

广东蛇药中主要有效成分有机酸的 薄层扫描定量法

梁 彬 李 彤

(药理研究室)

摘要 本文研究了广东蛇药的生药及其制剂中有机酸含量的薄层扫描测定方法。在原有的薄层分离鉴定法的基础上,进一步简化供试液制备流程,摸索出适合直接扫描定量条件,用岛津 CS-920 型薄层扫描仪进行定量测定,并用本法分析了生药及其浸膏、针剂、片剂有机酸的含量。实验参数: $\lambda_s = 433\text{nm}$, 反射法锯齿扫描,测得六种有机酸——富马酸、琥珀酸、丙二酸、苹果酸、枸橼酸、酒石酸的标准曲线为通过原点的直线。定量测定的变异系数分别在 1.56~5.96%。各有机酸呈色强度的线性范围,在 4~40 μg 之间。

广东蛇药水溶性有效部分所得的五个化学组分,经分别进行动物试验,初步认为无机离子及有机酸成分系其主要有效成分^[1]。后以外源性混合有机酸钾钠盐取代无机盐、有机酸组分,作动物试验,有迹象表明,广东蛇药的抗毒效价与有机酸盐含量有一定关系^[2]。为了探索广东蛇药的质量控制和量效关系,并进一步研究其化学有效配方,研究建立本法是有必要的。

材 料

一、仪器 岛津 CS-920 型高效薄层层析扫描仪;微量定量毛细管。

二、药品 富马酸、琥珀酸、丙二酸、苹果酸、枸橼酸、酒石酸。

方法与结果

一、薄层分离

将六种混合有机酸标准液,分别点在 10×20cm 大小硅胶 G (青岛海洋化工厂)的薄层板上(硅胶 G 板加 0.2% CMC 制成),用乙醚—甲酸—水 (70:10:20) 作展开剂,板置层析缸内,以展开剂预先饱和 40 分钟,然后上行展开 16.5cm,展开后的薄层板,挥去乙醚,于 105℃ 烘箱内鼓风干燥 1 $\frac{1}{2}$ 小时,除尽甲酸,待凉,用 0.04% 溴酚蓝乙醇显色剂(用 0.1N NaOH 调至微碱性)喷雾显色,即呈黄色斑,蓝色背景,于暗处放置一刻钟,开始扫描。

二、定量测定

1. 扫描波长的选择

将六种混合有机酸标准液,点在板上展开,显色后用单波长锯齿扫描,波长范围从 350~600nm,寻找其中最大吸收峰,波长为 433nm。

由此选择了以下的测定条件:

测定方式:反射法锯齿扫描;光源:钨灯;测定波长:433nm;狭缝:1.2×1.2mm;灵敏度:50×2;纸速:20mm/min。

2. 显色斑的稳定性试验

将标准品点在薄层板上,展开,挥干,显色后置于暗处,放置一刻钟扫描,扫描后在表面覆盖同样大小的洁净玻片,每隔半小时扫描一次,看来在 2 小时内显色斑不变,示下表 1。

表 1 有机酸显色斑的稳定性

时 间 色斑面积	1/2 小时	1 小时	2 小时
富 马 酸	9173	9154	9233
琥 珀 酸	14488	14407	14064
丙 二 酸	15534	15569	15753
苹 果 酸	13666	13427	13325
枸 橼 酸	12283	12028	12159
酒 石 酸	20772	20374	20419

3. 方法精密度试验

薄层扫描定量,一般引起的测量误差,可

以认为有三个方面：(1) 同一色斑反复测定时的误差；(2) 同一薄层板上不同样品色斑吸收度的误差；(3) 不同薄层板间的误差。按上述

不同来源，分别测定其色斑面积，从而计算出其不同变异系数，结果见下表 2。

表 2 有机酸的精密度试验

变异系数%	有 机 酸	富马酸	琥珀酸	丙二酸	苹果酸	枸橼酸	酒石酸	平 均 变异系数	测定次数
同 一 色 斑 重 复 扫 描		0.78	3.22	1.98	1.34	1.32	0.75	1.56	5
同一板上不同色斑扫描		1.71	3.33	1.87	1.99	3.80	2.69	2.56	5
不 同 板 上 扫 描		4.47	4.43	7.57	6.72	6.65	5.89	5.96	10

4. 标准曲线

标准溶液的配制：分别精密称取富马酸 2mg、琥珀酸 10mg、丙二酸 4.2mg、苹果酸 6.1mg、枸橼酸 5.8mg、酒石酸 6mg 于 6 个 10ml 容量瓶内，均用无水乙醇溶解，稀释至刻度，摇匀，备用。

标准曲线的制备：将上述标准溶液 2 μ l，3 μ l，4 μ l，5 μ l，6 μ l 分别点在 6 块薄层板上，按上述薄层分离同样条件，进行展开、显色、扫描，以点样浓度为横座标，色斑面积为纵座标，可得一组通过原点的标准曲线，见附图。

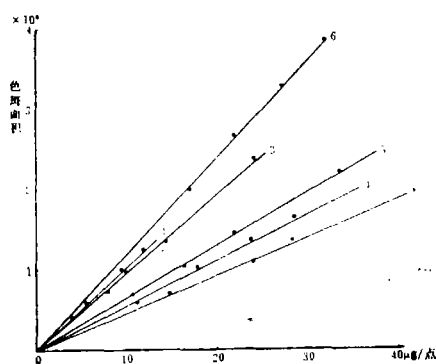


图 有机酸的标准曲线

在图中所示点样量的范围，色斑的测定，呈线性关系，由图中可选择各有机酸的适合点样量。

三、样品分析

1. 六种混合有机酸标准液的配制

精密称取富马酸 45mg、琥珀酸 300mg、丙

二酸 150mg、苹果酸 210mg、枸橼酸 210mg、酒石酸 210mg 于 10ml 刻度容量瓶内，用无水乙醇小量溶解，充分振摇至全溶后，再稀释至刻度（每 1 μ l 相当于富马酸 4.5 μ g、琥珀酸 30 μ g、丙二酸 15 μ g、苹果酸 21 μ g、枸橼酸 21 μ g、酒石酸 21 μ g）。

2. 制备检样方法

生药：精取 40 目生药粉末 10g，加水 100ml 浸泡，用浓氨水调其 pH 至 8.5，放置过夜，抽滤，清液再用浓氨水调至 pH 8.5，然后通过国产 717 强碱性阴离子交换树脂柱（内径 1.5 cm，树脂高 10cm），通完后用蒸馏水冲洗柱至中性，继用甲酸-乙醇（4:7）50ml 洗脱，洗脱液置于水浴上蒸干，残渣置干燥器内保存，待点样前再用无水乙醇溶解，小心转移至 1ml 刻度容量瓶内，稀释至刻度（每 μ l 相当于生药 10mg）。

浸膏：精取 1~2g 浸膏（每 g 浸膏相当于生药量 7~15g，加水 50ml，用浓氨水调 pH 至 8.5，放置半小时，抽滤，清液再用浓氨水调 pH 至 8.5，通柱，步骤可按生药项下操作（每 μ l 相当于生药 7~15mg）。

片剂：精取相当于 5 $\times$ 平均片重量的磨碎粉末（每片相当于生药 3g），加水 50ml，用浓氨水调其 pH 至 8.5，放置过夜，浸泡液再用浓氨水调 pH 至 8.5，抽滤，清液通柱，步骤仍按生药项下操作（每 μ l 相当于生药 15mg）。

针剂：精取注射液 10ml（每 ml 相当于生

药6g),加水40ml,用浓氨水调pH至8.5,通柱,步骤操作均与上同(每 μl 相当于生药60mg)。

3.点样量

不同制剂中,各有机酸含量有较大差异,通过定性估计,含量高与含量低兼顾的适宜点样量,生药、浸膏、片剂一般用 $1\sim 2\mu\text{l}$ 即可,而针剂则需用 $3\mu\text{l}$ 。

4.点样

在 $10\times 20\text{ cm}$ 薄层板上,离下缘2cm处,等距离点上六个点,第1、2点点第一个样品,第3、4点点混合有机酸标准品,第5、6点点第二个样品,原点直径为3mm,依上法展开,扫描测定,由积分面积求出含量。

含量%

$$= \frac{\text{标准品量}(\mu\text{g}) \times \text{样品色斑面积值}}{\text{标准色斑面积值} \times \text{点样量}(\mu\text{g})} \times 100$$

5.样品分析结果见表3

表3 广东蛇药生药及其制剂中有机酸的含量

含量%	有机酸	富马酸	琥珀酸	丙二酸	苹果酸	枸橼酸	酒石酸
	双目灵全草粉	0.030	0.113	0.096	0.573	0.325	—
	双目灵浸膏	0.013	0.201	0.045	0.610	0.240	—
	柚子叶浸膏	0.026	—	0.226	0.414	0.135	—
	蛇药浸膏	0.012	0.045	0.106	0.543	0.152	—
	片剂	0.031	0.025	0.075	0.412	0.209	—
	针剂	0.001	0.026	0.013	0.018	0.012	—

分析数据均为三次以上平均值

讨 论

一、本法必须在室温 20°C 以上条件下展开分离,不然将明显影响分离效果,在冬季气温较低的情况下,就得不到满意结果。

二、新铺的薄层板,晾干后,必须置干燥箱 105°C 烘烤半小时,取出,存放室温下3天后方可使用,这样分离效果较好。

三、薄层扫描定量引起的测量误差原因较多,如不同板之间铺板厚薄不一致,同一板上不均匀,点样的误差,展开条件的差异,层析缸内生成的边缘效应,测定时仪器本身的不稳定等等,从精密度试验结果就得以表明,不同板之间所得的变异系数就明显大于同一板,同一色斑由于仪器不稳也有一定差异,所以这些因素必须加以严密注意,尽量求得一致,并采取同时测量标准品进行样品分析,可以减少这些误差。

四、混合有机酸标准液,放久后,其含量明显下降,一般仅保持一周不变,同样已制备

的检液,放久后,测定结果也偏低,因此检液宜在临点样前配制,不能久存,或预先点好在板上,次日再作展开,这样结果不变。根据这种现象我们曾查阅了有关文献,据报道^[3],与我们相同的几种有机酸的丙酮与水配制的标准液,放久后也会变质,储藏在 4°C 5个月,其含量下降从5%~25%不等。由此说明,情况是一致的。广东蛇药浸膏,经长期存放,其效价明显有所下降,我们认为这可能与其中有机酸的含量降低有关,以后将作进一步研究。

五、通过广东蛇药样品分析,发现草酸色斑在多数情况下与点样原点紧接相连,由于它的Rf值较小(约0.05),很难分开,对扫描定量造成困难,所以决定放弃草酸成分的定量,在我们进行蛇药有效成分的组合与协同作用研究^[2]试验中,配制外源混合有机酸药液时曾删去草酸,对蛇药的抗毒效价并无明显影响迹象。

六、经过系列样品分析,初步搞清蛇药中有机酸的含量比例,了解其中主要含量最高为

苹果酸, 这将为研究化学单体有效配方提供依据。

(本文承吴秀荣教授审阅, 广州市新技术应用 研究所黎景清同志协助作薄层扫描测定及提供实验 条件并参加部分实验工作, 特此致谢。)

参 考 文 献

[1] 马郁琪, 等。广东蛇药中水溶性部分有效成

分的分离鉴定。中草药 1982, 13(5):1。

[2] 梁彬。广东蛇药水溶性有效成分的组合与其协同作用的研究。中药通报1985, 10(8):40。

[3] Leo Keoner, et al. Automatic determination of weak organic acid by partition column chromatography and indicator titration. J Anal Chem 1966, 38 (9):1164.

TLC-Densitometer Scanning Determination of Water Soluble Active Principal-Organic Acids in Cuangdong Snake Drug

Liang Pin Li Tong

(Department of Pharmacology)

Abstract

A simple rapid method for the separation and determination of organic acids (Fumanic. Snccinic. Malonic. Malic. Citric. Tartaric acid) in Guangdong snake drug is described. The method based on direct densitometric scanning of spots after chromatography on silica gel G CMC thin-layer plates.

Scanning parameters are: $\lambda_s = 432\text{nm}$, single wave-length, zigzag scanning, reflection mode; the range of coefficient Variation was 1.56~5.96%; The standard curve ranging from 4~40 μg is a straight line passing through the origin.

Analytical result of the samples were tabulated.