

材中香草酸、反式对香豆酸、牡荆素3种指标性成分,更好地控制了药材的质量,并且实验方法准确可靠,灵敏度高、重现性好,为淡竹叶药材的质量评价提供了有价值的参考。

3.2 通过对照品贮备液在200~400 nm进行紫外波长扫描,得出各自的紫外吸收曲线,根据相应的出峰时间确定波长切换梯度,使3种成分均在最大吸收波长测定,使测定结果更加灵敏、准确。

3.3 本实验比较了超声提取、水浴回流提取和索式提取的提取效果,最终确定水浴加热回流是最佳提取方法。同时通过正交设计实验考察了提取溶剂,提取时间,溶剂用量和提取次数对提取效果的影响。结果表明,以60%乙醇、60 mL、加热回流2 h提取效果最好。验证了提取时间过长使牡荆素(苷)降解,提取含量并不高。考虑到3种成分均偏酸性,因此加入盐酸调pH=3,使3种成分充分游离出来,便于提取完全。

3.4 淡竹叶药材中含较多如氨基酸、糖类等大极性成分,药材提取液杂质较多,直接测定会影响所测成分的分度并且达不到基线,影响各成分的准确测定,因此采用大孔吸附树脂除杂。本实验考察了不同极性大孔吸附树脂处理效果,比较各经过处理的样品色谱图,最终选用AB-8大孔吸附树脂。

该树脂能使淡竹叶药材提取液中的杂质除去,色谱图各峰之间分离度较好,达到基线分离,并且使所测3种成分损失较少。本实验考察了该树脂对淡竹叶药材提取液的吸附与解析能力,确定了最佳上样量、流速、所用洗脱溶剂乙醇的浓度梯度及洗脱溶剂体积。最终收集40%和60%乙醇流出液,经处理测定含量。

3.5 从表2可以看出不同来源的淡竹叶3种指标性成分含量差别很大,来自甘肃、上海、鞍山、沈阳的药材与其他商品地的相比含量较低。这可能由于是受生长环境不同所致。因此,淡竹叶应用于临床之前应对其质量进行评价。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 宋秋辉,吴启南.中药淡竹叶的研究进展[J].中华中医药学刊,2007,25(3):526-527.
- [3] 陈泉,吴立军,王军,等.中药淡竹叶的化学成分研究[J].沈阳药科大学学报,2002,19(1):23-24.
- [4] 周媛,程凡.大孔树脂对葛根总黄酮的吸附及分离纯化研究[J].时珍国医国药,2007,18(12):3009.

断血流皂苷A血浆浓度的自动柱切换高效液相色谱法测定

陈娇婷¹, 詹怡飞², 王跃生^{3*}

(1. 赣南医学院药学院, 江西 赣州 341000; 2. 湖州营养与健康产业创新中心, 浙江 湖州 313000; 3. 国家中药固体制剂工程中心, 江西 南昌 330000)

关键词:断血流皂苷A; 血浆浓度; 高效液相; 自动柱切换

摘要:目的:建立断血流皂苷A的柱切换高效液相色谱测定方法。方法:应用柱切换装置,预处理柱(PC):大连装Kromasil C₁₈(20 mm×4 mm, 5 μm);预处理流动相:甲醇-水;预处理流动相流速:1.0 mL/min;分析柱(AC):Lichrospher 100 RP-18e(250 mm×4 mm, 5 μm);分析流动相:甲醇-0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(磷酸调pH=3.0)(60:40);分析流动相流速:0.6 mL/min;分析柱柱温:45℃;检测波长:250 nm。结果:断血流皂苷A在15~45 μg/mL范围内具有良好的线性关系($r=0.9995$),净化回收率和方法回收率平均为96.6%和100.45%。日内和日间精密度的均小于10%。结论:本方法简便、快速、灵敏、准确,适于血样的分析。

中图分类号:R284.1

文献标识码:B

文章编号:1001-1528(2010)09-1626-03

断血流皂苷A(clinopodiside A)为中药断血流的主要成分,具有止血功效^[1],属于齐墩果烷型三萜皂苷类,含量较高,且化学性质稳定。

柱切换技术采用切换阀连接2根或2根以上相同或不同分离机理的色谱柱,通过改变流动相走向,在上一根色谱柱完成被测组份与干扰杂质的分离,达到纯化与富集的目的。

在随后的色谱柱完成被测组份的测定。因此,该技术可实现对复杂样品的直接进样分析,基本克服了以往样品前处理复杂、繁琐且耗费试剂、人工等缺点,使得该技术在分析含量低、干扰大、检测困难的复杂样品时显示出巨大的优越性。同时,该技术可实现柱前、柱后、痕量富集及制备等操作,并易于实现自动化操作^[2,3,4]。本实验建立断血流皂苷A血浆

收稿日期:2009-06-05

基金项目:江西省卫生厅中医药科研项目(2008A123)

作者简介:陈娇婷,女,硕士,讲师,研究方向:药物新剂型与新技术。Tel:15870715767

* 通讯作者:王跃生,男,博士生导师,教授,研究方向:药物新剂型与新技术。Tel:(0791)7119638

浓度的柱切换高效液相色谱测定方法。为今后阐明断血流皂苷A的体内药代动力学行为、新药研发以及相关制剂研究提供指导和依据。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 公司 1100 系列高效液相色谱仪(包括 DAD 检测器);FCV-2A 高压切换阀;高速离心机(上海安宁科学仪器有限公司);BSZ-2 型自动双重水蒸馏系统(上海博通);SartoriusBP221S 型电子天平(美国 Sartorius 公司);TG328B 型析天平(万分之一天平)(上海天平仪器厂)。

断血流皂苷 A 对照品(中国药品生物制品检定所),甲醇为色谱纯,水为三重蒸馏水(自制),其余试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 预处理柱(简称 PC):大连装 Kromasil C₁₈(20 mm × 4 mm 5 μm);预处理流动相(简称 PMP):甲醇-水;预处理流动相流速:1.0 mL/min;分析柱(简称 AC):Li-chrospher 100 RP-18e(250 mm × 4 mm 5 μm);分析流动相(简称 AMP):甲醇-0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(磷酸调 pH=3.0)(60:40);分析流动相流速:0.6 mL/min;分析柱柱温:45 °C;检测波长:250 nm。

1.2.2 对照品溶液的配制 精密称取干燥至恒重的断血流皂苷 A 对照品 7.5 mg,置 25 mL 量瓶中,用分析流动相溶解,并稀释至刻度,摇匀,即得含断血流皂苷 A 为 0.3 mg/mL 的对照品溶液。

1.2.3 样品处理步骤 取大鼠血浆样品 1.0 mL,置 2 mL 具塞离心试管中,加 0.3 mol/L 的三氯乙酸 0.2 mL,离心(4 000 r/min,10 min)精密量取上清液置于试管中,氮气吹干,残渣用 15% 甲醇溶液转入 1 mL 量瓶中,加 15% 甲醇至刻度,摇匀,滤过,作为供试品溶液。

1.2.4 柱切换系统及操作 本实验应用自装定时装置,控制切换阀自动切换。该装置可预置 T1(样品预处理时间)和 T2(AC 与 PC 串联时间)。样品进样的同时启动该装置,首先使切换阀处于 PC 与 AC 并联的 A(预处理)状态,经 T1(2 min)时间的预处理后切换阀自动切换至 PC 与 AC 串联的 B 状态,使保留在 PC 上的样品组分被 AMP 洗脱至 AC 上,经 T2(2 min)时间后,即自动切回初始 A 状态;待下次进样时再次启动该装置重复操作。

2 结果

2.1 色谱行为 样品的 CSHPLC 分析图谱见图 1 断血流皂苷 A 保留时间约为 7 min,血浆内源性杂质干扰较小,样品峰形良好。

2.2 线性关系 取空白大鼠血清 1 mL,加入上述对照品溶液 0.5 μL、0.7 μL、0.9 μL、1.1 μL、1.3 μL、1.5 μL,置于 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,得到浓度为 0.015、0.021、0.027、0.033、0.039、0.045 mg/mL 的系列对照品溶液。按照 1.2.3 项下样品处理步骤制备成对照品溶液,在拟定色谱条件下精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积。以进样量(x, μg)对峰面积进行线性回归,得方程为:Y=0.3113x-0.0441(r

=0.999 5)。

结果表明断血流皂苷 A 在 15~45 μg/mL 范围内具有良好的线性关系。

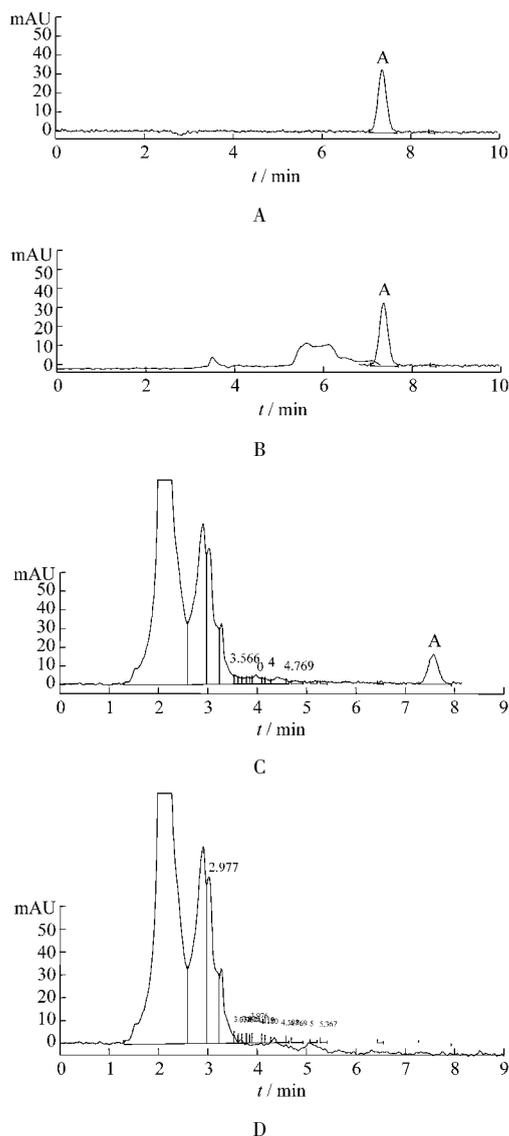


图 1 断血流皂苷 A 的 CSHPLC 图谱

A. 标准溶液直接(未经切换)进样 B. 标准溶液柱切换图谱
C. 血浆样品切换图谱 D. 空白血浆切换图谱

2.3 日内和日间精密度 取一定量(高、中、低 3 种浓度)断血流皂苷 A 对照品大鼠血浆液,按 1.2.3 项下样品处理步骤处理,采用断血流皂苷 A 血浆柱切换高效液相色谱法测定,在 1 d 内连续测定 6 次,得日内精密度 RSD 分别为 1.22%、0.81% 和 0.39% (n=6);连续 3 d 测定,测得各浓度的日间精密度 RSD 分别为:1.67%、0.74% 和 0.45% (n=6)。

2.4 重复性试验 取断血流皂苷 A 对照品大鼠血浆液,按 1.2.3 项下样品处理步骤处理制备 6 份对照品溶液,采用断血流皂苷 A 血浆柱切换高效液相色谱法测定,得 RSD 为 2.1% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.5 样品稳定性试验 取一定量(高、中、低 3 种浓度)断

血流皂苷 A 对照品大鼠血浆样品,分别进行样品处理液稳定性试验:进样条件下样品处理液在 5℃放置 0、4、10、20、40 h 进样分析;样品冷冻放置稳定性试验: -20℃冷冻储藏,分别放置 0、6、20、40 d 后按 1.2.3 项下样品处理步骤处理进样分析;室温放置稳定性试验:室温放置 0、1、2、4 h 后按 1.2.3 项下样品处理步骤处理进样分析。所用测定结果准确度均在 89~112% 范围内,RSD 均 <5% 断血流皂苷 A 在上述条件下均稳定性良好。

2.6 净化回收率 取一定量(高、中、低 3 种浓度)断血流皂苷 A 对照品血浆液,按前述色谱条件测定含量 5 次,另取相同进样量断血流皂苷 A 对照品溶液,直接进样测定。按峰面积计算,得血浆净化回收率,结果见表 1。

表 1 净化回收率结果 (n=5)

浓度/(μg/mL)	回收率/%	RSD/%
15	96.5	1.26
30	97.0	1.16
45	96.3	1.48

2.7 方法回收率 于空白大鼠血浆中加入一定量(高、中、低 3 种浓度)断血流皂苷 A 对照溶液,按 1.2.3 项下样品处理步骤处理,按前述色谱条件测定含量 5 次,求出回收量浓度(即实测值)与加入量浓度之比,即为断血流皂苷 A 血浆空白加样回收率,结果见表 2。

表 2 方法回收率结果 (n=5)

加入量浓度/(μg/mL)	回收量浓度/(μg/mL)	回收率/%	RSD/%
15	15.09	100.6	1.52
30	30.21	100.7	1.02
45	44.91	99.8	1.41

3 讨论

3.1 预处理柱选择与作用

实验初期曾用保护预柱(8 mm×4.0 mm)作预处理柱,虽基本能达到预期效果,但峰形很快变宽,影响测定的稳定性,然后采用 20 mm 短分析柱作预处理柱,保留时间恒定,峰形好,寿命长。

3.2 切换时间选择

切换时间窗越窄,则进入分析柱的杂质越少,但由于预处理柱未置恒温箱内,室温变化,流动相放置或新配后对保留时间均有一定影响,选择时间窗较宽一些,虽然前面杂质峰多一点,但不影响测定。

综上所述,本法具有操作简便,灵敏准确的特点,适用于断血流皂苷 A 血药浓度测定、药代动力学以及生物利用度的研究。

参考文献:

- [1] 彭代银,刘青云,戴敏,等. 荫风轮总苷的一般药理学试验研究[J]. 安徽医药,2005,9(7):486-488.
- [2] 张文珠,张虹,蒋生祥,等. HPLC 柱切换技术在临床药物分析中的应用[J]. 分析测试技术与仪器,2002,8(1):5-9.
- [3] 赵新锋,祝忠民,刘爱芳,等. 柱切换法在复方丹参滴丸中丹参素药代动力学研究中的应用[J]. 中成药,2004,26(6):490-492.
- [4] 向瑾,余勤,梁茂植,等. 柱切换高效液相色谱法测定人血浆中布洛芬对映体浓度[J]. 分析化学,2008,36(3):311-315.

粟米草中抗肿瘤的活性成分研究

刘可越¹, 刘海军¹, 吴家忠¹, 高春华¹, 刘建云¹, 李雪芹¹, 周斌²

(1. 九江学院 基础医学院 江西省高等学校系统生物学临床应用重点实验室,江西 九江 332000; 2. 江西科技师范学院,江西 南昌 330000)

关键词:粟米草;化学成分;抗肿瘤活性;凋亡

摘要:目的:研究粟米草(*Mollugo pentaphylla* L.)中的化学成分并对其抗肿瘤活性进行测试。方法:利用硅胶柱色谱,Sephadex LH-20,PHPLC 等手段对粟米草化学成分进行系统分离,通过理化和波谱分析方法鉴定化合物结构;并采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)和琼脂糖凝胶电泳法,研究化合物体外对Hela肿瘤细胞增殖的影响。结果:从粟米草中分离得到了5个化合物,经IR、NMR、MS等波谱方法分别鉴定为表木栓醇(*epi-friedelanol*) (1)、三十一烷醇(*hentriacontanol*) (2)、β-谷甾醇(*β-sitosterol*) (3)、牡荆素(*vitexin*) (4)、槲皮素(*quercetin*) (5)。药理实验结果发现化合物1、4、5对Hela肿瘤细胞增殖有显著抑制作用,且成一定剂量依赖关系,IC₅₀分别为216.0 μg/mL、102.4 μg/mL、92.2 μg/mL。

收稿日期:2009-10-12

基金项目:江西省自然科学基金课题(2007GQY0146);江西省教育万年青基金(GJJ09600)

作者简介:刘可越(1978-),女,吉林人,博士,副教授,研究方向:天然药物化学及新药研究。Tel:(0792)8570078 E-mail:elliec12345@yahoo.com.cn