

0.9, 1.2, 1.5 mL置于 5 mL量瓶中,再量取 1 mL甲萘酚内标溶液,加甲醇稀释至刻度,分别进样 10 μ L,以对照品溶液浓度为横坐标,对照品与内标物的峰面积比值为纵坐标进行线性回归,绘制标准曲线,得到回归方程为 $Y = 1.540X - 0.01151$, $r = 0.9999$; $Y = 51.73X - 0.006294$, $r = 0.9998$ 。结果表明:甘草酸在 0.055~1.10 mg/mL,桂皮酸在 2.0~30.1 μ g/mL呈现良好线性关系。

3.4 精密度试验:取同一浓度的样品重复进样 6次,以甘草酸和桂皮酸峰面积分别与内标物联苯和甲萘酚峰面积的比值计算,测得 RSD分别为 1.6%和 1.0%。

3.5 重现性试验:按“供品溶液的制备”方法制备 6份供品,分别进样,以甘草酸和桂皮酸峰面积分别与内标物联苯和甲萘酚峰面积的比值计算,得 RSD分别为 2.0%和 1.4%。

3.6 回收率试验:精密称取甘草 0.5 g,附子 0.5 g,白术 0.5 g,桂枝 1 g,共 9份,分为低、中、高 3组,分别加入甘草酸对照品 2.00, 4.00, 6.00 mg和桂皮酸 0.226, 0.452, 0.678 mg,每剂量 3份,处理并测定,计算回收率。结果甘草酸平均回收率为 95.9%, RSD为 2.6%;桂皮酸回收率为 94.8%, RSD为 2.0%。

3.7 供试品测定:精密称取甘草 0.5 g,附子 0.5 g,白术 0.5 g,桂枝 1 g,按照“供试品溶液的制备”方法进行处理并测定,测得甘草附子汤中含甘草酸 3.8 mg/g,桂皮酸 0.33 mg/g ($n = 6$)。

4 讨论

4.1 曾以正交试验设计法对甘草附子汤的提取工艺进行优化,以甘草酸、桂皮酸的含量和浸膏得率为指标,考察了溶剂量、提取时间和提取次数对提取结果的影响。经过直观分析和方差分析,结果显示以 10倍量 50%乙醇,提取 2次,每次 1 h能获得最好的提取效果。

4.2 在流动相中加入冰醋酸可以有效抑制甘草酸的解离,改善了甘草酸的峰形。经过对流动相的进一步优化,在此色谱条件下待测物质的色谱峰与相邻峰分离较好,重现性佳。本法简便、准确,可作为甘草附子汤质量控制的手段之一。

References

- [1] Zheng H Z, Dong Z H, Yu J. *Modern Study of Traditional Chinese Medicine* (中药现代研究与应用) [M]. Vol II. Beijing: Xueyuan Press, 1999.
- [2] Zheng H Z, Dong Z H, Yu J. *Modern Study of Traditional Chinese Medicine* (中药现代研究与应用) [M]. Vol IV. Beijing: Xueyuan Press, 1999.
- [3] Zhu L, Kong D Y, Wu X M. Determination of glycyrrhizic acid in Weiwanshu Granula by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 339-340.
- [4] Zuo W, Song M S, Kong S L, et al. Separation and determination of β -glycyrrhetic acid in *Glycyrrhiza* and its preparation and Chinese proprietary medicine by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1995, 13(1): 43-44.
- [5] Huang X H, Song Z H, Bi K S. Study on alcohol extraction process of Linggui Zhugan Decoction with orthogonal design [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2002, 13(4): 199-201.

HPLC法测定风湿关节炎片中土的宁和马钱子碱的含量

李晓妮,胡爽,葛新,丁红*
(山西医科大学药学院,山西太原 030001)

风湿关节炎片主要由马钱子、麻黄、当归、苍术、续断、桃仁等 17味中药组成,用于风湿痹痛、腰腿疼痛、风湿性关节炎等症的治疗,具有良好疗效。马钱子为本处方中的君药,为保证用药安全有效,本实验采用 HPLC法同时测定制剂中土的宁和马钱子碱两种有效成分的含量,方法简便、快速、准确,为提高和完善该制剂的质量标准提供了依据。

1 仪器和试剂

岛津高效液相色谱仪(LG-10A泵,SPD-10A紫外可见检测器,C-R6A数据处理机)。

甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯;土的宁对照品和马钱子碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为:0635-9903,0725-9806);风湿关节炎片(山西华康药业股份有限公司)。

* 收稿日期:2003-01-14

作者简介:李晓妮(1957-),女,山西省阳城县人,副教授,毕业于北京医学院药化专业,主要从事药物质量标准制定方面的工作。

Tel: (0351)4690071

2 方法和结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈柱 (4.6 mm× 250 mm, 5 μ m) (大连依特公司); 流动相: 甲醇-1%冰醋酸 (23: 77, 含 0.2%三乙胺); 检测波长: 254 nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L; 理论塔板数按士的宁峰计算不低于 5 000

2.2 供试溶液的制备: 取本品 20片, 除去糖衣, 研细, 精密称取约 0.4 g, 置具塞锥形瓶中, 加入碱性氯仿 [氯仿-氨水 (9: 1)] 20 mL, 精密称定, 冷浸 24 h 后再精密称定, 用碱性氯仿补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 10 mL 置蒸发皿中, 水浴蒸至近干, 残渣用适量甲醇使溶解, 用流动相分次洗涤后合并置 25 mL 量瓶中并稀释至刻度, 摇匀, 微孔滤膜 (0.45 μ m) 滤过, 即得

2.3 检测波长的选择: 精密称取士的宁对照品 5.2 mg, 马钱子碱对照品 7.0 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 制成对照品储备液。将士的宁和马钱子碱对照品储备液分别在 200~400 nm 波长进行扫描, 光谱图显示最大紫外吸收波长: 士的宁为 211, 254 nm, 马钱子碱为 263, 301 nm。为保证方法的灵敏度, 选定波长为 254 nm

2.4 空白干扰实验: 按制剂处方制成不含马钱子的阴性供试液, 与供试品在相同的色谱条件下测定, 结果在与士的宁和马钱子碱相应的保留时间处无干扰峰。见图 1

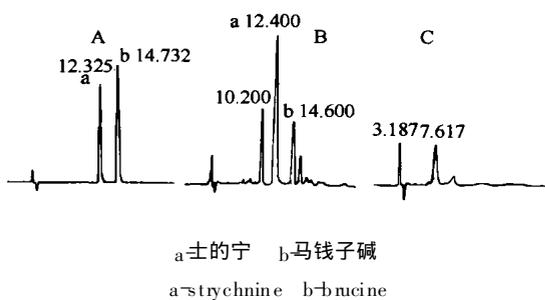


图 1 对照品 (A)、风湿关节炎片 (B) 和缺马钱子阴性对照 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), Fengshi Guanjieyan Pill (B) and sample without *Semen Strychni* (C)

2.5 线性关系的考察: 精密吸取士的宁储备液 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 mg 和马钱子碱储备液 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 mL 分别置 25 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过。取续滤液 20 μ L, 测定峰面积, 进行线性回归。士的宁回归方程为 $Y = 29\,633X - 1\,390.8$ ($r = 0.999\,6$), 线性范围为 2.08~20.8 μ g/mL; 马钱子碱回归方程

为 $Y = 17\,071X - 857.42$ ($r = 0.999\,7$), 线性范围为 0.56~9.86 μ g/mL

2.6 精密度试验: 取 10.4 μ g/mL 士的宁对照品溶液和 4.48 μ g/mL 马钱子碱对照品溶液 20 μ L 进样, 测定峰面积, 重复测定 6 次, 士的宁的 RSD 为 1.3%, 马钱子碱的 RSD 为 1.4%。

2.7 重现性试验: 取批号为 20020601 的供试品制备供试液, 按上述色谱条件平行测定 6 份, 计算得士的宁平均含量为 0.3314 mg/片, RSD 为 2.1%, 马钱子碱平均含量为 0.1842 mg/片, RSD 为 2.3%。

2.8 稳定性试验: 取 2.7 项下制备的供试液在配制后 0.5, 2, 4, 6 h 进样, 测定峰面积, 计算得供试品中士的宁峰面积的 RSD 为 1.4%, 马钱子碱峰面积的 RSD 为 1.2%。

2.9 回收率试验: 取已知含量的供试品 (批号 20020601), 分别加入士的宁对照品溶液 (0.52 mg/mL) 0.16, 0.16, 0.32, 0.32, 0.50, 0.50 mL 和马钱子碱对照品溶液 (0.14 mg/mL) 0.20, 0.20, 0.50, 0.50, 0.80, 0.80 mL, 按含量测定方法进行制备。测定, 士的宁的平均回收率为 95.1%, RSD 为 1.6%; 马钱子碱的平均回收率为 95.6%, RSD 为 2.4%。

2.10 供试品测定: 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液 20 μ L 进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 计算制剂中士的宁和马钱子碱含量, 测定结果见表 1

表 1 风湿关节炎片中士的宁和马钱子碱的含量测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Contents of strychnine and brucine in Fengshi Guanjieyan Tablets ($n = 3$)

| 批号 | 士的宁 / (mg·片 ⁻¹) | 马钱子碱 / (mg·片 ⁻¹) |
|----------|-----------------------------|------------------------------|
| 20020601 | 0.3368 | 0.1863 |
| 20020701 | 0.3448 | 0.1865 |
| 20020702 | 0.3469 | 0.1900 |

3 讨论

3.1 采用 HPLC 法同时测定马钱子及其制剂中的士的宁和马钱子碱含量的报道有以硅胶柱为固定相的正相色谱法^[1,2], 但多为 ODS 柱的反相色谱法^[3~5]。实验曾以 0.01 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇-乙腈 (75: 10: 15, H₃PO₄ 调 pH 2.5) 为流动相, 虽然使本制剂中士的宁、马钱子碱与其他组份完全分离, 但使用期间色谱柱柱效降低。最终选择的流动相未使用磷酸盐和价格较高的乙腈, 经测定其 pH 值为 3.0, 有利于延长柱寿命。

3.2 对比碱性氯仿提取和浓氨水湿润后氯仿提取两种方法, 片粉在前者中不成团、分散性好, 提取效率显著提高。

References

- [1] Fu Y H, Han W D, Xu H X. Simultaneous determination of strychnine and brucine in *Semen Strychni* by HPLC [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1998, 29(4): 281-283.
- [2] Xu L H, Lu J. Determination of strychnine and brucine in *Semen Strychni* and preparations by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 18(6): 383-385.
- [3] Zhang Z Q, Sha M, Yuan C L, et al. Determination of strychnine and brucine in *Semen Strychni* and Shangke Qiwei Tablets by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(4): 236-237.

- [4] Lu Y X, Cui J, Liu Y. Determination of strychnine and brucine in Qubidan Capsule by RP-HPLC [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2001, 21(8): 474-475.
- [5] Li S L, Chen B Y. Simultaneous determination of strychnine and brucine in Maqianzi Powder by RP-HPLC [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1998, 33(3): 168-169.

荷叶中荷叶碱提取工艺的研究

赵 骏,王洪章,齐喜红,高敏燕,高 钊*
(天津中医学院,天津 300193)

荷叶为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶,具有清热利湿,升发清阳,降脂减肥,止血散瘀等作用。《本草纲目》载:“荷叶服之,令人瘦劣,单服可以消阳水浮肿之气。”今用荷叶配方生产降脂减肥茶者颇多。据报道,将荷叶用乙醇回流提取后制成浸膏片具有良好的调血脂作用。国外尤其是日本关于荷叶化学成分的研究报道较多,主要是生物碱类、黄酮类、鞣质类成分。我国的荷叶资源丰富,价廉易得,为可开发的天然药用植物资源。本实验以荷叶生物碱为指标,利用不同的溶媒采用加热回流法和超声提取,大孔吸附树脂纯化来优化提取工艺。

1 仪器、试剂和材料

DU-530紫外可见分光光度计(美国 Beckman公司),电子天平(上海天平仪器厂)。试剂均为分析纯。荷叶购于天津中医学院门诊部,经本院药用植物教研室鉴定为睡莲科植物莲 *N. nucifera* Gaertn. 的干燥叶片。荷叶碱对照品(山东医学科学院药物研究所提供)。

2 实验方法

2.1 提取荷叶中总生物碱的正交设计:对不同溶媒加热回流和不同提取方法的影响因素及水平见表 1, 2。

2.2 荷叶总生物碱的提取与纯化:称取荷叶 100 g,加入表 1中的溶剂 2 000 mL浸泡,按表 2方法提取。滤过,合并滤液,回收溶剂至 100 mL,有机溶剂提取液拌入适当的树脂,挥去乙醇,再将拌有样品的树脂加到预先填好的大孔吸附树脂柱(药材与树脂

的比例为 1:2~1:3)上;酸水提取液经 0.5% 氢氧化钠溶液调 pH 9~11,直接上柱。先水洗去杂质,再用乙醇水洗脱,减压回收乙醇,挥干得总生物碱。

表 1 不同溶媒加热回流提取因素水平表

Table 1 Factors and levels by heating and refluxing with different resolvers

| 水平 | 因 素 | | |
|----|--------|-----------|--------|
| | A 溶剂 | B 回流时间 /h | C 提取次数 |
| 1 | 93% 乙醇 | 1.5 | 1 |
| 2 | 甲醇 | 2.0 | 2 |
| 3 | 0.5 盐酸 | 2.5 | 3 |

表 2 不同提取方法因素水平表

Table 2 Factors and levels by different extracting methods

| 水平 | 因 素 | | |
|----|---------|--------|-----------|
| | A 溶剂 | B 提取方法 | C 提取时间 /h |
| 1 | 0.5% 盐酸 | 超声 | 1.5 |
| 2 | 0.5% 醋酸 | 回流 | 2.0 |

2.3 对照品溶液的配制:精密称取减压干燥至恒重的荷叶碱对照品 4.5 mg,氯仿定容至 10 mL。精密吸取 4 mL,加入 20 mL 氯仿及 4 mL 溴甲酚绿缓冲液于分液漏斗中萃取,取 20 mL 氯仿层于试管中,加 0.01 mol/L 氢氧化钾溶液、无水乙醇各 5 mL 摇匀,精密吸取上层溶液 6 mL 于 10 mL 量瓶中定容,即得。

2.4 标准曲线的制备:分别精密吸取荷叶碱对照品溶液 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0 mL 置于干燥具塞试管中,加氢氧化钾溶液及无水乙醇的混合液至 5 mL,摇匀。以氢氧化钾溶液和无水乙醇的混合