保留时间变长。经反复探索,以 1 mL/min 的流速较佳,既缩短了保留时间,又达到良好的分离度。随着上样体积的增加,分离度会逐渐降低;当上样体积大于 2 mL 后,猫豆胍峰与左旋多巴峰很难分开。

酯甲酸水(10:2:3)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(365 nm)下检视,得薄层色谱图。结果在第二次峰收集液和猫豆盐酸提取液相应位置上,显相同的蓝紫色荧光斑点,且第二次峰收集液为单一斑点,说明所收集峰的样品质量分数较高。

2.4 质量分数的 HPLC 法测定

2.4.1 色谱条件:色谱柱为 Phenomenex™ C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.1 mol/L 冰醋酸-甲醇(95:5);体积流量 1 mL/min;紫外检测波长 246、280、320 nm;进样量 20 μL;柱温为室温。理论塔板数按猫豆胍峰计算,应不低于 5 000。

2.4.2 测定结果:取猫豆提取液、第一次峰收集液、第二次峰收集液,分别在 0.45 μm 微孔过滤器中滤过,作为待测液。按峰面积归一化法测定收集液在 3 个不同波长下的质量分数。它们在 280nm 波长下的 HPLC 色谱图见图 3。结果见表 1。

上样体积为 0.5 mL 时,分离度好,但一次分离得到的样品少,耗时长。所以,确定上样体积为 1 mL。采用猫豆中左旋多巴测定的流动相条件 0.1 mol/L 冰醋酸-甲醇(90:10)^[5] 进行洗脱,样品出峰时间过早,分离度小,无法进行峰收集。改为 0.1 mol/L 冰醋酸-甲醇(98:2)时,出峰时间过长,耗时大。经反复实验,以 0.1 mol/L 冰醋酸-甲醇(95:5) 进行洗脱效果较好。

实验中采用 246、280、320 nm 波长同时监测,有利于确定峰收集时间。猫豆胍的最大吸收波长在 320 nm 左右,次大吸收波长在 246 nm 附近。而左旋多巴在 280 nm 波长有较大吸收,246 nm 波长也有一定吸收,但 320 nm 处无吸收。如单纯采用 320 nm 进行监测,左旋多巴在该波长条件下无吸收,很难确定猫豆胍的峰收集时间。采用 246 nm 或 280 nm 监测,猫豆胍在这两个波长条件下吸收度较小,不利于确定峰收集时间。因此,采用 3 个波长同时监测,可确保峰收集完全。

采用 TLC 法进行鉴别和质量分数测定时,对不

同的展开系统进行了考察。以氯仿 醋酸乙酯 甲酸 (5:4:1) 为展开剂进行实验, 样品无法展开; 以正丁醇 冰醋酸 水 (4:1:5) 展开时, 展开速度慢, 分离效果差, 脱尾较严重。以本实验所采用的展开系统进行鉴别和测定质量分数, 效果较好。

结果表明, 运用安玛西亚的 AKTA Explorer 100 制备色谱系统分离猫豆胍对照品, 具有自动化程度高, 收集全面等优点, 而且样品质量分数高。该法可作为猫豆胍对照品的分离制备方法。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上册. 上海: 上海科学技术出版社, 1977.
- [2] 蒋伟哲, 周燕文, 吴 闯, 等. 不同产地猫豆中左旋多巴的含量比较[J]. 中草药, 2000, 31(11): 861.
- [3] 广西医科大学. 一种生物碱类化合物及其制备方法和用途[P]. 中国: 200810073635.9, 2008.06.20.
- [4] 黄增琼, 蒋伟哲, 黄兴振, 等. 猫豆胍镇静催眠和抗震颤麻痹作用研究[J]. 中草药, 2009, 40(2): 276-278.
- [5] 黄海滨, 许学健, 奉建芳. 高效液相色谱法测定猫豆中左旋多巴的含量[J]. 广西植物, 1994, 14(3): 293-294.

驴胶补血颗粒的壳聚糖纯化工艺研究

谢 安, 周文龙, 杨顺龙, 廖志雄

(九芝堂股份有限公司, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 对驴胶补血颗粒提取液的纯化工艺进行研究。方法 采用壳聚糖为絮凝剂的絮凝澄清法纯化提取药液, 并以干膏得率、多糖量为考察指标对絮凝澄清工艺参数进行优选。结果 以絮凝前药液浓缩至密度为 1.06 (60℃测定), 絮凝时药液温度为 45~85℃, 加入 5% 的壳聚糖溶液进行絮凝为最佳工艺。结论 采用此方法能有效去除提取药液中的鞣质等亲水性杂质, 同时具有生产周期短、工艺简单、成本低廉及环保等特点。

关键词: 驴胶补血颗粒; 壳聚糖; 絮凝澄清; 纯化

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2010)06-0906-03

驴胶补血颗粒由黄芪、党参、熟地、白术、当归、阿胶 6 味中药组成, 具有滋阴补血, 健脾益气, 调经活血的功能, 主要用于久病体虚, 气虚血亏型月经不调等妇女疾患。本品提取工艺中采用传统的水提醇沉法, 经醇沉回收乙醇的药液往往黏性较大, 较难浓缩、干燥, 制粒亦困难且易吸潮霉变, 且醇沉处理生产周期长, 成本高。采用壳聚糖为絮凝剂的絮凝澄清法优于醇沉法, 提取液经处理后有效成分损失少, 易于浓缩、干燥, 其干膏不易吸湿, 且工艺简单、成本低廉^[1-6]。本实验采用壳聚糖为絮凝剂的絮凝澄清法纯化提取药液, 并以固形物保留率、多糖为考察指标对絮凝澄清工艺参数进行优选。

1 仪器与材料

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用)。药材均为道地药材, 由九芝堂商南植物药有限公司提供, 由九芝堂股份有限公司质量中心检测合格; 壳聚糖(南通兴城生物制品厂), D-无水葡萄糖对照品(批号: 110833-200302) 由中国药品生物制品检定所提供, 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其他

试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 驴胶补血颗粒提取药液的制备: 按处方比例称取药材, 加水煎煮 3 次, 第 1 次 1.5h, 第 2、3 次各 1h, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩, 即得。

2.2 固形物保留率的测定: 取絮凝前后的样品溶液各 25.0 mL, 分别置于干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105℃干燥至恒重, 称定质量, 计算絮凝前后固形物保留率。

2.3 干膏得率的测定: 精密吸取 10 mL 絮凝后的浸膏, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105℃干燥 3h, 取出, 立即置干燥器中冷却 0.5h, 称定质量, 计算干膏得率。

2.4 多糖的测定

2.4.1 对照品溶液的制备: 取 105℃下干燥至恒重的 D-无水葡萄糖约 51.6 mg, 精密测定, 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4.2 供试品溶液的制备: 分别精密吸取絮凝液 10 mL, 加 5 倍量无水乙醇至含醇量达 83.33%, 离

①收稿日期: 2009-10-18

作者简介: 谢 安(1966—), 女, 湖南长沙人, 硕士, 高级工程师, 从事新药研究与开发多年, T el: (0731) 84499775