

HPLC 法同时测定防己药材中防己诺林碱和粉防己碱

饶毅¹, 黎莉², 刘隆洪³, 袁华生³, 魏惠珍¹, 黄周华¹, 杨世林¹(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006;
3. 江西翔云生物药业有限公司, 江西 遂川 343900)

防己为防己科粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥根, 粉防己根中含有粉防己碱、防己诺林碱、轮环藤酚碱等成分, 具有解热镇痛、风湿止痛、利尿消肿之功效^[1]。其中粉防己碱(TET)和防己诺林碱(FAN)是其主要活性成分, TET 能够有效抑制由胶原、凝血酶、肾上腺素等引起的血小板聚集, FAN 能够在体外抑制组胺的释放。因此, 以粉防己碱和防己诺林碱的量来作为防己药材的质量控制指标具有十分重要的意义。

目前国内主要是利用薄层扫描法、薄层色谱分光光度法和薄层色谱荧光法测定粉防己碱的量^[2~4], 利用 HPLC 法测定粉防己碱和防己诺林碱的文献报道较少^[5]。2005 年版《中国药典》改进了定量测定的方法, 采用 HPLC 方法, 使用离子对色谱^[6], 由于流动相中加入十二烷基磺酸钠, 易分层沉淀, 操作过程中要严格控制温度、时间等。本实验采用 HPLC 法对防己药材中粉防己碱和防己诺林碱成分同时进行测定, 样品处理方法简单, 测定结果准确, 方法专属性强, 精密度高, 重现性好。

1 仪器、试剂和药品

岛津 LC-10ATVP 高效液相色谱仪, SPD-M10AVP DAD 检测器, SIL-10ADVP 自动进样器, CLASS-VP 色谱工作站, 色谱柱为岛津 Shim-pack; Vp-ODS; (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 甲醇、三乙胺均为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为 millipo 超纯水。粉防己碱、防己诺林碱(中国药品生物制品检定所, 批号分别为 0711-200005, 0793-200003); 防己药材(购于江西遂川翔云药业有限公司, 由江西中医学院中药鉴定教研室傅小梅博士鉴定)。

2 方法和结果

2.1 色谱条件: 岛津 Shim-pack; Vp-ODS (250 mm×4.6 mm) 色谱柱; 流动相: 乙腈-0.2%磷酸 (63:37) (三乙胺调 pH 至 8.0); 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测波长: 282 nm。理论塔板数

以粉防己碱计算不低于 5 000。色谱图见图 1。

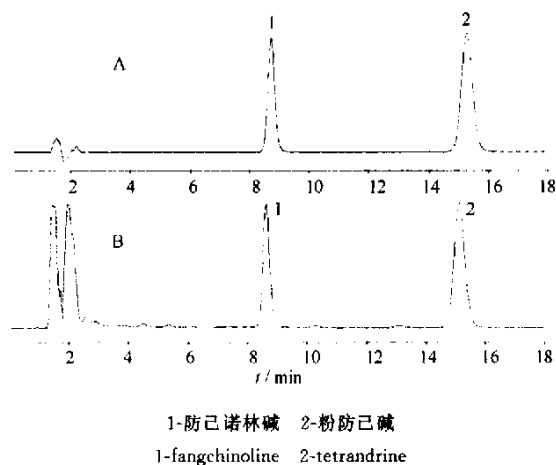


图 1 防己诺林碱和粉防己碱混合对照品(A)与样品(B)色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of fangchinoline and tetrandrine mixture (A), and sample (B)

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取粉防己碱、防己诺林碱对照品适量, 用甲醇溶解, 制成含粉防己碱 0.1 mg/mL, 含防己诺林碱 0.05 mg/mL, 即得。

2.3 供试品溶液的制备: 取防己药材粉末, 精密称取 0.4 g, 置 100 mL 平底烧瓶中, 精密加甲醇 50 mL, 称定质量, 水浴加热回流 1.5 h, 放冷, 擦干瓶外壁, 再称定质量, 加甲醇补足减失的质量, 摇匀, 取上清液, 即得。

2.4 线性关系考察: 精密称取防己诺林碱、粉防己碱对照品, 以甲醇溶解, 制得防己诺林碱、粉防己碱 0.526、0.975 mg/mL 的对照品溶液。精密吸取此溶液 0.05、0.10、0.20、0.40 mL, 加甲醇稀释至 2.0 mL, 摇匀。分别进样, 以峰面积平均值为纵坐标, 以对照品质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得两个成分的回归方程: 防己诺林碱 $Y = 42\,419X + 3\,698.1$, $r = 0.999\,9$, 线性范围: 0.010 5~0.105 2 mg/mL; 粉防己碱 $Y = 71\,963X + 828.9$, $r = 0.999\,9$ 。线性范围: 0.019 5~0.195 0 mg/mL。

2.5 精密度试验:精密吸取同一供试品溶液 10 μL , 重复进样 6 次, 测定, 结果其峰面积防己诺林碱 RSD 为 0.35%; 粉防己碱 0.37%。

2.6 重现性试验:精密称取防己药材粉末 0.4 g 共 6 份, 按“供试品溶液的制备”项下进行处理并测定, 每份进样两次各 10 μL , 以峰面积平均值计算, 防己诺林碱 RSD 为 0.48%; 粉防己碱 0.63%。说明该方法的重现性好。

2.7 稳定性试验:精密吸取供试品溶液 10 μL , 分别在 0、2、4、6、8、10、12、30 h 进样 1 次, 连续 8 次, 计算峰面积平均值。结果防己诺林碱 RSD 为 0.32%, 粉防己碱 0.33%。表明样品在 30 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验:称取防己药材粉末约 0.2 g 共 6 份, 精密称定, 分别按相当于药材中防己诺林碱和粉防己碱的 80%、100%、120% 的量加入混合对照品溶液, 按“供试品溶液的制备”项下进行处理并测定, 计算回收率, 平均回收率为防己诺林碱 99.12%, RSD 为 3.36%; 粉防己碱 101.55%, RSD 为 4.14%。

2.9 样品测定:取防己药材粉末各约 0.4 g, 精密称定, 按“供试品溶液的制备”项下进行处理并测定, 结果见表 1。

表 1 防己中粉防己碱和防己诺林碱的测定 ($n=3$)

Table 1 Determination of tetrandrine and fangchinoline in root of *S. tetrandrae* ($n=3$)

样品批号	粉防己碱/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	防己诺林碱/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	总计/%
04-1(10年生)	6.28	21.78	2.806
04-2(7年生)	7.21	12.93	2.014
04-3(6年生)	5.2	11.96	1.715
04-4(5年生)	5.3	9.94	1.614
04-5(3年生)	7.62	9.70	1.732

3 讨论

3.1 检测波长的选择:经岛津 SPD—M10AVP DAD 检测器分析, 样品 282 nm 处有吸收峰, 而 242 nm 处虽然吸光度值高, 但并不在吸收峰/谷处, 因此, 应选择在 282 nm 波长处来测定样品中防己诺林碱、粉防己碱的量。

3.2 在提取条件的筛选中, 分别采用了冷浸 10 h

后超声 1.5 h, 回流提取 3 h 和索式提取 6 h 的方法, 以峰面积为评价指标进行考察, 回流得率比超声的高, 且与索式提取相当, 由于回流方法相对简便, 所以选择了回流提取的方式。进一步试验不同回流时间(20、40、60、90 min), 发现回流时间对得率影响不大, 可选择 1.5 h 回流提取。

3.3 色谱柱的选择:试验中选择了依利特 Hypersil ODS2 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、VARIAN Microsorb-MV 100-5 C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、岛津 Shim-pack: Vp-ODS (250 mm $\times$ 4.6 mm) 色谱柱, 流动相采用乙腈-0.2% 磷酸(63:37, 三乙胺调 pH 至 8.0), 发现只有岛津色谱柱能在分析条件下使样品中粉防己碱峰体现出较好的对称性。所以采用岛津柱。

3.4 在流动相的筛选过程中发现, 如果流动相中没有三乙胺, 可见峰形的拖尾较严重, 其原因可能是粉防己碱中的碱性氮原子易与 C_{18} 色谱柱上未完全封尾的氢氧根产生的氢键结合, 使其难以洗脱, 造成拖尾。加入三乙胺后可取代粉防己碱与色谱柱中的氢氧根产生的氢键结合, 减少粉防己碱在色谱柱上的吸附, 使其易于洗脱, 从而改善色谱峰的形状。在本实验流动相筛选过程中曾用过二乙胺, 但其分离效果较三乙胺差。综上所述, 认为本方法简便、专属性强、灵敏度高且重现性好, 适用于粉防己碱的定量分析。

References

- [1] Li J P, Di L Z, Xu H. Determination of tetrandrine in Leifeng Liniment by double-wavelength TLC-scanning [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (5): 407.
- [2] Li Y Q, Chen L, Zhu J H. TLC-MS Determination of tetrahydropalmatine, tetrandrine and demethyltetrandrine in Tonglike Injection [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21 (1): 28-30.
- [3] Lou J S, Zhang C L. Pharmacokinetics of tetrandrine in rabbit *in vivo* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24 (1): 24.
- [4] Wang S Y, Wan L, Yan D. Extract and isolation of non-phenol alkaloid in *Radix Stephaniae Tetrandrae* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1998, 20 (10): 16-17.
- [5] Song X F, Yu J. Determination of tetrandrine and fangchinoline in Qingshenjianfei Tablets by RP-HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 27 (4): 405-407.
- [6] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话:(022)27474913 23006821

传真:23006821

联系人:陈常青