

动物出现呼吸困难、挣扎等症状,死亡动物行尸体解剖肉眼观肝、肾、心、肺、脑、脾、胸腺等重要器官无明显异常发现,但多数动物十二指肠色红充血。

将试验所得数据(表 1),用 Bliss 法求得冬凌草二萜类成分 LD₅₀为1.138 g•kg⁻¹,其 95% 可信限为0.949~ 1.397 g•kg⁻¹。急性毒性正式试验的各组给药剂量与小鼠死亡率见表 3。对存活小鼠连续观察 14 d,一般情况良好,未见其他不良反应情况出现。给药后的存活小鼠观察至 3,7,14 d,用 SPSS 13.0 软件行方差分析,各给药组小鼠体质量与阴性对照组比较,差异无显著性(*P*> 0.05)。见表 4。

表 4 急性毒性正式试验的小鼠体质量变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Changes of weight of mice in the acute toxicity formal test($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i> /只	剂量/g•kg ⁻¹	体质量/g			
			给药前	给药后 3 d 时	给药后 7 d 时	给药后 14 d 时
给药 1	10	2.00	21.3±2.4	27.6±1.1(2)	31.0±1.4(2)	30.2±2.1(2)
给药 2	10	1.52	21.1±2.2	27.3±3.1(2)	31.6±2.4(2)	32.5±4.0(2)
给药 3	10	1.15	20.4±2.0	26.4±2.2(4)	28.7±2.5(4)	30.8±3.8(4)
给药 4	10	0.87	21.0±1.5	25.2±2.1(7)	28.5±1.7(7)	29.7±42.0(7)
给药 5	10	0.66	21.5±2.0	27.0±2.8(9)	29.4±2.9(9)	31.4±3.2(9)
给药 6	10	0.50	20.0±2.9	25.1±3.6	28.7±4.2	31.3±4.7
阴性对照	10	等容量的 0.6% CMC-Na 溶液	21.2±2.5	25.3±2.7	30.0±3.3	31.2±4.7

注:与阴性对照组比较,各给药组体质量 *P*> 0.05;表中括号数据为该组动物存活只数

3 讨论

在预试验中,冬凌草二萜类成分对小鼠的 0% 和 100% 致死剂量分别为0.50 g•kg⁻¹和 2.00 g•kg⁻¹。正式试验时,最小给药剂量0.50 g•kg⁻¹得到了与预试验相同的 0% 死亡率,但最大给药剂量2.00 g•kg⁻¹的死亡率 80%,并未得到预试验中 100% 死亡率。究其原因,可能与试验的随机误差有关,随机误差仍服从统计规律。因冬凌草二萜类成分脂溶性较大,以水或食用油稀释,二萜类成分溶解性不好,经多次反复试验,选择0.6% 的 CMC-Na 水溶液作为混悬剂和阴性对照。

LD₅₀作为对一个药物毒性大小的粗略估计,与药物毒性呈反比关系^[5]。本实验按 Bliss 法设计,测得冬凌草二萜类成分 LD₅₀为1.138 g•kg⁻¹,LD₅₀的 95% 的可信限为0.949~ 1.397 g•kg⁻¹。但急性毒性试验不等于 LD₅₀测定,急性毒性试验结果仅提供 LD₅₀值是不够的,试验期间应详细记录动物的毒性反应情况和死亡动物分布,尤其是中毒和死亡的发生时间、毒性反应的持续时间和恢复时间^[6]。冬凌草二萜类成分中毒为急性中毒。2 h 之内死亡的小鼠数(13 只)相当于整个急性毒性试验小鼠死亡数(26 只)的 50%。给药 1,2 组存活小鼠在 20 h 后,给药 3,4,5 组存活小鼠在 15 h 后,给药 6 组存活小鼠在 3 h 后异常体征趋向恢复,阴性对照小鼠未见异常。给药后 24 h 之内未中毒死亡的小鼠,观察至第 3,7,14 天,各给药组小鼠体质量与阴性对照组比较,呈平行增长,差异无显著性。剖检发现,多数动物出现十二指肠色红充血,究其原因,冬凌草具有活血作用^[1],冬凌草甲素可能有舒张外周血管的作用,推测中毒剂量的冬凌草二萜类成分是否可引起十二指肠黏膜水肿和充血而引发炎症反应,有待进一步研究。

参考文献:

[1] 侯士良. 中药八百味详解 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2009: 1: 204.

表 3 急性毒性正式试验的给药剂量与小鼠死亡率

Tab 3 The dose of the formal acute toxicity test and death rate of mice

组别	动物数/只	剂量/g•kg ⁻¹	死亡数/只	<i>P</i> /%
给药 1	10	2.00	8	80
给药 2	10	1.52	8	80
给药 3	10	1.15	6	60
给药 4	10	0.87	3	30
给药 5	10	0.66	1	10
给药 6	10	0.50	0	0
阴性对照	10	等容量的 0.6% CMC-Na 溶液	0	0

[2] 刘净, 谢韬. 冬凌草化学成分的研究[J]. 中草药, 2007, 38 (1): 25-27.

[3] 杨中汉, 田京城. 冬凌草叶中冬凌草甲、乙素的含量测定[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2005, 26(4): 53-55.

[4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 112.

[5] 李寅超, 赵宜红. 辛夷挥发油半数致死量(LD₅₀)的测定[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(21): 1885-1886.

[6] 王瑞, 展晓日, 乔延江. 附子总碱提取物的急性毒性实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 102-103.

[收稿日期] 2010-03-22

高效液相色谱法测定护肝颗粒中绿原酸的含量

王永斌¹, 贾忠¹, 王兴刚¹, 蔡军¹, 王小红² (1. 兰州市肺科医院药剂科, 甘肃 兰州 730046; 2. 兰州大学药学院药物化学研究所, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 目的: 建立护肝颗粒中绿原酸含量的 HPLC 测定法。方法: 色谱柱为 C₁₈ Alltech Hypersil ODS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4% 磷酸溶液(1: 9), 流速 1.0 mL•min⁻¹, 进样量 10 μL, 检测波长 327 nm。结果: 绿原酸在 0.068~ 1.71 μg 内线性关系良好, *r* = 0.999 8, 平均加样回收率 101.4%, RSD 为 2.67%, 阴性对照无干扰。结论: 该法操作简便, 结果准确, 重复性好。

[关键词] 高效液相色谱法; 护肝颗粒; 绿原酸

[中图分类号] R927 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213 (2011) 02-0164-03

护肝颗粒为兰州肺科医院研发的医院制剂, 由茵陈、青

[基金项目] 兰州市科技计划项目(编号: 2008-1-74) [作者简介] 王永斌, 男, 学士, 副主任医师, 电话: 13893490901 [通讯作者] 贾忠, 男, 硕士, 主任药师, 电话: 13893479811, E-mail: lz-jiaz@163.com

皮、枸杞子等 7 味药组方,具有利胆退黄,补肝益肾功能,临床实验观察证明对抗结核药物引起的肝损伤疗效确切,但未见文献报道。本实验用 HPLC 法测定其中绿原酸含量。

1 材料

美国 SPS1800 型高效液相色谱仪,包括:真空在线脱气机、柱温箱、SPD210A 紫外检测器、自动进样器、化学工作站;RE-52C 型旋转蒸发器(巩义市英峪予华仪器厂);绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0753 200311);茵陈等药材(甘肃效灵生物开发有限责任公司);护肝颗粒(每克相当于生药 3.2 g,兰州市肺科医院);乙腈为色谱纯;其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3] 色谱柱: C₁₈ (Alltech Hypersil ODS 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 0.4% 磷酸溶液(1:9); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL; 检测波长: 327 nm; 柱温: 室温。在此色谱条件下,样品中绿原酸与其他成分得到较好分离,分离度值大于 1.5,理论塔板数为 3 000 以上。

2.2 对照溶液制备 精密称取绿原酸对照品 17.10 mg,置 100 mL 棕色量瓶中,加 30% 甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.3 标准曲线的制作 精密取对照品溶液适量,分别加 30% 甲醇稀释成 6.8, 13.6, 20.4, 27.2, 34, 68.0, 171.0 mg·L⁻¹。分别吸取 10 μL,注入液相色谱仪中,按“2.1”色谱条件测定峰面积,将对照品量与峰面积进行回归处理,得回归方程为 Y=22.010 6X-0.263 5, r=0.999 8(n=7),表明绿原酸对照品在 0.068~1.71 μg 范围内呈良好的线性关系。

2.4 样品溶液的制备

2.4.1 样品提取溶剂选择 绿原酸含量测定样品溶液的制备方法,多以甲醇、50% 甲醇、乙醇等为溶剂进行提取^[4],因此取本品适量,研细,精密称取约 0.4 g,共 12 份,分为 4 组,每组 3 份。置具塞三角瓶中,各组分别选择甲醇、30% 甲醇、50% 甲醇、乙醇各 30 mL 为提取溶剂,超声处理 30 min[功率 (250±70) W,频率 (33±2) kHz],蒸除溶剂,残渣用 30% 甲醇溶解并转移至 100 mL 量瓶中,加 30% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,测定含量。结果显示 30% 甲醇作为溶剂提取最好。见表 1。

表 1 样品提取溶剂选择结果(n=3)

Tab 1 Selectivity of extraction solvent (n=3)		
溶剂	含量/ %	RSD/ %
甲醇	0.434	2.11
30% 甲醇	0.466	1.59
50% 甲醇	0.416	2.47
乙醇	0.452	2.78

2.4.2 提取溶剂用量考察 同“2.4.1”取本品处理,于各组具塞三角瓶中分别精密加入 30% 甲醇 25, 50, 100 mL,同“2.4.1”处理。结果 50 mL 基本完全提取绿原酸。见表 2。

表 2 提取溶剂用量考察结果(n=3)

Tab 2 Results of investigation on the volume of solvents for extraction (n=3)		
30% 甲醇/ mL	含量/ %	RSD/ %
25	0.404	2.32
50	0.462	1.77
100	0.472	1.94

2.4.3 样品提取时间考察 同“2.4.1”取本品处理,于各组具塞三角瓶中分别精密加入 30% 甲醇 50 mL,各组分别超声

处理 25, 50, 75 min。然后仍同“2.4.1”处理。结果显示超声提取 50 min 基本完全提取绿原酸。见表 3。

表 3 样品提取时间考察结果(n=3)

Tab 3 Investigation of extraction time (n=3)		
时间/ min	含量/ %	RSD/ %
25	0.440	2.64
50	0.466	1.92
75	0.473	2.16

2.4.4 样品溶液的制备 取护肝颗粒适量,研细,取 0.4 g,精密称定,置具塞三角瓶中,精密加入 30% 甲醇 50 mL,超声处理 50 min,后处理同“2.4.1”。

2.5 精密度与重复性试验 精密吸取上述对照品溶液,按标准曲线项下方法操作,连续重复测定 6 次, RSD 为 0.68%。取同批本品,共 6 份,每份约 0.4 g,精密称定,按样品溶液的制备项下处理并测定,该批样品绿原酸含量为 46.17 mg·g⁻¹, RSD 为 0.90%。结果表明本方法重复性好。

2.6 加样回收率试验 取上述已知绿原酸含量 0.462% 的本品粉末,共 6 份,每份 0.2 g,分为 3 组,每组 2 份,精密称定,3 组样品分别精密加入对照品溶液 5, 7.5, 10 mL,按样品溶液的制备项下处理并测定,结果见表 4。结果表明,本法加样回收率良好。

表 4 加样回收率试验

Tab 4 Experiment of recovery rate				
样品含量/ mg	加入对照品/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %
0.923	0.855	1.890	106.3	101.4
0.923	0.855	1.757	98.8	
0.923	1.283	2.204	99.9	
0.923	1.283	2.226	101.6	
0.923	1.710	2.625	99.7	
0.923	1.710	2.694	102.3	

2.7 稳定性试验 取本品粉末精密称定 0.42 mg,按“2.4.4”项下处理,分别在 0, 3, 6, 12 h 分别进样,记录峰面积, RSD 为 0.89%。表明样品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.8 阴性对照试验 取缺茵陈的样品,照样品溶液制备方法处理制得阴性对照溶液。分别精密吸取对照品溶液、样品溶液和阴性样品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪,结果在与对照品色谱峰相应的位置上,阴性对照无干扰。

2.9 样品测定及结果 分别精密量取对照品溶液 10, 20 μL,供试品溶液 15 μL,注入液相色谱仪,计算供试品的含量,即得。结果见表 5。

表 5 护肝颗粒中绿原酸的含量测定结果(n=3)

Tab 5 Determination of the contents of chlorogenic acid in liver protective granules(n=3)		
批号	含量/ %	RSD/ %
090302	0.459	1.71
081201	0.471	1.91
090104	0.461	1.35

3 讨论

护肝颗粒具有利胆退黄,补肝益肾功能。方中茵陈为君药,因此选择茵陈的有效成分绿原酸为质控指标。该制剂与文献报道[1]有相似之处,含脂溶性成分较多,如脂溶性较高溶剂提取如甲醇,进样后极易堵塞色谱柱,分离效果也不好。故文献[1]采用氯仿脱脂,50% 甲醇提取。操作比较复杂。本法用 30% 甲醇提取,既保证了指标成分绿原酸的提

取,又去除了大部分脂溶性成分。该方法操作简便、稳定、可行。

参考文献:

- [1] 王敏春,王苑桃,温彩喜. HPLC 测定护肝片中绿原酸的含量[J]. 陕西中医, 2008, 29(7): 894-895.
- [2] 刘莉,于晓瑾. 正交设计优选茵山莲颗粒提取工艺[J]. 黑龙江中医药, 2006, 20(5): 46-48.
- [3] 陈怀冰. HPLC 法测定感冒灵颗粒中绿原酸的含量[J]. 海峡药学, 2009, 21(1): 342-345.
- [4] 卓菊,孙春燕. 高效液相色谱法测定茵陈清肝颗粒中绿原酸的含量[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(6): 509-510.

[收稿日期] 2010-07-10

高效液相色谱法测定合日呼-5 中栀子苷的含量

邹继红¹, 王洪斌² (1. 赤峰学院医学院, 内蒙古 赤峰 024000; 2. 赤峰市传染病防治医院, 内蒙古 赤峰 024000)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定合日呼-5 中栀子苷含量的方法。方法: 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 三乙胺溶液(用磷酸调 pH 7.0)-乙腈(85:15), 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长为 238 nm。结果: 栀子苷在 12.25~196 mg·L⁻¹ 范围内与峰面积呈良好的线性, 回归方程为 $Y = 2.840 \times 10^4 X + 3.095$ ($r = 0.9998$); 平均加样回收率为 98.49%, RSD 为 1.74%。结论: 该方法简便、快速、准确, 适用于合日呼-5 中栀子苷的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 合日呼-5; 栀子苷; 含量测定

[中图分类号] R927.2 [文献标识码] A [文章编号] 1004-5213(2011)02-0166-02

合日呼-5 是蒙医传统药方, 出自蒙医经典著作《观者之喜》、《蒙医百科全书》、《蒙药方剂学(统编教材)》、《中华人民共和国卫生部药品标准(蒙药分册)》均有记载。该方由苦参、栀子、诃子、川楝子、地格达等药组成, 具有清热、凉血之功效^[1], 蒙医临床上主要用于热性协日乌苏引起的关节病和皮肤病。为了有效控制该制剂的质量, 本实验采用高效液相色谱法对合日呼-5 中的栀子苷进行测定。

1 材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); UV765 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); 栀子苷对照品(批号 110749 200613, 纯度 ≥98%, 中国药品生物制品检定所); 蒙药合日呼-5(赤峰市蒙医研究所科研制剂室, 批号 050819, 050820, 050821); 阴性对照品的药材(内蒙古赤峰市中蒙医院); 乙腈为色谱纯; 水为娃哈哈纯净水; 甲醇、磷酸和三乙胺均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Eclipse XDB C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温: 室温; 流动相: 0.1% 三乙胺溶液(磷酸调 pH 7.0)-乙腈(85:15); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 238 nm; 进样量 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取栀子苷对照品 4.9 mg, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 并稀释至刻度, 即得 196 mg·L⁻¹ 的栀子苷对照品贮备溶液。精密吸取对照品贮备溶液 2 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 即得 39.2 mg·L⁻¹ 的栀子苷对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取蒙药合日呼-5 0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率: 250 W, 频率: 40 KHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方比例制备不含栀子药材的阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 方法专属性 取栀子苷对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 进样测定, 结果见图 1。由图可知阴性对照对栀子苷的测定无干扰, 而且栀子苷与其他组分可达到基线分离, 栀子苷的保留时间在 4.2 min 左右。

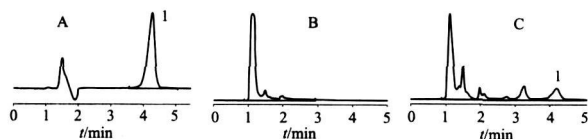


图 1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 阴性对照品; C. 供试品; † 栀子苷

Fig 1 Chromatograms of HPLC

A. standard; B. negative sample; C. test sample; † gardenoside

2.4 线性关系考察 分别精密吸取栀子苷对照品贮备溶液适量, 采用倍比稀释法制成系列浓度的栀子苷溶液。分别精密吸取每一份栀子苷溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 测定峰面积, 以栀子苷溶液质量浓度 X (mg·L⁻¹) 为横坐标, 峰面积值 Y 为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 2.840 \times 10^4 X + 3.095$ ($r = 0.9998$)。结果表明, 栀子苷在 12.25~196 mg·L⁻¹ 范围内峰面积与浓度具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积。结果峰面积的 RSD 为 0.62%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液, 分别于室温放置 0, 4, 8, 12, 24 h 后, 按“2.1”项下色谱条件进样, 测定峰面积, 结果栀子苷峰面积的 RSD 为 0.96%, 表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称取同一批样品(批号 050821), 按“2.2.2”项下方法, 平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定。结果样品中栀子苷的平均含量为 8.980 mg·g⁻¹, RSD 为 1.07%, 表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取 0.1 g 已知栀子苷含量的同一批(批号 050821, 含量: 8.980 mg·g⁻¹) 样品粉末 6 份, 分别置具塞锥形瓶中, 精密加入栀子苷对照品贮备溶液 4, 4.5, 5 mL (即加入栀子苷 0.784, 0.882, 0.980 mg), 按“2.2.2”项下方法制备供试液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。

2.9 样品的测定 取不同批号的供试品 3 批, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取对照品溶液和供试品