

·药物分析·

复方沙棘膏的定性定量研究(I)

滕晓萍 孙巧红 赵景和 苑春生 蒋爱华 由瑞琪

(黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

摘要 本文对复方沙棘膏进行了初步的定性研究,并选用比色法对其所含的总黄酮类物质进行了定量研究。

关键词 总黄酮;沙棘;定性检查;含量测定

The research on the quality and quantity ditermination of *Fructus Hippophae* compound adhesive plaster

Teng Xiaoping, Sun Qiaohong, Zhao Jinghe, Yuan Chunsheng, Jiang Aihua, You Ruiqi

(Heilongjiang Traditional Chinese Medicinal Institute Haerbin 150040)

ABSTRACT We set an initial research on *Fructus Hippophae* compound adhesive plaster and select colorimetric analysis to determine the quantities of the flavonid substances which contained in the plaster.

KEY WORDS flavonids, *Fructus Hippophae*, examination of quality determination, measurement of content

复方沙棘制剂是由沙棘、黄芪、党参等药经提取精制而成的复方制剂,剂型为膏滋。药理研究表明:此方具有抗辐射,增加机体活力,升高白细胞等功能。在对癌症患者放疗引起的损伤及促进患者机体康复方面将起到积极的辅助治疗作用。该制剂中沙棘为其主要药物,据文献^[1-2]报道,沙棘有效成分之一沙棘总黄酮具有重要的生理活性,其对体内产生的一些活性氧自由基有明显的清除作用。南京铁道医学院免疫药理研究室的研究提示,沙棘总黄酮很可能是一种免疫调节剂。目前,其研制成功的一些制剂,已广泛地运用于临床上治疗心血管系统的疾病。因此,我们在对该方中的沙棘、黄芪、党参药物做出定性研究后,又运用比色法测定了制剂

中总黄酮类物质的含量,复方沙棘膏中总黄酮含量为 1.2mg/g 以上。

实验部分

一、实验材料

药品:芦丁对照品、黄芪甲甙标准品均由中国药品生物制品检定所制备提供。复方沙棘制剂样品由黑龙江中医药大学药剂组提供。

试剂:95%乙醇(AR),哈尔滨市化工试剂厂生产;5%亚硝酸钠溶液(0.5g 亚硝酸钠,AR,溶于蒸馏水中定容使成 10ml 溶液)。10%硝酸铝溶液(1g 硝酸铝,AR,溶于蒸馏水中定容使成 10ml 溶液)。石油醚、乙酸乙酯、硫酸、甲醇、乙醚、甲苯、甲酸,均为 AR 级,由南京化学试剂厂生产。氯仿、浓盐酸

(AR),均为齐齐哈尔化学试剂厂生产。镁粉(AR),哈尔滨化工试剂厂生产。

仪器:721-A型分光光度计,四川分析仪器厂。分析天平,北京光学仪器厂。

二、外观性状

复方沙棘膏为棕色膏滋,有香气,味酸甜微涩。

三、定性研究

(一)试管法

1. 盐酸-镁粉反应:取样品 1g,加 95%乙醇 5ml,置其磨口塞的试管中,室温下振荡提取,离心。取上清液 1ml,加少许镁粉振荡,再滴加几滴浓盐酸,1~2min 呈红色,必要时可水浴上加热。

2. 三氯化铝显色反应:取上述样品处理液 0.2ml 和 1%三氯化铝乙醇溶液 0.2ml,通过纸斑反应后,紫外灯下呈现黄色荧光。

3. Libermann 反应:取样品 0.5g 水浴上蒸干,溶于 2ml 乙醚中,室温下振荡,取上清液 0.5ml,滴加浓硫酸 1 滴,呈黄→红→蓝色等变化。

4. Libermann - Burchard 反应:取样品 0.5g 水浴上蒸干,溶于 2ml 氯仿中,室温下振荡,取上清液 0.5ml,滴加浓硫酸-乙醚(1:20)数滴,生成红或紫红色。

(二)层析法

1. 沙棘的定性检查

供试液的制备 ①样品液:取样品 2g,置磨口烧瓶中,加 20ml 95%乙醇回流提取 1h,过滤得滤液,在水浴上蒸至近干,加石油醚洗至醚液无色,弃去醚液,醚不溶物用 10ml 热蒸馏水溶解并转移入分液漏斗中,用乙酸乙酯萃取 3 次,每次 5ml,合并乙酸乙酯液,回收乙酸乙酯至干,加 60%乙醇溶解,并稀释至 10ml,备用。②沙棘阳性对照液:取沙棘 2g,按原方工艺制出阳性对照制剂,参照“样品液”项下方法制备得其阳性对照液。③沙棘阴性对照液:该方去掉沙棘后,按原方比例配方,按原工艺制出阴性对照液。④对

照品液:取芦丁对照品 0.0010g 用 60%乙醇定容在 10ml 容量瓶中。

纸层析 层析纸:2 号新华滤纸。展开剂正丁醇:冰醋酸:水 上层(5:4:1)。显色剂:1%三氯化铝乙醇溶液喷雾,于紫外灯下观察。

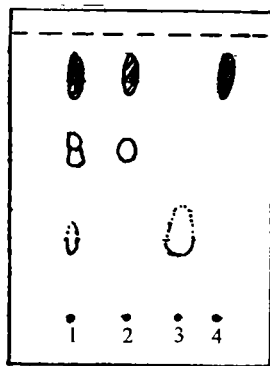


图 1 沙棘层析定性检查

注:图中画斜线斑点呈黄色

从图 1 可见,沙棘阳性对照液,样品液与对照品芦丁相比,在同一位置上有相似斑点,而其空白样品(即阴性对照液)则无。

2. 制剂中黄芪的定性检查^[3]

供试液的制备 ①样品液:取样品 3g,置磨口瓶中,加甲醇 75ml,提取 4h,回收溶剂,蒸干。残渣加蒸馏水 10ml,以水饱和正丁醇萃取 4 次(10,10,5,5),合并萃取液;用水洗涤 2 次,每次 15ml,弃去水液,正丁醇液置水浴上蒸干。残渣加甲醇 1ml 溶解,作为供试样品液。②黄芪阳性对照液:取黄芪 3g,按原方工艺制出阳性对照剂,参照“样品液”项下方法制备得其阳性对照液。③黄芪阴性对照液:该方去掉黄芪后,按原方比例配方,按原工艺制出阴性对照剂,参照“样品液”项下方法制备得其阴性液。④对照品液:取黄芪甲甙对照品 0.0020g 以甲醇溶解并稀释至 2ml。

薄层层析 吸附剂:硅胶 G 加 0.3% CMC-Na 水溶液铺板(5×15cm)自然干燥后 110°半小时备用。展开剂:氯仿-甲醇-水

(65:35:10), 下层。显色剂:10% 硫酸乙醇液, 105℃ 烘烤 5min。

结果见图 2。图中画斜线斑点日光下呈棕褐色; 紫外灯下(365nm)观察呈红橙色。

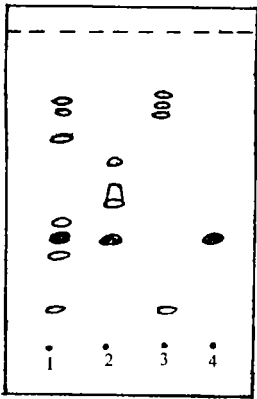


图 2 黄芪薄层层析定性检查

从图中可见, 黄芪阳性对照液, 样品液与对照品黄芪甲甙相比, 在同一位置上有相似斑点, 而其空白样品(即阴性对照液)则无。

3. 制剂中党参的定性检查^[4]

供试液的制备 ①样品液: 取样品 5g, 置磨口烧瓶中, 加 40ml 乙酸乙酯回流提取 1h, 过滤得滤液, 备用。②党参阳性对照液: 取党参 5g, 按原方制备工艺制出阳性对照制剂后, 参照“样品液”项下方法制备得其阳性对照液。③党参阴性对照液: 该方去掉党参, 按原方比例配方, 原工艺制出阴性对照制剂后, 参照“样品液”项下方法制备得其阴性对照液。

薄层层析 吸附剂: 硅胶 G 加 0.4% CMC。

按展开剂: 甲苯-乙酸乙酯-甲酸(15:5:2); 展距: 10cm。显色剂: 浓硫酸: 甲醇(1:1)溶液, 于 105℃ 烘约 5min, 紫外灯下检视。

结果: 见图 3。图中画斜线斑点呈亮蓝绿色。

图 3 中, 在与阳性药材斑点相应位置上, 样品液有与其颜色相同的两个亮蓝绿色荧光斑点, 而阴性对照液无荧光斑点。

四、定量研究

(一) 对照品液的配制

精密称取于 120℃ 干燥恒重之芦丁对照品 0.0010g, 置 50ml 容量瓶中, 加 60% 乙醇适量, 置水浴上微热使溶解; 放凉后, 用 60% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即为对照溶液 (0.2mg/ml)。

(二) 标准曲线的制作

精密量取对照品溶液 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0ml, 分别置 10ml 容量瓶中, 各加 30% 乙醇使成 5ml, 精密加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3ml, 摇匀, 放置 6min, 加 10% 硝酸铝溶液 0.3ml, 摇匀, 放置 6min, 加 1N 氢氧化钠 4ml, 分别用 30% 乙醇稀释至刻度, 放 15min, 置比色杯中, 用 721-A 型分光光度计在 510nm 波长处比色, 测吸收度绘制标准曲线, 结果见表 1。

表 1 标准曲线

	1	2	3	4	5
取量 V(ml)	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
含量 (mg/ml)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
吸收度 (\bar{A})	0.111	0.242	0.357	0.445	0.575

其中 \bar{A} 为 3 个平行样品的均值, 数据经统计学处理, 得回归方程

$$Y = -0.00093 + 0.1762x$$

其中 $a = -0.00093$, $b = 0.1762$

$$r = 0.9987$$

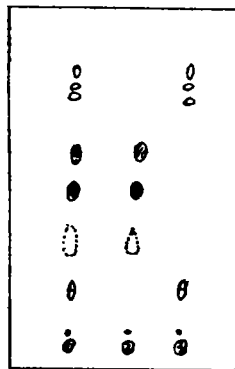


图 3 党参薄层定性检查

(三) 样品测定

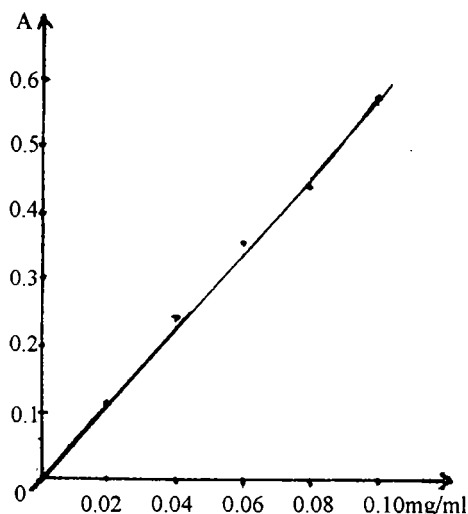


图 4 芦丁的标准曲线

复方沙棘膏中总黄酮的含量测定:精密称取样品 2g 左右,置 50ml 磨口烧瓶中加 30ml 95% 乙醇回流提取 5 次,每次 1h,过滤,合并滤液,回收乙醇,蒸至近干,加石油醚洗至醚液无色,弃去醚液,醚不溶物用 10ml 蒸馏水溶解并转移入分液漏斗中,用乙酸乙酯萃取 4 次每次乙酸乙酯为 10ml,合并乙酸乙

酯液,回收溶剂水浴蒸干,加 60% 乙醇溶解,并移入 25ml 容量瓶中,用 60% 乙醇稀释至刻度,摇匀备用。精密吸取此样品液 3.0ml,置 10ml 容量瓶中,加 30% 乙醇使成 5.0ml,后按标准曲线法操作并以 60% 乙醇试剂作空白,测得 5 份平行样品用回归方程计算其浓度计算含量,其结果见表 2。

用标准曲线计算制剂的含量,5 份平行样品的均值为:1.3265mg/g。

对 3 个批号的复方沙棘膏,用以上的方法测定制剂中总黄酮的含量,分别为 1.3265mg/g; 1.2811mg/g; 1.2461mg/g, 计算其 RSD 为 3.14%。初步确定该制剂中的总黄酮量应不低于 1.20mg/g。

(四)回收率的测定:

精称上述已知含量的样品 5 份,分别精密加入对照品液(0.2mg/ml),按样品测定项下的方法提取分离,测定总黄酮的含量,计算回收率,测得 5 次平均回收率为 96.23%, RSD 相对标准偏差 2.09%。

表 2 样品含量测定结果

	1	2	3	4	5
取样量(g)	2.8730	2.0686	2.4040	2.1433	2.7915
吸收度(\bar{A})	0.245	0.201	0.238	0.207	0.255
含量(mg/ml)	0.0422	0.0345	0.0410	0.0355	0.0440
制剂含量(mg/g)	1.2252	1.3893	1.4214	1.3813	1.3154

五、讨论

1. 本实验所采用的含量测定方法,是在参考文献^[5-7]报道的基础上,又结合本制剂的具体情况,经多次摸索制定了这个测定方法。此方法具有方便、快速、准确、重现性好等优点,可作为本方制剂的质控指标之一。

2. 就本制剂而言,笔者认为,在其采用比色法进行含量测定过程中,样品的前处理十分重要,用石油醚洗除杂质若不彻底将直接影响本制剂比色效果。

3. 采用比色法进行含量测定是依据黄酮类化合物与金属离子形成稳定的呈色螯合

物,此化合物在 510nm 波长处有最大吸收。文献上报道大多以异鼠李素做对照品测定沙棘中总黄酮甙元的含量,由于未得到异鼠李素标准品,我们在定性实验预试中又发现样品和沙棘药中都含有芦丁,故而选用芦丁做对照品控制其总黄酮的含量。

4. 我们还曾运用柱层析与薄层层析相结合的方法,从本方中分离出黄芪甲甙,并对利用薄层扫描法测定其含量进行了实验预试,下一步将是对制剂中黄芪甲甙的定量研究。

(本研究为黑龙江省自然科学基金资助

- 项目)
- 参考文献
- [1]王家良等. 醋柳总黄酮治疗缺血性心脏病的疗效观察. 四川医学院学报, 1982;13(1):6
- [2]陆燕誉. 药用沙棘. 中国中药杂志, 1989;14(1):57
- [3]鲁静等. 黄芪甲甙的薄层扫描法测定. 中成药, 1992; 14(6):34
- [4]唐湘红等. 生脉饮(党参方)及黄芪生脉饮中党参的薄层色谱法确证. 现代应用药学, 1991;8(5):32
- [5]杨建瑜等. 沙棘果汁中总黄酮甙元的含量. 西北药学杂志, 1989;4(3):31
- [6]魏立中等. 咳乐冲剂制备工艺及其质控指标研究. 中成药研究, 1985;(2):12
- [7]肖蓉等. 醋柳黄酮甙元的含量测定. 四川医学院学报, 1982;13(1):2

高效液相色谱间接光度检测法测定 心脏停搏液中钠、钾、钙、镁的含量

袁 成 王景祥 梁竹 焦素云 李凡东
(济南军区总医院 济南 250031)

摘要 本文用高效液相色谱间接光度检测法测定了心脏停搏液中钠、钾、钙、镁的含量。以 Soherisorb SCX 为固定相, 0.35mmol/L 硫酸铈的[水-乙腈(85:15), 并用磷酸调 pH 至 3.2~3.4]溶液为流动相, 亚铈离子作为流动相平衡离子直接应用光度检测器测定, 并与其他测定方法比较。结果表明, 分离度较好, 104% > 回收率 > 97%, 线性关系良好。结果与滴定法相比无显著性差异。该法具有操作简便快速, 灵敏准确, 适于作为制剂中 4 种离子的常规检测方法。

关键词 心脏停搏液; 钠; 钾; 钙; 镁; HPLC-IPD

Determination of sodium, kalium, magesium and calcium in liquor of cardioplegia by high performance liquor chromatography – indirect photometric determination method

Yuan Cheng, Wang Jingxiang, Liang Zhu, et al

(Department of Pharmacology, General Hospital of Jinan Command, Jinan 250031)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To determine the content of sodium, kalium, magesium and calcium in liquor of cardioplegia by HPLC-IPD method. **METHOD:** The chromatographic system consisted of Soherisorb SCX column and mobile phase of the solution of 0.35 mmol/L cerium sulphate in water-acetonitrile(85:15), that were regulated to pH 3.2~3.4 with phosphoric acid. Cerium was a balance-ion in mobile phase, therefore the content of sodium, kalium, magesium and calcium were determined directly by photometer. The detected wave length was UV254 nm. **RESULTS:** The mean recovery of 4 ion were between in 97~104% and detection limits of sodium, kalium, magesium and calcium were 5, 8, 5 and 4 ng. There was noremarkable between in this HPLC-IPD method and titrative method. **CONCLUSION:** The method is constant, sensitive, have a good concentration and is good for determination of sodium, kalium, magesium and calcium concentration.